

Caso práctico-2. Ejemplo de cálculos y toma de decisiones en laboratorios de ensayo (LE):

NOTA1: El presente ejemplo es un supuesto y no corresponde necesariamente con un método actualmente en uso en rutina (se trata en realidad de un método multianálisis para la determinación simultánea de Ca y Mg basado en un modelo de regresión PLS).

NOTA2: Algunas decisiones tomadas en este ejemplo pueden ser debatibles (se muestran a modo de posible postura o sugerencia). En el caso de usar este ejemplo en el ámbito de la formación, el docente deberá ajustar el nivel de exigencia al grado de conocimientos del alumnado.

NOTA3: La resolución y demás aspectos (nomenclatura, criterios, test, etc.) se basan en el **Manual: 'Manual práctico de calidad en los laboratorios. Enfoque ISO 17025'** (S. Sagrado y col. Ediciones AENOR. Madrid 2005); www.uv.es/~sagrado
En caso necesario, puede citarse el mismo como referencia.

NOTA4: Este documento puede sufrir modificaciones que aparecerán como nuevas revisiones. Se agradecen comentarios, sugerencias y observaciones vía sagrado@uv.es

Un LEC que posee ISO 17025 para ensayos físico-químicos de aguas en las instalaciones permanentes del LEC, desea validar un método espectrofotométrico nuevo (método candidato) para determinar Ca 'in situ' en agua potable (los niveles de conc. en la región donde se va a aplicar oscilan entre 50-250 mg.l⁻¹) El LEC emplea como requisitos internos (E<20%, precisión entre-días <10%). El cliente exige una exactitud (E<10%) para este ensayo.

Datos del PEE (ensayo de campo): Termostatar un volumen suficiente de agua (in situ), pipetear un volumen de muestra (V=10 ml), añadir 2 ml del reactivo ABF05, medir en un espectrofotómetro portátil e interpolar en la curva de calibrado del método. Factor de dilución aplicado a la muestra 12/10.

Datos fabricante: MRC (Ca=200 ± 0.01 mg.l⁻¹), Calibración pipeta 10 ml (± 0.03 ml), Calibración pipeta 2 ml (± 0.06 ml)

Datos IUPAC: Pesos atómicos: No se emplean

Datos operativo: Oscilación de Temperatura, T, in situ (ensayo de campo) en un día (ΔT: ± 5°C)

Datos validación interna: Se determina el MRC durante 10 días (4 réplicas por día)

Datos control de calidad: Se desea evaluar el empleo de la disolución-MRC como muestra de control (control de calidad interno).

Anexo casop2.1: Muestra los resultados de validación obtenidos empleando una disolución patrón de Ca (MRC) y estadísticos asociados (EXCEL), gráficos cualitativos, test de Cochran y tabla ANOVA (STATGRAPHICS), así como gráficos preliminares de control de calidad (etapa de aprendizaje; STATGRAPHICS).

Cuestiones:

- a) El responsable de calidad de ensayos químicos del LEC esta realizando un curso de formación para analistas y les propone el cuestionario adjunto. Contestar al mismo justificando la **única** [opción] elegida

(NOTA: La justificación se basa en referencias al **Manual**)

- b) Rellenar el **registro de validación interna** adjunto para las características exactitud (veracidad) y precisión (justificar vía cálculo).

(Registro según **Anexo 6.2-hojas 2 y 3** y siguiendo los **criterios del Manual**)

Anexo casop2.1. Resultados de validación datos sobre una disolución patrón de Ca (MRC):

Datos de validación interna (Conc. Ca sin corregir la dilución de muestra por el factor 12/10)

Réplica	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Suma	Media	s
1	171	169	162	170	163	171	159	169	160	170	1688.0	168.8	5.5
2	179	181	170	179	159	170	180	160	165	167			
3	173	175	171	170	155	171	156	169	160	166			
4	179	180	172	179	162	170	180	160	171	159			
Media	175.5	176.3	168.8	174.5	159.8	170.5	168.8	164.5	164.0	165.5			
s	4.1	5.5	4.6	5.2	3.6	0.6	13.0	5.2	5.2	4.7	51.7	5.2	3.1
SEM	2.1	2.8	2.3	2.6	1.8	0.3	6.5	2.6	2.6	2.3	25.8	2.6	1.6
SEM ²	4.3	7.6	5.2	6.8	3.2	0.1	42.6	6.8	6.8	5.4	88.7	8.9	12.0
Rango	8	12	10	9	8	1	24	9	11	11	103.0	10.3	5.7

Gráficos cualitativos

Gráfico de IC_{95%} (10 vectores-serie x_j)

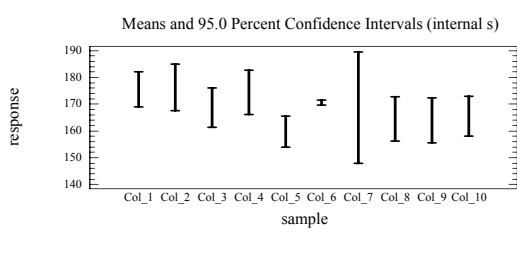
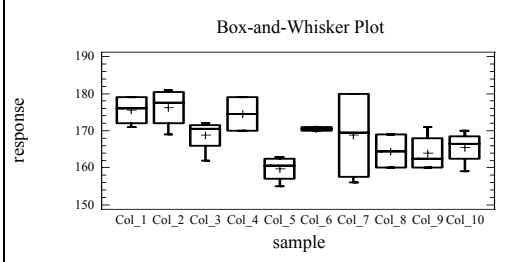


Gráfico de cajas (10 vectores-serie x_j)



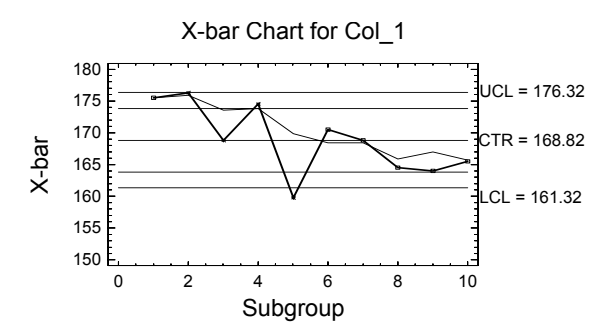
Test de Cochran (homocedástidad): Cochran's C test: 0.480028 P-Value = 0.00447902

Tabla ANOVA

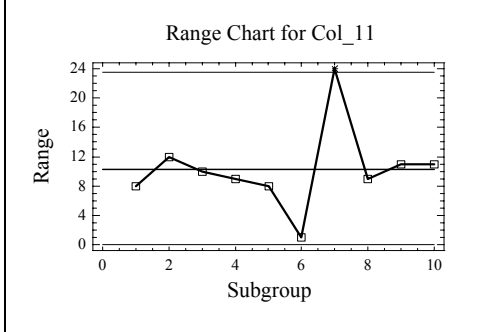
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
e-col.	1080.4	9	120.044	3.38	0.0056
i-col.	1064.0	30	35.4667		
Total (Corr.)	2144.4	39			

Gráficos preliminares de control de calidad (etapa de aprendizaje).

G.C. medias. Se incluyen medias móviles (m=4) (línea discontinua)



G.C. Rangos



Cuestionario-resuelto del Curso de formación interno impartido por el responsable de calidad de ensayos químicos del LEC a los analistas. Evaluación (según criterios del **Manual** empleado en el curso). 1 **[opción] correcta**.

Cuestiones / Justificación (referencias del Manual)	Respuesta correcta:
<p>1.- La norma ISO 17025 ... [es útil en el ámbito reglamentado, ej. FDA]; [sólo garantiza la gestión de calidad]; [sirve para un LC de preparación de MRs]; [es un documento interno del LEC]; [Todas]</p> <p>[no es útil en el ámbito reglamentado donde ENAC exige BPL (Tabla 1.4)]; [garantiza además competencia técnica para los ensayos (Tema 2.1 ó Tabla 1.5)]; [se considera un documento externo del LEC (Tabla 1.9)]</p>	<p>[sirve para un LC de preparación de MRs] (Tabla 1.6)</p>
<p>2.- Un LEC que posee ISO 17025 e ISO 14001, dispone respectivamente de ... [acreditación-ENAC y certificación-AENOR]; [certificación-AENOR]; [certificación-ENAC]; [homologación-ENAC]; [Ninguna]</p> <p>AENOR es una de las entidades de certificación que, entre otras, certifica ISO 14001. En la actualidad ENAC es la única entidad que acredita de ISO 17025. La homologación la proporcionan organismos oficiales (Tabla 2.1);</p>	<p>[acreditación-ENAC y certificación-AENOR] (Tabla 2.1)</p>
<p>3.- Se emplea ANOVA, sin comprobar homocedasticidad, para ... [aplicar el test de Grubbs]; [realizar el test de Cochran]; [detectar una <i>media</i> distinta a otras]; [cálculo de la <i>varianza conjunta</i>]; [Ninguna]</p> <p>[el test de Grubbs no emplea ANOVA (Anexo 3.8)]; [el test de Cochran no emplea ANOVA (Anexo 3.9)]; [para comparar <i>medias</i> vía ANOVA sus correspondientes <i>varianzas</i> deben ser homocedásticas (Anexo 3.9, nota a)]; [la <i>varianza conjunta</i>, bien se calcule o no vía ANOVA, requiere varianzas homocedásticas (Anexo 3.4)]</p>	<p>[Ninguna]</p>
<p>4.- La fortificación de muestra con analito es aplicable en... [validación de métodos]; [ensayos de aptitud]; [control de calidad]; [estimación de incertidumbres]; [Todas]</p> <p>[validación de métodos, ej. característica exactitud (Tabla 6.7) o (Anexos 6.7a,b)]; [ensayos de aptitud (Tabla 7.4)]; [control de calidad; para establecer LC se fortifican muestras sintéticas (Tabla 8.1)]; [es un caso de estimación de la incertidumbre del error estimado en el enfoque basado en datos de validación interna (Anexo 9.4)].</p>	<p>[Todas]</p>
<p>5.- El L.Alerta en control de calidad de un método... [se establece durante la 'etapa de control']; [se calcula a partir de LC y S]; [se emplea para validar el método]; [se usa en el G.C.SA]; [Ninguna]</p> <p>[se establece durante la 'etapa de aprendizaje (Tabla 8.1)']; [se emplea en gráficos de control de métodos validados (Anexo 8.1a), no durante la validación (Tema 6)]; [en el G.C.SA se emplea la máscara-V (Tabla 8.2)]</p>	<p>[se calcula a partir de LC y S] (Anexo 8.1a)</p>
<p>6.- El empleo de un MRC puede servir para... [justificar el empleo del algoritmo BLS en lugar de mínimos cuadrados]; [verificar métodos]; [calibrar equipos]; [Todas]; [Ninguna]</p> <p>[BLS es más consistente si las incertidumbres de la <i>conc.</i> y la señal son comparables (Tabla 4.4)]; [verificar métodos empleando MRC con analito (Tabla 9.6)]; [calibrar equipos empleando MRC sin analito (Tabla 9.6)]</p>	<p>[Todas]</p>
<p>7.- El LEC (del caso práctico 2) estimará la incertidumbre (U) basándose en... [enfoque componente a componente]; [datos de validación interna]; [datos de un estudio colaborativo]; [no se puede estimar U]; [Ninguna]</p> <p>[el enfoque componente a componente podría no contemplar fuentes de incertidumbre relacionadas con imprecisión o inexactitud (Capítulo 9.4)]; [no hay disponibles datos de estudio colaborativo (Tabla 9.9)]; [ISO 17025 exige tratar de realizar una estimación razonable de U (Tabla 9.2)]</p>	<p>[datos de validación interna] (Tabla 9.9)</p>

Responder en función de los resultados del **Anexo casop2.1**

8.- Los gráficos cualitativos en validación interna sugieren... (se confirmaría mediante el test de...) [1 dato individual (x_{ij}) anómalo... (Grubbs)]; [1 s^2 anómala ...(F)]; [1 s^2 anómala ...(Cochran)]; [normalidad en el vector de medias; ... (Rankit)]; [Todas]	
[los gráficos de caja no sugieren ningún x_{ij} anómalo (Cuadro Eje3.2.1)]; [IC o IQR del vector x_7 sugieren una s^2_7 anómala, sin embargo, el test-F se emplea para comparar 2 varianzas (Anexo 3.9)]; [los gráficos disponibles no permiten prever la normalidad en el vector medias, serían necesario criterios del tipo Rankit (Anexo 3.7)]	[1 s^2 anómala (Cochran)] Criterio ISO para comparar múltiples varianzas (Anexo 3.9)
9.- Los resultados del ANOVA indican que... [$s_r = 5.96$]; [$s_i = 7.52$]; [$r = 16.68$]; [no son fiables, pues se incumple la condición para aplicar ANOVA]; [Todas]	
[$s_r = (35.4467)^{1/2} = 5.9554$ (Anexo 6.8)]; [$s_{e-dias} = ((120.044 - 35.4667)/4)^{1/2} = 4.5983$; $s_i = (5.9554^2 + 4.5983^2)^{1/2} = 7.524$ (Anexo 6.8)]; [$r = 2.8 \cdot 5.9554 = 16.6751$ (Anexo 6.8)]; [p (test-Cochran) < 0.05 (Anexo 3.9)]; s^2 ; heterocedásticas. No es consistente aplicar ANOVA (Anexo 3.9 nota a)]	[Todas]
10.- Para el futuro control de calidad, y según los datos disponibles... [LC = 168.8; $S \sim 2.5$ (basado en rango; $d_2=2.08$); Criterio Statgraphics]; [el método esta fuera-de-control]; [MM sugiere deriva]; [L.Alerta o L.Acción no son fiables]; [Todas]	
[LC = $\mu(\text{exp.}) = 168.8$ (gran media(X)). Para el caso $N_r = 4$ (>1; subgrupos), $S = \text{media}(\text{rango}) / (d_2 N_r^{1/2}) = 2.47$ (Anexo 8.1a)]; [el método esta fuera-de-control: 2 puntos consecutivos > L.Alerta ó 1 punto > L.Acción (Tabla 8.2)]; [MM descendiendo sugieren deriva, sin influencia del error aleatorio, si bien hay dudas sobre si llegan a confirmarse 7 MM-consecutivas descendiendo (Tabla 8.2 nota c; Cuadro Eje8.2.2)]; [L.Alerta o L.Acción no son fiables pues el método no está bajo control con los datos actuales de la etapa de aprendizaje según el criterio empleado]	[Todas]
11.- La incertidumbre expandida, $U(\text{Conc. Ca})$, para $N_r = 2$ en las futuras muestras, utilizando $u_E = \sqrt{\left(\frac{0.01}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{5.5}{\sqrt{10}}\right)^2} = 1.7393 \sim 1.74, \text{ puede estimarse como ...}$ $\left[\sqrt{1.74^2 + 4.6^2 + \left(\frac{5.96}{\sqrt{2}}\right)^2} \right]; \quad \left[2 \times \sqrt{1.74^2 + 0^2 + \left(\frac{5.96}{\sqrt{2}}\right)^2} \right];$ $\left[2 \times \sqrt{0^2 + 4.6^2 + \left(\frac{5.96}{\sqrt{2}}\right)^2} \right]; \quad \left[2 \times \sqrt{1.74^2 + 4.6^2 + \left(\frac{5.96}{\sqrt{4}}\right)^2} \right]; \quad [\text{Ninguna}]$	
$u_E \sim 1.74$ es consistente con el Anexo 9.4 (caso ref. = MRC), empleando $u_{Ref} = u_{MRC} = 0.01/(3^{1/2})$; asumiendo incertidumbre tipo B y distribución rectangular (Anexo 9.2) y $u_{E,est} = s_1/\sqrt{N_r} = 5.5/(10^{1/2})$; empleando $s = 5.5$ asociada al promedio de las 10 medias; $S_{Cond} = S_{e-Factor} \sim 4.6$ y $s_r \sim 5.96$ ligada a N_r (en rutina) = 2, (Anexo 9.4). $k = 2$ (Anexo 9.2). NOTA adicional: Otras fuentes de incertidumbre estándar (ej. PF-IUPAC; volumen-T y calibración, etc.; Ejer.9.1) no se han considerado, si bien suelen ser despreciables frente a las fuentes consideradas aquí (ej. precisión intermedia o repetibilidad) y posiblemente se hallan englobadas en estas. Si otros factores como el operador o el equipo fueran a variarse en rutina, habría que considerarlos en la estimación de precisión intermedia, $S_{Cond} = S_{e-Factor}$ (Ejer.9.2).	[Ninguna] Con estos datos se podría estimar $U(\text{Res})$ (Anexo 9.4) como: $2 \times \sqrt{1.74^2 + 4.6^2 + \left(\frac{5.96}{\sqrt{2}}\right)^2}$

Modelo de registro de validación interna (Anexo 6.2) :

EMPRESA X	REGISTRO DE VALICIÓN INTERNA	Nº REGISTRO: Rev. 0 Hoja 2 de 4
VALIDACIÓN DE CARACTERÍSTICA DEL MÉTODO (debe ser consistente con los datos de la hoja 1)		
ALCANCE: (seleccionar) - nº analitos: <input checked="" type="checkbox"/> 1, <input type="checkbox"/> >1, <input type="checkbox"/> 1-especiado - nº matrices: <input checked="" type="checkbox"/> 1, <input type="checkbox"/> >1 - Intervalo (OM) ^a : <input type="checkbox"/> < ½, <input checked="" type="checkbox"/> > ½		REQUISITOS (que afectan a la característica a validar): <i>E</i> < 10% (cliente) <i>RSDi</i> < 10% (requisito interno)
CARACTERÍSTICA A VALIDAR (seleccionar)	Referencias (seleccionar)	Diseño experiencia (especificar)
<input checked="" type="checkbox"/> Exactitud Precisión <input checked="" type="checkbox"/> Repetibilidad, <i>s_r</i> <input checked="" type="checkbox"/> Precisión interm., <i>s_i</i> Factores: <input checked="" type="checkbox"/> Tiempo <input type="checkbox"/> Operario <input type="checkbox"/> Equipo <input type="checkbox"/> Identidad <input type="checkbox"/> <i>L_D</i> <input type="checkbox"/> <i>L_Q</i> Intervalo <input type="checkbox"/> de trabajo <input type="checkbox"/> lineal <input type="checkbox"/> Recuperación, <i>Rec</i> <input type="checkbox"/> Robustez	- Método de Referencia: <input type="checkbox"/> Primario <input type="checkbox"/> Oficial <input type="checkbox"/> Normalizado <input type="checkbox"/> Alternativo - Material <input type="checkbox"/> MR primario <input checked="" type="checkbox"/> MRC <input type="checkbox"/> MR <input type="checkbox"/> Patrón puro - Fortificar <input type="checkbox"/> Blanco de reactivos <input type="checkbox"/> Blanco analítico <input type="checkbox"/> Blanco de Muestra <input type="checkbox"/> Matriz sintética <input type="checkbox"/> Muestra	- <i>Nr</i> = - <i>Ns</i> = - <i>No</i> = - <i>Nv</i> = - <i>nc</i> - <i>Nf</i> = - <i>nf</i> 4 réplicas 10 días 1 (MRC) 1 (Conc. Ca) 1* 1 (tiempo e-col.) -
		* inconsistente con el alcance
DECLARACIÓN (seleccionar) <input type="checkbox"/> CARACTERÍSTICA VALIDADA <input type="checkbox"/> CARACTERÍSTICA NO VALIDADA <input checked="" type="checkbox"/> CARACTERÍSTICA VALIDADA con restricciones): Observaciones: Las características se han validado a un nivel de concentración (nc) alto (200 mg l⁻¹) dentro del alcance. No se esperan cambios con nc.		VºBº Fdo.

^a Orden de magnitud. $\log(250/50) = 0.7699$; $OM = 0 + 5/10^{(1+0)} = 0.5$ (Anexo 3.10A)

EMPRESA X	REGISTRO DE VALICIÓN INTERNA		Nº REGISTRO: Rev. 0 Hoja 3 de 4
VALIDACIÓN DE CARACTERÍSTICA DEL MÉTODO (debe ser consistente con los datos de las hojas 1 y 2)			
PROTOCOLO	DESARROLLO	COMENTARIOS	
Objetivos del estudio	Validar las características exactitud y precisión del método para el ensayo de campo del contenido Ca(II) en agua.	En las estimaciones de precisión se incluye el factor tiempo	
Organizar y caracterizar datos	<ul style="list-style-type: none"> - $X_{10 \times 4}$ (días x réplicas) - Escalares en hoja 2 del registro de validación 	Se calculan también vectores fila (10×1) de medias, SEM, SEM^2 y rangos, así como la suma, media y s de dichos vectores.	
Planteamiento	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Exploración de los 10 vectores-serie x_j 2.- Test de Cochran (múltiples s^2) 3.- ANOVA y estimación de s_r y s_i 4.- Trazabilidad al MRC aplicando el test-t (caso $\mu_1 \leftrightarrow \mu_0$) considerando la incertidumbre del MRC. 5.- Cálculo de RSD_i y $E(\%)$. Comparación con requisitos. Sopórtelo lógico: EXCEL y STATGRAPHICS 	<ul style="list-style-type: none"> - Se evalúa la influencia del factor día - Anexo 3.9 - Anexo 6.8 - μ_1 se estima como gran media(X), asociada a s_1 y Nr_1 del vector fila de 10 medias. Se aplica el test-t considerando $u_{MRC}: \mu_1 - \mu_0 \leq 2 u_E$ (Anexo 9.4-nota a) 	
Exploración de datos	- En el Anexo casop2.1 figuran los gráficos exploratorios (gráficos $IC_{95\%}$ y caja) asociados a cada vector x_j . Los resultados de la caja sugieren la ausencia de datos x_{ij} anómalos. En cuanto a x_j , IC_7 e IQR_7 y medianas son algo distintas al resto.	<ul style="list-style-type: none"> - No se realizan test de anómalos (Grubbs) a x_j aceptando el criterio gráfico de los gráficos de caja. - No se realizan test de normalidad debido a que Nr es bajo (se asume normalidad) - No se aplica el test de anómalos (Grubbs) al vector de medias; (se asume que medias forma parte de la variabilidad entre-días del método) - Resulta conveniente comprobar la posible heterocedasticidad asociada a s^2_7 	

EMPRESA X	REGISTRO DE VALICIÓN INTERNA		N° REGISTRO: Rev. 0 Hoja 4 de 4
VALIDACIÓN DE CARACTERÍSTICA DEL MÉTODO (debe ser consistente con los datos de las hojas 1 y 2)			
PROTOCOLO	DESARROLLO	COMENTARIOS	
Gráficos, estadísticos y test	<p>- En el Anexo casop2.1 se muestran los resultados del test de Cochran. Dado que $p < 0.05$, el test indica heterocedasticidad.</p> <p>- En el Anexo casop2.1 se muestran los resultados del ANOVA de X que permite estimar s en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia: $s_r = (35.4467)^{1/2} = 5.9554$ $s_{e-dias} = ((120.044 - 35.4667)/4)^{1/2} = 4.5983$ $s_i = (5.9554^2 + 4.5983^2)^{1/2} = 7.524$ (Anexo 6.8)</p> <p>- El test-t considerando u_{MRC} : $168.8 - 166.67 = 2.13 < 2 \cdot 1.74 = 3.48$</p> <p>- $RSDi = 100 \cdot 7.52/168.8 = 4.455\% < 10\%$</p> <p>- $E = 100 \cdot 2.13 / 166.67 = 1.278\% < 10\%$</p>	<p>- Se asume que el valor s^2_r forma parte de la variabilidad intra-día del método (no se elimina su información) NOTA: El resultado del test de Cochran, asociado a un valor anormalmente alto de s^2_r, implica un empleo inconsistente del ANOVA. La eliminación del vector x_7 reconduciría la consistencia estadística, conllevando la obtención de resultados de precisión más favorables para el método, pero quizás menos realistas. Provisionalmente se aceptan los resultados actuales</p> <p>- El criterio de aceptación se cumple, el método es trazable al MRC.</p> <p>- Precisión intermedia dentro del requisito interno</p> <p>- La exactitud está dentro del requisito del cliente</p>	
Informe Fdo. analista	<p>- Aceptando los resultados derivados del ANOVA y que la <i>gran media</i> (X) representa al valor central del método aplicado en rutina incluyendo la influencia del factor tiempo, sería correcto declarar las características precisión y exactitud validadas</p> <p><u>Comentario 1:</u> Los resultados del control de calidad (etapa de aprendizaje) confirman la discrepancia de los días-subgrupos 5 (G.C.Medias) y 7 (G.C.Rangos).</p> <p><u>Comentario 2:</u> En la evaluación de la exactitud se han seguido protocolos similares a los del Anexo 6.7a cuando el caso $OM = 0.5$, se ajusta más a protocolos del Anexo 6.7b).</p> <p><u>Comentario 3:</u> Las características exactitud y precisión se ha evaluado a 1 nc (200 mg.l⁻¹) mientras que el alcance del método incluye el intervalo 50-250 mg.l⁻¹. Ello podría generar una no conformidad en una posterior auditoría de acreditación o de revisión</p>	<p>- Los resultados para el día 5 (el más discrepante): $E = 100 \cdot (159.8 - 166.67)/166.67 = -4.12\%$ siguen dentro del requisito.</p> <p>- En los resultados (test) no se han tenido en cuenta consideraciones de error β</p> <p><u>Sugerencia 1 para el futuro control de calidad:</u> Dado que en estas condiciones el método no está bajo control, debería revisarse el valor de S al alza, considerando criterios más recientes y consistentes (Ver nota-Anexo 8.1a). Notar que la eventual eliminación del vector x_7 todavía disminuiría más el valor de S).</p> <p><u>Sugerencia 2:</u> Podría considerarse repetir la experiencia y, además de aumentar N_r (como sugieren Anexo 6.7b y Anexo 6.8), sería recomendable trabajar a otros nc dentro del alcance, en cuyo caso se podrían emplear técnicas de regresión para validar la exactitud (Anexo 6.7b)</p>	