



## GUIA PARA EL FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE ENSAYO DE AGUAS

### PARTE II

#### CRITERIOS PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ENSAYOS FÍSICO-QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS

## EQUIPO REDACTOR

### Coordinador:

Pedro Pablo Morillas Bravo

CANAL DE ISABEL II GESTIÓN

### Miembros activos:

Itziar Larumbe Hernández

AGUAS-AÑARBE

Lluís Vazquez Milá

AGUAS DE BARCELONA

Joan Boix Berna

AGUAS DE BARCELONA

Jesús Manuel Esteban Rodríguez

FCC AQUALIA

Javier Ruiz

DNOTA

Raúl Bermúdez

DNOTA

Estíbaliz Alda Tobar

C. DE AGUAS DE BILBAO

Consuelo Juan Rodríguez

EMASESA

Carina González Taboas

GAMASER

Begoña García Asensi

IPROMA

Marta Pedemonte

LAB. OLIVER-RODES

Paula Vaquero González

LABAQUA

Josepa Fabregas Serrà

C. DE AGUAS DE TARRAGONA

### Expertos en ensayos microbiológicos:

Belén Garlofré

AGUAS DE BARCELONA

Samuel Domínguez

DNOTA

Isabel Echarri

C. DE AGUAS DE BILBAO

Lucila Cuberos

EMASESA

Inmaculada Solís

IPROMA

Miriam Monedero

LAB. OLIVER-RODES

Agradecemos su colaboración al resto de expertos del resto de empresas participantes.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. OBJETO .....	6
3. SELECCIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO.....	6
4. VALIDACION DE METODOS Y ESTIMACION DE INCERTIDUMBRE.....	9
4.1. VALIDACIÓN EN ENSAYOS FISICO-QUIMICOS .....	9
4.1.1. SELECTIVIDAD .....	10
4.1.2. RANGO DE TRABAJO.....	10
4.1.3. LINEALIDAD.....	11
4.1.4. SENSIBILIDAD.....	13
4.1.5. LÍMITE DE DETECCIÓN (LD).....	13
4.1.6. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC).....	13
4.1.7. ROBUSTEZ .....	14
4.1.8. PRECISIÓN .....	16
4.1.9. SESGO (VERACIDAD DE LA MEDIDA).....	17
4.1.10. INCERTIDUMBRE .....	19
A) ESTIMACION DE LA COMPONENTE DE INCERTIDUMBRE DE REPRODUCIBILIDAD ( $u_R$ ).....	21
B) ESTIMACIÓN DE LA COMPONENTE DE LA INCERTIDUMBRE DEL SESGO ( $u_{\text{sesgo}}$ ).....	22
B.1) A partir de datos de material de referencia matricial.....	22
B.2) A partir de muestras adicionadas.....	24
B.3) A partir de datos de ejercicios de intercomparación .....	25
4.2. VALIDACIÓN EN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.....	28
4.2.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CUALITATIVOS .....	28
A) Límite de detección (LD) .....	29
B) Otros parámetros .....	31
4.2.2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CUANTITATIVOS .....	33
A) Precisión (REPRODUCIBILIDAD) .....	34
B) Recuperación.....	35
C) Incertidumbre .....	36
4.3. ASIGNACION DE LA INCERTIDUMBRE AL METODO .....	40
4.4. CRITERIOS GUIA PARA LA EXPRESIÓN DE RESULTADOS .....	41
A) PARÁMETROS FÍSICO – QUÍMICOS.....	41
B) PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS.....	42

5. REVISIÓN/VERIFICACIÓN DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO. OTRAS CONTRIBUCIONES .....	44
6. CONTROL DE LOS DATOS: VALIDACION DE APLICACIONES PROPIAS Y ADAPTACIONES DE APLICACIONES COMERCIALES .....	45
7. REFERENCIAS .....	46
8. ANEXOS .....	50

## 1. INTRODUCCIÓN

Este documento constituye la segunda parte de la Guía para el funcionamiento de los Laboratorios de Ensayos de Aguas, editada por la Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento (AEAS) a través de sus Comisiones Segunda y Quinta. En él, se tratan aspectos esenciales relacionados con las actividades de ensayo, fundamentales dentro de los Sistemas de Gestión de Calidad, como son la elaboración de los procedimientos de ensayo, la validación y estimación de incertidumbre así como el control y expresión de los datos obtenidos.

La elaboración de la documentación y, en particular, el desarrollo de los métodos de ensayo que el laboratorio utiliza para llevar a cabo el análisis de sus muestras son una parte fundamental de todo este proceso. Por otro lado, el laboratorio debe aplicar métodos que satisfagan los requerimientos del cliente y que sean apropiados para los ensayos que realiza; la validación constituye la forma de demostrar que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

En esta guía se proponen diversas pautas para la validación de los métodos de ensayo en determinaciones físicas, químicas y microbiológicas que permiten asegurar la idoneidad de los mismos, debiendo evaluarse parámetros como veracidad, precisión e incertidumbre de medida. En cualquier caso debe asumirse que la validación es siempre una ponderación entre costes, tiempos de ejecución, riesgos aceptables y capacidades técnicas disponibles.

Es necesario establecer pautas para la expresión de los resultados obtenidos en relación con la incertidumbre declarada de forma que se puedan tomar decisiones sobre el cumplimiento o no de especificaciones.

También debe asegurarse que los cálculos realizados en la aplicación de los métodos de ensayo, así como la transferencia de los resultados obtenidos, están sujetos a verificación. Por ello, deben validarse las aplicaciones informáticas desarrolladas por el laboratorio para obtener, procesar y registrar

los datos obtenidos en su actividad, con el objetivo de demostrar que son adecuadas al uso previsto.

## **2. OBJETO**

El objeto del presente documento es proponer una sistemática que permita llevar a cabo las actuaciones necesarias para la adecuada selección de métodos de ensayo, la validación de los mismos, la estimación de incertidumbre de medición, así como establecer pautas para la expresión de resultados de forma que se pueda garantizar el mantenimiento de la competencia técnica de los laboratorios.

No es objeto de este documento establecer directrices de obligado cumplimiento, pero sí aportar criterios homogéneos de funcionamiento basados en la experiencia, profesionalidad, coherencia y buena práctica de los laboratorios integrantes del Grupo de Trabajo, de tal forma que el mismo pueda ser un referente a tener en cuenta.

Los ejemplos incluidos en esta guía deben interpretarse como tal, ya que pueden existir otras alternativas igualmente válidas.

## **3. SELECCIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO**

Los documentos relacionados con los métodos de ensayo son procedimientos escritos, actualizados y aprobados que describen de forma específica las actividades de las que son objeto, para garantizar y asegurar que el personal que hace uso de ellos disponga de la información necesaria para proceder correctamente.

Los documentos o procedimientos utilizados por el laboratorio deben contemplar todas las actividades que éste realice, tanto de ensayo como de apoyo al mismo, como pueden ser la toma, manipulación, transporte y conservación de muestras, el uso y funcionamiento de equipos e instrumentos

de medición, la validación y la estimación de incertidumbre, el aseguramiento de la calidad de los ensayos, el análisis, evaluación y tratamiento de datos, etc. Su contenido debe ser tal que evite errores de interpretación y que permita la reconstrucción de las actividades de ensayo desarrolladas.

Los métodos de ensayo deben ser seleccionados de forma que satisfagan las especificaciones de los clientes, así como los requisitos reglamentarios vigentes que puedan ser de aplicación. En un laboratorio de ensayo de aguas, las opciones de las que se dispone son los métodos normalizados, los métodos basados en normas y los métodos desarrollados internamente por el propio laboratorio.

Los métodos normalizados se basan en normas internacionales, nacionales o documentos publicados por organismos de reconocido prestigio. Estos documentos suelen incorporar información que corrobora su validez técnica, lo que simplifica en gran medida los trabajos de puesta en marcha de métodos en un laboratorio ya que a éste le basta con demostrar su capacidad para llevarlo a cabo en esas condiciones.

Cuando el método normalizado no contempla todas las especificaciones para que se pueda llevar a cabo el ensayo, se debe completar con aquellos aspectos necesarios para su realización. En ese caso se trata de métodos basados en normas, y se debe confirmar y validar que las aportaciones incluidas mantienen el método de ensayo adecuado para el uso previsto.

Finalmente, en algunos casos particulares podría no disponerse de un método normalizado que tomar como referencia; en este caso el laboratorio debe definir y desarrollar su propio método. Antes de su uso en rutina, el laboratorio debe realizar las pruebas necesarias para confirmar que se adecúa al uso previsto y contempla todos los requerimientos que le son de aplicación, bien de los clientes o bien de carácter reglamentario.

En caso de que el laboratorio disponga de más de un procedimiento de ensayo para una misma determinación, deberá utilizar aquel que sea el adecuado para el uso previsto y deberá informar al cliente del método seleccionado. Si el

cliente especifica un método concreto, el laboratorio debe informar al cliente si dicho método no es adecuado.

En algún caso en ensayos microbiológicos el laboratorio tendrá la opción de implantar métodos alternativos, que han sido validados por comparación con un método ya normalizado (de referencia) y de acuerdo a un estándar aceptado<sup>(1,2,3)</sup>. Son generalmente reconocidos por la comunidad científica o bien por la administración pública, como equivalentes al método de referencia<sup>(4)</sup>. Para la adopción de este tipo de métodos, el laboratorio deberá realizar las pruebas que demuestren su correcta implantación en el mismo sentido que las indicadas para los métodos normalizados. El laboratorio deberá aportar documentación que evidencie la equivalencia respecto al método normalizado<sup>(1)</sup>.

En cuanto al contenido y estructura de los documentos donde se describen los métodos de ensayo, existen varias alternativas, siendo un contenido tipo el siguiente<sup>(5)</sup>:

1. Identificación apropiada
2. Alcance
3. Descripción del tipo de muestra a ensayar
4. Parámetros y rangos a determinar
5. Aparatos y equipos, incluyendo las especificaciones técnicas
6. Patrones y materiales de referencia necesarios
7. Condiciones ambientales requeridas y cualquier período de estabilización necesario
8. Descripción del procedimiento, incluyendo lo siguiente:
  - a. Colocación de marcas de identificación, transporte, almacenamiento y preparación de los objetos de ensayo
  - b. Verificaciones a realizar antes de comenzar el trabajo
  - c. Verificación del correcto funcionamiento de los equipos y, cuando proceda, calibración y ajuste de los equipos antes de utilizarlos
  - d. Método de registro de observaciones y resultados
  - e. Medidas de seguridad que tengan que adoptarse
9. Criterios o requisitos de aceptación/rechazo



10. Datos que deban registrarse y método de análisis y presentación

11. Incertidumbre o procedimiento para estimar la incertidumbre

#### **4. VALIDACION DE METODOS Y ESTIMACION DE INCERTIDUMBRE**

La validación de un método de ensayo constituye una de las actividades necesarias para garantizar la validez de los resultados de un laboratorio y es internacionalmente reconocida como criterio imprescindible para el establecimiento de un completo sistema de calidad. En general, la validación debe confirmar que el método se comporta de forma adecuada en todo el rango de concentraciones habituales y en las matrices de ensayo a analizar. Por tanto, es necesario especificar estas características antes de realizar la validación.

Este proceso comprende un conjunto de pruebas sistemáticas y programadas que tenga en cuenta todas las etapas del análisis de rutina, incluyendo preparación (extracción, pre-concentración, etc.) y cualquier tratamiento aplicado a las mismas que permita comprobar las características de medición en las que se basa el método de ensayo para el uso pretendido.

La amplitud del proceso de validación depende de varios factores, tales como la naturaleza del método (cualitativo o cuantitativo), la existencia de normas internacionales, el establecimiento de matrices equivalentes<sup>(6)</sup>, etc.

El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto<sup>(5)</sup>.

Finalmente, debe considerarse la revalidación del método a partir de datos de intercomparaciones, controles de calidad internos o externos, etc. en caso necesario.

##### **4.1. VALIDACIÓN EN ENSAYOS FISICO-QUIMICOS**

Los parámetros que pueden caracterizar la validación de un método de ensayo físico-químico son: selectividad, rango de trabajo, linealidad, sensibilidad, límite

de detección, límite de cuantificación, robustez, precisión, veracidad (sesgo) e incertidumbre. En función del método, el laboratorio deberá evaluar todos estos parámetros o bien una parte de ellos en su validación.

#### 4.1.1. SELECTIVIDAD

La selectividad es la capacidad de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones de prueba establecidas<sup>(6,7)</sup>. En algunos casos puede ser necesario efectuar estudios de selectividad/especificidad o confirmación de la identidad<sup>(9)</sup> para evaluar la existencia de interferencias <sup>(10)</sup> y deberán establecerse las medidas para su control.

Es imposible considerar todas las interferencias potenciales, por lo que es importante contemplar las referencias bibliográficas y el conocimiento previo del método con el fin de acotar el estudio. En el caso de métodos de análisis normalizados en los cuales se identifican los posibles interferentes, no es necesario que el laboratorio realice pruebas de selectividad <sup>(10)</sup>, si bien se tendrán que considerar las medidas propuestas para minimizar o tener bajo control las interferencias identificadas. En ausencia de referencias bibliográficas, el estudio de interferencias puede hacerse mediante el análisis de matriz con bajo contenido en analito y presencia de interferentes de forma natural o adicionados.

El método se considera selectivo siempre y cuando se cumplan los objetivos de recuperación y precisión prefijados.

#### 4.1.2. RANGO DE TRABAJO

Es el intervalo en el que el parámetro analítico puede ser determinado con una veracidad y precisión establecidas<sup>(10)</sup> y proporciona resultados con una incertidumbre aceptable <sup>(9)</sup>.

Los ensayos para establecer el rango de trabajo deben realizarse para diferentes niveles de concentración, incluyendo el límite de cuantificación del

método así como la concentración máxima definida. De manera general, el límite de cuantificación es específico para cada analito y cada matriz.

En el caso de límites superiores de concentración, para el análisis de aguas se considera aceptable aplicar diluciones sobre muestras, si bien deben cumplirse los criterios de calidad definidos.

#### 4.1.3. LINEALIDAD

La linealidad de un método indica la aptitud del mismo para obtener resultados proporcionales a la concentración del analito<sup>(10)</sup>.

La linealidad se establece generalmente analizando una serie de patrones que cubran el rango deseado de la calibración instrumental. En aguas, es habitual utilizar patrones preparados por el propio laboratorio directamente sobre agua para uso en análisis de laboratorio<sup>(11)</sup>.

*NOTA: Si existen interferencias debidas a la matriz que no pueden ser eliminadas o controladas, debe evaluarse la necesidad de emplear patrones de calibración preparados sobre matrices o utilizar el método de adiciones.*

Para el estudio de la linealidad, las normas técnicas recomiendan trabajar en un intervalo de 3 a 7 niveles de calibración<sup>(12)</sup>.

Estas mismas normas indican que un mayor número de niveles de calibración no influyen en una mejora significativa en la fiabilidad de los resultados.

Una primera forma intuitiva y sencilla de evaluar la linealidad es la **representación gráfica** (ver ejemplo del Anexo I, parte 1) de los datos de calibración y su correspondiente regresión, aunque este método aporta una información principalmente visual que puede ser incompleta. A partir de esta representación, se obtiene el **coeficiente de determinación ( $r^2$ )** (ver ejemplo del Anexo I, parte 2). Este coeficiente proporciona la correlación entre las variables concentración y señal analítica. Su valor se encuentra siempre comprendido entre 0 y 1, siendo 1 el valor de mejor correlación pero, dependiendo de la técnica analítica, es aceptable un valor mayor o igual a 0,98 en técnicas cromatográficas y mayor o igual a 0,99 en técnicas espectrofotométricas<sup>(13)</sup>.

Si bien, el coeficiente de determinación es una herramienta para determinar, de forma preliminar, la linealidad de la recta de regresión en su conjunto, no evalúa el grado de ajuste de cada uno de los puntos experimentales que intervienen, por lo que su empleo no es suficiente para establecer la linealidad de un método. Por lo tanto, es necesario completar dicho estudio con alguna de las siguientes opciones:

- A) **Análisis de residuales de regresión**<sup>(14)</sup>. El residual es, para cada nivel de concentración, la diferencia entre el valor obtenido una vez realizado el ajuste y el valor de referencia del patrón empleado. Estos valores se pueden representar en un gráfico donde la coordenada X es la concentración teórica e Y es la residual y se evalúan tal y como se indica en el ejemplo del Anexo I, parte 3.
- B) **Desviación del factor de respuesta** en todo el rango de trabajo ( $RSD_{fr}$ ). El factor de respuesta se define como el cociente entre la señal del instrumento para una concentración (habiendo restado la señal de la ordenada en el origen) y la propia concentración del analito. Sus valores deben ser aproximadamente constantes y, para comprobarlo, se calcula la desviación estándar de la serie formada por los factores de respuesta en todo el rango de trabajo. El valor de  $RSD_{fr}$  depende del método de ensayo, pudiendo variar desde un 10% (métodos espectrofotométricos) hasta un 25% (métodos cromatográficos)<sup>(12)</sup> (ver ejemplo del Anexo I, parte 1, parte 4).

Aunque es recomendable trabajar en intervalos lineales, cuando las condiciones instrumentales no lo permitan o sea necesario trabajar en un intervalo más amplio para evitar diluciones sistemáticas, se podrá recurrir a una función matemática no lineal que permita establecer la relación entre concentración y señal analítica. En cualquier caso, se deben establecer criterios de aceptación que aseguren la conveniencia y bondad de este tipo de ajuste<sup>(15)</sup>.

En todos los casos (lineales y no lineales), se deberían establecer controles que garanticen el mantenimiento de la respuesta y la obtención de resultados con la precisión y veracidad requeridas<sup>(15,16)</sup>.

#### 4.1.4. SENSIBILIDAD

La sensibilidad de un método analítico se corresponde con el cociente entre el cambio en la respuesta de un instrumento y el cambio correspondiente en el estímulo, generalmente concentración de analito<sup>(17)</sup>.

En sistemas instrumentales, la sensibilidad está representada por la pendiente de la recta de calibración que puede ser determinada mediante procedimiento de ajuste por mínimos cuadrados<sup>(7)</sup>.

Los ensayos de validación pueden servir para establecer un valor de sensibilidad de referencia que podrá verificarse a lo largo del tiempo en los ensayos de rutina, considerando un nivel de variabilidad aceptable y predefinida<sup>(7)</sup>. En el *Anexo II* se muestra un ejemplo al respecto.

#### 4.1.5. LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)

En términos generales, el límite de detección es la menor cantidad o concentración de un analito que puede detectarse de manera fiable o diferenciada por un método específico<sup>(7)</sup>.

Este parámetro debe estimarse para los ensayos cualitativos y la bibliografía propone distintas opciones, resumidas en la tabla I.

#### 4.1.6. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)

El límite de cuantificación corresponde al nivel mínimo de concentración establecido en el proceso de validación desarrollado para una matriz determinada en el que se cumplen los valores objetivos de veracidad y precisión, o incertidumbre. Estos valores suelen ser superiores a los obtenidos en el resto del rango de medida y pueden diferir de los establecidos en textos legales para otros niveles diferentes de concentración<sup>(18,19)</sup>.

Este parámetro debe estimarse para los ensayos cuantitativos y la bibliografía propone distintas opciones, resumidas en la tabla I. En cualquier caso, el laboratorio deberá comprobarlo experimentalmente en sus matrices de ensayo.

#### 4.1.7. ROBUSTEZ

Es la medida de la capacidad de permanecer inalterado frente cambios en las condiciones experimentales tales como tiempo de conservación de los reactivos, pH, temperatura, etc. que pueden afectar a los resultados de un mismo método aplicado en diferentes condiciones<sup>(7)</sup>.

En el caso que el laboratorio utilice métodos no basados en norma o bibliografía de referencia, se recomienda que investigue y documente si variaciones en las condiciones de medida pueden provocar cambios significativos en los resultados obtenidos. Deberían identificarse y controlarse las posibles fuentes de variación e incluirse en el estudio de valores de precisión y veracidad desarrollado durante la validación del método. Estos estudios pueden ser llevados a cabo sobre blancos, muestras dopadas con concentración conocida, materiales de referencia, ejercicios de intercomparación, etc.

Tabla I: Métodos de estimación del límite de detección y del límite de cuantificación

REFERENCIA	LÍMITE DE DETECCIÓN	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN
IUPAC THOMPSON	$LD = 3 \cdot S_0$ donde $S_0$ es la desviación típica de la media de 6 determinaciones completas e independientes sobre una muestra natural con baja concentración de analito	También lo denomina límite de determinación. No considera adecuado establecerlo como un múltiplo fijo del límite de detección (típicamente 2). No se recomienda aquí el uso de este tipo de límite en la validación. Prefiere establecer una concentración a partir de la cual la incertidumbre es aceptada y convenida entre el laboratorio y el cliente
PS 15	$LD = \bar{x} + 3 \cdot S_0$ donde $\bar{x}$ es la media de una serie de determinaciones sobre un blanco de muestra y $S_0$ es la desviación típica de la media	$LC = \bar{x} + 10 \cdot S_0$ donde $S_0$ es la desviación típica de la media de 6 determinaciones completas e independientes sobre un blanco de muestra O bien a partir del límite de detección: $LC = 3 \cdot LD$
NATA	$LD = \frac{3 \cdot S_b}{m}$ Donde $S_b$ es la desviación típica del valor de la ordenada de la recta obtenida por regresión lineal, y $m$ su pendiente.	Si $b > 0$ : $LC = \frac{10 \cdot S_b}{m}$ Donde $S_b$ es la desviación típica del valor de la ordenada de la recta obtenida por regresión lineal, y $m$ su pendiente.  Si $b < 0$ : $LC = \frac{(-b + 10 \cdot S_b)}{m}$
RD 140/2003	$LD = 5 \cdot S_0$ donde $S_0$ es la desviación típica relativa de la media de una serie de determinaciones sobre un blanco de muestra.  También es: $LD = 3 \cdot S_1$ donde $S_1$ es la desviación típica relativa dentro de un lote de una muestra natural que contenga baja concentración del parámetro	No define LC

#### 4.1.8. PRECISIÓN

Es el grado de concordancia entre los valores obtenidos por medidas repetidas en la misma muestra o similares en condiciones determinadas de repetibilidad y reproducibilidad <sup>(17)</sup>. La medida de la precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se determina como desviación estándar del conjunto de los resultados obtenidos. A menor precisión, mayor desviación estándar. Se relaciona con errores aleatorios.

En los estudios de validación, la precisión debe evaluarse en condiciones de reproducibilidad, es decir, variando en lo posible los equipos, los analistas u operadores, las condiciones ambientales, las muestras, etc. El laboratorio deberá tener en cuenta si debe realizar además un estudio de precisión en condiciones de repetibilidad, es decir, mismo procedimiento de medición, mismos operadores, mismo sistema de medida, mismas condiciones de operación y mismo lugar en un corto periodo de tiempo<sup>(20)</sup>.

La desviación estándar de reproducibilidad ( $S_R$ ) debe calcularse sobre, al menos, 7 grados de libertad<sup>(10)</sup>. Se puede expresar como un coeficiente de variación o desviación estándar relativa.

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$S_R(\%) = (S_R / \bar{x}) * 100$$

La desviación estándar de repetibilidad ( $S_r$ ) se calcula del mismo modo que la desviación estándar de reproducibilidad ( $S_R$ ). Se puede expresar como un coeficiente de variación o desviación estándar relativa.

En caso que se hayan determinado ambas, se obtiene una precisión combinada equivalente a:

$$S_t = \sqrt{\frac{S_r^2}{n} + S_R^2}$$



La determinación de la precisión debe realizarse en el rango de trabajo a varios niveles de concentración, incluyendo el límite de cuantificación y el nivel superior de concentración. Es importante que las condiciones de medida para el estudio de la precisión sean representativas de las condiciones reales en las que se va a aplicar el ensayo. Para el cálculo de la precisión se podrán emplear entre otros los valores obtenidos mediante el uso de material de referencia certificado, ejercicios de intercomparación y muestras reales (fortificadas o no).

A partir de los valores obtenidos en el estudio de precisión, se podrán establecer los límites de reproducibilidad y repetibilidad de utilidad para el control de calidad interno del laboratorio <sup>(6,21)</sup>:

$$\text{LIMITE REPRODUCIBILIDAD: } R = 2,8 \cdot s_R$$

$$\text{LIMITE REPETIBILIDAD: } r = 2,8 \cdot s_r$$

En el *Anexo III* a este documento se incluye un ejemplo de cálculo para un ensayo realizado sobre matriz de agua de consumo.

#### 4.1.9. SESGO (VERACIDAD DE LA MEDIDA)

El sesgo describe la diferencia que existe entre el valor medio de un número infinito de medidas repetidas y el valor de referencia asignado a la misma. El sesgo se relaciona con errores sistemáticos y guarda una relación inversa con la veracidad del método <sup>(10,17)</sup>

Se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\text{sesgo (b)} = \bar{V} - V_{\text{ref}}$$

$$\text{sesgo (b \%)} = \frac{\bar{V} - V_{\text{ref}}}{V_{\text{ref}}} * 100$$

*NOTA:* Algunos textos legales (Directiva y su transposición y R.D.140/2003) incluyen como criterio de calidad del método el parámetro exactitud pero está definido como la diferencia entre el valor obtenido de la media de una serie de réplicas y el valor exacto de un material de referencia. Esta definición concuerda con la de sesgo según los documentos internacionales de referencia empleados para la elaboración de la presente guía <sup>(17, 20, 22)</sup>.

El sesgo se puede determinar empleando alguno de los siguientes métodos:

- Empleo de materiales de referencia certificados y preferiblemente sobre materiales de referencia certificados matriciales.
- Comparación del método con un método de referencia con error conocido.
- Participación en ejercicios de intercomparación
- Empleo de muestras fortificadas con patrones trazables. En este caso, el sesgo se calcula a partir de la recuperación <sup>(7)</sup>

La recuperación (**R**) se calcula como:

$$R(\%) = \frac{C1 - C2}{C3} * 100$$

Siendo:

- o C1: concentración medida en muestra fortificada
- o C2: concentración medida en muestra sin fortificar
- o C3: concentración de la fortificación realizada

En el estudio de la recuperación en el límite de cuantificación, se recomienda el uso de matrices donde el valor de concentración de la muestra sin fortificar (C2) sea inferior al límite de detección, de modo que C2 puede considerarse 'cero'. Si no es así, puede recurrirse a diluciones máximas sin eliminar el efecto matriz (ej.: 30% del valor obtenido) o mezcla de matrices. De forma general, la concentración mínima de la fortificación (C3) debe ser de 1 a 5 veces el valor de concentración del analito de fondo de la muestra <sup>(12)</sup>.

En cualquier caso, la fortificación mínima debe ser tal que no se produzca solapamiento en los intervalos de confianza de los valores de C1 y C2.

Con objeto de contemplar la variación entre series, el sesgo se debe determinar en condiciones de reproducibilidad y en todo el rango de trabajo incluyendo, al menos, el límite de cuantificación y el nivel superior de concentración.

El sesgo se puede calcular como una media de las desviaciones obtenidas respecto a un valor de referencia en, al menos, 6 grados de libertad <sup>(10)</sup>.

Los resultados analíticos obtenidos en la rutina diaria podrían, en principio, ser corregidos partiendo de los datos de recuperación obtenidos. Sin embargo, existen ciertas limitaciones para aplicar esta corrección <sup>(23)</sup>.

En el *Anexo IV* a este documento se incluye un ejemplo de cálculo para un ensayo realizado sobre una matriz de agua de consumo y otra matriz de agua residual.

#### 4.1.10. INCERTIDUMBRE

Se define incertidumbre de medida como el parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a la magnitud que se desea medir, a partir de la contribución de las componentes consideradas <sup>(17)</sup>.

La incertidumbre proporciona una idea de la calidad del resultado ya que muestra un intervalo alrededor del valor estimado dentro del cual se encuentra el valor considerado verdadero con una probabilidad determinada y permite comparar resultados obtenidos por varios laboratorios o con diferentes metodologías analíticas <sup>(24)</sup>.

Para su cálculo se deben tener en cuenta dos componentes: la componente sistemática (**a**) y la componente aleatoria (**b**), que se suman cuadráticamente, obteniéndose la incertidumbre combinada (**u<sub>c</sub>**), mediante la siguiente fórmula:

$$u_c = \sqrt{u_a^2 + u_b^2}$$

Finalmente, el cálculo de la incertidumbre expandida **U**, proporciona el intervalo en el que se espera encontrar el valor verdadero con una determinada probabilidad. Esta incertidumbre se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada (**u<sub>c</sub>**) por un factor de cobertura (**k**).

$$U = k u_c$$

Normalmente, se utiliza el valor de  $k=2$ , que implica una probabilidad del 95% de contener el valor verdadero, asumiendo una distribución normal <sup>(17)</sup>.

Dado que el valor de incertidumbre obtenido puede variar significativamente dependiendo de la matriz o del rango de concentración, la estimación debe hacerse en las distintas matrices a las que aplica el método y en distintos rangos debiéndose incluir el nivel del límite de cuantificación.

La incertidumbre de medida puede ser estimada por diferentes procedimientos. Su elección dependerá fundamentalmente de la información experimental y bibliográfica disponible. Los más utilizados son:

- a) Estimación por componentes
- b) Estimación con datos experimentales de validación, control de calidad o ejercicios de intercomparación

Actualmente, éste último es el más utilizado en los laboratorios ya que las principales fuentes de variabilidad son evaluadas en el estudio de validación del método y durante el proceso del control de calidad.

La combinación de las componentes de incertidumbre debidas a la veracidad del método (error sistemático) y a la reproducibilidad (error aleatorio) puede dar una aproximación aceptable en la estimación de la incertidumbre de un método analítico<sup>(20)</sup>.

Es importante tener en cuenta que para evaluar la componente aleatoria, los ensayos de validación deben ser diseñados de forma que se hayan tenido en cuenta las fuentes de variabilidad más significativas (condiciones de ensayo, efectos de la matriz, variabilidad instrumental, etc.) a partir de un número de datos suficientemente representativo.

El cálculo de la incertidumbre combinada se realizará de la siguiente forma:

$$u_c = \sqrt{u_R^2 + u_{\text{sesgo}}^2}$$

donde:

$u_c$  Incertidumbre combinada

$u_R$  Incertidumbre típica de reproducibilidad dentro del laboratorio

$u_{\text{sesgo}}$  Incertidumbre típica del sesgo

Para realizar la suma cuadrática, todas las componentes deben estar en términos absolutos, en cuyo caso,  $u_c$  también lo estaría, o en términos relativos (%), en cuyo caso, la  $u_c$  estaría también expresada en %. En ningún caso, se deberá transformar a valores relativos una incertidumbre combinada calculada en términos absolutos.

Finalmente, se calculará la incertidumbre expandida:

$$U = k * u_c$$

donde:

U Incertidumbre expandida

k factor de cobertura (normalmente,  $k=2$  para una probabilidad del 95%)

$u_c$  Incertidumbre combinada

#### A) ESTIMACION DE LA COMPONENTE DE INCERTIDUMBRE DE REPRODUCIBILIDAD ( $u_R$ )

Si la reproducibilidad dentro del laboratorio tiene en cuenta todas las posibles fuentes de contribuciones a la incertidumbre, su desviación estándar para una matriz o matrices equivalentes <sup>(6)</sup> y una concentración determinada establecerá la componente de reproducibilidad de la incertidumbre.

La estimación de la incertidumbre de reproducibilidad ( $u_R$ ) puede ser obtenida mediante la utilización de materiales de referencia o de ejercicios de intercomparación.

El valor de la incertidumbre típica de reproducibilidad ( $u_R$ ) puede asociarse a la dispersión ( $S_R$ ) de los 'n' resultados obtenidos en la medida de una muestra, es decir:

$$u_R = S_R = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

donde:

$x_i$  cada uno de los resultados obtenidos

$\bar{x}$  valor medio de los resultados obtenidos

n número de mediciones realizadas en condiciones de reproducibilidad

En el caso de expresar  $u_R$  en términos relativos:

$$u_R(\%) = \frac{u_R}{\bar{x}} * 100$$

*NOTA:* Cuando el laboratorio no tiene acceso a muestras de control estables o los datos de validación o control de calidad no se han obtenido en la misma matriz que las muestras de rutina y se utilizan soluciones estándar, se debe calcular una componente adicional de incertidumbre para considerar el efecto matriz. Esta componente adicional se puede estimar a partir de gráficos de recorridos derivados de actividades de control interno del laboratorio, obtenidos con muestras naturales<sup>(20)</sup>.

## B) ESTIMACIÓN DE LA COMPONENTE DE LA INCERTIDUMBRE DEL SESGO

$(u_{\text{sesgo}})$

La componente de la incertidumbre del sesgo es la correspondiente a los errores sistemáticos y se puede calcular teniendo en cuenta dos componentes:

- Sesgo (**sesgo**)
- Incertidumbre del valor de referencia ( $u_{MR}$ )

La estimación de la incertidumbre del sesgo ( $u_{\text{sesgo}}$ ) puede ser obtenida mediante la utilización de materiales de referencia, de pruebas de recuperación o de ejercicios de intercomparación. A continuación se expone cada uno de estos casos.

### B.1) A partir de datos de material de referencia matricial

Para cada uno de los materiales de referencia empleados, la estimación de esta componente será <sup>(21)</sup>:

$$u_{\text{sesgo}} = \sqrt{u_{MR}^2 + \left(\frac{SV_{\text{media}}}{\sqrt{n}}\right)^2 + b^2}$$

donde:

$u_{MR}$  incertidumbre típica del material de referencia

$S_{V_{media}}$	desviación estándar de las mediciones realizadas sobre el material de referencia
$n$	número de repeticiones realizadas
$b$	valor numérico del sesgo ( $V_{media} - V_{ref}$ )

Para el cálculo de  $u_{MR}$  se pueden dar generalmente dos situaciones:

- El certificado del material de referencia expresa límites indicando el nivel de confianza, del tipo  $x_{MR} \pm U$  con un intervalo de confianza del 95% ( $k=2$ ). Este caso describe una distribución de tipo normal y su incertidumbre típica se calcularía como  $U/k$ .
- El certificado expresa límites pero sin especificar el nivel de confianza. En este caso, la distribución se puede considerar de tipo rectangular y la incertidumbre típica se calcularía como  $U/\sqrt{3}$ .

Para diferentes matrices (equivalentes) y/o diferentes concentraciones, debe realizarse el cálculo para cada una de ellas. Hay que tener en cuenta que si las diferencias en veracidad o incertidumbre son significativas para los diferentes materiales de referencia empleados, bien sea por concentración o matriz, es necesario estimar la incertidumbre separadamente para cada uno de ellos <sup>(20)</sup>.

En caso de no detectarse diferencias significativas en los valores obtenidos por el método anterior, podría realizarse también una estimación mediante el uso de la media cuadrática de los valores:

$$u_{sesgo} = \sqrt{\bar{u}_{MR}^2 + MC_{sesgo}^2}$$

donde:

- $\bar{u}_{MR}$  media aritmética de las incertidumbres típicas de los materiales de referencia utilizados
- $MC_{sesgo} = \sqrt{\frac{\sum(b_i)^2}{n_{MR}}}$  media cuadrática de los sesgos individuales
- $b_i$  sesgo de cada uno de los materiales de referencia empleados
- $n_{MR}$  nº de materiales de referencia utilizados en el cálculo

*NOTA:* Si los materiales de referencia tienen distintos valores de concentración, se recomienda trabajar en términos relativos.

En el Anexo V se muestra un ejemplo al respecto con un material de referencia.

## B.2) A partir de muestras adicionadas

La estimación de la componente de la incertidumbre de sesgo puede hacerse a partir de recuperaciones de adiciones conocidas en matrices reales<sup>(8)</sup> y estimando la recuperación del analito añadido.

En este caso, habría que añadir a la componente de incertidumbre de sesgo de la recuperación, la componente de la incertidumbre de la concentración del analito añadido<sup>(20)</sup>.

$$u_{sesgo} = \sqrt{MC_{sesgo}^2 + u_{ad}^2}$$

Donde:

- $MC_{sesgo} = \sqrt{\frac{\sum(b_i)^2}{n_{ad}}}$  media cuadrática de los sesgos de las adiciones realizadas ( $n_{ad}$  número de adiciones realizadas)
- $u_{ad}$  Incertidumbre estándar de la adición realizada (sus componentes varían en función de la naturaleza del material adicionado; ejm. material volumétrico)

La estimación de esta componente puede obtenerse estimando por separado la incertidumbre debida a la concentración del material de referencia y la debida al volumen añadido<sup>(20)</sup>.

En el Anexo VI y Anexo VII, se incluye el desarrollo de estos conceptos y un ejemplo de aplicación.



### B.3) A partir de datos de ejercicios de intercomparación

También se puede estimar la componente de la incertidumbre debida al sesgo mediante la utilización de resultados de ejercicios de intercomparación. En este caso, los datos deben ser tratados en valores relativos (%).

Al menos, se deben tener seis resultados de muestras diferentes<sup>(20)</sup> correspondientes a una o varias rondas de ejercicios de intercomparación.

La estimación de la componente de la incertidumbre se realiza de forma similar a la utilizada con material de referencia. Sin embargo, el resultado de incertidumbre debida al sesgo obtenido a partir de intercomparaciones puede ser mayor que a partir de material de referencia, debido a que el valor certificado del material de referencia está normalmente mejor definido que el valor conocido o consenso en los ejercicios de intercomparación.

La fórmula a utilizar es:

$$u_{\text{sesgo}} = \sqrt{MC_{\text{sesgo}}^2 + (\bar{u}_{\text{cref}})^2}$$

donde:

$$MC_{\text{sesgo}} = \sqrt{\frac{\sum (b_i)^2}{N_{\text{int}}}}$$

media cuadrática de los sesgos obtenidos en las intercomparaciones

$b_i$  sesgo individual para cada uno de los ejercicios de intercomparación, es decir, diferencia relativa entre el valor asignado y el obtenido por el laboratorio

$N_{\text{int}}$  número de ejercicios de intercomparación

$\bar{u}_{\text{cref}}$  media de los valores de la incertidumbre relativa de los valores asignados calculada como

$$\bar{u}_{\text{cref}} = \frac{\sum u_{\text{crefi}}}{N_{\text{int}}}$$

$u_{\text{crefi}}$  incertidumbre relativa del valor asignado para cada muestra de intercomparación

$N_{int}$  número de ejercicios de intercomparaciones

*Nota: En algunos casos,  $\bar{u}_{cref}$  es demasiado alta y no es válida para estimar  $u_{sesgo}$ .*

Si las diferencias individuales ( $b_i$ ) y las incertidumbres del valor asignado ( $u_{crefi}$ ) varían significativamente entre las diferentes intercomparaciones, puede ser necesario realizar la estimación de la incertidumbre de forma separada para cada caso.

La contribución debida a la incertidumbre de valor asignado ( $u_{crefi}$ ) se puede obtener<sup>(20)</sup>:

- a) Directamente del organizador del ejercicio de intercomparación
- b) Si se usa la mediana o media robusta para calcular el valor asignado:

$$u_{crefi} = 1,25 \times \frac{S_{R,i}}{\sqrt{n_{p,i}}}$$

- c) Si se usa la media aritmética como valor asignado:

$$u_{crefi} = \frac{S_{R,i}}{\sqrt{n_{p,i}}}$$

$u_{crefi}$  Incertidumbre relativa del valor asignado a la muestra del ejercicio de intercomparación  $i$

$S_{R,i}$  Desviación estándar relativa de reproducibilidad del ejercicio de intercomparación  $i$

$n_{p,i}$  Número de participantes en el ejercicio de intercomparación  $i$

En el *Anexo VIII* se muestra un ejemplo a partir de resultados de ejercicios de intercomparación.

Como resumen de las formas de cálculo de incertidumbre, se adjunta la siguiente tabla:

<p><b>Incertidumbre Expandida:</b> <math>U = k * u_c</math> (K: factor de cobertura, normalmente K=2 para una probabilidad del 95%)</p>	
<p><b>Incertidumbre Combinada:</b> <math>u_c = \sqrt{u_R^2 + u_{sesgo}^2}</math>      <math>u_R</math>: Incertidumbre típica de reproducibilidad dentro del laboratorio  <math>u_{sesgo}</math>: Incertidumbre típica de veracidad o sesgo</p>	
<p>Nota: Siempre que se quiera expresar la Incertidumbre expandida en %, se deberán pasar todas las componentes a valor relativo antes de realizar la suma cuadrática.</p>	
<p><b>A. Componente de Reproducibilidad</b></p>	<p><b>B. Componente de Sesgo</b></p>
<p>Si se utilizan muestras reales o MR matricial:</p> $u_R = S_R = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$ <p><math>S_R</math>: desviación estándar de los 'n' resultados obtenidos en la medida de una muestra  <math>x_i</math>: cada uno de los resultados obtenidos  <math>\bar{x}</math>: valor medio de los resultados obtenidos  <math>n</math>: n° de iteraciones realizadas en condiciones de reproducibilidad</p> <p>Nota: <math>S_R</math> Puede obtenerse también a partir de datos de control de calidad. Utilizando Límite de control (LC) a 95% de confianza</p> $LC = 2 S_R$	<p>Se puede obtener:</p> <p><b>B1) A partir de datos de material de referencia matricial:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Con un material de referencia:             <math display="block">u_{sesgo} = \sqrt{u_{MR}^2 + \left(\frac{s_{\bar{y}}}{\sqrt{n}}\right)^2 + b^2}</math> <p><math>u_{MR}</math>: incertidumbre típica del material de referencia.  <math>s_{\bar{y}}</math>: desviación estándar de las mediciones realizadas del material de referencia en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio  <math>b</math>: valor numérico del sesgo (diferencia entre la media de los valores obtenidos y el valor de referencia)  <math>n</math>: n° de repeticiones realizadas</p> </li> <li>Con distintos materiales de referencia: <math>u_{sesgo} = \sqrt{\bar{u}_{MR}^2 + MC_{sesgo}^2}</math> <p><math>\bar{u}_{MR}</math>: media aritmética de las incertidumbres típicas de los materiales de referencia utilizados  <math>MC_{sesgo} = \sqrt{\frac{\sum(sesgo_i)^2}{n_{MR}}}</math>: media cuadrática de los sesgos individuales  <math>sesgo_i</math>: sesgo de cada uno de los materiales de referencia empleados  <math>n_{MR}</math>: n° de materiales de referencia utilizados en el cálculo</p> </li> </ul> <p><b>B2) A partir de muestras adicionadas:</b></p> $u_{sesgo} = \sqrt{MC_{sesgo}^2 + u_{ad}^2}$ <p><math>MC_{sesgo} = \sqrt{\frac{\sum(sesgo_i)^2}{n_{ad}}}</math>: media cuadrática de los sesgos de las adiciones realizadas  <math>n_{ad}</math>: n° de adiciones realizadas  <math>u_{ad}</math>: incertidumbre típica de la adición realizada (ISO 11352-2012, apdo. 8.3.4)</p> <p><b>B3) A partir de datos de interlaboratorios (Utilizar siempre datos en %):</b></p> $u_{sesgo} = \sqrt{MC_{sesgo}^2 + (\bar{u}_{crefi})^2}$ <p><math>\bar{u}_{crefi} = \frac{\sum u_{crefi}}{N_{int}}</math> media de los valores de la incertidumbre de los valores asignados  <math>u_{crefi}</math>: incertidumbre del valor asignado de cada interlaboratorio (ver 6.1.10, B3)  <math>N_{int}</math>: n° de interlaboratorios  <math>MC_{sesgo} = \sqrt{\frac{\sum(sesgo_i)^2}{N_{int}}}</math>, media cuadrática de los sesgos obtenidos en los interlaboratorios  <math>sesgo_i</math>: sesgo obtenido en cada interlaboratorio  <math>N_{int}</math>: n° de interlaboratorios</p>

## 4.2. VALIDACIÓN EN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

Al igual que en los ensayos físico-químicos, la validación de los ensayos microbiológicos debe intentar reproducir las condiciones reales de los mismos. Esto puede conseguirse utilizando muestras naturales o, en su defecto, muestras inoculadas preferiblemente no esterilizadas para que exista microbiota interferente, con un nivel conocido de microorganismos diana. El laboratorio debe tener en cuenta que la inoculación de una matriz con microorganismos diana sólo simula la presencia de éstos de forma natural. No obstante, a menudo es la mejor y la única solución disponible.

Una particularidad a tener en cuenta en este tipo de ensayos consiste en la dificultad de disponer de valores de referencia estables, lo que condiciona el desarrollo del proceso de validación en comparación con los ensayos físico-químicos.

En función de la respuesta obtenida por el método utilizado, los métodos microbiológicos pueden clasificarse en:

- **Cualitativos:** Denominados también “de investigación”, son métodos de análisis cuya respuesta es la presencia o ausencia del analito (microorganismo) detectado directa o indirectamente en una cierta cantidad de muestra<sup>(1)</sup>.
- **Cuantitativos:** Denominados “de detección y recuento” son métodos de análisis cuya respuesta es la cantidad de analito (microorganismo) medido directamente (recuento en masa o volumen) o indirectamente (NMP, absorbancia de color, impedancia, etc.) en una cierta cantidad de muestra<sup>(1)</sup>.

### 4.2.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CUALITATIVOS

Los métodos cualitativos deben ser validados estimando, como mínimo, el límite de detección <sup>(25)</sup>. En caso que existiera algún requisito normativo o legal, además, se extenderá el alcance de la validación a parámetros tales como sensibilidad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos, eficiencia o selectividad.

### A) Límite de detección (LD)

Es el menor número de microorganismos que pueden detectarse en una muestra con un nivel aceptable de confianza. Desde el punto de vista teórico, aplicando la distribución de Poisson, cabe esperar un valor aproximado de 3 ufc/volumen analizado.

El estudio se debe realizar sobre muestras de matriz representativa con ausencia del microorganismo diana y requiere el empleo de suspensiones de inóculo con niveles de concentración bajos.

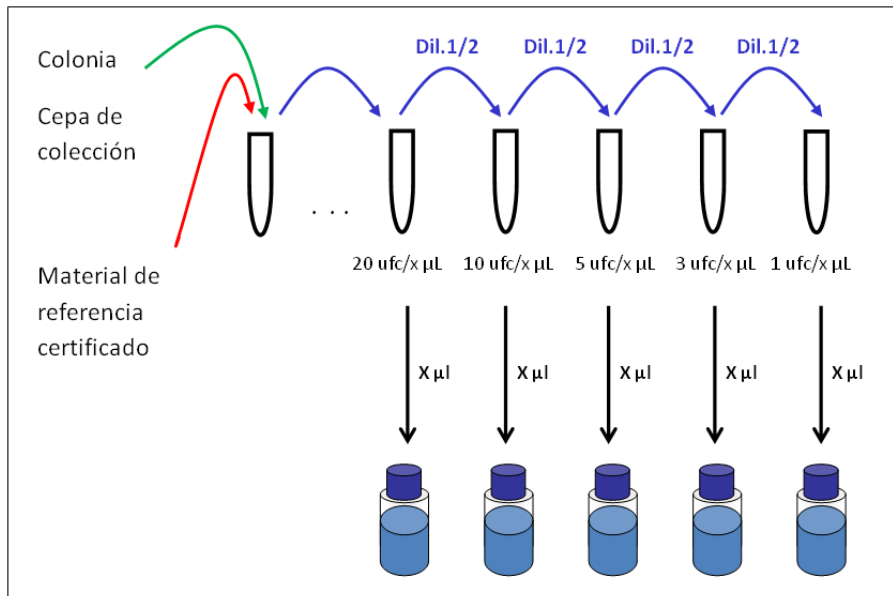
Se propone el siguiente esquema de trabajo en agua matriz:

- Analizar una alícuota blanco para demostrar que la muestra no tiene el microorganismo diana.
- Preparar varias alícuotas de dicha muestra, que deberán ser fortificadas con el material de referencia en concentraciones progresivamente menores, partiendo de una concentración máxima de 20 ufc por alícuota.
- Analizar 10 repeticiones de cada nivel de fortificación, obteniendo para cada una de ellas un valor de "ausencia" o "presencia".

Se adjunta a continuación el esquema de trabajo descrito anteriormente.

Paso 1. Preparación del banco de diluciones

Paso 2. Fortificación de alicuotas de matriz y realización del procedimiento



Paso 3. Repetición del paso 2 diez veces en condiciones de reproducibilidad.

Paso 4. Elaboración del cuadro de resultados para la obtención del valor del LD.

	20 ufc	10 ufc	5 ufc	3 ufc	1 ufc
Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia
Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia
Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia	Presencia
Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia
Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia
Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia
<b>Porcentaje de Presencia</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>90 %</b>	<b>50 %</b>

↓  
LD = 3 ufc/volumen analizado

Se establece como criterio del límite de detección el menor nivel de concentración que proporcione al menos un 90% de réplicas positivas (presencia).

Para el caso de métodos normalizados en los que se indiquen criterios de precisión y recuperación obtenidos a partir de un número  $n$  de réplicas, se podrá llevar a cabo la evaluación del límite de detección con un mínimo de 3 repeticiones en las condiciones anteriormente indicadas. En estos casos, como criterio para el establecimiento del límite de detección, se define como el menor nivel de concentración que proporcione el 100% de réplicas positivas (*presencia*).

## B) Otros parámetros

El objetivo del estudio de estos parámetros es evaluar la influencia de la microbiota acompañante en el recuento del microorganismo diana.

A continuación, se indican los parámetros a evaluar<sup>(2)</sup>:

- **Sensibilidad:** Fracción del número total de cultivos o colonias positivas correctamente asignadas en el recuento presuntivo. Se calcula como:

$$\frac{A}{A+B}$$

- **Especificidad:** Fracción del número total de cultivos o colonias negativas correctamente asignadas en el recuento presuntivo. Se calcula como:

$$\frac{D}{C+D}$$

- **Falsos positivos:** Fracción del número total de cultivos o colonias positivas observados incorrectamente asignados. Se calcula como:

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

- **Falsos negativos:** Fracción del número total de cultivos o colonias negativas observados incorrectamente asignados. Se calcula como:

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

- **Eficiencia:** Fracción de colonias o cultivos correctamente asignados. Se calcula como:

$$\frac{A + D}{N}$$

- **Selectividad:** Fracción de presuntos positivos respecto al total. Se calcula como:

$$F = \log \frac{A + C}{N}$$

Donde

- **A**= número de presuntivos positivos encontrados positivos
- **B** = número de presuntivos negativos encontrados positivos
- **C** = número de presuntivos positivos encontrados negativos
- **D** = número de presuntivos negativos encontrados negativos
- **N**= número total de muestras examinadas es: A +B +C +D

La lectura de los resultados se expresan según la tabla siguiente:

		<i>RESULTADO PRESUNTIVO</i>			
			+	-	
<i>RESULTADO ENCONTRADO</i>	+		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A+B</b>
	-		<b>C</b>	<b>D</b>	<b>C+D</b>
			<b>A+C</b>	<b>B+D</b>	<b>A+B+C+D=N</b>

Siempre que sea posible se deben usar muestras naturales con microbiota acompañante pero, de no ser así, se inoculará la muestra con microorganismos interferentes. El rango y la distribución de la microbiota interferente deberían ser representativos de los niveles habituales en las matrices de trabajo.

El número mínimo de muestras replicadas no debería ser inferior a 20 (10 presuntos positivos y 10 presuntos negativos) y se establece un criterio de aceptación para la sensibilidad de mayor o igual al 90%.



#### 4.2.2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CUANTITATIVOS

En este caso, la validación incluirá estudios de recuperación y precisión<sup>(25)</sup>. y comprenderá todo el rango de trabajo establecido en el método que permita un tratamiento estadístico fiable de los valores.

Los recuentos comprendidos entre 20 ufc y el límite superior de cada método se encuentran dentro del rango de precisión óptimo. Por ello, se recomienda realizar cálculos de recuperación en niveles de concentración superiores a 20 ufc debido a la sobredispersión de los microorganismos<sup>(2)</sup>, si bien la precisión de los recuentos comprendidos entre 10 y 20 ufc siguen siendo aceptables<sup>(26)</sup>.

Los niveles de trabajo se establecerán en función de la técnica a utilizar<sup>(26)</sup>:

- Técnica de incorporación en placa: el número de colonias típicas debe estar entre 20 y 150 ufc (la suma de las colonias típicas y atípicas no debe superar las 300 ufc) para placas de 90-100 mm de diámetro.
- Técnica de reparto en placa: el número de colonias típicas debe estar entre 20 y 150 ufc (la suma de las colonias típicas y atípicas no debe superar las 200 ufc) para placas de 90-100 mm de diámetro.
- Técnica de filtración en membrana: el número de colonias típicas debe estar entre 20 y 100 ufc (la suma de las colonias típicas y atípicas no debe superar las 200 ufc) para filtros de 47-50 mm de diámetro.

*NOTA: Se entiende por colonia típica aquella presuntiva que cumple las características definidas en el método.*

En cuanto a la obtención de los valores de referencia en microbiología, debe tenerse en cuenta la dificultad añadida de trabajar con organismos vivos.

Para la obtención del valor de referencia, habitualmente pueden utilizarse:

- A. Estandarización a partir de una cepa de referencia, mediante titulación en un medio de cultivo no selectivo. Como criterio orientativo, se propone, por ejemplo, que la dispersión de las réplicas sea  $\leq 1,2$  veces la RSD de Poisson ( $\frac{1}{\sqrt{C}}$ ). Existen otros criterios también válidos como el test

de la Q de Dixon o valores de dispersión (CV) obtenidos durante el proceso de validación.

- B. Uso del valor de referencia proporcionado por un material de referencia de valor certificado.
- C. Resultados de ejercicios de intercomparación.
- D. Comparación con métodos de referencia.

En el caso B, podemos optar por comparar los resultados de nuestro procedimiento de ensayo con el valor certificado para el material de referencia; esta circunstancia requiere que el valor de referencia haya sido obtenido en condiciones similares a nuestro procedimiento de ensayo. Alternativamente, un material de referencia de valor certificado puede titularse siguiendo las indicaciones del ejemplo (*Anexo IX*), lo que facilita la tarea de preparación de stock de cultivo, diluciones, etc.

#### A) Precisión (REPRODUCIBILIDAD)

La precisión se define como el grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos con el mismo método, sobre idéntico material de ensayo, en distintas condiciones de medición (distintos lotes de filtros de membrana, medio de cultivo de distinta preparación, distinto analista)<sup>(26)</sup>.

Se calcula como la desviación estándar de reproducibilidad  $S_R$ <sup>(27)</sup> :

$$S_R = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}}$$

Donde:

$y_{iA}$ , es el dato transformado en Log10 de la réplica A (ufc/volumen filtrado (mL))

$y_{iB}$ , es el dato transformado en Log10 de la réplica B (ufc/volumen filtrado (mL))

$i$ , es el número de muestras

n es el número de repeticiones ( $n \geq 10$ )

Aunque es función del método y del rango a estudio, como valor orientativo, se puede establecer un valor de  $S_R$  inferior o igual a 0,2 (CV = 37%). Habitualmente, los resultados de precisión se expresan como coeficiente de variación (en %) mediante la siguiente fórmula:

$$CV (\%) = (1 - 10^{-S_R}) 100$$

Para el caso de métodos normalizados en los que se indiquen criterios de precisión y recuperación obtenidos a partir de un número n de réplicas, se propone que la evaluación de la precisión consista en la realización de un mínimo de 3 ensayos de muestras positivas.

Otras fuentes de información para obtener datos de reproducibilidad del método pueden proceder de los resultados de participación en ejercicios de intercomparación y del uso de materiales de referencia certificados.

### B) Recuperación

La estimación de la recuperación se evalúa a partir de valores de referencia<sup>(25)</sup>. Para ello, se requiere comparar los resultados obtenidos con los valores esperados. Se calcula como:

$$\% Rec = 10^{-\bar{d}} * 100$$

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n}$$

$$d_i = \text{Log}(VR_i) - \text{Log}(VL_i)$$

Donde:

- $VR_i$  es el valor de referencia obtenido según el apartado 4.2.2. para cada repetición
- $VL_i$  es el valor obtenido por el laboratorio aplicando el método de ensayo para cada repetición
- $d_i$  es la diferencia entre el logaritmo del valor de referencia y el obtenido por el laboratorio para cada repetición

- $\bar{d}$  es la media de los di obtenidos
- n es el número de repeticiones ( $n \geq 10$ )

Para el caso de métodos normalizados en los que se indiquen criterios de precisión y recuperación obtenidos a partir de un número n de réplicas, se propone que la evaluación de la recuperación consista en la realización de un mínimo de 3 ensayos de muestras positivas fortificadas.

El laboratorio debe establecer su propio criterio de aceptación de la recuperación. A modo de orientación, en el Anexo X se adjunta una tabla obtenida a partir de los resultados experimentales de los laboratorios participantes en la elaboración de esta guía.

*Nota: Cada laboratorio ha utilizado sus métodos internos propios y, por tanto, los valores de recuperación proceden del uso de medios selectivos, medios no selectivos, intercomparaciones, materiales de referencia y otros.*

### C) Incertidumbre

La estimación de la incertidumbre en ensayos microbiológicos se limita a los métodos de recuento y su alcance debe tener en cuenta el tipo de matriz y microorganismo a analizar. No es de aplicación a métodos cualitativos ni NMP<sup>(25)</sup>.

Como en otros ámbitos, no existe un único modelo para llevar a cabo una estimación de incertidumbre, si bien suele tenerse en cuenta sólo la componente de precisión. Dada la particularidad experimental de este tipo de ensayos, no puede realizarse una estimación adecuada de la contribución del sesgo en la incertidumbre de medida, aún cuando se disponga de material de referencia certificado, por lo que no se considera esta componente en sí misma<sup>(27)</sup>.

Puede ocurrir que los métodos normalizados indiquen expresamente un valor de incertidumbre de medida, en cuyo caso, el laboratorio deberá confirmar su capacidad de ensayo frente al valor indicado.

El cálculo de la estimación de la incertidumbre se puede llevar a cabo mediante dos modelos diferentes: ISO/TS 19036 e ISO 29201.

Modelo según ISO/TS 19036:2006 (A1-2009) <sup>(27, 28)</sup>

La estimación de la incertidumbre (**u**) se realiza mediante el cálculo de la precisión según la ecuación:

$$u = \sqrt{S_R^2 + \frac{0,18861}{\sum C}}$$

Siendo:

$S_R$  : desviación estándar de reproducibilidad calculada según se indica en el punto 4.4.2 Apartado A.

$\sum C$ : es la suma del total de número de colonias contadas en todas las placas en las que se realiza contaje para la muestra ensayada.

*Nota.- En análisis de aguas es habitual realizar un solo contaje en placa para determinar el número de colonias total, por tanto,  $\sum C = C$*

Para obtener el valor de  $S_R$ , los ensayos deben realizarse asegurando un número suficiente de colonias en el contaje de las placas. No se incluirán para el cálculo de  $S_R$  los recuentos inferiores a 10 colonias. Los recuentos entre 10 y 30 colonias se incluirán en el cálculo solamente si se espera obtener un valor para  $S_R$  superior a 0,2. El cálculo de la desviación estándar en forma logarítmica estabiliza la variación de la reproducibilidad en los diferentes niveles de concentración siempre que no sea necesario introducir datos de recuentos bajos en su cálculo, por lo que en estos casos, no será necesario evaluar la incertidumbre para diferentes niveles de concentración, aunque los datos empleados deberían cubrir todo el rango de trabajo.

El cálculo de la desviación estándar también puede realizarse a partir de las réplicas remitidas por el laboratorio en ejercicios de intercomparación siempre que se hayan hecho en condiciones de reproducibilidad.

#### Modelo según ISO 29201:2012<sup>(33)</sup>

El cálculo se realiza teniendo en cuenta dos componentes: variabilidad operacional y variabilidad intrínseca del método.

- La variabilidad operacional es la combinación de las incertidumbres asociadas con los procesos técnicos del método de trabajo, que incluye homogeneidad, diluciones, incubación y lectura de resultados. Esta estimación puede realizarse mediante una aproximación global como la diferencia entre la incertidumbre estándar relativa por reproducibilidad intralaboratorios y la variabilidad intrínseca.
- La variabilidad intrínseca del método es una variación inevitable que está asociada con la distribución de las partículas en la suspensión final y con la detección instrumental. Las suspensiones microbiológicas habitualmente siguen una distribución de Poisson.

Los cálculos se resumen en la tabla siguiente.

Algoritmo general:		$u = \sqrt{u_{Rp}^2 + u_{met}^2}$	
Incertidumbre relativa de reproducibilidad operacional ( $u_{Rp}$ )			
$u^2_{Rp} = S_R^2 - u_{metval}^2$			
$S_R^2$		$u_{metval}^2$	
$S_R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n S_{Ri}^2}{n}$ <p>Siendo:</p> $S_{Ri}^2 = \frac{(\log C_{1i} - \log C_{2i})^2}{2}$ <p>Donde:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>C_{1i}</math>: primera réplica de recuento de colonias.</li> <li>• <math>C_{2i}</math>: segunda réplica de recuento de colonias de la misma muestra natural o dopada que <math>C_{1i}</math></li> </ul> <p><math>n</math> es el número de muestras en las que se realizan los duplicados (<math>n</math> mayor o igual a 10)</p> <p>Este cálculo (<math>S_{Ri}^2</math>) se realiza para cada par de réplicas de la misma muestra.</p>		$u_{metvali}^2 = \frac{0,1886}{C_{media}}$ <p>Donde:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>C_{media}</math>: media del recuento de colonias de <math>C_{1i}</math> y <math>C_{2i}</math></li> </ul> <p>Este cálculo se realiza para cada par de réplicas de la misma muestra.</p> <p>El cálculo de la incertidumbre estimada para el conjunto de pares de muestras se realizará con la fórmula:</p> $u_{metval}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n u_{metvali}^2}{n}$ <p>Donde <math>n</math> es el número de muestras en las que se realizan los duplicados (<math>n</math> mayor o igual a 10)</p>	
Incertidumbre intrínseca al método ( $u_{met}$ )			
$u_{met}^2 = \frac{0,1886}{\sum C}$			
Donde $\sum C$ es la suma del total de número de colonias contadas en todas las placas en las que se realiza contaje para la muestra ensayada			

En ambos modelos se obtiene una estimación de incertidumbre para cada resultado de muestra ensayada (C).

Finalmente, el cálculo de la incertidumbre expandida (**U**), se realizará multiplicando la incertidumbre combinada obtenida ( $u_c$ ) por un factor de cobertura **k**. El valor de  $k=2$  ofrece aproximadamente un intervalo de confianza del 95%, y es el más usado habitualmente.

$$U = k u_c$$

Una vez estimada la incertidumbre expandida, ésta se podrá expresar como intervalo de recuento de colonias o bien como porcentaje. No es necesario expresar la misma con más de dos cifras significativas.

Se adjunta un ejemplo en el Anexo XI.

### 4.3. ASIGNACION DE LA INCERTIDUMBRE AL METODO

A partir de los valores de incertidumbre expandida obtenidos en los estudios realizados (distintos niveles, incluyendo el límite de cuantificación, y en las matrices de estudio), se establecerá una incertidumbre del método acorde con los resultados obtenidos. Los criterios a seguir pueden ser:

- A) Establecer diferentes valores de incertidumbre del método según el nivel de concentración en caso que sean muy diferentes.
- B) Tomar como incertidumbre del método la más desfavorable evaluada en los niveles de concentración estudiados. Este criterio penaliza los niveles de concentración con incertidumbres menores.

Cuando sea aplicable, se incluirá una declaración sobre la incertidumbre de medición estimada; la información sobre la incertidumbre es necesaria cuando sea pertinente para la validez o aplicación de los resultados de los ensayos, cuando así lo requieran las instrucciones del cliente o cuando la incertidumbre afecte al cumplimiento con los límites de una especificación.<sup>(5)</sup>



## 4.4. CRITERIOS GUIA PARA LA EXPRESIÓN DE RESULTADOS

### A) PARÁMETROS FÍSICO - QUÍMICOS

Es habitual expresar los resultados de ensayo como:

$$[(y \pm U) \text{ unidades}] \text{ o } [y (\text{unidades}) \pm U (\%)]$$

donde:

$y$  es el resultado numérico obtenido por el laboratorio

$U$  es la incertidumbre expandida que proporciona un intervalo dentro del cual se sitúa el valor de la medida con una probabilidad determinada, normalmente el 95%.

El laboratorio debe expresar los resultados de medida en función de la incertidumbre obtenida. Una recomendación general <sup>(29)</sup> es que la incertidumbre se exprese con dos cifras significativas y el valor numérico del resultado debe redondearse de forma que el último decimal se corresponda con el último dígito de la incertidumbre, reflejando así la capacidad de medida en la práctica. En ambos casos pueden aplicarse las reglas habituales de redondeo.

En algunos casos puede ser suficiente el uso de una cifra significativa en la expresión de la incertidumbre, sin embargo debe considerarse la coherencia de la expresión final así como su uso para la toma de decisiones. Un ejemplo se puede consultar en el *Anexo XII*.

Cuando la legislación indica la expresión de resultados asociada a los valores paramétricos o niveles de calidad aceptables que se regulan, el laboratorio deberá atender a dicha especificación. Sin embargo, puede haber casos en los que sea apropiado utilizar una cifra significativa adicional.

Existen parámetros cuyo valor se calcula sumando resultados individuales. En caso de que alguno de estos resultados sean menores del límite de cuantificación deberán seguirse las indicaciones de la legislación vigente <sup>(30,31)</sup>. En los casos en que no haya ninguna especificación sobre cómo realizar la

suma en caso de valores por debajo del límite de cuantificación, el laboratorio establecerá y documentará el criterio.

## B) PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

Existen varios textos normativos <sup>(26,32,33)</sup> que dan indicaciones sobre las particularidades de la expresión de resultados como consecuencia de la distribución estadística de los recuentos microbianos, así como de la necesidad de informar la estimación de la incertidumbre en función del uso previsto del resultado del ensayo.

Sin embargo, debe considerarse prioritario el cumplimiento del requisito 5.10.1 de la norma UNE EN ISO/IEC 17025:2005, relacionado con el contenido de los informes de ensayo:

*“Los resultados de cada ensayo, calibración, series de ensayos o calibraciones efectuados por el laboratorio deben ser informados en forma exacta, clara, no ambigua y objetiva, de acuerdo con las instrucciones específicas de los métodos de ensayo o calibración”*

Son claros ejemplos de esta situación resultados como 6 ufc/vol donde se indica como conveniente acompañar el valor numérico con el texto *“numero estimativo”* o *“recuento estimado”*, o cuando el recuento está comprendido entre 1 y 3 ufc/vol, que debería informarse como *“organismo detectado”*.

El resultado informado debe proporcionarse de forma que permita la toma de decisiones, por tanto, en el apartado de expresión de resultados de los procedimientos de ensayo microbiológicos se contemplarán los requerimientos de las normas que procedan, incluyendo un texto adicional en el que se indique que se informará siempre con el valor numérico de recuento obtenido en los informes de ensayo. De esta forma, el procedimiento de ensayo podría indicar:

*“De acuerdo con la norma ISO 8199, los resultados obtenidos para la determinación de un determinado microorganismo en una matriz dada se ajustan a la expresión*

<i>Número de colonias</i>	<i>Criterios de expresión según ISO 8199</i>
<i>0 ufc/placa</i>	<i>0 ufc/volumen analizado</i>
<i>De 1 a 3 ufc/placa</i>	<i>Organismo detectado/volumen analizado</i>
<i>De 4 a 9 ufc/placa</i>	<i>X ufc/volumen analizado (Recuento estimado)</i>
<i>De 10 a 100 ufc/placa</i>	<i>X ufc/volumen analizado</i>
<i>&gt; 100 ufc/placa</i>	<i>&gt; ufc max/volumen analizado</i>

*En el informe de ensayo los resultados se expresan con el recuento obtenido en las lecturas de las placas. Por debajo de 10 ufc/vol, el resultado se considera como recuento estimado debido al efecto de sobredispersión"*

El laboratorio podrá incluir una llamada en sus informes de ensayo para aquellos resultados comprendidos entre 1 y 9 ufc/vol indicando, por ejemplo:

*"Según la norma ISO 8199, los recuentos comprendidos entre 1 y 3 ufc/vol suponen una detección de la presencia del organismo, y los comprendidos entre 4 y 9 ufc/vol son un número estimativo"*

Debe tenerse en cuenta que pueden existir requisitos particulares para la expresión de resultados en documentos normativos específicos para los ensayos que se realicen <sup>(34)</sup>.

## 5. REVISIÓN/VERIFICACIÓN DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO. OTRAS CONTRIBUCIONES

Los laboratorios deben comprobar a lo largo del tiempo la adecuación de los datos obtenidos en la validación inicial, teniendo en cuenta <sup>(35)</sup>:

- datos recientes de los controles de calidad internos
- nuevos datos obtenidos de la participación en ensayos de intercomparación
- revisiones de las normas aplicables
- documentos con directrices específicas para los respectivos campos de ensayo

Debe tenerse en cuenta que la incertidumbre estándar para un método de ensayo de rutina nunca debe ser menor que la precisión a largo plazo para el mismo método y mismo tipo de muestra.

Si la incertidumbre estándar es significativamente menor que la desviación estándar observada dentro del laboratorio, la estimación de la incertidumbre debe ser revisada inmediatamente <sup>(36)</sup>.

En los casos en que se realicen cambios de importancia en el método que puedan afectar a los parámetros de la validación del mismo, será necesario realizar de nuevo el cálculo de veracidad, precisión e incertidumbre de acuerdo a las condiciones actuales de trabajo.

## 6. CONTROL DE LOS DATOS: VALIDACION DE APLICACIONES PROPIAS Y ADAPTACIONES DE APLICACIONES COMERCIALES

Las aplicaciones informáticas usadas por el laboratorio para el cálculo, tratamiento o transferencia de resultados deben estar validadas para confirmar su adecuación al uso previsto. Se recomienda además contar con instrucciones del uso de dichas aplicaciones.

La extensión de las pruebas de validación varía en función del tipo de soporte lógico utilizado por el laboratorio. El software comercial se considera suficientemente validado, pero las parametrizaciones y configuraciones particulares (hojas de cálculo) deben validarse.

Para validar una hoja de cálculo se tienen que comprobar los siguientes puntos:

1. Que los cálculos que contiene la hoja son los que aparecen descritos en los procedimientos a los que aplican
2. Que las celdas que componen las fórmulas en la hoja de cálculo están vinculadas a las celdas de datos correctamente
3. Que los resultados obtenidos son los correctos

Para la hoja de cálculo se deberían establecer los niveles de acceso por usuario, cuáles son las celdas de ENTRADA (aquellas donde los usuarios pueden ingresar los datos), qué fórmulas o cálculos tiene la hoja de cálculo (funciones) y cuáles son las celdas de SALIDA.

Es necesario verificar que las celdas que no son de entrada de datos estén bloqueadas y así evitar modificaciones accidentales. Además, los datos soportados y guardados en estas aplicaciones estarán protegidos contra manipulaciones indebidas que puedan cuestionar la integridad y confidencialidad de los datos almacenados.

La sistemática de validación debe estar documentada y debe quedar evidencia de las pruebas realizadas para la validación.

## 7. REFERENCIAS

1. UNE-EN ISO 16140:2003. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Protocolo de validación de métodos alternativos (ISO 16140:2003).
2. ISO/TR 13843:2000. Water quality -- Guidance on validation of microbiological methods.
3. UNE-EN ISO 17994:2004. Calidad del agua. Criterios para establecer la equivalencia de dos métodos microbiológicos (ISO 17994:2004).
4. Orden SCO/778/2009, de 17 de marzo, sobre métodos alternativos para el análisis microbiológico del agua de consumo humano.
5. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
6. Guía para el funcionamiento de los laboratorios de ensayos de aguas. Parte I: criterios para el aseguramiento de la calidad de los ensayos. Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento (AEAS). Julio 2012.
7. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. NATA Technical Note 17. June 2012.
8. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. EURACHEM-CITAC Guide CG 4. 3rd Edition (2012).
9. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. EURACHEM. 1998.
10. Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories (PS15). INAB. Issue 3 April 2012.
11. ISO 3696:1987. Water for analytical laboratory use. Specification and test methods.

12. Guide to Method Flexibility and Approval of EPA Water Methods. EPA. December 1996.
13. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA, AWWA, WEF. 22<sup>nd</sup> Edition, 2012.
14. Calibración lineal. Jordi Riu, Ricard Boqué. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica, Universitat Rovira i Virgili. Tarragona. Técnicas de Laboratorio, 284 (2003) 676-680.
15. ISO 8466-2:2001. Water quality -- Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics -- Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions.
16. ISO 8466-1:1990 Water quality -- Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics -- Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.
17. International Vocabulary of Metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM). BIMP. 3<sup>rd</sup> edition (2008 version with minor corrections).
18. Real Decreto 140/2003, de 7 de Febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.
19. Real Decreto 1620/2007, de 7 de Febrero, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.
20. ISO 11352:2012. Water quality -- Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data.
21. Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. NORTEST TECHNICAL REPORT 537. Edition 3. Approved 2011-11.
22. ISO/TS 13530:2009. Water quality -- Guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis.
23. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. IUPAC, Pure Appl. Chem. 71, 337–348. 1999.

24. Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Alicia Maroto. Tesis Doctoral Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados. Universitat Rovira i Virgili. 2002.
25. NT-32: Análisis microbiológico. Documento aclaratorio. ENAC. Abril 2012.
26. UNE-EN ISO 8199:2005. Calidad del Agua. Orientaciones generales para el recuento de microorganismos en cultivo.
27. ISO/TS 19036:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.
28. ISO/TS 19036:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. AMENDMENT 1: Measurement uncertainty for low counts (2009).
29. EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing. EA-4/16 G Rev. 00 (December 2003).
30. Orden MAM/3207/2006, de 25 de septiembre, por la que se aprueba la instrucción técnica complementaria MMA-EECC-1/06, determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
31. Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas.
32. ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
33. ISO 29201:2012. Water quality – the variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods.
34. Accreditation for Microbiological Laboratories. EURACHEM. 2nd edition 2013.
35. G-ENAC-09. Guía para la expresión de la incertidumbre en los ensayos cuantitativos. Rev. 1. Julio 2005.



36. Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation. EUROLAB Technical Report No. 1/2007. March 2007.

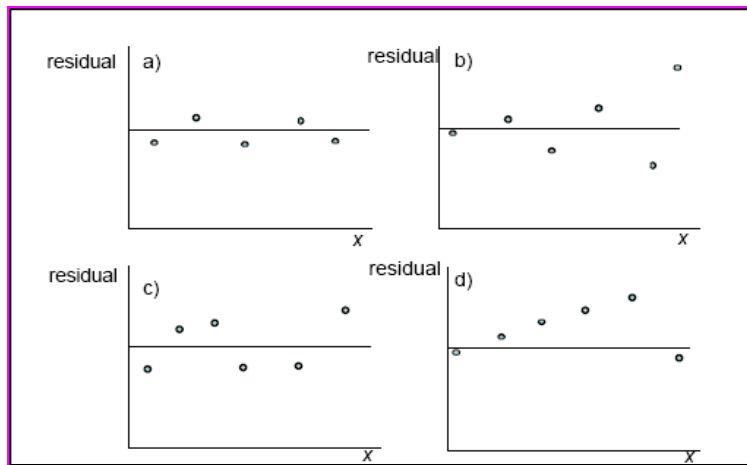
## 8. ANEXOS

<u>Anexo I</u>	Ejemplo de cálculo de linealidad
<u>Anexo II</u>	Ejemplo de cálculo de sensibilidad
<u>Anexo III</u>	Ejemplo de cálculo de precisión
<u>Anexo IV</u>	Ejemplo de cálculo de sesgo
<u>Anexo V</u>	Ejemplo de cálculo de incertidumbre con material de referencia
<u>Anexo VI</u>	Ejemplo de cálculo de incertidumbre con control interno
<u>Anexo VII</u>	Ejemplo comparativo de las dos formas indicadas en la guía para el cálculo de la incertidumbre asociada a la adición
<u>Anexo VIII</u>	Ejemplo de cálculo de incertidumbre con ejercicios de intercomparación
<u>Anexo IX</u>	Obtención del valor de referencia en métodos microbiológicos cuantitativos
<u>Anexo X</u>	Valores orientativos de aceptación de recuperación en microbiología
<u>Anexo XI</u>	Ejemplos de estimación de incertidumbre bajo las normas ISO/TS 19036 e ISO 29201
<u>Anexo XII</u>	Ejemplo sobre expresión de resultados

## ANEXO I: EJEMPLO DE CÁLCULO DE LINEALIDAD

Para poder considerar que un modelo de línea recta es válido, en el gráfico de residuales, se debe observar que:

- 1) El número de residuales positivos es aproximadamente igual al número de residuales negativos
- 2) Los residuales están distribuidos aleatoriamente
- 3) Todos tienen aproximadamente el mismo valor absoluto
- 4) No deben mostrar tendencias



Las cuatro situaciones tipo que pueden observarse en los gráficos de residuales son:

- a) Cumple con los requisitos anteriormente mencionados. Situación correcta.
- b) El valor de los residuales aumenta con la concentración: indica que la incertidumbre asociada a cada punto experimental aumenta con la concentración y que probablemente serían más adecuados otros métodos de regresión para calcular los coeficientes de la recta de calibrado (ej. mínimos cuadrados ponderados).
- c) Probablemente se está intentando ajustar a una línea recta datos experimentales que se quizás ajustarían mejor a una curva.
- d) Presencia de un punto discrepante (*outlier*) en nuestro conjunto de datos experimentales. Los puntos discrepantes pueden estar causados, por ejemplo, por un error humano o por una falta de linealidad.

A continuación, se adjunta un ejemplo de los cuatro casos citados anteriormente dentro del apartado de linealidad.

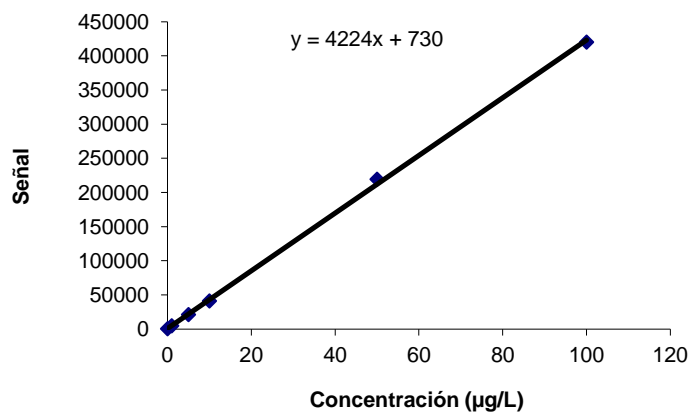
**1) Representación gráfica.**

A partir de los datos de concentración y señal, siendo x la concentración e y la señal, se hace la representación gráfica correspondiente.

De esta manera se pueden detectar visualmente la existencia de valores aberrantes.

**Caso 1**

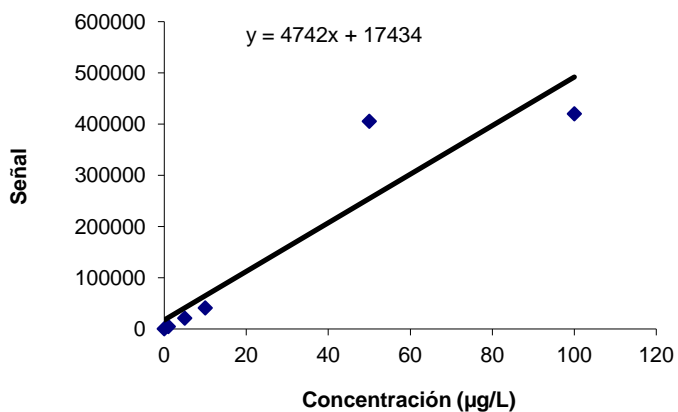
Concentración (µg/L)	Señal
0	234
1	4557
5	20960
10	40926
50	219110
100	419847



Representación gráfica adecuada visualmente.

**Caso 2**

Concentración (µg/L)	Señal
0	234
1	4557
5	20960
10	40926
50	405230
100	419847



Representación gráfica con valores aberrantes.

Se observa que gráficamente no es una recta adecuada pero habría que realizar estudios adicionales para identificar qué valor es el aberrante.

## 2) Coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

A partir de los datos de concentración y señal, siendo x la concentración e y la señal, se obtienen los valores de la pendiente (a), la ordenada en el origen (b) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la recta.

Si establecemos un criterio de linealidad de  $r^2 > 0,995$  tendríamos:

### Caso 1

Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Señal
0	234
1	4557
5	20960
10	40926
50	219110
100	419847

$$y = ax + b$$

$$a = 4224$$

$$b = 730$$

$$r^2 = 0,9995$$

**Cumple criterio de linealidad.**

### Caso 2

Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Señal
0	234
1	4557
5	20960
10	40926
50	405230
100	419847

$$y = ax + b$$

$$a = 4742$$

$$b = 17434$$

$$r^2 = 0,8598$$

**No cumple criterio de linealidad.**

### 3) Análisis de residuales de regresión.

A partir de los datos de concentración y señal, se obtiene la ecuación de la recta. Con la ecuación de la recta se determinan las concentraciones calculadas y se obtiene los residuales de regresión como, la diferencia entre la concentración calculada y la teórica.

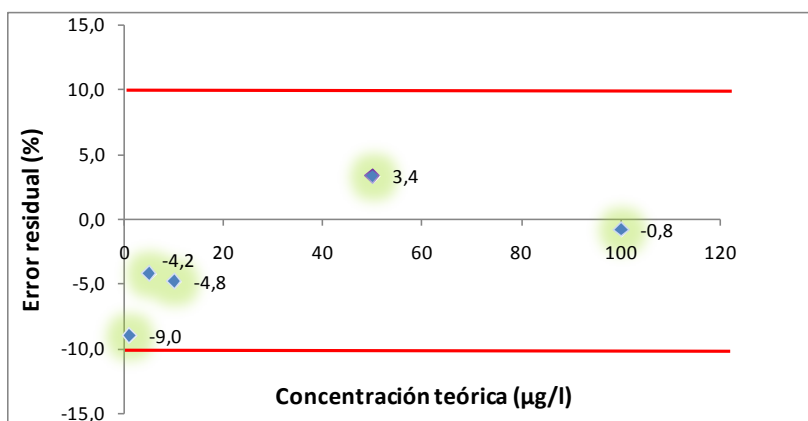
Si establecemos un criterio para la tolerancia de los residuales  $\leq 10\%$ , calculada como el residual de regresión entre la concentración teórica por 100 (en valor absoluto), tenemos:

#### Caso 1

Concentración (µg/L)	Señal	Concentración calculada	Residual de regresión	Tolerancia de los residuales $\leq 10\%$
0	234			
1	4557	0,91	-0,094	9,4
5	20960	4,79	-0,211	4,2
10	40926	9,52	-0,485	4,9
50	219110	51,69	1,695	3,4
100	419847	99,21	-0,787	0,8

Representación gráfica de residuales:

$y = ax + b$   
 $a = 4224$   
 $b = 730$



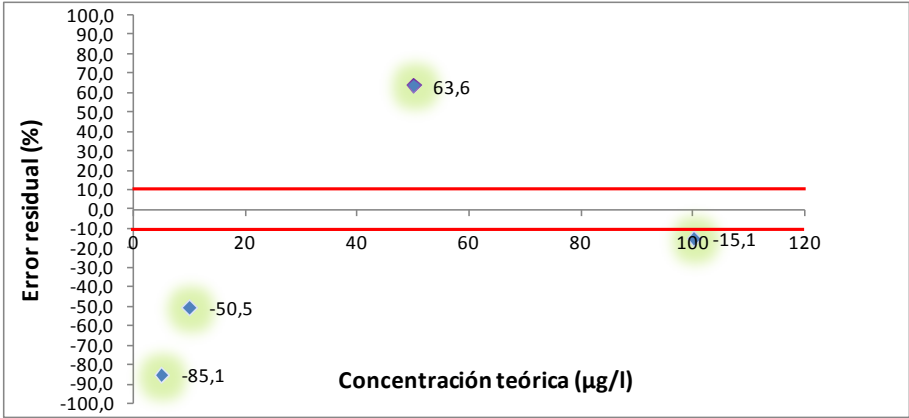
Cumple criterio de linealidad.

**Caso 2**

Concentración (µg/L)	Señal	Concentración calculada	Residual de regresión	Tolerancia de los residuales ≤ 10%
0	234			
1	4557	-2,72	-3,716	- 371,6
5	20960	0,74	-4,256	- 85,1
10	40926	4,94	-5,046	- 50,5
50	405230	81,78	31,781	63,6
100	419847	84,86	-15,136	- 15,1

Representación gráfica de residuales:

$y = ax + b$   
 $a = 4742$   
 $b = 17434$



**No cumple criterio de linealidad.**

**4) Desviación del factor de respuesta.**

A partir de los datos de concentración y señal, se calculan los factores de respuesta para cada una de las concentraciones como la relación entre la señal y la concentración obtenida para dicha señal.

Si establecemos un criterio para el factor de respuesta del 10%, calculado como la RSDfr entre el promediofr por 100, tenemos:

**Caso 1**

Concentración (µg/L)	Señal	Factor de respuesta.
0	234	
1	4557	4323
5	20960	4145
10	40926	4069
50	219110	4378
100	419847	4196

$y = ax + b$   
 $a = 4224$   
 $b = 730$

Promediofr = 4222

RSDfr = 127

$(RSDfr/Promediofr) \times 100 = 3\%$

**Cumple criterio de linealidad.**

**Caso 2**

Concentración (µg/L)	Señal	Factor de respuesta.
0	234	
1	4557	4323
5	20960	4145
10	40926	4069
50	405230	8100
100	419847	4196

$y = ax + b$   
 $a = 4742$   
 $b = 17434$

Promediofr = 4967

RSDfr = 1754

$(RSDfr/Promediofr) \times 100 = 35\%$

**No cumple criterio de linealidad.**



## ANEXO II: EJEMPLO DE CÁLCULO DE SENSIBILIDAD

### Estudio de la sensibilidad en ICP-MS para la determinación de Li

Considerando la pendiente de la regresión lineal como indicadora de la sensibilidad del método, se propone controlar que ésta se mantiene cuando se analizan muestras en rutina.

Para ello, suponiendo que los valores de la pendiente se comportan como una distribución normal, se toman los datos de la pendiente de las diferentes rectas realizadas durante la validación y se calcula el valor medio, la desviación estándar ( $S_d$ ) y el coeficiente de variación, pudiéndose establecer a partir de los valores obtenidos unos intervalos de confianza:

- *Límite de aviso*: Valor medio de la pendiente más dos veces su desviación estándar
- *Límite de alarma*: Valor medio de la pendiente más tres veces su desviación estándar
- *Coefficiente de variación*: Se establece un criterio de aceptación del 10%

Fecha	Recta	Pendiente
02/05/2012	$y=4749x + 282$	4749
09/05/2012	$y=4460x + 398$	4460
15/05/2012	$y=4636x + 200$	4636
21/05/2012	$y=4640x + 626$	4640
30/05/2012	$y=3802x + 313$	3802
06/06/2012	$y=3951x + 317$	3951
13/06/2012	$y=4054x + 302$	4054

Valor medio	4327
$S_d$	383
CV%	8,9

Límites de confianza			
Límites de aviso	$X \pm 2S_d$	$4327 \pm 766$	3561 – 5093
Límites de alarma	$X \pm 3S_d$	$4327 \pm 1149$	3178 – 5476

Debido a que el método de determinación de Li por ICP emplea patrón interno para la cuantificación y en la construcción de la recta de calibrado se utilizan valores relativos, es necesario establecer un criterio adicional que demuestre que la sensibilidad del equipo es aceptable.

Se propone establecer un valor mínimo de lectura del patrón, una vez optimizadas las condiciones del equipo. Para ello, a partir de los valores del patrón interno de 1 ppb de Indio obtenidos durante la validación, se calcula el valor medio de las lecturas y su desviación estándar y se establece como criterio de aceptación el valor medio menos tres veces la desviación estándar.

Fecha	Respuesta Patrón interno 1 ppb Indio
02/05/2012	66934
09/05/2012	60540
15/05/2012	59622
21/05/2012	59338
30/05/2012	61185
06/06/2012	59641
13/06/2012	64662
<b>V medio</b>	61703
<b>S<sub>d</sub></b>	2942
<b>Criterio de aceptación (X-3S<sub>d</sub>)</b>	52879

## ANEXO III: EJEMPLO DE CÁLCULO DE PRECISIÓN

El estudio de precisión en la validación puede realizarse con materiales de referencia, muestras adicionadas o muestras reales.

### A. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

- Límite de cuantificación: 0,100 mg/L
- Rango de trabajo: 0,100-15,0 mg/L

### B. MATERIALES DE REFERENCIA UTILIZADOS EN LA VALIDACIÓN

Se trata de materiales de referencia matriciales con las siguientes concentraciones e incertidumbres:

MR1 0,150 ± 0,006 mg/L

MR2 1,250 ± 0,015 mg/L

MR3 14,10 ± 0,28 mg/L

### C. REPRODUCIBILIDAD (SR)

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$S_R (\%) = \frac{S_R}{\bar{x}} \cdot 100$$

$S_R$	desviación estándar de reproducibilidad
$\bar{x}$	Valor medio obtenido del material de referencia en condiciones de reproducibilidad.
n	Nº de repeticiones
$x_i$	Cada uno de los resultados obtenidos

		MR1	MR2	MR3
Día	Analista	(0,153 mg/L)	(1,250 mg/L)	(14,10 mg/L)
1	A	0,146	1,11	13,5
2	B	0,149	1,20	13,3
3	A	0,153	1,21	13,8
4	B	0,151	1,20	13,4
5	A	0,145	1,24	13,9
6	B	0,152	1,23	13,1
7	B	0,142	1,15	13,5
8	A	0,159	1,16	13,4
9	A	0,142	1,23	14,2
10	B	0,146	1,24	13,8
	<b>S<sub>R</sub></b>	<b>0,005</b>	<b>0,044</b>	<b>0,33</b>
	$\bar{x}$	<b>0,149</b>	<b>1,200</b>	<b>13,60</b>
	<b>S<sub>R</sub>(%)</b>	<b>3,4</b>	<b>3,7</b>	<b>2,4</b>

#### D. REPETIBILIDAD (S<sub>r</sub>)

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$S_r (\%) = \frac{S_r}{\bar{x}} \cdot 100$$

S <sub>r</sub>	desviación estándar de repetibilidad
$\bar{x}$	Valor medio obtenido del material de referencia en condiciones de repetibilidad.
n	Nº de repeticiones
x <sub>i</sub>	Cada uno de los resultados obtenidos

		MR1	MR2	MR3
Día	Analista	(0,153 mg/L)	(1,250 mg/L)	(14,10 mg/L)
1	A	0,149	1,25	13,7
1	A	0,149	1,23	13,7
1	A	0,153	1,26	13,8
1	A	0,151	1,25	13,9
1	A	0,148	1,24	14,0
1	A	0,150	1,23	13,7
1	A	0,149	1,22	13,9
1	A	0,153	1,23	14,0
1	A	0,152	1,22	14,1
1	A	0,149	1,21	14,0
	<b>S<sub>r</sub></b>	<b>0,002</b>	<b>0,016</b>	<b>0,15</b>
	$\bar{x}$	<b>0,150</b>	<b>1,230</b>	<b>13,90</b>
	<b>S<sub>r</sub>(%)</b>	<b>1,3</b>	<b>1,3</b>	<b>1,1</b>

## ANEXO IV: EJEMPLO DE CÁLCULO DEL SESGO

### Ejemplo 1: Agua de consumo

Para el cálculo del sesgo en la validación de un método de determinación de Hg mediante la técnica de fluorescencia atómica, se analizan diferentes réplicas de un material de referencia de  $0,200 \pm 0,001 \mu\text{g/L}$  en matriz agua de consumo humano.

Se realizan un mínimo de 7 réplicas en condiciones de reproducibilidad:

Réplica	V ( $\mu\text{g/L}$ )
1	0,209
2	0,230
3	0,228
4	0,231
5	0,181
6	0,193
7	0,211
$\bar{V}$	0,212

Con los datos obtenidos se calcula el sesgo tal y como se ha descrito en el apartado 4.1.9:

$$\text{sesgo (b)} = \bar{V} - V_{\text{ref}}$$

$$\text{sesgo (b\%)} = \frac{\bar{V} - V_{\text{ref}}}{V_{\text{ref}}} * 100$$

Obteniéndose los siguientes resultados:

sesgo (b)	0,012
sesgo (b%)	5,9

### Ejemplo 2: Agua residual

Se quiere obtener una concentración de entorno a 0,50 mg/L de nitritos en agua residual a partir de una muestra de agua residual real con concentración de 0,12 mg/L y adicionamos 4 mL de un material de referencia de concentración  $10,00 \pm 0,05$  mg/L a 95 mL de la muestra real. El valor de concentración final obtenido es de  $0,51 \pm 0,02$  mg/L.

Se realizan un mínimo de 7 réplicas en condiciones de reproducibilidad:

Replica	V
1	0,51
2	0,49
3	0,51
4	0,51
5	0,50
6	0,52
7	0,53
$\bar{V}$	<b>0,51</b>

Con los datos obtenidos se calcula el sesgo como recuperación, tal y como se ha descrito en el apartado 4.1.9:

$$R(\%) = \frac{C1 - C2}{C3} * 100$$

Se obtienen los siguientes resultados:

RECUPERACION (%)	97,5
------------------	------

## ANEXO V: EJEMPLO DE CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE CON MATERIAL DE REFERENCIA

Se estima la incertidumbre de la determinación de P por ICP, en agua continental. El método tiene un límite de cuantificación de 0,100 mg/L P y el rango de trabajo es 0,100 a 15,0 mg/L P

Se han diseñado una serie de pruebas para la validación consistentes en el análisis de distintos MR certificados, en matriz agua continental, en condiciones de reproducibilidad (distintos días, distintos analistas, distinta calibraciones...).

*Nota: Si el laboratorio ya dispone de datos de control de calidad realizados con material de referencia matricial puede utilizar estos para el cálculo de la incertidumbre siguiendo este mismo ejemplo*

Las concentraciones e incertidumbres de los materiales de referencia utilizados son:

MR1 0,153 ± 0,006 mg/L

MR2 1,250 ± 0,015 mg/L

MR3 14,10 ± 0,28 mg/L

Las incertidumbres (U) están expresadas como expandidas para una k=2.



Se obtienen los resultados siguientes:

	MR1	MR2	MR3
Resultado	(0,153 mg/L)	(1,250 mg/L)	(14,10 mg/L)
1	0,146	1,11	13,5
2	0,149	1,20	13,3
3	0,153	1,21	13,8
4	0,151	1,20	13,4
5	0,145	1,24	13,9
6	0,152	1,23	13,1
7	0,142	1,15	13,5
8	0,159	1,16	13,4
9	0,142	1,23	14,2
10	0,146	1,24	13,8
11	0,146	1,20	13,6
12	0,148	1,25	13,5
13	0,141	1,24	14,0
14	0,149	1,24	13,8
15	0,159	1,19	13,4

Se estima la incertidumbre para cada rango de trabajo estudiado. Se realiza el cálculo en términos relativos (%).

La incertidumbre expandida (U) del método se calcula como:

$$U = k * u_c$$

Donde k es el factor de cobertura (para una distribución normal y un 95% de probabilidad su valor es k=2) y  $u_c$  es la incertidumbre combinada estándar.

El cálculo de la incertidumbre combinada estándar se realiza atendiendo a la ecuación:

$$u_c = \sqrt{u_R^2 + u_{sesgo}^2}$$

$u_R$  Incertidumbre reproducibilidad dentro del laboratorio.

$u_{sesgo}$  Incertidumbre debida al sesgo.

A. ESTIMACIÓN DE LA COMPONENTE DE INCERTIDUMBRE CORRESPONDIENTE A LA REPRODUCIBILIDAD ( $u_R$ ):

$$u_R = S_R$$

$$u_R(\%) = \frac{u_R}{\bar{x}} \times 100$$

$S_R$  Desviación estándar para una concentración determinada.  $S_R = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

$\bar{x}$  Valor medio obtenido

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} (\text{mg/L})$$

n es el N° de repeticiones

$x_i$  Cada uno de los resultados obtenidos

Los resultados obtenidos para los tres materiales de referencia son:

	<b>MR1 (0,153 mg/L)</b>	<b>MR2 (1,250 mg/L)</b>	<b>MR3 (14,10 mg/L)</b>
<b><math>S_R</math></b>	0,006	0,040	0,29
<b><math>\bar{X}</math></b>	0,149	1,210	13,60
<b><math>u_R(\%)</math></b>	<b>3,739</b>	<b>3,33</b>	<b>2,2</b>

B. ESTIMACIÓN DE LA COMPONENTE DE INCERTIDUMBRE CORRESPONDIENTE AL SESGO ( $u_{\text{sesgo}}$ ):

$$u_{\text{sesgo}} = \sqrt{u_{MR}^2 + \left(\frac{s_{\bar{v}}}{\sqrt{n}}\right)^2 + b^2}$$

$u_{MR}$  incertidumbre típica del material de referencia

$$u_{MR}(\%) = \frac{U}{2} * \frac{100}{V_R}$$

U=Incertidumbre expandida del material de referencia

$V_R$  = Valor del material de referencia

$s_{\bar{v}}$  desviación estándar de las mediciones realizadas sobre el material de referencia

n número de repeticiones realizadas

$$\frac{S_{\bar{V}}}{\sqrt{n}} (\%) = \frac{S_{\bar{V}}}{V_R} * 100$$

b valor numérico del sesgo ( $\bar{V} - V_R$ )

$\bar{V}$  Valor medio de las medidas realizadas sobre el material de referencia

$V_R$  Valor del material de referencia

$$b(\%) = 100 * \frac{|\bar{V} - V_R|}{V_R}$$

Los resultados obtenidos son:

	MR1 (0,153 mg/L)	MR2 (1,250 mg/L)	MR3 (14,10 mg/L)
$u_{MR}(\%)$	2,026	0,80	1,1
$\frac{S_{\bar{V}}}{\sqrt{n}}(\%)$	0,937	0,83	0,5
<b>b (%)</b>	2,919	3,52	3,5
<b><math>u_{sesgo}(\%)</math></b>	<b>3,675</b>	<b>3,70</b>	<b>3,7</b>

Para el cálculo de la **incertidumbre combinada estándar**:

$$u_c = \sqrt{u_R^2 + u_{sesgo}^2}$$

	MR1 (0,153 mg/L)	MR2 (1,250 mg/L)	MR3 (14,10 mg/L)
$u_R(\%)$	3,739	3,33	2,2
$u_{sesgo}(\%)$	3,675	3,70	3,7
<b><math>u_c(\%)</math></b>	<b>5,243</b>	<b>4,98</b>	<b>4,2</b>

El cálculo de la **incertidumbre expandida** es:

$$U(\%) = 2 * u_c(\%)$$

	MR1 (0,153 mg/L)	MR2 (1,250 mg/L)	MR3 (14,10 mg/L)
<b><math>U(\%)</math></b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>8</b>

## ANEXO VI: EJEMPLO DE CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE A PARTIR DE CONTROL INTERNO

Se estima la incertidumbre de la determinación de sodio por el método de emisión atómica en agua de consumo humano, siendo el Límite de cuantificación del método de 0,5 mg/L

CASO 1: A PARTIR DE DATOS DE MUESTRA ADICIONADAS

CASO 2: A PARTIR DE DATOS DE PATRON DE CONTROL (sin matriz) Y GRAFICOS DE DUPLICADOS DE MUESTRAS REALES (solo se estima la componente de reproducibilidad de la incertidumbre. Para el cálculo de la componente del sesgo se pueden utilizar alguno de los otros métodos descritos en la guía)

**CASO 1:** El protocolo de control de calidad del laboratorio tiene establecido que periódicamente determinará el sodio en una muestra de agua de consumo humano adicionada con 10 mg/L de sodio. Diez de los resultados obtenidos en el control de calidad de dicho método a lo largo del año son utilizados en este ejemplo para la estimación de la componente de incertidumbre.

Debe tenerse en cuenta que el resultado de incertidumbre obtenido con el patrón de 10mg/L puede no ser aplicable a todo el rango de trabajo. En ese caso, deberá repetirse el proceso a diferentes niveles de concentración.

Todas las componentes de la incertidumbre se han calculado en valor relativo (%)

Para la adición se ha utilizado un patrón de 1000 mg/L de Na. En el certificado correspondiente al patrón se indica que la concentración es de 1002 con una incertidumbre expandida de 4.1 mg/L para una  $k=2$ .

La adición se realiza usando un micropipeta de 100  $\mu$ L y adicionando sobre 10 ml de muestra por lo que la concentración adicionada es

$$\text{Adición} = \frac{1002 \times 0.1}{10.1} = 9.92 \text{ mg/L}$$

Se analizó cada una de las muestras antes y después de la adición y se obtuvieron los resultados de la siguiente tabla

RESULTADO MUESTRA (mg/L)	ADICIÓN (mg/L)	RESULTADO EXPERIMENTAL (mg/L)	RECUPERACIÓN (mg/L)	SESGO
1,70	9,92	11,37	9,67	-0,25
2,81	9,92	12,48	9,67	-0,25
1,07	9,92	11,23	10,16	0,24
3,40	9,92	12,74	9,34	-0,58
0,15	9,92	10,18	10,03	0,11
5,67	9,92	15,24	9,57	-0,35
3,95	9,92	14,21	10,26	0,34
1,81	9,92	10,40	8,59	-1,33
4,92	9,92	14,50	9,58	-0,34
4,89	9,92	14,36	9,47	-0,45

#### A. ESTIMACIÓN DE LA COMPONENTE DE REPRODUCIBILIDAD ( $u_R$ )

Para el cálculo de esta componente se usan los valores de recuperación obtenidos en los días seleccionados (9,67, 9,67, 10,16, 9,34, 10,03, 9,57, 10,26, 8,59, 9,58, 9,47) se determina:

$$\bar{x} = 9,6 \text{ mg/L}$$

$$u_R = S_R = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = 0,48$$

$$u_R(\%) = \frac{u_R}{\bar{x}} \times 100 = 5,0\%$$

#### B. ESTIMACIÓN DE LA COMPONENTE DEL SESGO $u_{sesgo}$

Se estima la incertidumbre del sesgo como:

$$u_{sesgo} = \sqrt{MC_{sesgo}^2 + u_{ad}^2}$$

La incertidumbre del sesgo tiene como componentes:

1. La incertidumbre del sesgo de la recuperación  $MC_{sesgo}$
2. La incertidumbre de la adición realizada  $u_{ad}$

## B.1 COMPONENTE INCERTIDUMBRE DE SESGO DE LA RECUPERACIÓN ( $MC_{sesgo}$ )

$$MC_{sesgo} = \sqrt{\frac{\sum(b_i)^2}{n_{ad}}}$$

Siendo:

$n_{ad}$  el número de muestras adicionadas analizadas

$b_i$ : Sesgo de las adiciones realizadas

$$MC_{sesgo} = \sqrt{\frac{(-0,25)^2 + (-0,25)^2 + (0,24)^2 + (-0,58)^2 + (0,11)^2 + (-0,35)^2 + (0,34)^2 + (-1,33)^2 + (-0,34)^2 + (-0,45)^2}{10}}$$

$$= 0,53$$

$$MC_{sesgo}(\%) = \frac{MC_{sesgo}}{Conc\ adiconada} \times 100, \frac{0,59}{9,92} \times 100 = 5,4\%$$

## B.2 COMPONENTE INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DE LA ADICIÓN REALIZADA ( $u_{ad}$ )

$$u_{ad} = \sqrt{u_{vol}^2 + u_{conc}^2}$$

Para calcular esta componente, tener en cuenta:

1. La incertidumbre de la concentración adicionada  $u_{conc}$
2. La incertidumbre del volumen añadido  $u_{vol}$

### B.2.1 COMPONENTE INCERTIDUMBRE DE LA CONCENTRACIÓN ADICIONADA $u_{conc}$

La solución patrón de sodio utilizada para la adición es de 1002 mg/L con una incertidumbre expandida (U) de 4,1 mg/L y una  $k=2$ . La incertidumbre debida a la concentración añadida se calcula como:

$$u_{conc} = \frac{U}{k} = \frac{4,1}{2} = 2,05$$

$$u_{conc}(\%) = \frac{u_{con}}{Conc} \times 100 = \frac{2,05}{1002} \times 100 = 0,20\%$$

*Nota: En el ejemplo desarrollado no se realizan diluciones intermedias, en el caso de que se trabaje con diluciones del patrón, se tendría que tener en cuenta el error máximo del material de vidrio utilizado y la desviación estándar obtenida de su calibración.*

## **B.2.2 COMPONENTE INCERTIDUMBRE DEL VOLUMEN $u_{vol}$**

$$u_{vol} = \sqrt{u_{vol\ b}^2 + u_{vol\ rep}^2}$$

Para calcular esta componente se debe tener en cuenta:

1. La incertidumbre sistemática del volumen  $u_{vol,b}$
2. La incertidumbre aleatoria del volumen  $u_{vol,rep}$

### **B.2.2.1. COMPONENTE INCERTIDUMBRE SISTEMÁTICA DEL VOLUMEN $u_{vol,b}$**

El volumen adicionado es de 100  $\mu$ L, usando una micropipeta cuyo error máximo para ese volumen es del 2% (UNE-EN ISO 8655-2:2003)

$$u_{vol\ b1} = \frac{\mathcal{E}_{vol\ max}}{\sqrt{3}} = \frac{0,02}{\sqrt{3}} = 0,012$$

$$u_{vol\ b1}(\%) = 1,2\%$$

El volumen de muestra sobre el que se adiciona, es de 10 mL, usando una pipeta de doble aforo cuyo error máximo para ese volumen es del 0,5%

$$u_{vol\ b2} = \frac{\mathcal{E}_{vol\ max}}{\sqrt{3}} = \frac{0,005}{\sqrt{3}} = 0,0028$$

$$u_{vol\ b2}(\%) = 0,3\%$$

### B.2.2.2. COMPONENTE INCERTIDUMBRE ALEATORIA DEL VOLUMEN $u_{vol,rep}$

Se calcula pesando 10 dispensaciones de 100  $\mu$ L realizadas con micropipeta. Los resultados obtenidos son los siguientes:

NUMERO DE MEDIDAS	masa (g)
1	0,10000
2	0,10004
3	0,10005
4	0,10010
5	0,10030
6	0,10043
7	0,10001
8	0,10036
9	0,10027
10	0,10030

Siendo:

$$\bar{m} = 0,10019 \text{ (Valor promedio de las masas)}$$

$$s = 1.61509 \times 10^{-04}$$

$$u_{vol rep} = \frac{s}{\bar{m}} = \frac{0,000161509}{0,10019} = 0,00162$$

$$u_{vol rep(\%)} = 0,16\%$$

La componente aleatoria del volumen correspondiente a la pipeta ( $u_{vol rep(\%)}$ ), material utilizado para medir la muestra, se ha determinado como la desviación estándar de la pesada de diversas dosificaciones de 10mL en condiciones de repetibilidad, siendo esta.

$$u_{vol rep(\%)} = 0,17\%$$

A partir de los valores obtenidos, la componente de la incertidumbre debida al volumen añadido sería:

$$u_{vol(\%)} = \sqrt{u_{vol b(\%)}^2 + u_{vol rep(\%)}^2} =$$



$$u_{vol}(\%) = \sqrt{1,2^2 + 0,16^2 + 0,3^2 + 0,17^2} = 1,3\%$$

*Nota: La componente de incertidumbre estándar de la adición realizada ( $u_{ad}$ ) también puede calcularse aplicando Ley de propagación de varianzas. En el Anexo VII, se da una comparación de la estimación de esta componente por ambos métodos.*

La incertidumbre asociada a la adición sería:

$$u_{ad}(\%) = \sqrt{u_{vol}^2(\%) + u_{conc}^2(\%)} = \sqrt{1,3^2 + 0,20^2} = 1,3\%$$

ESTIMACIÓN DE LA COMPONENTE DE SESGO  $u_{sesgo}$

$$u_V(\%) = \sqrt{MC_{sesgo}^2(\%) + u_{ad}^2(\%)} = \sqrt{5,4^2 + 1,3^2} = 5,5\%$$

### C. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE COMBINADA ESTÁNDAR

$$u_c(\%) = \sqrt{u_R^2(\%) + u_{sesgo}^2(\%)} = \sqrt{4,9^2 + 5,5^2} = 7,2\%$$

### D. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EXPANDIDA

$$U(\%) = k \times u_c(\%) = 2 \times 7,2 = 14 \%$$

**CASO 2:** El laboratorio realiza el control de calidad del método de sodio usando un patrón de control de concentración de 35 mg/L preparada en agua sin matriz y periódicamente determina muestras por duplicado. Los datos obtenidos en este tipo de control pueden utilizarse para estimar la componente de reproducibilidad de la incertidumbre. Para el cálculo de la componente del sesgo se podrían utilizar alguno de los otros métodos anteriormente descritos en la guía.

Todas las componentes de la incertidumbre se han calculado en valor relativo (%)

$$u_R = \sqrt{u_{Rw\ stand}^2 + u_{r,rango}^2}$$

#### A. COMPONENTE DE LA INCERTIDUMBRE A PARTIR DE LOS RESULTADOS DE QC ( $u_{Rw\ stand}$ )

Se toman 10 datos del control de calidad, en condiciones de reproducibilidad, de un QC con un contenido en sodio de 35 mg/L obteniéndose los resultados de la siguiente tabla.

Número medidas n	RESULTADO EXPERIMENTAL ( $x_i$ ) (mgNa/L)
1	35,06
2	33,99
3	34,42
4	33,38
5	33,94
6	34,84
7	34,73
8	34,65
9	34,99
10	34,37

Se determina:

$$\bar{x} = 34,4\text{mg/L}$$

$$u_{Rw\ stand} = S_R = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 0,53$$

$$u_{Rw\ stand}(\%) = \frac{u_R}{\bar{x}} \times 100 = 1,5\%$$

## B. COMPONENTE DE LA INCERTIDUMBRE A PARTIR DE DATOS DE GRÁFICO DE RECORRIDO ( $u_{r,rango}$ )

Datos de un gráfico de recorrido derivado de actividades de control interno, obtenido con diferentes muestras de agua de consumo.

R1	R2	Rango  R1 - R2	$\bar{x}_i$	$Rango_{promedio}$
11,41	11,35	0,06	11,38	0,53
18,56	18,44	0,12	18,50	0,65
14,60	14,51	0,09	14,56	0,62
13,16	13,18	0,02	13,17	0,15
29,24	29,94	0,70	29,59	2,37
41,46	41,35	0,11	41,41	0,27
15,46	15,62	0,16	15,54	1,03
13,42	13,49	0,07	13,46	0,52
48,70	48,77	0,07	48,74	0,14
16,50	16,46	0,04	16,48	0,24
25,67	25,64	0,03	25,66	0,12
30,20	30,02	0,18	30,11	0,60
17,06	16,80	0,26	16,93	1,54
18,93	19,03	0,10	18,98	0,53
40,76	40,70	0,06	40,73	0,15
42,60	42,63	0,03	42,62	0,07

Siendo:

R1, es el resultado del primer análisis de la muestra

R2, es el resultado del segundo análisis de la muestra

Rango, es la diferencia, en valor absoluto, entre el R1 y el R2

Valor medio de los duplicados:

$$\bar{x}_i = \frac{(R1 + R2)}{2}$$

Rango promedio, es:

$$Rango_{promedio}(\%) = \frac{Rango \times 100}{\bar{x}_i}$$

$$\bar{R} = \frac{\sum Rango_{promedio}(\%),i}{n_{dup}} = 0,59$$

$$u_{r,rango} = \frac{\bar{R}}{d_2}$$

Siendo  $d_2$  un factor que depende del número de valores a partir del que se ha calculado el rango. En este caso, el número de valores es 2, por lo que,  $d_2$  es 1,128.

$$u_{r,rango}(\%) = \frac{0,59}{1,128} = 0,5\%$$

$$u_R = \sqrt{u_{Rw stand}^2 + u_{r,rango}^2}$$

$$u_R = \sqrt{1,5^2 + 0,5^2} = 1,6\%$$

**ANEXO VII: EJEMPLO COMPARATIVO DE LAS DOS FORMAS INDICADAS EN LA GUIA PARA EL CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA ADICIÓN**

<p><b>COMPONENTE INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DE LA CONCENTRACIÓN ADICIONADA (<math>u_{ad}</math>)</b></p> <p><b>COMPONENTE INCERTIDUMBRE DE LA CONCENTRACIÓN ADICIONADA <math>u_{conc}</math></b></p> <p>La solución patrón de sodio utilizada para la adición es de 1002 mg/L con una incertidumbre expandida de 4,1 mg/L y una <math>k=2</math>. La incertidumbre debida a la concentración añadida se calcula como:</p> $u_{conc} = \frac{U}{k} = \frac{4,1}{2} = 2,05$ $u_{conc}(\%) = \frac{u_{con}}{Conc} \times 100 = \frac{2,05}{1002} \times 100 = 0,20\%$ <p>En el ejemplo desarrollado no se realizan diluciones intermedias, en el caso de que se trabaje con diluciones del patrón, se tendría que tener en cuenta el error máximo del material de vidrio utilizado y la desviación estándar obtenida de su calibración.</p> <p><b>A.COMPONENTE INCERTIDUMBRE SISTEMÁTICA <math>u_{vol,b1}</math></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>El volumen adicionado es de 100 <math>\mu</math>L, usando una micropipeta cuyo error máximo para ese volumen es del 2% (UNE-EN ISO 8655-2:2003)</li> </ul> $u_{vol\ b1} = \frac{\epsilon_{vol\ max}}{\sqrt{3}} = \frac{0,02}{\sqrt{3}} = 0,012$ $u_{vol\ b1}(\%) = 1,2\%$ <ul style="list-style-type: none"> <li>El volumen de muestra sobre el que se adiciona, es de 10 mL, usando una pipeta de doble aforo cuyo error máximo para ese volumen es del 0,5%</li> </ul>	<p><b>COMPONENTE INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DE LA CONCENTRACIÓN ADICIONADA (<math>u_{ad}</math>) propagación de Varianzas</b></p> $u_{ad} = \sqrt{u_{conc}^2 \left(\frac{V_i}{V_f}\right)^2 + u_{Vi}^2 \left(\frac{C_i}{V_f}\right)^2 + u_{Vf}^2 \left(\frac{C_i \times V_i}{V_f^2}\right)^2}$ <p>La solución patrón de sodio utilizada para la adición es de 1002 mg/L con una incertidumbre expandida de 4,1 mg/L y una <math>k=2</math>. La incertidumbre debida a la concentración añadida se calcula como:</p> <p>Siendo:</p> <p><math>u_{conc}</math> la incertidumbre del material de referencia</p> $u_{conc} = \frac{U}{k} = \frac{4,1}{2} = 2,05$ <p>El volumen adicionado es de 100 <math>\mu</math>L, usando una micropipeta cuyo error máximo para ese volumen es del 2%.</p> <p>El volumen de muestra sobre el que se adiciona, es de 10 mL, usando una pipeta de doble aforo cuyo error máximo para ese volumen es del 0,5% .</p> <p>Por lo que:</p> <p><math>V_i</math> el volumen inicial (0,1 mL= 0.0001L)</p> <p><math>V_f</math> el volumen de muestra (10,1mL=0.0101 L)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><math>u_{Vi}</math> la incertidumbre de la micropipeta</li> </ul> <p>Usando una micropipeta cuyo error máximo para ese volumen es del 2% (Tolerancia 0.02)</p> $u_{Vi} = \frac{Valor\ nominal \times Tolerancia}{\sqrt{3}} = \frac{0.000002}{\sqrt{3}} = 1,2 \times 10^{-6}$
---	--

$$u_{vol\ b2} = \frac{\mathcal{E}_{vol\ max}}{\sqrt{3}} = \frac{0,005}{\sqrt{3}} = 0,0028$$

$$u_{vol\ b2}(\%) = 0,3\%$$

**A.2. COMPONENTE INCERTIDUMBRE ALEATORIA  $u_{Vol,rep\ 1}$**

En el caso de la micropipeta, se calcula pesando 10 dispensaciones de 100  $\mu$ L realizadas con micropipeta.

Los resultados obtenidos son al calibrar la micropipeta 1

Siendo:

$\bar{m} = 0,10019$  (Valor promedio de las masas)

$$s = 1.61509 \times 10^{-04}$$

$$u_{vol\ rep} = \frac{s}{\bar{m}} = \frac{0,000161509}{0,10019} = 0,00162$$

$$u_{vol\ rep}(\%) = 0,16\%$$

La componente aleatoria de la pipeta, material utilizado para medir la muestra, se calcula pesando 5 dispensaciones de 10 mL realizadas con la pipeta de doble aforo. Los resultados obtenidos son de la calibración de la s pipetas de 10 mL de doble aforo.

Siendo:

$$u_{vol\ rep}(\%) = 0,17\%$$

**C COMPONENTE INCERTIDUMBRE DEL VOLUMEN AÑADIDO  $u_{vol\ A}$**

A partir de los valores obtenidos, la componente de la incertidumbre debida al volumen añadido sería:

$$u_{vol}(\%) = \sqrt{u_{vol\ b}^2(\%) + u_{vol\ rep}^2(\%)} = \sqrt{1,2^2 + 0,16^2 + 0,3^2 + 0,17^2} = 1,3\%$$

**LA INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA ADICIÓN**

$$u_{ad}(\%) = \sqrt{u_{vol}^2(\%) + u_{conc}^2(\%)} = \sqrt{1,3^2 + 0,20^2} = 1,3\%$$

- $u_{vf}$  la incertidumbre de la pipeta  
Usando una pipeta de doble aforo cuyo error máximo para ese volumen es del 0,5%( Tolerancia =0.05

$$u_{vf} = \frac{Valor\ nominal \times Tolerancia(\%)}{\sqrt{3}} = \frac{0,00005}{\sqrt{3}} = 2,88 \times 10^{-5}$$

**LA INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA ADICIÓN**

$$u_{ad} = \sqrt{(2.05)^2 \left(\frac{0,0001}{0,0101}\right)^2 + (1,2 \times 10^{-6})^2 \left(\frac{1002}{0,0101}\right)^2 + (2,88 \times 10^{-5})^2 \left(\frac{1002 \times 0,0001}{(0,0101)^2}\right)^2} = 0,13$$

$$u_{ad}(\%) = \frac{0.13 \times 100}{9.92} = 1,3\%$$

## ANEXO VIII: EJEMPLO DE ESTIMACION DE INCERTIDUMBRE A PARTIR DE DATOS DE EJERCICIOS DE INTERCOMPARACION

Se estima la incertidumbre de la determinación de DQO por el método volumétrico con dicromato potásico en agua residual, utilizando los resultados obtenidos en ejercicios de interlaboratorio entre los años 2007 y 2013,

La sospecha de la existencia de diferentes incertidumbres dentro del rango de trabajo y el hecho de que realizar el cálculo conjunto pueda penalizar en exceso los valores altos de DQO, ha propiciado el estudio por separado de dos rangos.: 50 mg/L y 500 mg/L.

### CASO 1: ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE PARA RANGO 1 (50 mg O<sub>2</sub>/L)

Para el cálculo de esta componente se han tomado los resultados de DQO de 7 ejercicios de interlaboratorio de agua residual, con valores de DQO comprendidos entre 40 y 100 mg O<sub>2</sub>/L.

Valor consenso mg O <sub>2</sub> /L	Valor laboratorio mg O <sub>2</sub> /L	<i>b</i> sesgo mg O <sub>2</sub> /L	<i>b<sub>i</sub></i> (%) sesgo(%)	<i>S<sub>R,i,rel</sub></i> %	<i>n<sub>p,i</sub></i>	<i>u<sub>cref,i,rel</sub></i> %
84,0	71,0	-13,0	-15,5	16,3	103	2,01
44,0	48,0	4,00	9,09	4,32	111	0,51
95,0	99,7	4,70	4,95	9,68	120	1,11
73,0	78,7	5,70	7,81	8,49	145	0,88
35,0	40,0	5,00	14,3	17,1	123	1,93
56,0	56,7	0,70	1,25	13,1	154	1,32
78,2	85,0	6,82	8,72	17,5	117	2,03

## A. ESTIMACIÓN DE LA COMPONENTE DE REPRODUCIBILIDAD ( $u_R$ )

Para el cálculo de esta componente se usan los valores de recuperación obtenidos ( $b_i(\%)$ ) se determina:

$$\bar{x} = 4,37 \%$$

$$u_R(\%) = S_R = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 9,6 \%$$

## B. ESTIMACIÓN DE LA COMPONENTE DE SESGO ( $u_{\text{sesgo}}$ )

Para el cálculo de esta componente se han tomado los resultados de DQO de 7 ejercicios de interlaboratorio de agua residual, con valores de DQO comprendidos entre 40 y 100 mg O<sub>2</sub>/L

Se estima la incertidumbre del sesgo como:

$$u_{\text{sesgo}} = \sqrt{MC_{\text{sesgo}}^2 + (\bar{u}_{\text{cref}})^2}$$

La incertidumbre del sesgo tiene como componentes:

1. La incertidumbre del sesgo de la recuperación  $MC_{\text{sesgo}}$
2. La incertidumbre del valor asignado  $\bar{u}_{\text{cref}}$

### B.1. COMPONENTE INCERTIDUMBRE DE SESGO DE LA RECUPERACIÓN ( $MC_{\text{sesgo}}$ )

$$MC_{\text{sesgo}}(\%) = \sqrt{\frac{\sum(b_i(\%))^2}{N_{\text{int}}}}$$

Donde:

$b_i$  sesgo individual para cada uno de los ejercicios de intercomparación, es decir, diferencia relativa entre el valor asignado y el obtenido por el laboratorio.

$N_{\text{int}}$  el número de ejercicios interlaboratorio

$$MC_{\text{sesgo}}(\%) = \sqrt{\frac{(-15,5)^2 + (9,09)^2 + (4,95)^2 + (7,81)^2 + (14,3)^2 + (1,25)^2 + (8,72)^2}{7}};$$

$$MC_{\text{sesgo}}(\%) = 9.92\%$$



## B.2. COMPONENTE INCERTIDUMBRE DEL VALOR CONSENSO ( $u_{cref}$ )

El organizador informa que el valor consenso se ha calculado mediante el uso de la media robusta, en ese caso, la incertidumbre del valor consenso se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$u_{cref\ i}(\%) = 1,25 \times \frac{S_{R,i}(\%)}{\sqrt{n_{p,i}}}$$

Siendo  $n_{p,i}$  el número de participantes de cada ejercicio interlaboratorio.

La incertidumbre del valor consenso correspondiente a cada ejercicio interlaboratorio ( $u_{cref\ i}(\%)$ ) se indica en la tabla 1.

La media de los valores de la incertidumbre de los valores consenso vendrá dada por la siguiente fórmula:

$$\bar{u}_{cref}(\%) = \frac{\sum u_{cref\ i}(\%)}{N_{int}}$$

$$\bar{u}_{cref}(\%) = \frac{2,01+0,51+1,11+0,88+1,93+1,32+2,03}{7} = 1,40\%$$

## ESTIMACIÓN DE LA COMPONENTE DE SESGO $u_{sesgo}$

$$u_{sesgo}(\%) = \sqrt{MC_{sesgo}^2(\%) + (\bar{u}_{cref}(\%))^2} = \sqrt{9,92^2 + 1,40^2};$$

$$u_{sesgo}(\%) = 10,0\%$$

## C. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE COMBINADA ESTÁNDAR

$$u_c(\%) = \sqrt{u_R^2(\%) + u_{sesgo}^2(\%)} = \sqrt{9,6^2 + 10,0^2} = 13,8\%$$

## D. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EXPANDIDA PARA RANGO 1

$$U(\%) = k \times u_c(\%) = 2 \times 13,8 = 28\%$$

## CASO 2: ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE PARA RANGO 2 (500 mg O<sub>2</sub>/L)

Para el cálculo de esta componente se han tomado los resultados de DQO de 7 ejercicios interlaboratorio de agua residual, con valores de DQO comprendidos entre 300 y 700 mg O<sub>2</sub>/L

Valor consenso mg O <sub>2</sub> /L	Valor laboratorio mg O <sub>2</sub> /L	<i>b</i> sesgo mg O <sub>2</sub> /L	<i>b<sub>i</sub></i> (%) sesgo(%)	<i>S<sub>R,i,rel</sub></i> %	<i>n<sub>p,i</sub></i>	<i>u<sub>cref,i,rel</sub></i> %
334	326	-8,00	-2,40	12,0	103	1,48
668	637	-31,0	-4,64	6,29	111	0,75
489	469	-20,0	-4,09	10,0	120	1,14
472	421	-51,0	-10,8	10,9	145	1,13
350	353	3,00	0,86	8,45	123	0,95
614	593	-21,0	-3,42	6,66	154	0,67
588	533	-55,0	-9,35	7,13	117	0,82

### A. ESTIMACIÓN DE LA COMPONENTE DE REPRODUCIBILIDAD (*u<sub>R</sub>*)

Para el cálculo de esta componente se usan los valores de recuperación obtenidos (*b<sub>i</sub>*(%)) se determina :

$$\bar{x} = -4,83 \%$$

$$u_R(\%) = S_R = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 4,0 \%$$

### B. ESTIMACIÓN DE LA COMPONENTE DE SESGO (*u<sub>sesgo</sub>*)

Se estima la incertidumbre del sesgo como:

$$u_{\text{sesgo}} = \sqrt{MC_{\text{sesgo}}^2 + (\bar{u}_{\text{cref}})^2}$$

La incertidumbre del sesgo tiene como componentes:

1. La incertidumbre del sesgo de la recuperación *MC<sub>sesgo</sub>*
2. La incertidumbre del valor asignado *u<sub>cref</sub>*

### B.1. COMPONENTE INCERTIDUMBRE DE SESGO DE LA RECUPERACIÓN ( $MC_{sesgo}$ )

$$MC_{sesgo} (\%) = \sqrt{\frac{\sum (b_i(\%))^2}{N_{int}}}$$

Donde:

$b_i$  sesgo individual para cada uno de los ejercicios de intercomparación, es decir, diferencia relativa entre el valor asignado y el obtenido por el laboratorio.

$N_{int}$  el número de ejercicios interlaboratorio

$$MC_{sesgo} (\%) = \sqrt{\frac{(-2,40)^2 + (-4,64)^2 + (-4,09)^2 + (-10,8)^2 + (-0,86)^2 + (-3,42)^2 + (-9,35)^2}{7}}$$

$$MC_{sesgo} (\%) = 6,10\%$$

### B.2. COMPONENTE INCERTIDUMBRE DEL VALOR CONSENSO ( $u_{cref}$ )

El organizador informa que el valor consenso se ha calculado mediante el uso de la media robusta, en ese caso, la incertidumbre del valor consenso se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$u_{cref i} (\%) = 1,25 \times \frac{S_{R,i}(\%)}{\sqrt{n_{p,i}}}$$

Siendo  $n_{p,i}$  el número de participantes de cada ejercicio interlaboratorio.

La incertidumbre del valor consenso correspondiente a cada ejercicio interlaboratorio ( $u_{cref i}$ ) se indica en la tabla 2.

La media de los valores de la incertidumbre de los valores consenso vendrá dada por la siguiente fórmula:

$$\bar{u}_{cref} (\%) = \frac{\sum u_{cref i} (\%)}{N_{int}}$$

$$\bar{u}_{cref} (\%) = \frac{1,48+0,75+1,14+1,13+0,95+0,67+0,82}{7} = 0,99 \%$$

**ESTIMACIÓN DE LA COMPONENTE DE SESGO  $u_{sesgo}$** 

$$u_{sesgo}(\%) = \sqrt{MC_{sesgo}^2(\%) + (\bar{u}_{cref}(\%))^2} = \sqrt{6,10^2 + 0,99^2} = 6,2\%$$

**C. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE COMBINADA ESTÁNDAR**

$$u_c(\%) = \sqrt{u_R^2(\%) + u_{sesgo}^2(\%)} = \sqrt{4,0^2 + 6,2} = 7,4\%$$

**D. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EXPANDIDA PARA RANGO 2**

$$U(\%) = k \times u_c(\%) = 2 \times 7,4 = 15\%$$

## ANEXO IX: OBTENCIÓN DEL VALOR DE REFERENCIA EN MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CUANTITATIVOS

Una titulación es la obtención del número de ufc que se encuentran en un volumen determinado. Para ello, a partir de un volumen inicial inoculado se realizan diluciones seriadas hasta llegar a una dilución en la que se pueda realizar un recuento.

Se realiza una batería de diluciones (1/10) a partir de un tubo inoculado inicialmente con la cepa. El tubo inicial se puede obtener de las siguientes formas:

1. Se recoge una porción del crecimiento microbiano de la placa/tubo inclinado donde se mantiene la cepa, mediante un escobillón estéril, y se inocula un tubo con diluyente hasta obtener una disolución turbia (se puede controlar con la escala de Mc Farland o por espectrofotometría).
2. Mediante una asa de siembra se recogen algunas colonias del crecimiento microbiano de la placa/tubo inclinado donde se mantiene la cepa, y se inocula en un tubo con diluyente.

Los diluyentes que se suelen utilizar son: Solución salina 0,85%, Solución Ringer ¼, Agua de peptona Salina.

Las diluciones seriadas 1/10 (9mL diluyente +1mL inoculado), suelen hacerse llegar hasta  $10^{-6}/10^{-8}$  ufc/mL.

De los tubos más diluidos  $10^{-6}$  hasta  $10^{-8}$  (o última dilución realizada) se inoculan en superficie, por triplicado, placas de Agar Nutritivo, Triptona Soja Agar, Brain Heart Infusion... (medios no selectivos). Se suele utilizar un inóculo de 0,1mL que se extiende sobre las placas con medio de cultivo mediante asa de Drigalsky. Las titulaciones se realizarán por triplicado. Se incuba a la temperatura y tiempos adecuados (por ejemplo 36°C/24h).

Se realizan los recuentos de las placas siguiendo las indicaciones de la Norma ISO 8199.

### Aceptación de los resultados

Los resultados obtenidos en el triplicado se considerarán válidos siempre que el CV sea inferior o igual a  $1,2 \cdot \text{RSD Poisson}$ .

$$CV = \frac{S_d}{\bar{c}} \times 100 \quad RSD = \frac{1}{\sqrt{\bar{c}}} \times 100$$

Siendo:

CV Coeficiente de Variación  
 RSD Poisson  
 $S_d$  Desviación estándar de los tres recuentos  
 $\bar{C}$  Media de los tres recuentos.

La titulación del tubo inoculado inicial se obtendrá multiplicando el resultado obtenido en la dilución (donde se ha realizado el recuento) por el factor de dilución.

### Ejemplo:

De un tubo inicial contaminado se realizan diluciones 1/10 llegándose a la dilución  $10^{-8}$ . Se siembran, por triplicado tres placas de BHI con 0,1mL de las tres últimas diluciones, obteniéndose los siguientes resultados:

Dilución  $10^{-8}$ : 3ufc/0,1mL; 5ufc/0,1mL; 8ufc/0,1mL  
 Dilución  $10^{-7}$ : 38ufc/0,1mL; 45ufc/0,1mL; 34ufc/0,1mL  
 Dilución  $10^{-6}$ : >200ufc/0,1mL; >200ufc/0,1mL; >200ufc/0,1mL

### Aceptación de los resultados:

$\bar{C} = 39$   
 $S_d = 5,57$

CV = 14,28  
 RSD = 16,01  
 $1,2 \cdot RSD = 19,22$

Los resultados del triplicado se aceptan ya que  $CV \leq 1,2 \cdot RSD$ .

### Recuento:

$3,9 \times 10^2$  ufc/mL en la dilución  $10^{-7}$

El resultado de la titulación será  $3,9 \times 10^9$  ufc/mL en el tubo inicial.

## ANEXO X: VALORES ORIENTATIVOS DE ACEPTACIÓN DE RECUPERACIÓN (%) EN MICROBIOLOGÍA

(Intervalo de confianza: 95%)

Parámetro	Método	Medio de cultivo	Recuperación (%)		Número de datos	Intervalo de tiempo
			Límite Inferior	Límite Superior		Meses
Aerobios a 22°C	Recuento	Plate Count Agar	50	189	428	3 a 5
		Agar Extracto de Levadura	66	151	79	3 a 24
		TGE	52	159	24	24
Aerobios a 37°C	Recuento	Plate Count Agar	63	234	465	3 a 24
		Agar Extracto de Levadura	66	181	79	3 a 24
		TGE	52	196	24	24
Bacterias coliformes	Filtración	Agar Endo	75	222	294	3 a 24
		Agar Tergitol	66	164	157	15 a 25
		Agar Cromogénico	36	178	393	3 a 60
	NMP	Colilert	32	224	747	3 a 60
<i>Escherichia coli</i>	Filtración	Agar Endo	47	164	354	3 a 24
		Agar Tergitol	37	206	289	3 a 60
		Agar Cromogénico	66	124	24	24
	NMP	Colilert	45	212	591	3 a 60
Enterococos	Filtración	Slanetz&Bartley	52	195	725	3 a 60
	NMP	Enterolert	48	140	180	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Filtración	Agar Cetrimide	46	232	485	3 a 24
<i>Clostridium perfringens</i>	Filtración	Agar TSC-MUP	53	250	325	3 a 60
		Agar m-CP	52	191	73	24
		Agar TSC	24	305	299	12 a 15
<i>Legionella</i> spp.	Filtración	Agar GVPC-BCYE	3	437	393	3 a 24

## ANEXO XI: EJEMPLOS DE ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE EN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

A continuación se realiza estudio de estimación de incertidumbre en ensayos microbiológicos siguiendo los dos modelos indicados en el cuerpo del presente documento: modelo según ISO/TS 19036 e ISO 29201

Para ello se evalúan los resultados obtenidos por duplicado de muestras analizadas durante un periodo de diez días.

En el caso del modelo según la ISO/TS 19036 los recuentos con un número de colonias inferior a 30 no deben de ser tenidos en cuenta. Por este motivo se ha considerado presentar este estudio con dos ejemplos, con el fin de comparar entre dichos modelos el efecto de eliminación de dichos recuentos.

En el Ejemplo 1 todos los recuentos obtenidos son superiores a 30 colonias.

En el Ejemplo 2 se han mantenido los recuentos del ejemplo 1 para los ocho primeros días. Los días noveno y décimo presentan resultados con un número de colonias inferior a 30.

En los dos ejemplos se indican los resultados de incertidumbre correspondientes a recuentos de análisis de muestras de rango bajo (15 colonias), rango medio (70 colonias) y rango alto (200 colonias) para los dos modelos a estudio.

### **Ejemplo 1:**

Datos obtenidos en los diez días de medida:

	1 Réplica ( $C_{1i}$ )	2 Réplica ( $C_{2i}$ )	1 Réplica $y_{iA}$ (log)	2 Réplica $y_{iB}$ (log)
Día 1	77	52	1,886	1,716
Día 2	88	63	1,994	1,799
Día 3	52	42	1,716	1,623
Día 4	185	177	2,267	2,248
Día 5	42	36	1,623	1,556
Día 6	62	74	1,792	1,869
Día 7	151	136	2,179	2,134
Día 8	96	78	1,982	1,892
Día 9	44	53	1,724	1,724
Día 10	92	74	1,869	1,869



La incertidumbre para cada uno de los modelos y rangos es la siguiente:

**Rango bajo:**

El resultado de la muestra a ensayar es de 15 colonias.

Para el modelo **ISO/TS 19036**, la incertidumbre se calcula con la expresión:

$$u = \sqrt{S_R^2 + \frac{0,18861}{\sum C}}$$

En primer lugar se determinará la desviación estándar:

$$S_R = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}}$$

con  $n= 10$ , ya que son diez días de medidas.

Seguidamente se calcula el término dependiente del resultado de la muestra a ensayar con:

$$\sum C = C = 15$$

Los resultados obtenidos son los siguientes:

	$S_R$	$0,18861/\sum C$	Incertidumbre Expandida (k=2) (log)
<b>ISO/TS 19036</b>	0,068978	0,012574	<b>0,26</b>

Para el modelo **ISO 29201**, la incertidumbre se calcula con la expresión:

$$u = \sqrt{u_{Rp}^2 + u_{met}^2}$$

El cálculo de  $u_{Rp}^2$  se realiza:

$$u_{Rp}^2 = S_R^2 - u_{metval}^2$$

con: 
$$S_R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n S_{Ri}^2}{n}$$

siendo: 
$$S_{Ri}^2 = \frac{(\log C_{1i} - \log C_{2i})^2}{2}$$

y 
$$u_{metval}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n u_{metvali}^2}{n}$$
, n=10 ya que son 10 días de medidas

siendo: 
$$u_{metvali}^2 = \frac{0,1886}{C_{media}}$$

y 
$$C_{media} = \text{media de los recuentos de } C_{1i} \text{ Y } C_{2i}$$

para el cálculo de  $u_{met}^2$  se utiliza:

$$u_{met}^2 = \frac{0,1886}{\sum C}$$

con  $\sum C = C = 15$

Así, los resultados obtenidos son:

	$u_{Rp}^2$	$u_{met}^2$	Incertidumbre Expandida (k=2) (log)
<b>ISO 29201</b>	0,001985	0,012574	<b>0,24</b>

Del mismo modo se efectúa para los rangos medio y alto, obteniendo las siguientes incertidumbres:

**Rango medio:**

El resultado de la muestra a ensayar es de 70 colonias.

	$S_R$	$0,18861/\Sigma C$	Incertidumbre Expandida (k=2) (log)
<b>ISO/TS 19036</b>	0.068978	0,002694	<b>0,17</b>

	$u_{Rp}^2$	$u_{met}^2$	Incertidumbre Expandida (k=2) (log)
<b>ISO 29201</b>	0,001985	0,002694	<b>0,14</b>

### Rango alto:

El resultado de la muestra a ensayar es de 200 colonias.

	$S_R$	$0,18861/\Sigma C$	Incertidumbre Expandida (k=2) (log)
<b>ISO/TS 19036</b>	0,068978	0,000943	<b>0,15</b>

	$u_{Rp}^2$	$u_{met}^2$	Incertidumbre Expandida (k=2) (log)
<b>ISO 29201</b>	0,001985	0,0000943	<b>0,11</b>

La diferencia mayor en los tres rangos que se observa para la incertidumbre expandida entre los dos modelos es de 0,04 unidades logarítmicas.

**Ejemplo 2:**

Datos obtenidos en los diez días de medida:

	1 Réplica (C <sub>1i</sub> )	2 Réplica (C <sub>2i</sub> )	1 Réplica y <sub>iA</sub> (log)	2 Réplica y <sub>iB</sub> (log)
Día 1	77	52	1,886	1,716
Día 2	88	63	1,994	1,799
Día 3	52	42	1,716	1,623
Día 4	185	177	2,267	2,248
Día 5	42	36	1,623	1,556
Día 6	62	74	1,792	1,869
Día 7	151	136	2,179	2,134
Día 8	96	78	1,982	1,892
Día 9	19	29	1,297	1,462
Día 10	12	21	1,079	1,322

Para el modelo **ISO/TS 19036**, es necesario eliminar los recuentos que se encuentran por debajo de 30 colonias, que son los señalados en oscuro en la tabla anterior y que corresponden a los días 9 y 10.

Una vez eliminados estos recuentos, el cálculo de la incertidumbre se realiza del mismo modo que en el ejemplo 1.

*Nota- Es necesario indicar que el número de muestras utilizado para el cálculo de la incertidumbre según el modelo ISO/TS 19036, una vez eliminados los recuentos inferiores a 30 colonias, es de 8, por lo que sería necesario efectuar análisis de un número mayor de muestras para tener al menos un total de 10.*

La incertidumbre para cada uno de los rangos y modelos es la siguiente:

**Rango bajo:**

El resultado de la muestra a ensayar es de 15 colonias.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

	S <sub>R</sub>	0,18861/ΣC	Incertidumbre Expandida (k=2) (log)
<b>ISO/TS 19036</b>	0,0074845	0,012574	<b>0,26</b>

	$u^2_{Rp}$	$u^2_{met}$	Incertidumbre Expandida (k=2) (log)
<b>ISO 29201</b>	0,004926	0,012573	<b>0,26</b>

### Rango medio:

El resultado de la muestra a ensayar es de 70 colonias.

	$S_R$	$0,18861/\Sigma C$	Incertidumbre Expandida (k=2) (log)
<b>ISO/TS 19036</b>	0,0074845	0,002694	<b>0,18</b>

	$u^2_{Rp}$	$u^2_{met}$	Incertidumbre Expandida (k=2) (log)
<b>ISO 29201</b>	0,004926	0,002694	<b>0,18</b>

### Rango alto:

El resultado de la muestra a ensayar es de 200 colonias.

	$S_R$	$0,18861/\Sigma C$	Incertidumbre Expandida (k=2) (log)
<b>ISO/TS 19036</b>	0,074845	0,000943	<b>0,16</b>

	$u^2_{Rp}$	$u^2_{met}$	Incertidumbre Expandida (k=2) (log)
<b>ISO 29201</b>	0,004926	0,000943	<b>0,16</b>

En este caso se obtienen resultados de incertidumbre iguales para los dos modelos de cálculo.

Estudiando los dos ejemplos se observa la importancia en la elección de los recuentos en los diferentes días, con el fin de que se encuentren bien definidos los resultados en todo el rango de trabajo. Así, la falta de resultados en el rango bajo en el ejemplo 1 hace que no se tenga suficiente información para que el modelo según la ISO 29201 ofrezca resultados satisfactorios.

Una vez definidos los resultados del rango bajo en los días 9 y 10 en el ejemplo 2, se observa la coherencia en los resultados obtenidos mediante los dos modelos.

## ANEXO XII: EJEMPLOS SOBRE EXPRESION DE RESULTADOS

Se exponen a continuación una serie de ejemplos de expresión de resultados a partir de valores de incertidumbre simulados.

### Ejemplo 1: Aluminio en aguas de consumo

Valor Paramétrico (R.D. 140/2003)      200 µg/L

Para una incertidumbre del 12%, en unidades de medida y con dos cifras significativas tendremos 24 µg/L. Por tanto, el valor reportado por el laboratorio será:

$$(200 \pm 24) \mu\text{g/L} \text{ ó } 200 \mu\text{g/L} \pm 12\%$$

### Ejemplo 2: Boro en aguas de consumo

Valor Paramétrico (R.D. 140/2003)      1,0 mg/L

Para una incertidumbre del 12%, en unidades de medida y con dos cifras significativas tendremos 0,12 mg/L. Por tanto, el valor reportado por el laboratorio será:

$$(1,00 \pm 0,12) \text{ mg/L} \text{ ó } 1,00 \text{ mg/L} \pm 12\%$$

En este caso el requisito legal sobre el número de decimales indicado en el valor paramétrico es menor que el que ofrece la incertidumbre del método. Entonces la incertidumbre podría expresarse con una sola cifra significativa, con el fin de que el resultado posea el mismo número de decimales que el Valor Paramétrico. De este modo, el valor reportado por el laboratorio pasaría a ser:

$$(1,0 \pm 0,1) \text{ mg/L} \text{ ó } 1,0 \text{ mg/L} \pm 12\%$$

*Nota:* Considerando una cifra significativa, debería informarse como 1,1 mg/L cuando el resultado de ensayo fuera mayor o igual que 1,05 mg/L, es decir, un 5% por encima del Valor Paramétrico.

Considerando dos cifras significativas, debería informarse como 1,01 mg/L cuando el resultado de ensayo fuera mayor o igual que 1,005 mg/L, es decir, sería necesario superar el Valor Paramétrico en un 0,5% para emitir un resultado por encima del mismo.

### **Ejemplo 3: Turbidez en agua regenerada**

Nivel de Calidad Aceptable (R.D. 1620/2007) 2 UNT (calidad 1.1)

Para una incertidumbre del 12%, en unidades de medida y con dos cifras significativas tendremos 0,24 UNT. Por tanto, el valor reportado por el laboratorio será:

$$(2,00 \pm 0,24) \text{ UNT } \text{ó} \text{ } 2,00 \text{ UNT } \pm 12\%$$

En este caso, el laboratorio no podría informar de acuerdo con el requerimiento legal, ya que se obtendría un resultado incoherente de:

$$(2 \pm 0) \text{ UNT}$$