



Validación de los métodos microbiológicos

## **HERRAMIENTAS ESTADISTICAS**

Bqca. QM Alicia I. Cuesta,  
Consultora Internacional de la FAO



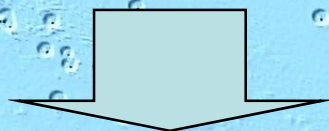
## Objetivos de la clase

- ✓ Objetivos de la estadística.
- ✓ Concepto y parámetros poblacional y muestral.
- ✓ Técnicas estadísticas usadas para validar métodos en el laboratorio de microbiología:
  - o Cálculo de  $\bar{X}$ ,  $s$ ,  $r$ ,  $R$ .
  - o Test de F y Student.
  - o Correlación de métodos: regresión lineal. Cálculo de  $s_{y,x}$  y  $r$ .

# OBJETIVOS DE LA ESTADISTICA



**EXPRESAR  
RESULTADOS NUMERICOS  
EN UN CONTEXTO TAL  
QUE SE PUEDA INTERPRETAR,  
JUZGAR**



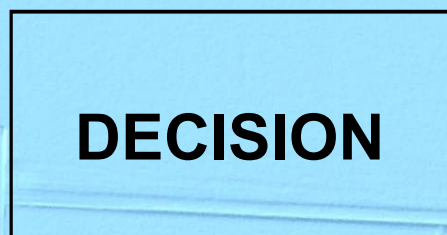
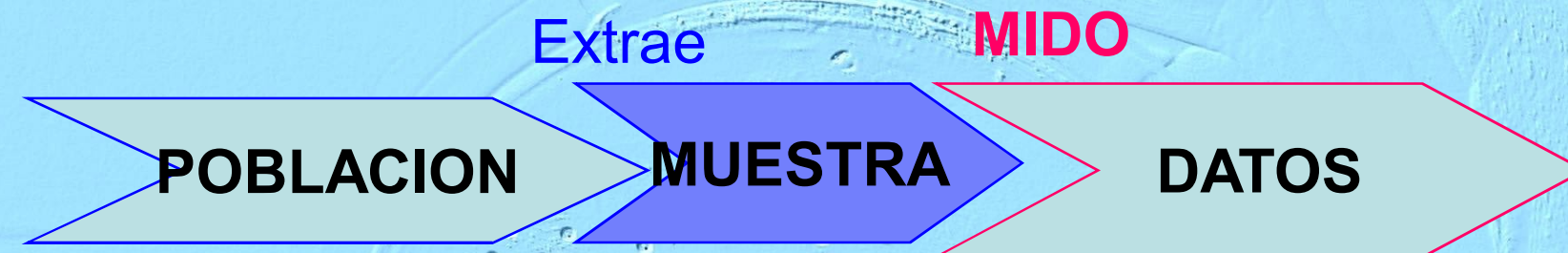
**TOMAR DECISIONES**

**Estadística descriptiva:** cálculo de parámetros  $\bar{x}$  y  $s$ .

**Inferencia estadística:** pruebas de hipótesis, test de Student, etc.



# INFERENCIA ESTADISTICA



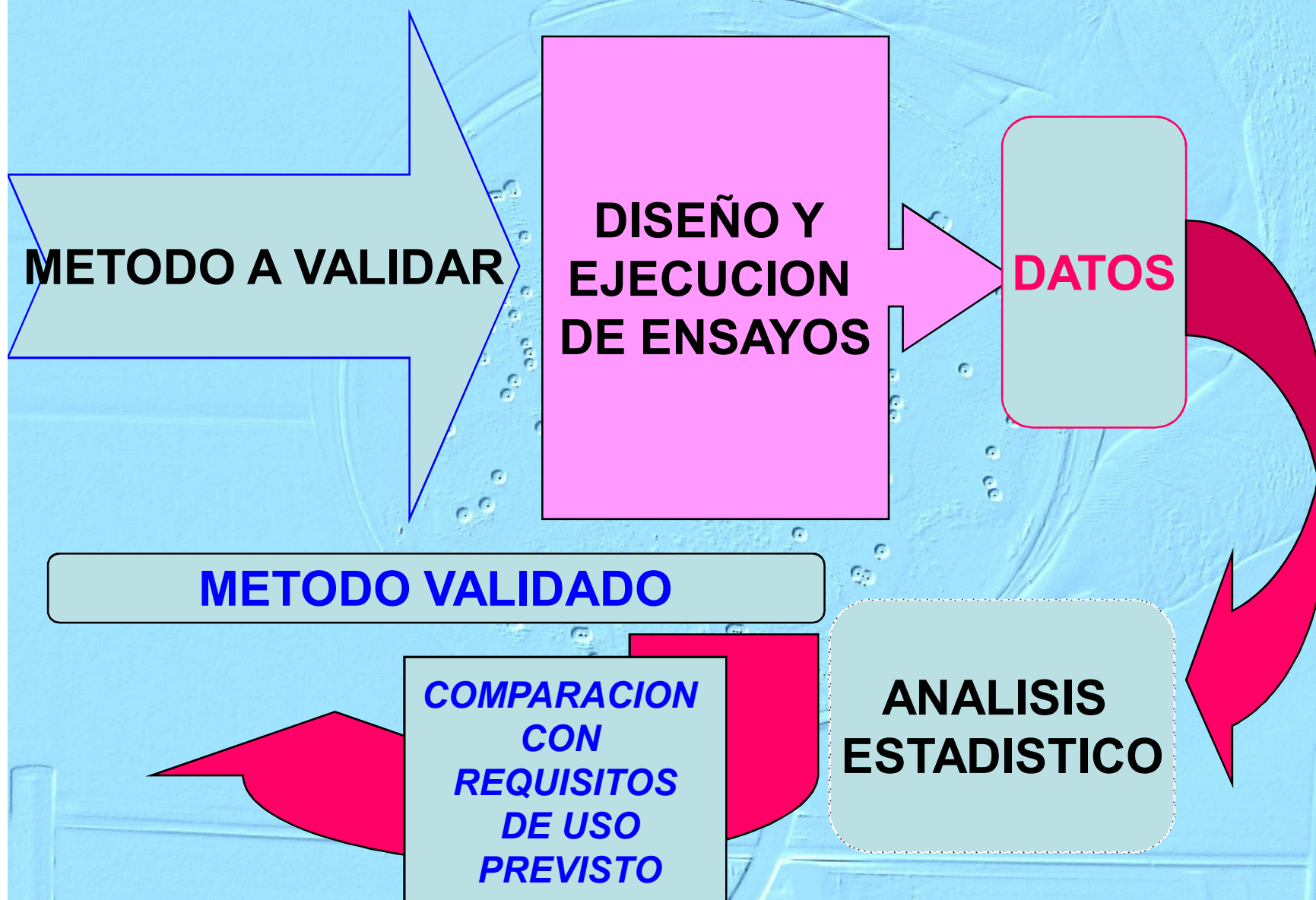


## Conceptos estadísticos:

<b>POBLACIONAL</b> <b>(teórico)</b>	<b>MUESTRAL</b> <b>(experimental)</b>
Variable aleatoria: $x$	Observaciones: $x_1, \dots, x_n$
Distribución	Histograma
Probabilidad	Frecuencia relativa
$\mu$	$\bar{x}$
$\sigma$	$s$



# PROCESO DE VALIDACION





## Cálculos estadísticos simples:

A) Medida de la dispersión:

Expresión cuantitativa de la precisión.

Desviación estándar

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

n-1 grados de libertad

*TENER EN CUENTA!:* Para el cálculo de parámetros estadísticos en microbiología los datos se deben pasar a logaritmo en base 10 para normalizar la distribución.

*Calculadora: log10*

*Excel: LOG10*



## Ejercicio A:

Para validar un método:

- Tres analistas realizaron por quintuplicado **una misma muestra**.
- Dicha muestra es un material de referencia de Ensayo de Aptitud. **Valor asignado (log ufc/ml) : 4.26**

Personal técnico	Rdo 1 ufc/ml	Rdo 2 ufc/ml	Rdo 3 ufc/ml	Rdo 4 ufc/ml	Rdo 5 ufc/ml
Analista 1	40.000	41.000	39.000	35.000	42.000
Analista 2	38.000	37.000	36.000	32.000	35.000
Analista 3	45.000	48.000	50.000	51.000	47.000





## Ejercicio A (cont):

Se quiere estimar:

- ✓ La desviación estándar repetibilidad (DESVEST o  $\sigma_{n-1}$ ).
- ✓ La desviación estándar reproducibilidad entre analistas.
- ✓ Sesgo.

Personal técnico	Rdo 1 Log ufc/ml	Rdo 2 Log ufc/ml	Rdo 3 Log ufc/ml	Rdo 4 Log ufc/ml	Rdo 5 Log ufc/ml
Analista 1	4.60	4.61	4.59	4.54	4.62
Analista 2	4.58	4.57	4.56	4.51	4.54
Analista 3	4.65	4.68	4.70	4.71	4.67



## Ejercicio A (cont):

Paso 1: Calculamos el promedio de los valores obtenidos por el analista 1.

<b>1</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>
<b>2</b>							<b>Promedio</b>
<b>3</b>	Analista 1	4.60	4.61	4.59	4.54	4.62	= promedio (C3:G3)
<b>4</b>	Analista 2	4.58	4.57	4.56	4.51	4.54	
<b>5</b>	Analista 3	4.65	4.68	4.70	4.71	4.67	



## Ejercicio A (cont):

Paso 2: Con la desviación estándar de sus replicados, estimamos la repetibilidad del Analista 1. (celda I3)

1	B	C	D	E	F	G	H	I
2							Promedio	Desv. St (s)
3	Analista 1	4.60	4.61	4.59	4.54	4.62	<b>4.59</b>	=DEVEST(C3:G3)
4	Analista 2	4.58	4.57	4.56	4.51	4.54		
5	Analista 3	4.65	4.68	4.70	4.71	4.67		



## Ejercicio A (cont):

Paso 3: Con la desviación estándar de sus replicados, estimamos la repetibilidad del Analista 1. (celda I3)

<b>1</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>
<b>2</b>							Promedio log ufc/ml	Desv. St (s) log ufc/ml
<b>3</b>	Analista 1	4.60	4.61	4.59	4.54	4.62	<b>4.59</b>	<b>0.03</b>
<b>4</b>	Analista 2	4.58	4.57	4.56	4.51	4.54		
<b>5</b>	Analista 3	4.65	4.68	4.70	4.71	4.67		



## Ejercicio A (cont):

Paso 4: Copiando las celdas hacia abajo, calculamos lo mismo para el analista 2 y 3.

1	B	C	D	E	F	G	H	I
2							Promedio log ufc/ml	Desv. St (s) log ufc/ml
3	Analista 1	4.60	4.61	4.59	4.54	4.62	<b>4.59</b>	<b>0.03</b>
4	Analista 2	4.58	4.57	4.56	4.51	4.54	↓	↓
5	Analista 3	4.65	4.68	4.70	4.71	4.67	↓	↓



## Ejercicio A (cont):

Paso 5: Obtenemos el Sr para el analista 1, 2 y 3. (columna I)

<b>1</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>
<b>2</b>							<b>Promediolog ufc/ml</b>	<b>Desv. St (s) log ufc/ml</b>
<b>3</b>	<b>Analista 1</b>	4.60	4.61	4.59	4.54	4.62	<b>4.59</b>	<b>0.03</b>
<b>4</b>	<b>Analista 2</b>	4.58	4.57	4.56	4.51	4.54	<b>4.55</b>	<b>0.03</b>
<b>5</b>	<b>Analista 3</b>	4.65	4.68	4.70	4.71	4.67	<b>4.68</b>	<b>0.02</b>



## Ejercicio A (cont):

### Paso 6: Cálculo Sr

Una vez estimada la desviación estándar repetibilidad de todos los analistas

Calcular una **estimación global de la desviación estándar repetibilidad.**

Promediamos cuadráticamente las estimaciones de repetibilidad de los analistas:

$$Sr = \sqrt{\frac{sr_1^2 + sr_2^2 + sr_3^2}{3}}$$

**En Excel: Sr= raiz( suma.cuadrados (I3:I5)/3)**

Resultado Sr global (log ufc/ml):0.03

# Ejercicio A (cont):



Paso 7: Estimar la reproducibilidad entre analistas.

1	B	C	D	E	F	G	H	I
2							<b>Promedio</b> log ufc/ml	<b>Desv. St</b> (s) log ufc/ml
3	Analista 1	4.60	4.61	4.59	4.54	4.62	<b>4.59</b>	<b>0.03</b>
4	Analista 2	4.58	4.57	4.56	4.51	4.54	<b>4.55</b>	<b>0.03</b>
5	Analista 3	4.65	4.68	4.70	4.71	4.67	<b>4.68</b>	<b>0.02</b>
6						<b>Sr</b>		<b>0.03</b>
7						<b>SR</b>	<b>0.07</b>	





## Ejercicio A (cont):

Paso 7: Estimar la reproducibilidad entre analistas.

SR entre analistas = **desviación estándar  
entre los promedios de cada analista**

**EN EXCEL  
SR = DESVEST (H3:H5)**

# Repetibilidad (r) y Reproducibilidad (R)



$$r = 2.8 \times S_r$$

$$R = 2.8 \times S_R$$

S<sub>r</sub>: desviación estándar repetibilidad.

S<sub>R</sub>: desviación estándar reproducibilidad.



## Ejercicio A (cont):

Paso 8: Estimamos el sesgo del laboratorio.

Calculo el promedio de los 3 analistas:

$$\text{Promedio: } \frac{4.59 + 4.55 + 4.68}{3} = 4.61$$

Excel: Promedio (H3:H5)

**SESGO = Promedio lab- valor asignado**

$$\text{SESGO} = 4.61 - 4.26 = 0.35$$



## Conclusiones del ejercicio A

De la experiencia realizada obtuve:

- ✓  $S_r$  (log ufc/ml): 0.03
- ✓  $S_R$  (log ufc/ml): 0.07
- ✓ Sesgo (log ufc/ml): 0.35

Evalúo la aptitud del laboratorio para el ensayo teniendo en cuenta los valores límites.

Obtengo muchos resultados como estos, para diferentes muestras de la misma matriz, los analizo y calculo los valores límites para estos parámetros.



**CALCULO DE INCERTIDUMBRE**

# Ejemplo B: Cálculo de $r$ y $R$ con valores obtenidos en forma periódica

*Uso de datos históricos a partir de*  
**INTRALABORATORIOS**



Fecha	Analistas	x1(ufc/g)	x2(ufc/g)
13-Sep	1	40000	45000
13-Sep	2	42000	40000
10-Oct	.	160000	150000
.	.	.	.
.	.	.	.
2-Jun	1	69000	72000
2-Jun	2	82000	80000

## Ejemplo B: Cálculo de r y R con valores obtenidos en forma periódica (cont)



$$Sr^2 = \Sigma (\text{diferencia entre duplicados})^2 / 2n$$

n: número de pares de duplicados

$$Sr = \sqrt{Sr^2}$$

$$SR^2 = \Sigma (\text{diferencias de los duplicados entre analistas})^2 / 2n$$

$$SR = \sqrt{SR^2}$$



## TEST DE HIPOTESIS

*PERMITE DECIDIR, CON DETERMINADO NIVEL DE SIGNIFICACIÓN  $\alpha$ , SI UNA HIPOTESIS ESTABLECIDA ES VERDADERA O FALSA*

*DADA UNA HIPÓTESIS ESTADÍSTICA EXISTE SIEMPRE OTRA COMPLEMENTARIA, DE MODO QUE SI UNA ES VERDADERA LA OTRA ES FALSA.*



## TEST DE HIPOTESIS (cont)

$\alpha$  es la *Probabilidad de cometer un error de tipo I* o sea **decidir rechazar la hipótesis cuando es verdadera.**

*Se toma una muestra aleatoria y se estiman parámetros (estadísticos) de modo de decidir si la Hipótesis si nula es verdadera o falsa.*





## Ejercicio C:

Para validar un método:

Se analiza por quintuplicado **una misma muestra por el método a validar y por un método de referencia.**

<b>Método 1 a validar ufc/g</b>	<b>Método 2 <i>Referencia</i> ufc/g</b>	<b>Método 1 a validar log ufc/g</b>	<b>Método 2 <i>Referencia</i> log ufc/g</b>
2000	2100	3,30	3,32
1800	2200	3,26	3,34
1900	2300	3,28	3,36
1800	2100	3,26	3,32
2100	2200	3,32	3,34
	<b>Prom</b>	3,28	3,34
	<b>S</b>	0,03	0,02



## Ejercicio C (cont):

Se quiere estimar:

1) Determinar si hay diferencias en la precisión entre ambos métodos.

2) Comparar las medias de método a validar y referencia.  
(comparar si el sesgo entre los dos métodos es significativo)

✓ Es correcto aplicar  $F$  y  $t$  cuando los valores tienen una distribución normal.



## Ejercicio C (cont):

1) Evalúo diferencias en la precisión (comparo la precisión) entre ambos métodos 1 y 2.

**Excel: Herramientas – Análisis de Datos - Prueba de F para varianzas de dos muestras.**

Uso  $\alpha=0.05$

Prueba F para varianzas de dos muestras

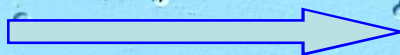
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
<b>Media</b>	3,28250958	3,338202357
<b>Varianza</b>	0,000854423	0,000274997
<b>Observaciones</b>	5	5
<b>Grados de libertad</b>	4	4
<b>F</b>	3,107028678	→ Estadístico
<b>P(F&lt;=f) una cola</b>	0,148984879	
<b>Valor crítico para F (una cola)</b>	6,388233942	→ Valor límite



## Ejercicio C (cont):

1) Evalúo diferencias en la precisión entre ambos métodos

$$F < 6.39$$



### Conclusiones:

NO se observa diferencia significativa entre la varianza de los dos métodos con un  $\alpha=0.05$



## Ejercicio C (cont):

2) Compara las medias de método a validar y de referencia

**Excel: Herramientas – Análisis de Datos - Prueba de t para de dos muestras suponiendo varianzas iguales.**

Uso  $\alpha=0.05$

	Variable 1	Variable 2
Media	3,28250958	3,338202357
Varianza	0,000854423	0,000274997
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	0,00056471	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
<b>Estadístico t</b>	-3,70558032	<b>Estadístico</b>
P(T<=t) una cola	0,002997154	
Valor crítico de t (una cola)	1,85954832	
P(T<=t) dos colas	0,005994308	
<b>Valor crítico de t (dos colas)</b>	2,306005626	<b>Valor límite</b>



## Ejercicio C (cont):

2) Evalúo diferencias en las medias entre ambos métodos

$$|t| > 2.31 \quad \longrightarrow$$

t para dos cola se usa en valor absoluto.

### Conclusiones:

Por este test estadístico se observa diferencia significativa entre la medias de los dos métodos con un  $\alpha=0.05$ .

*Sin embargo desde el punto de vista microbiológico*

- Las diferencias entre las media de 3.28 y 3.34 no son importantes.*
- Evalúo teniendo en cuenta la incertidumbre. Veo si las diferencias entre medias es menor a la incertidumbre asignada al método de referencia.*



## Correlación de métodos: regresión lineal.

- Cálculo de  $s_{y,x}$  y  $r$ .

A partir de los datos se construye una curva de cuadrados mínimos.

$r$  = coeficiente de correlación mide *el grado de linealidad*



## Ejercicio C:

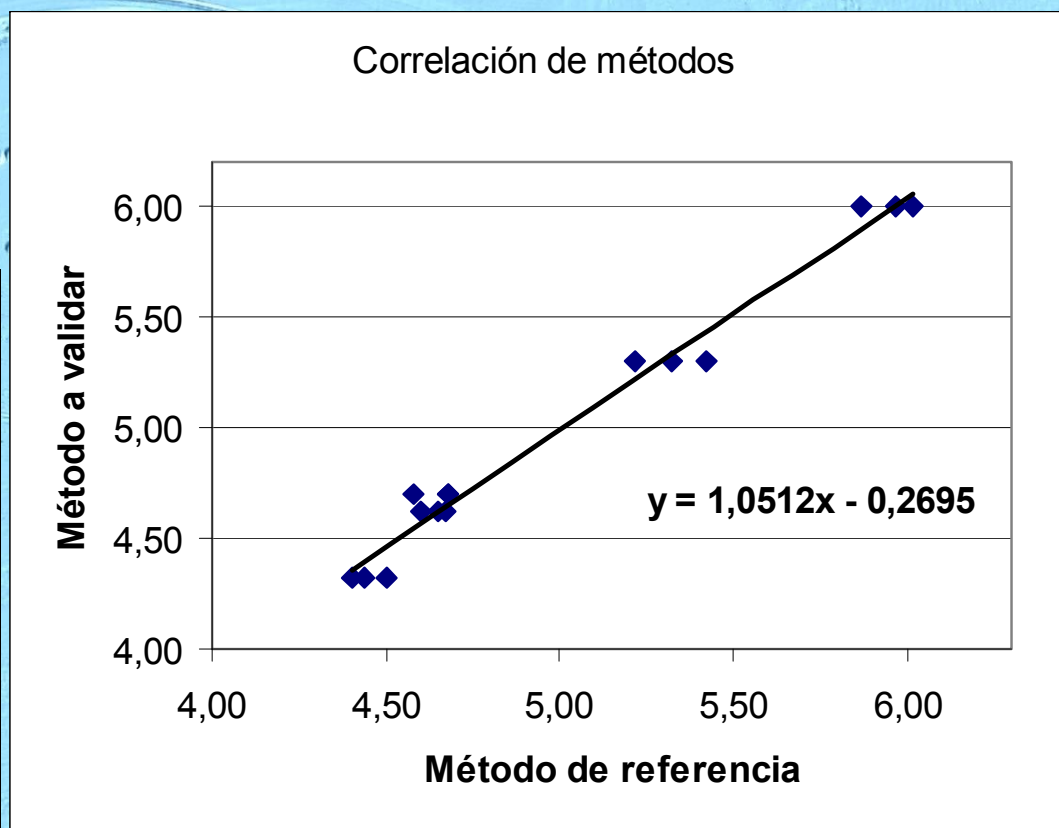
**Excel ERROR.TIPICO.xy**

**Syx = 0.09**

**Excel COEF.DE.CORREL**

**r= 0.99**

Método de referencia log ufc/ml	Método a validar log ufc/ml
4,50	4,32
4,60	4,62
4,58	4,70
5,42	5,30
5,87	6,00
4,40	4,32
4,65	4,62
4,68	4,70
5,32	5,30
5,97	6,00
4,44	4,32
4,67	4,62
4,68	4,70
5,22	5,30
6,02	6,00







## Síntesis final

A lo largo de esta clase hemos visto algunas formas de usar la estadística para validar métodos.

Sabemos que contamos en el laboratorio con herramientas estadística que nos permiten evaluar los datos obtenidos a partir de los métodos y tomar decisiones acerca de ellos.

Luego ejercitaremos en grupo dichas herramientas.



**NOS MERECEMOS UN DESCANSO**