

LINEAMIENTOS TÉCNICOS PARA EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO VERSIÓN 02

Componente: Anexo 02 Evaluación métodos microbiológicos de Número Más probable (NMP)

SUBDIRECCIÓN DE GESTIÓN DE CALIDAD DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA

DIRECCIÓN DE REDES EN SALUD PÚBLICA

Elaborado por: Jeannette Cristina Forero - Diana Patricia Martínez. Profesionales DRSP

Revisado por: Esther Cristina Barros, Ángela Coronado, Responsables Técnicos Grupos INS
Microbiología

Aprobado por: Claudia Llerena Polo – Directora Técnica (E) RSP

Diciembre 2018

2. INTRODUCCIÓN

Los lineamientos que se aportan en este documento corresponden los lineamientos para evaluar las características de desempeño de los métodos de Número Más Probable (NMP), en coherencia con las recomendaciones de organismos de reconocida competencia técnica.

Es importante tener en cuenta que en algunos casos las opciones de abordaje se extractan de versiones bibliográficas diferentes a la vigente; sin embargo, a la luz de la practicidad y aplicabilidad, siguen siendo excelentes alternativas para el análisis de datos; en cualquier caso, queda a criterio del usuario de este documento, el aporte de valor a sus propios esquemas.

Por lo anterior, los criterios que se aportan en este documento recopilan las recomendaciones emitidas en la bibliografía y se enriquecen con las experiencias de evaluación de métodos que se han llevado a cabo en el Instituto Nacional de Salud, como parte de los procesos de acreditación de ensayos y el fortalecimiento de los esquemas de aseguramiento de la validez del resultado.

3. OBJETIVO DEL LINEAMIENTO

Presentar criterios orientativos que permitan a los Laboratorios de Salud Pública planificar y desarrollar ejercicios de evaluación de métodos de ensayo de número más probable (NMP).

4. ALCANCE DEL LINEAMIENTO

Los criterios de evaluación de carácter cualitativo y cuantitativo para Métodos Número Más probable (NMP) aplicados para determinar la calidad del agua para consumo humano.

5. DEFINICIONES ESPECÍFICAS

- **Características de categoría:** característica de funcionamiento de un método, expresada numéricamente en forma de frecuencia relativa basada en una clasificación P/A o +/- [UNE-EN-ISO 13843]
- **Detector:** placa de matriz sólida o tubo de líquido que contiene un medio nutritivo para el recuento o detección de partículas biológicamente activas [UNE-EN-ISO 13843]
- **Distribución homogénea de Poisson:** distribución completamente aleatoria de cantidades de partículas cuando se muestrea una suspensión perfectamente mezclada [UNE-EN-ISO 13843]

NOTA — La probabilidad, $P(k)$, de observar en una porción de ensayo, cuya media es igual a λ , exactamente k unidades, se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$P(k) = \frac{u^k}{k!} e^{-u}$$

- **Exclusividad:** cepas no target que pueden ser potencialmente interferentes y no deben ser detectadas por el método. [AOAC Appendix J].
- **Inclusividad:** cepas o aislamientos target que el método puede detectar. [AOAC Appendix J].
- **Límite de Detección:** Valor medido, obtenido mediante un procedimiento de medida dado, con una probabilidad β de declarar erróneamente la ausencia de un constituyente en un material, dada una probabilidad α , de declarar erróneamente su presencia. [VIM 2012]

NOTA 1 — La IUPAC recomienda por defecto los valores de α y β iguales a 0,05.

NOTA 2 — En inglés algunas veces se usa la abreviatura LOD.

NOTA 3 — No debe utilizarse el término “sensibilidad” en lugar de “límite de detección”

Número de partículas x por porción analítica donde la probabilidad p_0 de un resultado negativo es igual al 5%. Probabilidad de un resultado positivo $p_{(+)} = 1 - p_0$. [GTC 84].

- **Material de referencia interno (IRM - in house reference material):** sustancia o material no certificado producido por un laboratorio, del cual los valores de una o más de sus propiedades son suficientemente homogéneas y bien establecidas como para utilizarse para la validación [ISO 16140-1].
- **Nivel de detección:** concentración mínima de organismos que producen evidencia de crecimiento con una probabilidad de $P = 0,95$, cuando se inoculan en un medio de cultivo específico y se incuban en condiciones definidas [UNE-EN-ISO 13843]

NOTA — El nivel teórico conforme a esta definición es una media de tres células viables en un volumen de inóculo.

- **Porción analítica;** porción de ensayo: volumen de suspensión de partículas (muestra) inoculado en una unidad de detección (placa de agar, filtro de membrana, tubo de ensayo, porta cuadrado para microscopía). [UNE-EN-ISO 13843]
- **Proporcionalidad:** Correspondencia de los recuentos de partículas efectuados con el volumen (o la dilución) de una serie de porciones analíticas, a partir de una suspensión de raíz común. [UNE-EN-ISO 13843]

NOTA — La proporcionalidad se calcula para una evaluación estadística como el coeficiente de ajuste logarítmico estadístico, G_2 , con $n-1$ grados de libertad.

- **Recuperación:** término general utilizado para el número de partículas estimado en una porción de ensayo o una muestra, asumiendo que hay un número real de partículas (aunque sea desconocido) del cual la metodología empleada “recupera” un 100% o menos. [UNE-EN-ISO 13843]

- **Serie de detección:** Combinación de placas o de tubos sobre los que está basada la estimación cuantitativa de la concentración microbiológica de la muestra.

NOTA — La serie de detección es el conjunto de placas o tubos utilizados para la estimación numérica de un único valor.

EJEMPLO Placas paralelas de una suspensión, placas de diluciones consecutivas, sistema por NMP de 3 x 5 tubos, microplaca.

- **Desviación estándar operativa relativa, u_0 :** variabilidad operativa, expresada como una incertidumbre estándar relativa, asociada a las etapas técnicas del procedimiento operativo de análisis.

NOTA — La desviación estándar operativa relativa se expresa frecuentemente en forma de porcentaje.

- **Varianza operativa relativa, u_0^2 :** constante de sobredispersión, el cuadrado de la desviación estándar operativa relativa.
- **Desviación estándar relativa, u_{rel} :** estimación de la desviación estándar de una población para una muestra de n resultados dividida por la media de dicha muestra.
- **Varianza relativa, u_{rel}^2 :** cuadrado de la desviación estándar relativa.

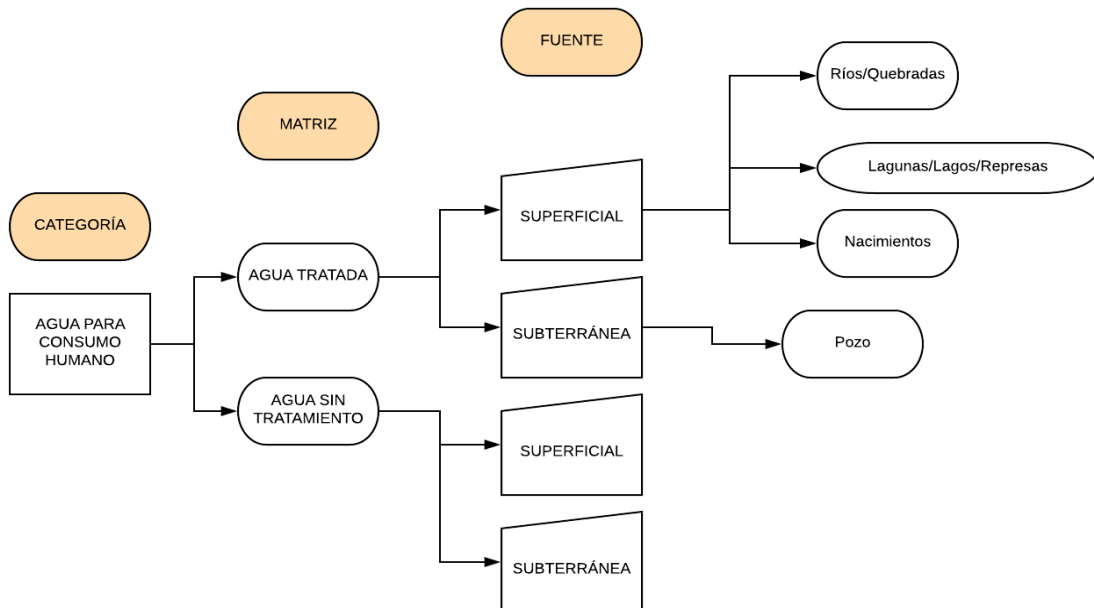
6. GENERALIDADES

- Las actividades de evaluación de método deben realizarse sobre muestras naturales o, en su defecto, con muestras fortificadas, preferiblemente no esterilizadas para que exista microbiota interferente. Si se incluye la categoría de agua superficial para preparar el material enriquecido por adición, las muestras deben proceder de tres orígenes, como mínimo. [UNE-EN-ISO 13843]
- En los casos en que sea necesario **fortificar o adicionar** las muestras incluidas en el estudio de evaluación se deben tener cuenta lineamientos frente a estandarización del inóculo para llevar a cabo el proceso de estandarización requerido. Sin embargo, independiente de la metodología escogida para el proceso esta debe referenciarse en el respectivo diseño experimental del ejercicio.
- Para el análisis de datos es necesario tener claridad que las pruebas estadísticas de estimación y contraste frecuentemente empleadas se basan en suponer que se ha obtenido una muestra aleatoria de una distribución de probabilidad de tipo normal o de Gauss. En muchas ocasiones esta suposición no resulta válida, y en otras la sospecha de que no sea adecuada no resulta fácil de comprobar, por tratarse de muestras pequeñas. En estos casos se dispone de dos posibles mecanismos [GTC 84]
 - Los datos se pueden transformar de tal manera que sigan una distribución normal, por ejemplo, la transformación a Log_{10} y Ln aplicable a los recuentos y estimación de densidad poblacional en métodos microbiológicos.

- Aplicar pruebas estadísticas que no se basan en ninguna suposición en cuanto a la distribución de probabilidad a partir de la que fueron obtenidos los datos, y por ello se denominan pruebas no paramétricas (distribución free), mientras que las pruebas que suponen una distribución de probabilidad determinada para los datos se denominan pruebas paramétricas.

7. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS A INCLUIR EN EL PANEL DE EVALUACIÓN

Según la aplicación del método y en el marco de la vigilancia de la calidad del agua, se debe considerar la inclusión de muestras representativas del agua para consumo humano. De manera general se pueden agrupar en las siguientes categorías:



Idealmente se deben trabajar muestras “naturalmente” contaminadas; sin embargo, para los estudios de veracidad se hace necesario “fortificar” muestras con concentraciones conocidas del mensurando target; es ideal trabajar como mínimo, niveles bajos (por encima del límite de cuantificación del método) y niveles medios. Si se realiza inclusión de niveles altos de concentración, se debe tener especial cuidado en que se pueda obtener un resultado dentro de los establecidos en las tablas de NMP asociadas al método.

8. TAMAÑO DE MUESTRA

Según la jerarquía del método adoptado, se presentan a continuación las alternativas de tamaño de muestra para el ejercicio, las cuales deben aplicarse de manera equivalente para muestras que contengan el mensurando target y muestras que no lo contengan.

- **Método normalizado o de fabricante avalado por organismo normalizador.** Se debe procesar un número de veinte muestras como mínimo procedentes de distintos orígenes [[UNE-EN-ISO 13843], es decir, representativas de las categorías de matrices sobre las cuales se aplica el método de manera rutinaria.
- **Método no normalizado del fabricante**
 - **Verificación de un método del fabricante con soporte robusto de validación primaria:** cuando el fabricante suministra información de estudios internos y externos aplicados al método utilizando un tamaño de muestra superior a 30 muestras procesadas, se asume una evaluación robusta de desempeño del método. En estos casos se establece procesar mínimo un $n \geq 33$ de muestras positivas y un equivalente de muestras negativas; este tamaño de muestra permite tener un número de datos estadísticamente válido para inferir el comportamiento de una población y adicionalmente suministra un margen razonable (10%) para sustracción de datos atípicos.
 - **Verificación de un método del fabricante sin soporte robusto de validación primaria:** cuando el fabricante suministra información de estudios internos y externos aplicados al método con un tamaño de muestra inferior a 30 muestras procesadas, no se puede tener certeza del nivel de robustez con el cual se desarrolló la validación primaria, por tanto, es prudente adoptar criterios más estrictos para evaluar el método. En estos casos se establece procesar mínimo un $n \geq 55$ de muestras positivas y un equivalente de muestras negativas, adoptando el criterio detallado en el documento CLSI EP12 A2 e incluyendo un margen razonable (10%) para sustracción de datos atípicos.
 - **Validación de modificación de un método del fabricante:** en algunos casos específicos y mediando una justificación técnicamente válida, puede ser necesario ajustar una variable en el proceso de ejecución del método (por ejemplo, esquemas de mezcla de muestra, número de réplicas, etc.). Para realizar una evaluación del impacto de la modificación implementada, se debe trabajar un tamaño de muestra estadísticamente representativo (mínimo un $n=33$), el cual debe idealmente ser procesado en condiciones de precisión intermedia (cambio de día y/o analista) y enfocado a evaluar el cambio a evaluar.

9. PARÁMETROS A EVALUAR

9.1. Inclusividad y Exclusividad [AOAC Appendix J]

- Los ensayos se realizan directamente con las cepas aisladas directamente por el LSP, custodiadas y manejadas en el cepario de acuerdo con los lineamientos correspondientes construidos para este fin.
- Para el caso en que se utilicen medios de cultivo preparados en el LSP, estos deben ser evaluados de acuerdo con criterios adecuados que pueden incluir ensayos de productividad, selectividad, rendimiento y esterilidad.

- Para cada cepa utilizada en la evaluación, debe ser reportada la fuente que documenta la caracterización y método (s) utilizados para determinar la identidad. Esta información debe ser incluida en los soportes que acompañan el diseño de validación o verificación.
- Para el estudio de inclusividad la fase de recuperación de las **cepas target** debe incluir cualquier fase de pre-enriquecimiento o enriquecimiento según aplique al método de ensayo bajo estudio. De igual forma si incluye una etapa de confirmación adicional, esta debe realizarse para las cepas seleccionadas.
- Para el estudio de exclusividad las cepas deben ser recuperadas en un medio **no** selectivo en la fase de aislamiento con el fin de ser probadas en los medios selectivos correspondientes. Si el método supone realizar un pre-enriquecimiento y/o enriquecimiento antes de la etapa de detección este debe ser aplicado según establezca el método bajo estudio.
- La evaluación de inclusividad y exclusividad debe ser desarrollada en forma simultánea; los aislamientos deben ser codificados aleatoriamente asegurando que los analistas no puedan conocer la identidad de los microorganismos bajo prueba.
- Para la evaluación de inclusividad y exclusividad se debe procesar al menos 10 cepas target y no target respectivamente. El inóculo a emplear corresponde a suspender una colonia (tomada con asa de 10 µl) en 100 ml de matriz seleccionada para trabajar el ejercicio experimental.
- Analizar los datos de inclusividad y exclusividad para la identificación correcta, identificación errónea y organismos no identificados. Los datos se informan como número de cepas correctamente identificadas.
- El informe del estudio debe incluir los resultados obtenidos asociados a la información de las cepas probadas, su origen y características esenciales más el resultado de caracterización inicial.
- El informe consolidado del estudio debe considerar lo siguiente:

PANEL DE INCLUSIVIDAD / EXCLUSIVIDAD							
Inclusividad (cepas target / objeto de estudio)							
Microorganismo		Serotipificación u otro método de confirmación adicional (Cuando aplica)	Tipo de material de control (MRC-MR-MQC)	Resultado de la prueba (Identificación o ausencia de crecimiento)	Conclusiones del estudio Identificación		
Género	Especie				Correcta	Incorrecta	Observaciones
1							
...							
n							
Exclusividad (cepas no target / no objeto de estudio)							
1							
...							
n							

- El criterio de aceptación para esta fase de evaluación teóricamente debe corresponder al 100% de identificaciones correctas para el parámetro de inclusividad y 0% de detección para el parámetro de exclusividad. Sin embargo, adicionalmente debe realizar correlación frente al comportamiento de los parámetros de sensibilidad y especificidad respectivamente.

9.2. Identidad / Selectividad [IDEXX]

Es necesario establecer que la señal producida en la etapa de medición se debe únicamente al analito (mensurando) y no a la presencia de algo química o físicamente similar o que surja como una coincidencia; esta es la confirmación de la identidad. La selectividad (especificidad) es atributo del método que garantiza la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias. Es bastante difícil establecer que nada interfiere ya que siempre existe la posibilidad de encontrar alguna interferencia no reconocida hasta el momento [EURACHEM - AEF].

A partir de los cultivos de muestras naturalmente contaminadas o fortificadas, se debe realizar un porcentaje de aislamientos tras la incubación de los tubos o dispositivos del fabricante, seleccionando para siembra en medios selectivos y posterior confirmación de identificación. Con el fin de tener una evaluación representativa se debe procesar un $n \geq 33$ distribuido como se detalla a continuación:

- 11 aislamientos de tubos o celdas de reacción que muestren reacción positiva para coliformes totales, de tal forma que se propenda por la inclusión de la gamma de reacciones posibles.
- 11 tubos o celdas de reacción que muestren reacción positiva para *E. coli* o coliformes fecales, de tal forma que se propenda por la inclusión de la gamma de reacciones posibles.
- 11 tubos o celdas de reacción que muestren reacción negativa.

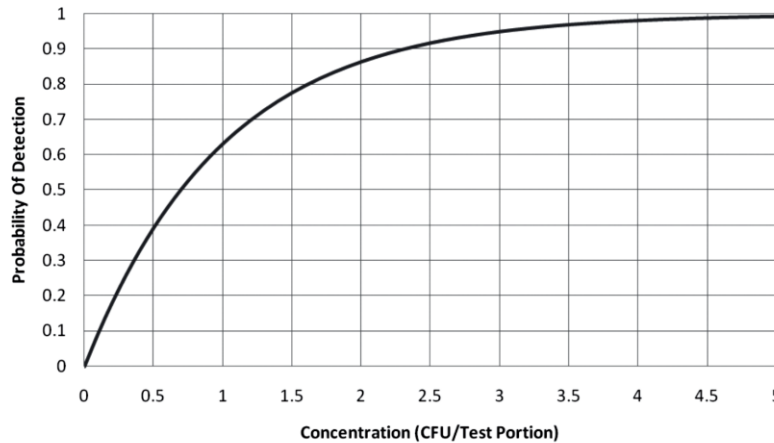
Determinar mediante tabla de contingencia 2 x 2 los porcentajes de sensibilidad, selectividad (especificidad) estimadas y las correspondientes tasas de falsos positivos y negativos, basados en las confirmaciones bioquímicas de los microorganismos aislados.

9.3. Límite de detección (LOD) [AOAC Appendix F – Appendix H]

Los límites de trabajo confiables se pueden inferir para los métodos microbiológicos desde las especificaciones de los métodos en cuanto a **rangos confiables** para el recuento. Para determinar el LOD se deben aplicar los siguientes criterios:

- En esta herramienta el parámetro se evalúa sobre la probabilidad de que el método detecte al menos 1 unidad formadora de colonias (ufc) en la porción de muestra de ensayo.
- Para la estimación de los parámetros la herramienta utilizada es el POD Program la cual se encuentra disponible en el link <http://www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/professoren/wilrich/index.html> de la Freie Universität Berlin. Dado que el programa es frecuentemente actualizado, se sugiere verificar la versión vigente al momento del uso de la herramienta.
- La estrategia de análisis corresponde combinar sensibilidad, especificidad, falsos positivos y falsos negativos en un parámetro único, equivalente a la probabilidad de detección (POD), que cubre todos los rangos de concentración, tanto cero como distinto de cero. Este modelo simplificado permite comparar probabilidades de detección del método

a través de las concentraciones y además permite representar los datos de validación/verificación como una curva POD graficada por concentración frente a la probabilidad asociada [Adaptado AOAC Appendix H].



Fuente AOAC Appendix H

- La herramienta permite obtener la Probabilidad de detección (POD) 50% (POD_{50%}) y 95% (POD_{95%}) asociada a sus intervalos de confianza al 95%.

9.4. Límite de cuantificación (LOQ)

- El límite de cuantificación se determina a partir del rango de concentración en que la curva de probabilidad de detección (POD) marque un 100% de detección.
- Se debe realizar una confirmación gráfica mediante la confrontación del rango de concentración vs la precisión en unidades logarítmicas base 10 / veracidad en porcentaje de recuperación, con el fin de verificar el rango a partir del cual se obtienen resultados con precisión y veracidad de manera consistente.
- El criterio de precisión se define en términos de rango (diferencia entre réplicas) y corresponde al establecido en SM 9020 (ver ítem Precisión del presente documento) y el de veracidad se define respecto al porcentaje de recuperación esperado y los intervalos de confianza asociados al NMP promedio (ver ítem de veracidad del presente documento).

9.5. Efecto Matriz [AOAC Appendix J - FAO 2013]

Por principio el ejercicio de evaluación tendrá como uno de sus objetivos evaluar el comportamiento del método en las diferentes matrices aplicables. Sin embargo, si se decide que dicha aplicación sea gradual o si se identifica la necesidad de trabajar el método con matrices fundamentalmente diferentes a las incluidas, se debe valorar el efecto que la matriz puede tener sobre el resultado de ensayo la siguiente herramienta de cálculo de los porcentajes de recuperación en muestras fortificadas así:

- El estudio de efecto matriz debe ser conducido en un día de análisis, procesando simultáneamente las matrices objeto de estudio.
- Si el ensayo tiene por objeto la detección de más de un microorganismo target, se deben estructurar categorías que permitan la evaluación simultánea de los mismos en las matrices alcance del estudio/ensayo.
- Se debe realizar la valoración del efecto matriz para la recuperación del microorganismo target para cada matriz que se incluya en el alcance del método.
- Se preparan inóculos de concentraciones baja y media, con los cuales se fortifican las matrices a evaluar, procesando cinco (5) réplicas para cada concentración.
- Es válido realizar el análisis de efecto matriz desde los datos obtenidos en la fase de evaluación del Límite de Detección/Límite de cuantificación, tomando los datos generados a partir los dos rangos de concentración equivalentes o superiores al límite de cuantificación.
- Se evalúa el porcentaje de recuperación promedio (ver ítem de veracidad del presente anexo) de conformidad con los criterios de aceptación establecidos para la metodología de análisis y/o los establecidos previamente en la validación o verificación del método, esto en caso de incorporar una nueva matriz en el alcance de aplicación. Esta evaluación permite determinar si existe o no un efecto de la matriz que impacte negativamente la recuperación del microorganismo target.
- Realizar la comparación de los resultados transformados en logaritmo base 10 obtenidos mediante la herramienta de ANOVA de un factor para verificar que no existen diferencias significativas entre las medias asociadas a cada matriz.

9.6. Precisión

Método GTC 84 / UNE-EN-ISO 13843 – Criterio de precisión

La precisión de los resultados en NMP depende del recuento mismo, pero de una manera un poco más complicada que la del recuento de colonias. La desviación estándar del registro de NMP es una curva ondulatoria. Tienen tanto elementos mínimos locales como niveles de dilución existentes en el conjunto de detección. [GTC 84/ UNE-EN-ISO 13843].

Para la estimación de precisión se adopta la fórmula de Cochran [GTC 84/ UNE-EN-ISO 13843] en la cual el cálculo se realiza en escala logarítmica y depende del número de tubos/pozos (n) y del factor de dilución (f) entre diluciones consecutivas.

Fórmula para diluciones décuplas:

$$s_{\log NMP} = 0,58 \sqrt{\frac{\log f}{n}}$$

Fórmula para dilución menor a 10:

$$S_{\log \text{NMP}} = 0,55 \sqrt{\frac{\log f}{n}}$$

Método Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [SM 9020]

- Procesar duplicados de las muestras incluidas en el panel de validación/verificación las cuales deben corresponder mínimo 15 muestras para cada matriz/analista participante en el ejercicio.
- Las muestras a incluir deben ser positivas idealmente; dicha condición debe asegurarse mediante una caracterización histórica o por fortificación a una concentración superior al límite de cuantificación del método (rango estimado), propendiendo por cubrir el intervalo de aplicación del método en las muestras rutinarias.
- Registrar los duplicados D_1 y D_2 y calcular el logaritmo base 10 de cada resultado. En casos excepcionales y si el resultado de una muestra naturalmente contaminada que se esperaba diera positiva arroja un resultado <1 , reemplazar por 1 para el cálculo del logaritmo.
- Calcular el rango R de cada par de duplicados transformados y la media de dichos rangos \bar{R} .
- El criterio de precisión corresponde a:

$$\bar{R} = \frac{\sum R_{\log}}{n}$$

$$\text{Criterio de precisión} = 3.27 * \bar{R}$$

9.7. Veracidad

Porcentaje de recuperación [SM 9020]

Permite evaluar la cantidad de microorganismo target que el método de prueba es capaz de recuperar cuando una matriz es inoculada con un número conocido de microorganismos. Para realizar el análisis se deben **fortificar** o **adicionar** muestras naturales, a las cuales por principio se les debe caracterizar su contenido inicial de microorganismos target.

- Con los resultados obtenidos de por lo menos seis corridas analíticas montadas por duplicado, se debe calcular la media de la concentración del microorganismo target.
- Realizar el tratamiento requerido de acuerdo con el comportamiento de distribución de los datos, la cual corresponde a transformación en logaritmo base 10.

- Finalmente se debe calcular el porcentaje de recuperación de acuerdo a lo definido por el método o aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Media de la concentración de microorganismo target}}{\text{Concentración de microorganismo inoculada}} \times 100$$

Intervalos de confianza [SM 9020- ISO 9308-2 – BAM]

Para una concentración de microorganismo target, se calcula la media geométrica de los resultados expresados en NMP y posteriormente se confrontan frente a los intervalos de confianza definidos al 95%:

- Para cada rango de concentración incluido en el ejercicio de validación se realiza transformación del dato en logaritmo base 10.
- Se halla la media aritmética de los datos transformados correspondiente a los resultados obtenidos por todos los analistas participantes para **cada** rango de concentración establecido.
- Se halla la media geométrica de los datos transformados obtenidos en el anterior paso, la cual se calcula así:

$$\bar{x}_g = \sqrt[n]{(x_1)(x_2) \dots (x_n)}$$

y

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

Esto es, la media geométrica en NMP es igual al antilogaritmo de la media aritmética de los logaritmos.

- Se establece el cumplimiento de la media geométrica global frente al intervalo de confianza al 95% desde los criterios establecidos en la tabla NMP, de acuerdo a la naturaleza de la categoría de matriz respectiva (agua-ISO 9308-2)

10. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- (1) INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN – ICONTEC. GTC 84:2003 Calidad del agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológicos
- (2) AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION (APHA), THE AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA), AND THE WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23th Edition, 2017.

- (3) ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO), NATIONAL FOOD ADMINISTRATION Science Department – Swedish National Food Agency, SISTEMA INTEGRADO DE LABORATORIOS DE ALIMENTOS (SILA). Curso-Taller: "La Confiabilidad de los Resultados Analíticos para la Calidad e Inocuidad de los Alimentos (Validación, Incertidumbre y Trazabilidad). Validación IV (en línea) <http://sila.achipia.gob.cl/repositorio/curso-taller-la-confiabilidad-de-los-resultados-analiticos-para-la-calidad-e-inocuidad> (consultado en 2017-11)
- (4) ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Appendix J - AOAC: Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. 2012. Disponible en http://www.eoma.aoac.org/app_j.pdf
- (5) ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Appendix F - AOAC: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 2016. Disponible en http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf
- (6) ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Appendix H - AOAC: Probability of Detection (POD) as a Statistical Model for the Validation of Qualitative Methods. 2010. Disponible en http://www.eoma.aoac.org/app_h.pdf
- (7) INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 9308-2:2012. Water quality -- Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria -- Part 2: Most probable number method. (Versión académica)
- (8) IDEXX. Validación del método Colilert®-18/Quanti-Tray® para el recuento de *E. coli* y de bacterias coliformes en muestras de agua. 2008.
- (9) U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION Microbiological Methods & Bacteriological Analytical Manual (BAM) 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. 2017.
- (10) ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN – AENOR. Calidad del agua Requisitos para el establecimiento de las características de Funcionamiento de los métodos microbiológicos cuantitativos (ISO 13843:2017). UNE-EN ISO 13843. 2018
- (11) B. MAGNUSSON, Y U. ÖRNEMARK (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Disponible en www.eurachem.org
- (12) ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA – AEFI. Validación de métodos analíticos. Barcelona, 2001.
- (13) INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 16140-1:2016. Microbiology of the food chain - Method validation -- Part 1: Vocabulary