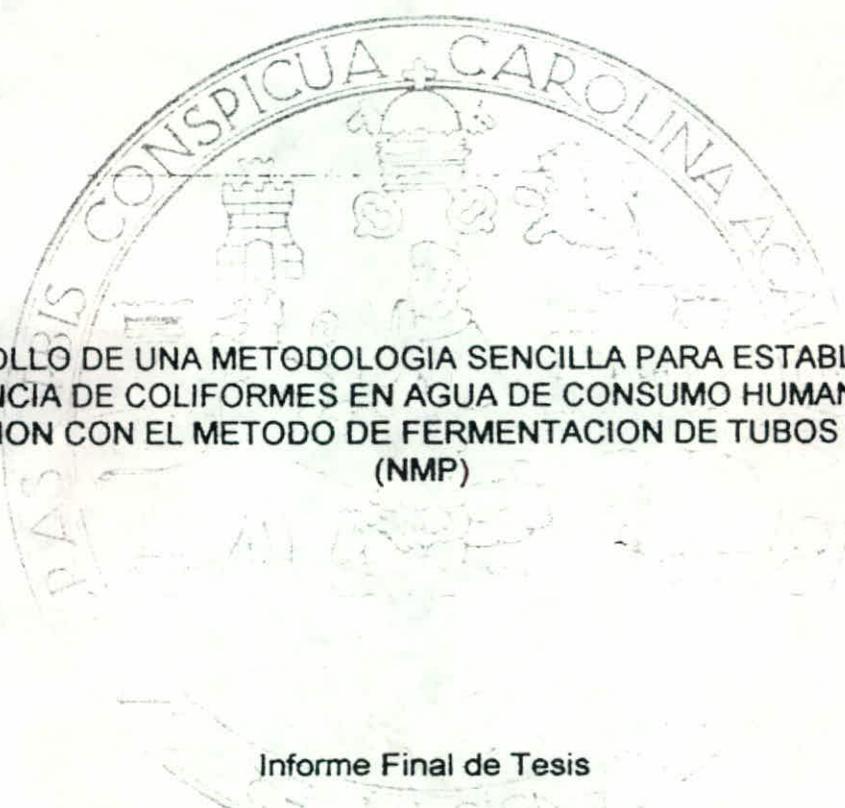


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA SENCILLA PARA ESTABLECER LA
PRESENCIA DE COLIFORMES EN AGUA DE CONSUMO HUMANO Y SU
CORRELACION CON EL METODO DE FERMENTACION DE TUBOS MULTIPLES
(NMP)

Informe Final de Tesis

Presentado Por:

Byanca Rosenda Isabel Ortiz Ruiz

Para optar al Título de

Químico Biólogo

Guatemala. Enero del 2000

DL
06
T(2055)

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANA	LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO
VOCAL II	DR. RUBEN DARIEL VELASQUEZ MIRANDA
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. DAVID ESTUARDO DELGADO GONZALEZ
VOCAL V	BR. ESTUARDO SOLORZANO LEMUS

ACTO QUE DEDICO

A DIOS:

Por brindarme la sabiduría para alcanzar esta meta.

A MIS PADRES:

Jaime Armando Ortiz Méndez †
Quien desde el infinito se goza de mi triunfo

Rosa Yolanda Ruiz de Ortiz
Gracias por el apoyo moral para seguir adelante hoy mi triunfo es para ella
una mínima recompensa a sus esfuerzos y sacrificios

A MIS HERMANOS:

Paola, Jimmy, Pedro Luis y Faustina García
Con cariño y aprecio

A MI ABUELA:

Rosenda Ortiz Paniagua
Con respeto y cariño

A MIS PRIMOS:

Danilo Duarte y Saraí de Duarte
Agradecimientos sinceros por su apoyo incondicional en la
culminación de ésta meta

A MIS TIOS:

Adolfo, Lesbia, Leroy y Paty
Gracias por ser tan bondadosos

A:

Julio Paz Espinoza
Gracias amigo por tu ayuda en todo momento

A MIS AMIGOS:

Ileana, Marielos, Claudia, Maria Elisa, José, Gueidy, Katina, Elda, Javier, Silvia,
Gricelda, Hugo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

A la Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia

Al Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, (INCAP)

Al Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y de Medicamentos,
(LUCAM)

A las Licdas. Floridalma Cano y Teresita Aguilar de Miranda, gracias por su
paciencia y sabias enseñanzas

A la Licda. Olga Torres de Matute

A Luis Rodríguez, Esperanza Bran y Faustina Leiva

A Ana Ruth de Burckhard

A Eugenia Garzaro de Rivas

A Silvia Barrios

A Odilia García de Larios

Al Padre Robert

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2-3
ANTECEDENTES	4- 17
JUSTIFICACION	18 - 19
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y METODOS	21 - 23
METODOLOGIA	24 - 27
RESULTADOS Y DISCUSION	28 - 33
TABLAS DE RESULTADOS	34 - 39
CONCLUSIONES	40
RECOMENDACIONES	41
REFERENCIAS	42 - 48
ANEXOS	49 - 58

1. RESUMEN

Se evaluó un método de campo sencillo para determinar la presencia de coliformes totales en agua para dicho estudio se analizaron un total de 280 muestras de agua referidas al Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y de Medicamentos (LUCAM) y al Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP).

A cada muestra se le determinó el método DAT-PA (disco agua test – presencia ausencia) y el método estándar de Fermentación de Tubos Múltiples (NMP) para validar la prueba.

El método DAT-PA fue evaluado a dos temperaturas: $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ y $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ resultando óptimas para el crecimiento de coliformes totales. Las condiciones de transporte, almacenamiento y estabilidad también fueron evaluadas observándose que tanto la temperatura ambiente y de refrigeración (25°C y 8°C) permiten que la estabilidad del medio se mantenga durante tres meses teniendo el cuidado de no exponerlo a la luz ya que ésta deteriora el disco. Para manejar en forma sencilla la prueba, fue evaluado el uso de bolsas plásticas estériles las cuales permiten que el disco DAT - PA se conserve en óptimas condiciones y al mismo tiempo no ocupe espacio al momento de almacenarlo.

Estadísticamente los métodos fueron comparados obteniéndose una muy buena correlación con el método de referencia Fermentación de Tubos Múltiples (NMP). La sensibilidad fue de 93 por ciento y la especificidad fue de 95 por ciento.

Se concluye que es un método sensible y específico de carácter cualitativo que puede ser aplicado para el monitoreo de aguas ya que fue diseñado para uso de la población que no cuenta con recursos de infraestructura y personal capacitado para realizar el examen bacteriológico del agua.

2. INTRODUCCION

La calidad del agua se refiere a que este libre de contaminantes químicos y biológicos.

Los contaminantes biológicos son de primordial importancia, y se refieren a que el agua debe llegar al consumidor libre de contaminación con excretas humanas y de animales para evitar la transmisión de enfermedades gastrointestinales.

La forma más sensible y específica de medir la calidad biológica o higiénica del agua para consumo humano es a través del examen bacteriológico. Este examen se basa en la búsqueda de microorganismos indicadores de contaminación fecal, lo que evita que se tenga que investigar todos los microorganismos patógenos que pueden presentarse en el agua, lo que llevaría demasiado tiempo en la obtención de resultados y sería una tarea compleja en los laboratorios.

Desde hace muchos años se reconoce a las bacterias del grupo coliforme como el indicador más aceptado para estimar contaminación fecal en el agua para consumo humano. El grupo coliforme está formado por bacterias que universalmente son excretadas en grandes cantidades en las heces humanas y de animales. Sin embargo; algunas especies de este grupo no necesariamente son de origen fecal y pueden estar presentes en otros ambientes, y no sólo formando parte de la flora intestinal. Por esta razón, se considera a *E. coli* como el indicador más preciso de contaminación fecal.

Para facilitar las pruebas de laboratorio se ha identificado dentro del grupo coliforme a los "coliformes totales", "fecales" dentro de los que se incluye a *E. coli*. Por tal razón la presencia de éste microorganismo en el agua, en la mayoría de los casos guarda una relación directa con los "coliformes fecales". La determinación del grupo coliforme identificado como "coliformes totales", "coliformes fecales" o también llamados termorresistentes y *E. coli* en el agua para consumo humano depende de las especificaciones aceptadas en cada país y del origen del agua.

Los métodos aceptados para la determinación de los coliformes en agua son: Fermentación de Tubos Múltiples (conocido como Número Más Probable) y Filtración por Membrana (FM). Ambos métodos requieren de instalaciones adecuadas y personal especializado para su realización. Esto hace que no se cuente con facilidades que permitan el monitoreo del agua suministrada a las diferentes comunidades.

Con el objeto, de facilitar el monitoreo bacteriológico del agua a nivel local se desarrolló una metodología sencilla con base en los métodos ya establecidos, que pueda adaptarse a nivel de campo, de fácil aplicación y bajo costo, es decir, una prueba que facilite la vigilancia de la calidad bacteriológica del agua para consumo humano.

3. ANTECEDENTES

3.1. Aspectos Microbiológicos del Agua

El agua potable es la que está destinada al consumo humano y no debe tener microorganismos patógenos ni sustancias químicas perjudiciales para la salud (1).

El agua puede contaminarse con una diversidad de microorganismos (bacterias, virus, parásitos y otros). Dentro de éstos microorganismos algunos son patógenos oportunistas siendo las heces una de las fuentes principales de contaminación (Anexo 1). Los patógenos oportunistas están presentes en el ambiente natural, ésto puede causar infecciones en personas cuyos mecanismos de defensa están disminuídos, en personas de edad avanzada, de muy corta edad y pacientes hospitalizados (1).

La detección de diversos microorganismos patógenos en el agua es posible actualmente, pero con la desventaja de que los métodos a menudo son complejos y consumen demasiado tiempo, por lo que se han desarrollado métodos a través de los cuales es posible detectar organismos que normalmente se encuentran presentes en las heces de humanos y animales de sangre caliente en grandes cantidades, facilitando su detección en el agua.

Los patógenos oportunistas están presentes en el ambiente natural, esto puede causar infecciones en personas cuyos mecanismos de defensa están disminuídos, en personas de edad avanzada, de muy corta edad y pacientes hospitalizados (1).

3.2. Indicadores de Contaminación Fecal

Las bacterias indicadoras de contaminación fecal deben cumplir con determinados criterios. Deben estar universalmente presentes en gran número en las heces de los seres humanos y de los animales de sangre caliente, deben ser

fáciles de detectar por métodos sencillos y no deben desarrollarse en el agua en condiciones naturales (2).

Los microorganismos que se utilizan como indicadores de contaminación fecal en el agua están las bacterias del grupo coliforme.

3.2.1. Bacterias del Grupo Coliforme (Coliformes Totales)

Las bacterias del grupo coliforme son organismos que pueden encontrarse en el intestino humano y de animales, excretándose en número elevado en las heces.

Se consideran el principal indicador de contaminación fecal de agua de uso doméstico, industrial y otros. Su presencia en el agua es considerado como un estándar de calidad bacteriológico de suministros de agua, y se definen como:

Coliformes Totales: Las bacterias en forma de bacilos, Gram-negativo que pueden crecer en presencia de sales biliares u otros agentes tensoactivos y que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas en 24 - 48 horas. La mayoría son especies de géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente representados por los géneros tradicionales: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* (2,6,7). Con la taxonomía actual la definición de coliformes involucra a un grupo heterogéneo, que comprende bacterias que pueden encontrarse tanto en heces como en el medio ambiente (suelos, aguas ricas en nutrientes y materias vegetales en descomposición) y también a especies no fecales (2,6).

3.2.2. Coliformes Fecales, Termorresistentes o Termotolerantes

Son organismos que pueden fermentar la lactosa a 44 - 45 °C (3,6,7). Comprenden el género *Escherichia*, y en menor grado a especies de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* (3,6).

Los coliformes termorresistentes distintos de *E. coli* pueden encontrarse en aguas orgánicamente enriquecidas. Se ha observado que estos organismos se

encuentran en la mayoría de los casos en relación directa con *E. coli*. Por ello su utilización para evaluar la calidad del agua se considera aceptable (3,6).

3.2.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli es el coliforme fecal más preciso y de mayor aceptación como indicador de contaminación fecal. Abunda en las heces de origen humano y animal, alcanzando en heces recientes concentraciones de 10^9 por gramo de heces. Se caracteriza por poseer las enzimas β -galactosidasa y β -glucuronidasa, fermenta la lactosa y el manitol liberando ácido y gas, produce indol a partir del triptófano (3,13). Recientemente se ha sugerido que *E. coli* puede existir e incluso proliferar en aguas tropicales que no han sido objeto de contaminación fecal de origen humano (3).

Algunas cepas pueden desarrollarse a 37 °C pero no a 44 – 45 °C y algunas no liberan gas. *Escherichia coli* es oxidasa negativo y no hidroliza la urea (Anexo 2)(4).

3.2.4. *Streptococos Fecales*

Son aquellos que generalmente se encuentran presentes en las heces de origen humano y animal. Son cocos Gram-positivo, catalasa negativo y pertenecen a los grupos serológicos D y G de Lancefield. Estos estreptococos se caracterizan por poseer en su pared celular polisacáridos específicos denominados antígenos de Lancefield, también poseen ácidos teicoicos y moléculas de glicerol para hacerlos más específicos en su clasificación. Dentro de este grupo se han clasificado dos géneros: *Streptococcus* conformado por las especies, *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. avium*, *S. equinus*, *S. bovis*, y *S. gallinarum*; y el género *Enterococcus* conformado por las especies, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, y *E. gallinarum* (5). Para la diferenciación de especies es necesario realizar diferentes pruebas bioquímicas (Anexo 3) (5).

Aún no se conoce con detalle la ecología de muchas de las nuevas especies, pero la mayoría se consideran de origen fecal (6).

Los estreptococos son muy resistentes a la desecación y pueden ser útiles para realizar controles sistemáticos después de la colocación de nuevas tuberías maestras o la reparación de los sistemas de distribución, así como para detectar la contaminación de aguas subterráneas o superficiales (6).

3.2.5. *Clostridium* Reductores de Sulfito

Son bacilos anaerobios Gram-positivo, esporoformadores, catalasa negativo, fermentan la lactosa, sucrosa y el inositol con producción de gas. La especie *Clostridium perfringens* está normalmente presente en las heces, aunque en número mucho más reducido que *E. coli*. No obstante su origen no es exclusivamente fecal, ya que puede proceder de otras fuentes ambientales. Debido a que las esporas sobreviven por mucho tiempo en el agua y resisten a la desinfección, son vitales para evaluar la eficacia del tratamiento. La presencia de *Clostridium perfringens* en agua filtrada es signo de que ha habido fallos en el proceso de filtración. Estos organismos son útiles sobre todo como indicadores de la contaminación intermitente o distante, pero no se recomienda su uso para la vigilancia sistemática de las plantas de distribución (7).

3.2.6. Colifagos y Otros Posibles Indicadores

Actualmente se ha propuesto que los bacteriófagos se utilicen como indicadores debido a que se asemejan a los enterovirus humanos y son fáciles de detectar en el agua. Se han estudiado dos grupos: Los colifagos somáticos, que infectan a las cepas hospederas de *E. coli* y los bacteriófagos del ARN F- específicos (ARN de los pilli F), que infectan a las cepas de *E. coli* y otras bacterias afines a través de los pilli F o sexuales. Ambos están en abundancia en las aguas de origen residual y por eso son importantes como indicadores de contaminación en esas aguas (7).

3.3. Otros Indicadores de la Calidad del Agua

Después de los indicadores de contaminación fecal también existen microorganismos que a menudo se encuentran en las heces en menor grado que los coliformes y que son utilizados para verificar la calidad del agua (8). Dentro de éstos organismos se encuentran *Pseudomonas aeruginosa* (patógeno oportunista), que es utilizado para evaluar la calidad sanitaria del agua, en el agua para la elaboración de mezclas rehidratantes, alimentos de bebés, preparados farmacéuticos, vigilancia de sistemas de dotación de agua a hospitales y de agua embotellada (8,9).

P. aeruginosa, generalmente se encuentra en el agua natural, en presencia de coliformes. No obstante puede estar en agua potable en ausencia de las bacterias coliformes (9). Existen otros organismos molestos que incluyen las algas planctónicas y sésiles, hongos, crustáceos y protozoarios así como actinomicetos y bacterias de hierro y del azufre. Estos organismos pueden producir olores, sabores, turbidez que pueden influir en los sistemas de tratamiento al obstruir tamices y filtros (9).

3.4. Tratamiento y Desinfección del Agua

La selección y protección adecuadas de las fuentes de agua tienen una importancia fundamental para el abastecimiento de agua inócua. Antes de seleccionar una nueva fuente de agua para consumo humano, es importante asegurarse de que la calidad es satisfactoria o puede llegar a serlo después del tratamiento. Para decidir que procesos de tratamiento se utilizarán en un determinado momento, se debe tener en cuenta el tipo de fuente y la calidad del agua procedente de ésta. El objeto del tratamiento del agua es proteger al consumidor contra los agentes patógenos y las impurezas que pueden resultar desagradables o perjudiciales para la salud. En el Anexo 4 se proporciona un ejemplo de objetivos para los procesos típicos de tratamiento del agua en zonas urbanas, sobre la base de las cargas de turbidez y de bacterias coliformes

termorresistentes y de la eliminación de las mismas (10). El tratamiento del agua procedente de fuentes situadas en tierras bajas en las zonas urbanas comprende por lo general las siguientes fases: almacenamiento en depósitos o desinfección previa, coagulación, floculación, sedimentación, filtración y desinfección. Las fases de tratamiento mencionadas anteriormente se aplicarán según la fuente y calidad del agua procedente de ésta (10, 11). La desinfección permite mantener un control permante en el mantenimiento de la calidad del agua para consumo humano. Esto es posible a través de la evaluación frecuente de las concentraciones de los desinfectantes usados. La eficiencia de los desinfectantes puede expresarse en términos ya sea de concentraciones relativas para alcanzar el mismo nivel de desinfección o la de los niveles relativos de desinfección producidos con una misma concentración de desinfectante. Sin embargo, debido a la naturaleza diferente de los microorganismos y los problemas para estandarizar las condiciones para realizar la desinfección, sólo es posible formular apreciaciones sobre las eficiencias comparativas de los distintos desinfectantes. Dentro de estas limitaciones, se puede agrupar a los diversos agentes desinfectantes según sea su eficacia, entre los cuales están: cloro, bióxido de cloro u ozono (10, 11).

En el caso del cloro debe tomarse en cuenta que el pH del agua sea menor a 8.0, verificar que el agua no contenga sustancias reductoras como sales ferrosas o sulfuro de hidrógeno, que no contenga sustancias como amoníaco y sus derivados, materia orgánica y que la turbidez del agua sea equivalente a una unidad nefelométrica (UNT) o menos para evitar interferencias con el cloro en su proceso de desinfección (10).

3.4.1. Desinfectantes Residuales

Los desinfectantes residuales son aquellos que tienen la capacidad de mantenerse en el agua en forma residual permitiendo así un control microbiano continuo principalmente en tanques de distribución. A excepción del ozono todos

los desinfectantes antes mencionados son factibles de ser utilizados debido a que son de fácil disponibilidad y de bajo costo (11).

Todos los sistemas de abastecimiento deberán contar con desinfección como tratamiento mínimo. El cloro es el agente desinfectante más utilizado principalmente por su bajo costo y debido a que su medición para la vigilancia de los sistemas de distribución es fácil.

Se recomienda examinar diariamente su concentración la cual debe encontrarse en 0.5 - 1.0 mg/L. Cuando ésta cantidad disminuye es necesario hacer una clorinación de refuerzo con el objeto de mantener el cloro residual en los sistemas de abastecimiento (11).

3.5. Examen Bacteriológico del Agua

3.5.1. Recolección de la Muestra

Todo procedimiento de muestreo se inicia desde el envase, volumen y etiquetado de la muestra. El volumen mínimo de muestra es de 100 ml, y la etiqueta debe contar con los datos de su origen, la fecha y hora de su recolección, la naturaleza del agua y datos sobre su transporte (12).

3.5.1.1. Uso de Agentes Neutralizantes

En el caso de aguas clorinadas debe agregarse un agente declorinador para inactivar la acción del cloro. Con este propósito se esterilizan recipientes conteniendo 0.1 ml de una solución de tiosulfato de sodio al 10 por ciento para 100 ml de muestra. Esta concentración de tiosulfato de sodio neutraliza alrededor de 15 mg/L de cloro residual. Para muestras de agua para beber puede usarse 0.1 ml de tiosulfato de sodio al 3 por ciento que neutraliza hasta 5 mg/L (12).

Para aguas de desecho con altas concentraciones de metales pesados se utiliza 0.3 ml de una solución de etilendiaminotetracético (EDTA) al 15 por ciento y

ajustada a un pH de 6.5. Este es un agente quelante que reduce la toxicidad de los metales (12).

3.5.1.2. Vigilancia y Frecuencia de Muestreo

Para evaluar la calidad del agua potable suministrada a los consumidores es necesario reunir información durante un determinado período y así poder implementar un sistema de vigilancia desarrollando programas de muestreo diseñados de tal forma que permitan incluir variaciones de tipo aleatorias como sistemáticas.

La frecuencia del muestreo debe ser alta, sin embargo, conociendo el tiempo y la magnitud de las variaciones relacionadas con el lugar, así como las concentraciones de los componentes del agua, su comportamiento en los tanques de distribución logran disminuir esa frecuencia de muestreo (13). En el anexo 5 se ilustra la frecuencia mínima de muestreo de un sistema de distribución según la población abastecida.

3.5.1.3. Procedimiento de Muestreo y Recolección

Siempre que se realiza un muestreo de agua debe tomarse en cuenta que existen diferentes formas de tomar la muestra según sea su origen, el frasco o bolsa estéril no debe abrirse hasta el momento que tenga que llenarse, debe cuidarse que no se contamine el tapón para evitar resultados erróneos en el examen bacteriológico del agua.

3.5.1.3.1. Agua Potable:

Si es recolectada de un sistema de distribución se seleccionan chorros (grifos) que estén conectados directamente al servicio de distribución. Estos deben estar en puntos representativos (14).

3.5.1.3.2. Muestras de Agua de Chorro:

En un sistema de distribución de agua, los exámenes bacteriológicos deben realizarse en muestras de puntos representativos del sistema de distribución

cuidadosamente seleccionados. Deben incluirse muestras de puntos finales para demostrar la calidad bacteriológica a través de toda la red y asegurar que no ocurran problemas de ruptura en las líneas de distribución o reducción de la presión positiva (14).

Para tomar la muestra se realizan los siguientes pasos: se abre el chorro y se deja correr el agua durante 2 ó 3 minutos, después se cierra, limpiando el exterior con algodón impregnado con etanol o una solución de cloro (100 mg/L). Se abre de nuevo el chorro dejando que el agua corra durante algunos segundos y se llena la botella con un chorro débil para evitar que el agua se derrame. Luego la botella se cierra y se rotula (14).

3.5.1.3.3. Aguas Superficiales:

Dentro de las aguas superficiales se encuentran los suministros de aguas crudas (ríos, lagos); aguas superficiales y recreacionales. Las muestras se obtienen en diferentes puntos de acuerdo con el objetivo de los análisis se establece la frecuencia del muestreo. Para tomar la muestra se utiliza un frasco o botella previamente esterilizada y se coloca de manera inclinada en dirección opuesta a la corriente, se deja llenar, se saca inmediatamente y se cierra (15).

3.5.1.3.4. Aguas Profundas:

Se sumerge un frasco o botella previamente esterilizada unos 30 cm a 1 m de profundidad, se gira hasta que el cuello quede con la boca contra la corriente, si no hay corriente se mueve horizontalmente. Cuando se llena se saca rápidamente y se tapa (15).

3.5.1.4. Transporte y Recepción de Muestras

Las muestras deben ser enviadas rápidamente al laboratorio para ser analizadas. Se deben transportar en frío (abajo de 10 °C) si no se procesan una hora después de su recolección. El tiempo prudencial para efectuar el examen bacteriológico después de su recolección es de 6 horas; el tiempo máximo entre la colección y análisis es de 24 horas (15).

3.5.1.5. Instalaciones de Laboratorio y Condiciones de Seguridad

Es importante que el laboratorio cuente con instalaciones y equipo satisfactorio para el exámen de agua potable con objeto de asegurar resultados confiables y reproducibles, especialmente en lo que se refiere a las bacterias indicadoras de contaminación fecal. Debe prestarse atención especial a las prácticas de laboratorio adecuadas, que comprendan la capacitación del personal y la utilización correcta de las incubadoras, de los medios de cultivo, así como el uso de procedimientos de control de calidad (15).

3.5.2. Métodos de Análisis

En la actualidad existen métodos rápidos para la enumeración y determinación de bacterias coliformes en el agua. Los métodos estándar para la determinación de las bacterias coliformes son: Filtración por Membrana y el de Fermentación de Tubos Múltiples conocido como Número Más Probable (NMP), los resultados de ambos métodos son comparables (16).

3.5.2.1. Filtración por Membrana

El método de Filtración por Membrana es considerado como un método práctico en el cual se pueden usar volúmenes grandes de muestra obteniendo resultados comparables con el procedimiento de Fermentación de Tubos Múltiples (16). Es un método bastante útil en el monitoreo de agua para consumo humano así como también para una variedad de aguas naturales. Sin embargo tiene ciertas limitaciones particularmente cuando se trata de análisis de aguas turbias (16).

Generalmente se utilizan filtros compuestos de ésteres de celulosa, típicamente con poros de 0.45 μm de diámetro que retienen las bacterias coliformes al filtrar volúmenes específicos (100, 50, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ml) según el origen de la muestra. Las membranas son colocadas en un medio selectivo (endo agar para coliformes totales y agar M-FC para coliformes fecales) donde se desarrollan las colonias características que se cuentan posteriormente (17). Para los coliformes

totales la temperatura de incubación es 37 °C y para los coliformes fecales 44.5 °C utilizando un Baño de maría donde son colocadas las cajas de Petri empacadas en bolsas plásticas estériles; para ambas el tiempo de incubación es de 24 - 48 horas (18). El método de Filtración por Membrana se aplica para el análisis de aguas salinas, monitoreo de tratamientos de agua para consumo humano (19).

Los resultados obtenidos con el método de Filtración por Membrana son comparables con el test de Fermentación de Tubos Múltiples (NMP), siendo una de sus ventajas requiere de menor tiempo para establecer la presencia de contaminación en el agua y es posible hacer un cálculo directo del número de bacterias coliformes totales y fecales (20,21).

3.5.2.2. Método de Fermentación de Tubos Múltiples (NMP)

El método de Fermentación de Tubos múltiples (NMP) es considerado como estándar para la determinación del grupo coliforme. Se fundamenta en la fermentación de lactosa con producción de gas por lo que es utilizado para la determinación del grupo coliforme. El método del NMP consta de tres fases: presuntiva, confirmatoria y complementaria. La fase presuntiva se realiza a través de la presencia de gas debido a la fermentación de lactosa. Las fases confirmatoria y complementaria se realizan de acuerdo a los resultados obtenidos en la fase presuntiva; para ello se utilizan medios específicos (Anexo 6) (22).

La precisión de éste método depende del número de tubos usados. Los resultados son reportados en términos de NMP. Este número se basa en tablas de probabilidad estadística, las cuales tienen un límite de confianza del 95 por ciento. A través de ellas se puede conocer la densidad bacteriana (coliformes presentes) en la muestra (23).

El procedimiento del NMP puede aplicarse en todo tipo de aguas, especialmente en las que la turbidez es alta. Cuando el agua a analizar se sabe que es no potable se utilizan 10 ml de muestra para cada 5 tubos de Caldo Lauryl Triptosa

(CLT) de doble concentración (2X), 1 ml a 5 tubos de CLT de concentración simple (1X), y 0.1 ml a 5 tubos de CLT 1X.

Para el agua de buena calidad (potable) existen las siguientes alternativas: 5 réplicas de CLT 3X para porciones de 20 ml de agua y 10 réplicas de CLT 2X para porciones de 10 ml de agua (La fase presuntiva utiliza cuatro medios de cultivo diferentes: el medio de glutamato modificado y minerales (MGMM), caldo lauril triptosa (CTL), caldo MacConkey y caldo lactosa conocido como caldo lactosado (25).

En la fase confirmatoria se utilizan medios selectivos como: caldo bilis verde brillante (CBV), caldo *E. coli* (EC) y caldo triptona. Estos medios se utilizan para diferenciar entre coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* respectivamente (26). Sin embargo existen otros métodos a través de los cuales se puede realizar la determinación de coliformes en el agua, estos métodos están basados en modificaciones del método de NMP y son de carácter cualitativo (27).

3.5.3. Métodos Rápidos de Análisis

3.5.3.1. Test de Presencia-Ausencia (P-A) para Coliformes

El test de presencia-ausencia (P-A) es una modificación del método NMP simplificado para poder utilizar volúmenes grandes de agua. Este test muestra buena correlación con el método de Filtración por Membrana y consiste en un medio líquido de doble concentración colocado en botellas a las cuales se les agrega 100 ml de muestra (28). Es un test cualitativo que permite analizar un número grande de muestras por unidad de tiempo (29).

El test P-A es usado para el monitoreo de coliformes y *E. coli* en los sistemas de distribución de agua o plantas de tratamiento. Consta de una fase presuntiva en la que se observa la fermentación de la lactosa a través de un cambio de color (púrpura a amarillo) y producción de gas; la fase confirmatoria se realiza con medio bilis verde brillante (30,31,32).

3.5.3.2. Substratos Cromogénicos y Fluorogénicos en Medios de Cultivo para Coliformes

Los substratos cromogénicos y fluorogénicos producen color y fluorescencia respectivamente, a través de la hidrólisis por enzimas específicas. Los substratos más utilizadas son: o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), p-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (PNPG), y 4-metillumberiferil- β -D-galactopiranosido (MUGal) (33). Estos sustratos han sido incluidos en una variedad de medios de cultivo para demostrar la presencias de β -galactosidasa producida por las bacterias coliformes. (34, 35). La enzima β -D-galactosidasa hidroliza el sustrato y produce un cambio de color que indica una prueba positiva dentro de 24 - 28 horas de incubación fuera de los procedimientos adicionales (36, 37). Bacterias no coliformes como especies *Aeromonas* y *Pseudomonas*, que producen pequeñas cantidades de la enzima β -D-galactosidasa, son suprimidas y no producen respuesta positiva dentro de las 28 horas de incubación a menos que hallan más de 10^4 UFC/ml presentes (38, 39). El 4 metillumberiferil- β -D-glucoronido (MUG) también ha sido utilizado para la determinación de *Escherichia coli* tanto en alimentos, leche, agua, así como en muestras clínicas (40,41). Recientemente, se ha visto que otros cromógenos como el indoxil- β -D-glucoronido (IBDG) y el 5-bromo-4-cloro-3 indoxil- β -D-glucorondio (X-Gluc) también tienen uso en la detección y enumeración de *Escherichia coli* en agua, muestras como alimentos y muestras clínicas (42, 43).

Actualmente la adición de cromógenos y fluorógenos en algunos de los métodos para la determinación de coliformes y *Escherichia coli* (NMP, P-A y plaqueo directo) ha cobrado importancia debido a que se obtienen resultados más rápidos por lo que son considerados como una buena alternativa para ser implementados en el análisis de aguas (44,45).

Es necesario que al iniciar estas metodologías se utilice paralelamente uno de los test estándar para coliformes alrededor de un período de varios meses para asegurar la efectividad del test y ver su correlación (46,47).

Las muestras de agua que contienen Humus y otros materiales pueden dar cierta coloración y muestras con alto contenido de calcio puede precipitar pero sin afectar la reacción (48).

Este test se recomienda para el análisis de agua de consumo humano; no se debe utilizar para pruebas presuntivas de NMP y Filtración por Membrana ya que pueden recargar el sustrato y dar falsos positivos (49,50).

4. JUSTIFICACION

La salud de una población se ve beneficiada con el suministro de agua de buena calidad. El agua que consume la población debe estar libre de contaminantes químicos y biológicos. Se sabe que la forma más común de contaminación biológica es a través de las excretas de humanos y animales de sangre caliente.

El contar con una infraestructura de distribución de agua en las comunidades no garantiza su calidad higiénica; por lo que todo proyecto de suministro de agua debe incorporar un sistema de monitoreo que garantice su pureza biológica.

La calidad biológica es evaluada a través del examen bacteriológico. Este examen se basa en la determinación de la presencia de microorganismo indicadores como lo son las bacterias del grupo coliforme. Este grupo de microorganismos se encuentra en concentraciones elevadas en las heces por lo que su evaluación con los métodos de análisis resulta ser la forma más sensible y específica de estimar la pureza sanitaria del agua.

A nivel de la República la obtención de agua segura se ve limitada por la falta de infraestructura de plantas de tratamiento y laboratorios de control que puedan brindar a la población sistemas de vigilancia que permitan garantizar el suministro de agua.

La evaluación y adaptación de pruebas de campo a nuestro medio, disponibles para la evaluación sanitaria del agua, es una alternativa para monitorear la calidad bacteriológica del agua, tomando en cuenta los límites de infraestructura necesarios para establecer sistemas de monitoreo continuo del agua que consume la población.

Se hizo un estudio, utilizando un disco de papel filtro impregnado con un medio de cultivo específico para el crecimiento de las bacterias coliformes. Este es un método sencillo y no necesita de personal capacitado ni de infraestructura para su utilización permitiendo realizar la evaluación permanente de la calidad del agua.

Es importante considerar que si se facilita el control microbiológico del agua, la población se beneficia principalmente en aquellos lugares en los cuales a veces es imposible realizar dicho análisis.

El implementar métodos sencillos de campo contribuirá a mejorar la calidad de vida de las personas ya que como se menciona anteriormente el agua segura permite mantener mejores niveles de salud.

5. OBJETIVOS

5.1. General:

- 5.1.1. Desarrollar y validar una prueba de campo, de fácil aplicación y bajo costo, con base en los métodos estándar para la determinación de coliformes totales en agua para consumo humano.

5.2. Específicos:

- 5.2.1. Estandarizar una prueba sencilla de campo para la determinación de coliformes totales en agua para consumo humano.
- 5.2.2. Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba a desarrollar en relación con el método estándar de Fermentación de Tubos Múltiples (NMP).
- 5.2.3. Comparar la efectividad de la prueba para determinar la presencia de coliformes totales a temperatura ambiente (25° C) y a 37° C.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Universo de Trabajo

Se analizó un total de 277 muestras de agua de diferentes lugares de la república. Estas muestras fueron referidas al Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y de Medicamentos (LUCAM) para su exámen bacteriológico.

6.2. Recursos

6.2.1. Humanos

Br. Byanca Rosendá Isabel Ortíz Ruiz (Tesisista)

Licda. Q.B. Floridalma Cano Granados (Asesora), INCAP

Licda. Q.B. Teresita Aguilar de Miranda (Asesora), LUCAM

Personal del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP)

Lic. Q.B. Jorge Luis De León (Asesor estadístico del Departamento de Investigación IIQB, USAC)

6.2.2. Institucionales

Laboratorio de Microbiología del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP)

Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y de Medicamentos (LUCAM)

6.2.3. Físicos

6.2.3.1. Materiales

Nefelómetro de MacFarland (0.5)

Cajas de Petri 15 * 150 mm

Gradillas

Asas bacteriológicas

Espátula

Algodón
Pinzas
Papel parafilm
Masking tape
Papel parafinado
Papel aluminio
Filtros Millipore de 0.45 μm
Bulbo para pipetas Pasteur
Bolsas plásticas Nasco de 4 onzas
Papel Filtro Whatman No. 3
Magnetos agitadores

6.2.3.2. Cristalería

Pipetas Pasteur
Pipetas serológicas de 1, 10, y 25 ml
Tubos con tapón de rosca de 16 * 125 mm
Probetas de 10, 25, y 50 ml
Beakers de 100 ml
Frascos de vidrio de 100 ml

6.2.3.3. Reactivos

Agua destilada
Aceite mineral
Alcohol etílico
Cloruro de Sodio
Fosfato de Potasio e Hidrógeno
Extracto de Levadura
Lactosa
Lauril Sulfato de Sodio

Púrpura de Bromocresol
Tiosulfato de Sodio
Tryptona
Osil (desinfectante)

6.2.3.4. Equipo

Estufa con agitador magnético (Fisher Scientific Thermix Stirring Hot Plate)
Incubadora de 35-37°C (Thelco)
Autoclave
Campana de Flujo Laminar
Balanza (AND FX 3200)
Vortex (Curtin Scientific Co.)
Refrigeradora
Pipetor
Filtros de agua
Bomba de vacío

6.2.3.5. Medios de Cultivo

Agar MacConkey (BBL)
Agar Muller Hinton (Difco)
Agar Nutritivo (BBL)

6.3. Metodología

6.3.1. Desarrollo y Validación de una Prueba para Determinar Coliformes en Agua para Consumo Humano

6.3.1.1. Formulación del Medio de Cultivo

La formulación del medio de cultivo se realizó con base en los componentes del medio P-A usado en el test de Presencia-Ausencia de coliformes en agua. El método de P-A es cualitativo y permite determinar la presencia de coliformes a través de un cambio de color del medio provocado por la reacción de fermentación de la lactosa. También se tomó en cuenta un estudio realizado en la India, donde usaron tiras de papel filtro impregnadas con un medio de cultivo para observar la producción de H_2S . Esta reacción fue asociada con la presencia de coliformes en el agua (50).

El medio fue formulado con los siguientes ingredientes: extracto de levadura, triptona, cloruro de sodio; lauril sulfato de sodio que actúa como agente tensioactivo, fosfato de potasio monohidratado (K_2HPO_4) para mantener el pH del medio, el carbohidrato de fermentación lactosa sobre el cual se fundamenta la prueba. El indicador púrpura de bromocresol para manifestar o hacer visible la reacción de fermentación de la lactosa. Tiosulfato de sodio que fue usado como neutralizador de cloro. Y un pH final de 6.8 ± 1 . Para establecer la concentración final de los componentes del medio de cultivo se probaron diferentes concentraciones hasta determinar la fórmula adecuada (Anexo 7).

6.3.1.2. Preparación del Disco de Papel Filtro para Absorber el Medio de Cultivo Formulado

El tamaño del disco de papel filtro Whatman No. 3 se estableció, tomando como referencia el área estimada en el estudio realizado en la India donde se utilizaron tiras de papel con un área de 80 cm^2 (50). Sin embargo el tamaño del área se disminuyó a 13 cm^2 lo cual es equivalente a 4 cm de diámetro. La razón por la

cual se hizo la reducción fue para adaptarlo al ancho de la bolsa al momento de preparar la unidad. La bolsa que se utilizó para su transporte es estéril de marca NASCO WHIRL – PAK para un volumen de 4 onzas.

El objetivo de utilizar estos discos de papel filtro, facilitó el almacenamiento manejo y transporte del medio para evitar su contaminación. Los discos de papel filtro fueron impregnados con el medio de cultivo bajo condiciones asépticas, (proporcionadas por el uso de una campana de flujo laminar y luz ultravioleta). El disco de papel filtro se colocó en la bolsa con una pinza estéril. Dicho envase tiene la ventaja de no romperse, se puede manipular fácilmente y su almacenamiento no requiere espacio.

La unidad preparada (bolsa + disco) para el test fue evaluada para establecer las condiciones de almacenamiento: tiempo y temperatura de estabilidad.

6.3.1.3. Establecimiento de el Volumen de Muestra

Se estableció el volumen de agua a ser inoculado tomando como base el volumen utilizado en el estudio realizado en la India. En dicho estudio se estandarizó un volumen de 20 ml de agua . Por esa razón se utilizó el mismo volumen de agua (50).

6.3.1.4. Evaluación, Aplicación y Sensibilidad de la Prueba

Luego de establecer el medio de cultivo, tamaño del disco, envase y volumen de muestra se evaluó la aplicación y sensibilidad del disco. Se prepararon cultivos de cepas conocidas de bacterias coliformes: *E. coli* ATCC 25922 y cepas del género *Klebsiella ozane* INV 870792 y *Citrobacter sp.* INV 13496, aisladas en el laboratorio de microbiología del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). Estas cepas se utilizaron para verificar la reacción de fermentación de la lactosa, y determinar el número de bacterias que la prueba es capaz de detectar. Y se utilizó como control negativo (no fermentador de la

lactosa) la cepa de *S. aureus* INV 13025 aislada en el laboratorio de microbiología del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP).

Las cepas utilizadas fueron aisladas en agar Müller Hinton y MacConkey para checar su pureza e identificarlas. Al mismo tiempo se les realizaron las diferentes pruebas bioquímicas para caracterizarlas.

A partir de cultivos de 24 horas de incubación a $36^{\circ} \text{C} \pm 1$ en agar Müller-Hinton se hicieron suspensiones de éstas cepas con una turbidez de MacFarland 0.5 (aproximadamente 10^9 bacterias/ml). A partir de ésta suspensión se realizaron las siguientes diluciones: 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 (1ml de suspensión + 9 ml de diluyente). A cada dilución se le cuantificó el número de células presentes filtrando 1 ml de cada una en una membrana de $0.45\mu\text{m}$, las que fueron colocadas posteriormente en una caja de agar ENDO e incubadas a $36^{\circ} \text{C} \pm 1$ durante 24 horas. Se contó el número de colonias por dilución.

También se inoculó 1 ml en 19 ml de agua estéril y así obtener los 20 ml de agua contaminada estimados como volumen estándar que se necesita para evaluar la unidad preparada. Esto se hizo para establecer el número de bacterias que son capaces de fermentar la lactosa y de esa forma se determinó la sensibilidad de la prueba. La dilución menor en donde se obtuvo un cambio de color estable (10^6) determinó la sensibilidad de la prueba. Esta dilución se tomó como referencia para establecer el control positivo y el control de calidad de la prueba.

6.3.1.5. Validación de la Prueba

Para validar la prueba se realizó un muestreo al azar. Dichas muestras fueron analizadas con la nueva metodología y con el método de Fermentación de Tubos Múltiples. Los resultados obtenidos con la metodología evaluada fueron comparados con el método de Fermentación de Tubos Múltiples.

6.4. Diseño Experimental

6.4.1. Diseño de Muestreo

El muestreo se realizó completamente al azar, y fue un estudio un estudio ciego. Se analizarón 280 muestras de agua. El número de muestra se determinó por los siguientes cálculos (ver Anexo 8 significado de la fórmula):

$$n = NC^2 S^2 / \nabla^2$$

$$NC = Z_1 - a/2 + Z_1 - \beta$$

$$a = 0.05 \quad \beta = 0.20$$

$$NC = 3.33$$

$$\nabla = 0.05$$

$$s^2 = p * q$$

$$p = 0.5$$

$$q = 0.5$$

$$n = \frac{(3.33)^2 (0.25)^2}{(0.05)^2}$$

$$n = 277.22$$

6.4.2. Análisis de Resultados

Por ser un estudio descriptivo no lleva hipótesis. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Kappa, se les determinó el índice de concordancia, (Anexo 9, ver tabla No. 5 de resultados).

Se determinó la sensibilidad de la prueba y su especificidad. De igual forma se determinó el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo (Ver tabla No. 4 y 5 de resultados).

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Formulación del Medio de Cultivo

El medio de cultivo formulado al igual que los medios utilizados para el cultivo de bacterias coliformes, se basa en la capacidad de éstos organismos de fermentar el azúcar lactosa y producir ácido y gas.

Para lograr adecuar la concentración de los componentes del medio se realizaron pruebas con 3 diferentes concentraciones de cada componente. La tabla No. 1 muestra que para un volumen de 50 ml de agua se estableció la formulación final del medio hasta lograr que en la reacción de fermentación de la lactosa no interfiriera ninguno de los componentes el pH final es de 6.8 ± 1 . Con ese pH la reacción de fermentación observada a través del cambio de color se mantiene estable al momento de realizar la lectura.

El medio de cultivo formulado posee en relación a otras formulaciones de medios una concentración elevada de lactosa por lo que no es posible esterilizarlo en autoclave ya que esto provoca el acaramelamiento del mismo. Debido a ello se recomienda utilizar el sistema de filtración por membrana (FM) utilizando membranas de $0.45 \mu\text{m}$.

El pH final del medio debe ser verificado para que no interfiera al momento de el cambio de color del indicador y de como resultado falso positivo de la prueba.

La reacción de fermentación se manifiesta utilizando el indicador de acidez púrpura de bromocresol, el indicador posee un color púrpura a un pH 6.8 ± 1 y cambia a un color amarillo a un pH ácido (4.5 ± 1) (26). Debe prepararse al 0.5 por ciento en agua/etanol y debe agregarse un volumen de 4 ml para 50 ml de medio.

7.2. Preparación del Disco de Papel Filtro para Absorber el Medio de Cultivo

Formulado

El objetivo del estudio es facilitar a las comunidades que no cuentan con infraestructura, el análisis bacteriológico del agua. Por tal razón se evaluó una forma sencilla de poder transportar y almacenar el medio de cultivo. Se estableció el uso de discos de papel filtro Whatman No.3 con un diámetro de 4 cm. El papel filtro whatman No.3 posee un grosor

adecuado que permite la absorción de 0.5 a 1 ml del medio al momento de impregnar el disco, puede ser sometido a procesos de esterilización sin deteriorarse. También se realizaron pruebas con papel No.1 y No. 2 las cuales no resultaron ser funcionales pues el grosor del papel no absorbe el mínimo de volumen del medio (0.5 ml) y se deteriora con facilidad al ser sometido a procesos de esterilización.

Los discos se prepararon con la ayuda de un perforador cuyo diámetro es de 4 cm y luego fueron esterilizados con vapor a 121 ± 1 °C y 15 Lb. De presión durante 10 minutos. Para poderlos esterilizar fueron colocados en cajas petri de vidrio.

Los discos fueron impregnados con el medio de cultivo en condiciones estériles utilizando una campana de flujo laminar. El volumen de medio que se utilizó para el disco es aproximadamente de 1 ml. Con ese volumen se logró humedecer completamente el disco y permite que se seque fácilmente.

Para secar el disco se utilizó la campana de flujo laminar y para ello se usó papel aluminio como base para colocar los discos y así evitar manchar la superficie de la campana. El papel aluminio se colocó previamente para esterilizarlo. El tiempo requerido para esterilizar el papel aluminio fue de dos horas expuesto a luz ultravioleta (UV).

Los discos fueron impregnados con el medio de cultivo y colocados sobre el papel aluminio, se dejaron por 10 minutos con luz UV y el flujo de la campana, luego de transcurrido el tiempo se cambiaron de lado y se dejaron otros 10 minutos para continuar con el secado. Se estableció ese tiempo de secado pues este permite que el disco no se deshidrate y se deteriore fácilmente.

Los discos luego de ser secados tiene un color púrpura opaco y su consistencia es flexible. Debe evaluarse estos dos parámetros ya que un disco con proceso de secado prolongado tiende a palidecerse en su coloración y a tomarse duro. Los discos fueron colocados en las bolsas para su posterior evaluación. Las bolsas plásticas estériles de 4 onzas fueron utilizadas debido a que es un material que no ocupa espacio al momento de ser almacenado el disco, no se deteriora al momento de ser manipulado, resiste a golpes, es de bajo costo y es de descarte sencillo.

Para poder establecer lo anterior se probaron diferentes envases: frascos de vidrio los cuales resultaron poco prácticos y de riesgo al utilizarse ya que generan la necesidad de lavarse, esterilizarse, ocupa espacio al almacenarse y se lastiman con facilidad (se rompen).

7.7. Evaluación de las Condiciones de Almacenamiento

Al definir la preparación del disco y su envase se procedió a evaluar las condiciones de almacenamiento: temperatura y tiempo de estabilidad.

La tabla No.2 muestra la evaluación de dos temperaturas de almacenamiento: temperatura de refrigeración (8° C) y temperatura ambiente (25° C). El disco permanece en buenas condiciones a 8° C durante tres meses, después de este tiempo se deshidrata y el indicador tiende a evaporarse provocando la decoloración del mismo. A temperatura ambiente también se almacenó y se mantiene viable siempre y cuando no se exponga a luz pues se observó que ésta es un factor que provoca el deterioro del disco principalmente en su coloración.

La evaluación de la temperatura y estabilidad del test se realizó observando la reacción de fermentación luego de haber sido almacenado a las temperaturas en el tiempo anteriormente mencionados.

La reacción observada fue la siguiente: El disco al entrar en contacto con el agua libera el medio de cultivo, el agua toma un color púrpura. Si se da la reacción de fermentación el agua cambia a un color amarillo debido a la producción de ácido.

La estabilidad de los colores indicaron si el disco se encuentra en buenas condiciones para ser utilizado.

7.4. Establecimiento del Volumen de Muestra

El volumen de muestra se definió tomando como base el utilizado en el estudio realizado en la India, el cual se estandarizó a 20 ml de agua. Sin embargo no hay que olvidar que en el muestreo se debe mantener el volumen 100 ml y luego utilizar 20 ml.

Para medir los 20 ml de muestra únicamente se agregó el agua hasta la altura del disco la cual se midió varias veces y es equivalente a 20 ml de agua.

7.5. Aplicación y Sensibilidad de la Prueba

La evaluación del disco se hizo utilizando cepas control de *E. coli* ATCC 25922, y los géneros: *Klebsiella ozanae* INV 870792, *Citrobacter spp* INV 13496. Como se menciona en la metodología a partir de suspensiones y diluciones decimales se cuantificaron las bacterias y se estableció que la menor concentración de bacterias/ ml es equivalente a la dilución 10^6 . A esta concentración se determinó que el número de bacterias detectadas por el método es igual 8 bacteria/ml permitiendo establecer la sensibilidad de la prueba. Para establecer el control positivo (control de Calidad) se utilizó la misma dilución pues a esa concentración de bacterias la estabilidad de la reacción de fermentación es óptima en el cambio de color. Las pruebas de sensibilidad fueron realizadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ en 24 ± 1 horas de incubación. Como el control negativo se utilizó la cepa de *S. aureus* INV 13025 para establecer el monitoreo de las condiciones de esterilidad del medio.

La aplicación de la prueba se realizó utilizando la unidad preparada (disco + bolsa) y evaluando su comportamiento a dos temperaturas y tiempos de incubación en la reacción.

En la reacción, el disco al entrar en contacto con el agua (20 ml) libera el medio de cultivo, y se toma de un color púrpura, luego cambia a un color amarillo cuando se da la producción de ácido. Para observar esto las unidades fueron sometidas a las temperaturas: $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ y temperatura ambiente $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ y los tiempos de incubación de 24 ± 1 y 48 ± 1 horas. Se hicieron combinaciones de muestras a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ y 24 horas de incubación, y muestras a 25°C y 24 – 48 horas de incubación. Ambos tiempos y temperaturas resultaron óptimas para el crecimiento de las bacterias coliformes (coliformes totales)

En algunos casos la reacción a temperatura ambiente puede ser óptima en 24 horas de incubación esto esta relacionado con la carga microbiana de la muestra.

La interpretación de la prueba es de carácter cualitativo: un resultado negativo se da cuando después del tiempo y temperatura de incubación no hay cambio de color (tono púrpura); un resultado es positivo cuando sucede un cambio de color púrpura a amarillo. Es importante mencionar que la evaluación del disco se hizo para determinar coliformes totales, para los coliformes fecales se dificulta debido a que es necesario utilizar un baño de María a 44-45 °C ya que por definición los coliformes fecales crecen a esa temperatura.

7.6. Validación de la Prueba

Se analizaron un total de 280 muestras y fueron evaluadas a dos tiempos y temperaturas de incubación (24 \pm 1 y 48 \pm 1 horas a 36° C \pm 1 y 25° C \pm 1). Ambas temperaturas resultaron óptimas ya que a 36° C \pm 1 y 24 \pm 1 horas de incubación un 66 por ciento de las muestras fueron positivas y a 25° C \pm 1 y 48 \pm 1 horas la positividad de las muestras fue de un 74 por ciento.

Por ser una metodología que puede ser incubada al ambiente es importante mencionar que para utilizarse en el área del interior de la república puede utilizarse ambientes como la cocina de las casas como área de incubación, principalmente en regiones donde la temperatura es menor a 25° C (regiones frías).

Las muestras de agua utilizadas procedían de diferentes lugares de la república por lo que dentro del análisis también fueron evaluadas muestras de aguas clorinadas sin embargo la adición de tiosulfato de sodio en el medio (0.6 por ciento) permitió inactivar el cloro sin afectar el estudio.

Estadísticamente se comparó el estudio realizado con el método Fermentación de Tubos Múltiples para establecer el nivel de correlación (51).

La sensibilidad de la prueba es de 93 por ciento y la especificidad es de 95 por ciento.

El índice de correlación de acuerdo a la prueba de Kappa es 0.88 (51).

Estadísticamente existe una muy buena correlación con el método Fermentación de Tubos Múltiples, es una prueba altamente sensible y específica por lo que se cataloga como una prueba cualitativa que puede ser utilizada para el monitoreo de los sistemas

de abastecimiento, a lo largo de las redes de distribución y de esa manera garantizar agua potable para consumo humano. También se determinó el valor predictivo Positivo el cual es igual 97 por ciento y el valor predictivo negativo igual a 90 por ciento (51).

La validación de la prueba está realizada para determinar coliformes totales como se menciona anteriormente uno de los objetivos es facilitar a las comunidades que no cuentan con infraestructura el análisis de agua, por esa razón para determinar coliformes fecales se dificulta pues es necesario proporcionar una temperatura de 44 – 45° C y eso conlleva a la utilización de baños de María, y no todas las comuninades, o áreas del interior de la república tienen accesos a esos recursos.

7.7. Ventajas

- 7.7.1. Es una prueba sencilla de fácil manejo que no necesita de infraestructura, equipo de laboratorio y personal capacitado para su aplicación. Solamente en lugares en los cuales la temperatura se encuentra abajo de 20°C a 25°C es necesario el uso de una incubadora.
- 7.7.2. La unidad es práctica para su almacenamiento debido a que no ocupa mayor espacio.
- 7.7.3. El disco DAT-PA tiene incorporado tiosulfato de sodio como parte de la formulación lo cual permite el monitoreo de aguas clorinadas.

7.8. Desventajas

- 7.8.1. La estabilidad del método DAT-PA es de tres meses siendo una de las limitantes para su uso
- 7.8.2. Es un método específicamente para la evaluación de coliformes totales.

7.9. Nombre de la Prueba

La unidad preparada (disco + bolsa) fue nombrada como DAT-PA que significa: DISCO AGUA TEST–PRESENCIA AUSENCIA. El nombre fue dado tomando como base que es un prueba de presencia – ausencia para monitorear aguas (test cualitativo).

TABLA No 1

FORMULACION FINAL DEL MEDIO DE CULTIVO PARA 50 ml DE AGUA

COMPONENTES	FORMULACION FINAL Gramos
Triptona	5
Extracto de Levadura	1
Lactosa	5
Lauril Sulfato	1
Tiosulfato de Sodio	0.3
K ₂ HPO ₄	0.1
NaCl	0.5

pH final del medio 6.8 ± 1

TABLA No. 2

COMPARACION DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO DEL DISCO

TIEMPO días	TEMPERATURAS	
	4- 8 °C	25 °C *
15	estable	estable
30	estable	estable
45	estable	estable
60	estable	estable
75	estable	estable
90	estable	estable
115	inestabilidad de color	inestabilidad de color
130	inestabilidad de color	inestabilidad de color
145	inestabilidad de color	pérdida de humedad

* Temperatura ambiente en un lugar fresco y obscuridad

TABLA No. 3

COMPARACION DE TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACION

TEMPERATURAS	TIEMPOS DE INCUBACION				TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS*
	24 HORAS		48 HORAS		
	NO. MUESTRAS	PORCENTAJE	NO. MUESTRAS	PORCENTAJE	
37 °C	100	66%	52	34%	152
25 °C	40	26%	112	74%	152

* N = 152 Muestras positivas verdaderas

DETERMINACION ESTADISTICA DE LA SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD
DE LA PRUEBA

FORMULA	DESCRIPCION DE LA FORMULA	CALCULOS DE ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD
SENSIBILIDAD = $(P V) / (P V + F N) \times 100$	PV= POSITIVOS VERDADEROS	SENSIBILIDAD DE LA METODOLOGIA EVALUADA: $152 / (152 + 12) \times 100 = 93.0 \%$
ESPECIFICIDAD = $(N V) / (N V + FP) \times 100$	NV= NEGATIVOS VERDADEROS FP= FALSOS POSITIVOS FN= FALSOS NEGATIVOS	ESPECIFICIDAD DE LA METODOLOGIA EVALUADA: $111 / (111 + 5) \times 100 = 95 \%$

TABLA NO. 5

**NIVEL DE CONCORDANCIA DE LA PRUEBA UTILIZANDO LA PRUEBA DE KAPPA
CORRELACION ESTADISTICA DEL METODO EVALUADO**

FORMULAS	DESCRIPCION DE LAS FORMULAS	DETERMINACION INDICE DE KAPPA:	INTERPRETACION INDICE DE KAPPA
$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$	a = positivos verdaderos	$P = \frac{(152+5) \times (152+12)}{280} \times 280 = 90.44$	<0.20 = Correlación deficiente
$P_o = \frac{a+d}{n}$	d = negativos verdaderos	280	0.21-0.40 = Correlación regular
$P_e = \frac{P \times N}{n}$	n = total de muestras	$N = (12+11) - \{(152+12) - 90.44\} = 49.44$	0.41-0.60 = Correlación moderada
$P = \frac{(a+b)}{n} \times \frac{(a+c)}{n} \times n$	c = falsos negativos	$P_e = \frac{90.44 \times 40.44}{280} = 0.50$	0.61-0.80 = Correlación buena
$N = (c+d) - [(a+c) - p]$	b = falsos positivos	$P_o = \frac{152+111}{280} = 0.94$	0.81-1.0 = Correlación muy buena
	P = concordancia con positivos	$K = \frac{0.94 - 0.50}{1 - 0.50} = \frac{0.44}{0.5} = 0.88$	
	N = concordancia con negativos		

TABLA NO. 6

DETERMINACION DE VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y NEGATIVO

FORMULAS

CALCULOS

$$\text{VALOR PREDICTIVO} = (PV / (P V + F P)) \times 100$$

VALOR PREDICTIVO POSITIVO DE LA METODOLOGIA EVALUADA:

POSITIVO

$$152 / (152 + 5) \times 100 = 97\%$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO} = (N V) / (N V + F N) \times 100$$

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO DE METODOLOGIA EVALUADA:

NEGATIVO

$$111 / (111 + 12) \times 100 = 90\%$$

8. CONCLUSIONES

- 8.1. Estadísticamente el método DAT-PA (disco agua test - presencia ausencia) es altamente específico y sensible para determinar coliformes totales en el agua. Correlaciona muy bien con el método de Fermentación de Tubos Múltiples por lo que puede ser catalogada como un sistema de monitoreo de carácter cualitativo.
- 8.2. El test DAT-PA es un método sencillo para monitorear la presencia de coliformes totales en los sistemas de distribución de agua a nivel rural, es de bajo costo y su transporte y almacenamiento a través del uso de bolsas plásticas estériles simplifica la ejecución de la prueba, principalmente cuando no es posible contar con una infraestructura de un laboratorio.
- 8.3. Las temperaturas de incubación para el método evaluado son $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ y $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ (temperatura ambiente 20°C a 25°C). Ambas son óptimas sin embargo para incubar las muestras a temperatura ambiente es necesario un tiempo de 48 horas para observar la reacción.
- 8.4. El tiosulfato de sodio actúa como inactivador del cloro presente en el agua, la incorporación de éste componente en la formulación del medio permite que el método DAT-PA sea utilizado para monitorear sistemas de distribución de aguas cloradas.
- 8.5. El método DAT-PA permanece estable durante un período de tres meses almacenado en rango de 4°C - 8°C y/o a temperatura ambiente (25°C) sin exponerse a la luz.

9. RECOMENDACIONES

- 9.1. Promover a través del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) el uso del test DAT-PA (disco agua test – presencia ausencia) en lugares donde no se cuente con infraestructura y personal calificado para la evaluación de la calidad bacteriológica del agua y así contribuir a mejorar la calidad de vida de la población.
- 9.2. En la preparación del método DAT-PA se debe establecer para cada lote el control de calidad, utilizando cepas control para garantizar la estabilidad y la confiabilidad de la prueba al momento de su aplicación.
- 9.3. Evaluar la utilización de preservantes que se puedan incorporar al método DAT-PA para lograr prolongar la estabilidad en un tiempo mayor de tres meses.
- 9.4. Evaluar la adición de sustratos cromógenos para determinar la presencia de *E. coli* y coliformes fecales principalmente en aguas rurales.
- 9.5. La incubación del método DAT-PA a nivel rural, se debe hacer en un lugar donde la temperatura ambiente sea igual o mayor a un rango de 20° C - 25° C. Sin embargo en regiones donde el clima sea frío y la temperatura del ambiente sea menor a 20° C - 25° C se debe utilizar una incubadora.

10. REFERENCIAS

1. Las Condiciones de la Salud en las Américas. 2da. ed., vols. 2, vol 2 1994.
2. Organización Panamericana de la Salud. Guías para la Calidad de Agua Potable. 2da. ed., Ginebra, Suiza. vols. 3, vol 3 1987 p 380. pp. 8-10.
3. Organización Panamericana de la Salud. Guías para la Calidad de Agua Potable. 2da. ed., Ginebra, Suiza. vols. 2, vol 1 1995. P 380. pp 10-15.
4. Organización Panamericana de la Salud. Guías para la Calidad de Agua Potable. 2da. ed., Ginebra, Suiza. vols. 2, vol 2 1995. P 388. pp. 25-34.
5. Sneath, P. H. A., *et al.* Manual of Systematic Bacteriology. vol. 2 1986. p 1169. pp. 1125.
6. Arnold E. Greenberg. *et al.* Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 18th ed. Washington D.C. 1992. p.10-130 pp. 9-45 – 9-63.
7. Wentzel., *et al.* Evaluation of Coliphage Detection as a Rapid Indicator of Water Quality. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982;43(1):430.
8. E.H. Lennete. *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Washington D.C. 1991. P1483. pp.1132
9. LeChevallier M. W., Welch N. J., and Smith D. B. Full Scale Studies of Factors Related to Coliform Regrowth in Drinking Water. *Appl. Environ. Microbiol. J.* 1996;62(7):2201-2211.

10. Norma H. Avendaño Flores. Taller de Métodos para el Examen Bacteriológico de Agua para Consumo Humano (tratamiento y desinfección del agua). Instituto Microbiológico de Fomento Municipal (IMFOM). Doc. Tec. 1997.
11. Federal Register. National Primary Drinking Regulations: analytical techniques; coliform final bacteria; water rule. *Fed Regist.* 1992;57:24744-24747.
12. Floridalma Cano. Técnicas Básicas para el Examen Bacteriológico de Agua para Consumo Humano. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). Doc. Tec. 1997.
13. Jean F. MacFaddin., *et al.* Media for Isolation Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore M.D. U.S.A. 1985. pp.1456. pp. 1236-1238.
14. Edberg, S.C., M. J., Allen , D.B. Smith, and The National Collaborative Study. Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Source Water by the Defined Substrate Technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990;56:366-369.
15. Olson., *et al.* Total coliform Detection in Drinking Water: Comparison of membrane filtration with colilert and coliquik. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991;57:1535-1539.
16. Lewis, C.M., and J.L. Mak. Comparison of Membrane Filtration and Autoanalysis Colilert presence-Absence Techniques for Analisis of Total Coliforms and *Escherichia coli* in Drinking Water Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990;55:3091-3094.
17. Feng, P., R. Lum, and G. Chang. Two Temperature Membrane Filter Methods for Enumeration Fecal Coliform Bacteria From Chlorinated Effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990;33:1259-1264.

18. Mates, A., and M. Shaffer. Membrane Filtration Differentiation of *Escherichia coli* from Coliforms in the Examination of Water. *J. Appl. Bacteriol.* 1990;67:343-346.
19. Dufour, A. P., E.R. Strickland, and V.J. Cabelli. Membrane Filter Method enumerating *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981;41:1152-1158.
20. Farber, J.M. Potential use of Membrane Filters and Fluorogenic Regen-Based Solid Medium for the Enumeration of *Escherichia coli* in Foods. *Can. Inst. Food Sci. Technol J.* 1986;19:34-37.
21. Freier, T. A., and P.A. Hartman. Improved Membrane Filtration Media for Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Sewage and Surface Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987;53:1246-1250.
22. Edberg, S.C., M.J. Allen, D.B. Smith, and The National collaborative Study. National Field Evaluation of a Defined Substrate Method for the Simultaneous Enumeration of Total with the Standard Multiple Tebe Method. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990;54:1595-1601.
23. Federal Register. National Primary drinking water regulations; Analytical Techniques; Coliform Bacteria; Final Rule. *Fed. Regist.* 1991;56:636-643.
24. Federal Register. National Primary Drinking Eater Regulations; Total Coliform: Proposed rule. *Fed. Regist.* 1989;54:27544-27567.
25. David A. Power. and Peggy J. McCuen. Manual of BBL Products and Laboratory Procedures. 6th. ed., U.S.A. 1988. P 850. pp 30.
26. Manual Difco. 10a. ed., Detroit Michigan U.S.A. 1985. P 1166. Pp 308, 713.

27. Edberg, S.C., and M.M. Edberg. A defined Substrate Technology for Enumeration of Microbial Indicators of Environmental Pollution. *Yale J. Biol. Med.* 1990;61:389-399.
28. Ellgas, *et al.* Evaluation of Autoanalysis Colilert in Wastewater. Presented at the Water Pollution Control Federation Conference, Chicago, Ill. 30 May 1989.
29. Lee, R. M., and P.A. Hartman. Inexpensive Disposable Presence-Absence test for Coliforms and *E. coli* in Water. *J. Food. Prot.* 1989;52:162-164.
30. Wyer M. D., *et al.* Indicator Organism Sources and Coastal Water Quality: A catchment study on the island of Jersey. *J. Appl. Bacteriol.* 1995 Mar;78(3):290-296.
31. Iritani, B., and T. J. Inzana. Evaluation of a Rapid Tube Assay for Presumptive Identification of *Escherichia coli* from Veterinary Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26:564-566.
32. Packer P. J., Mackerness C. W., and Keevil C. W. Comparison of Selective Agars for the Isolation and Identification of *Klebsiella oxytoca* and *Escherichia coli* from Environmental Drinking Water Samples. *Lett. Appl. Microbiol. M.* 1995;20(5):303-307.
33. Kristen P. Brenner., *et al.* New Medium for the Simultaneous Detection of Total Coliforms and *Escherichia coli* in Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993;59(11):3534-3544.

34. Ley, A. N., R.J. Bowers, and S. Wolfe. Indoxyl- β -D-glucuronide, a Novel Chromogenic Reagent for the Specific Detection and Enumeration of *Escherichia coli* in Environmental Samples. *Can. J. Microbiol.* 1988;34:622-627.
35. Restaino, L., E.W. Frampton, and R.H. Lyon. Use of the Chromogenic Substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC) for Enumerating *Escherichia coli* in 24 hours from Ground Beef. *J. Food. Prot.* 1990;53:508-510.
36. Rice., *et al.* Assay for β -glucuronidase in Species of the Genus *Escherichia* and its Application for Drinking Water Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991;57:592-593.
37. Rice., *et al.* Efficacy of β -glucuronidase Assay for Identification of *Escherichia coli* by the Defined Substrate Technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990;56:1203-1205.
38. Adams., *et al.* Colorimetric Enumeration of *Escherichia coli* Based on β -glucuronidase Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990;56:2021-2024.
39. Berg, J.D., and L. Fiksdal. Rapid Detection of Total and Fecal Coliforms in Water by Enzymatic Hydrolysis of 4-methylumbelliferone- β -D-galactoside. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989;54:2118-2122.
40. Biely., *et al.* A New Chromogenic Substrate for Assay and Detection of α -amylase. *Anal. Biochem.* 1988;172:176-179.
41. Frampton, E.W., L. Restaino, and N. Blaszkowski. Evaluation of the β -glucuronidase Substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC) in a 24 Hours Direct Plating Method for *Escherichia coli*. *J. Food. Prot.* 1988;51:402-404.

42. Geiss, H.K. Comparison of Two Test Kits for Rapid Identification of *Escherichia coli* by a β -glucuronidase Assay. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1990;9:151-152.
43. Manafi, W. Kneifel and S. Bascomb. Fluorogenic and Chromogenic Substrates Used in Bacterial Diagnostic. *Microbiol.* 1991;55:335-348.
44. Balebona., *et al.* Modified Most Probable-Number Technique for the Specific Determination of *Escherichia coli* from Environmental Samples Using a Fluorogenic Method. *J. Microbiol. Methods.* 1990;12:235-245.
45. M. J. Allen., *et al.* National Field Evaluation of a Defined Substrate Method for the Simultaneous Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Drinking Water: Comparison with the Standard Multiple Tube Fermentation Method. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988;54:1595-1601.
46. Berg, J. D., and L. Fiksdal. Rapid Detection of Total and Fecal Coliform in Water by Enzymatic Hydrolysis of 4-methyl-umbelliferone- β -D-galactoside. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988;54:2118-2122.
47. Delisle, G. J., and A. Ley. Rapid Detection of *Escherichia coli* in Urine Samples by New Chromogenic β -glucuronidase Assay. *J. Clin. Microbiol.* 1989;27:778-779.
48. Hartman, P. A. The MUG (glucuronidase) Test for *Escherichia coli* in Food and Water. Birixia Academic Press, Brescia, Italy. 1990.
49. Davies C. M., Apte S. C., Peterson S. M. Possible Interference of Lactose Fermenting Marine Vibrios in Coliform β -D- galactosidase Assays. *J. Appl. Bacteriol. Ap.* 1995;78(4):387-393.

50. K. S. Manja., *et al.* A simple Field for Detection of Fecal Pollution in Drinking Water. *Bull. Wor. H. Organ.* 1982;60(5):797-801.
51. Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serología de los Bancos de Sangre. PHAO/HPC/HCT/ 94.21. Washington D.C. Febrero de 1994. P 61. pp. 15 – 18 y 20 – 21.

ANEXOS

ANEXO 1

AGENTES PATOGENOS PRESENTES EN EL AGUA QUE SE TRANSMITEN POR VIA ORAL Y SU IMPORTANCIA PARA EL ABASTECIMIENTO

Agente Patógeno	Persistencia en el agua ^a	Resistencia al cloro ^b	Dosis infecciosa relativa ^c	Reservorio animal importante
BACTERIAS				
<i>Campylobacter jejuni</i>	M	B	M	si
<i>Campylobacter coli</i>	M			
<i>E. coli patógeno</i>	M	B	A	si
<i>Salmonella tify</i>	M	B	A ^d	no
Otras <i>Salmonellas</i>	P	B	A	si
<i>Shigella spp.</i>	breve	B	M	no
<i>Vibrio cholerae</i>	breve	B	A	no
<i>Yersinia enterocolitica</i>	P	B	A (?)	si
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e	puede multiplicarse	M	A (?)	no
<i>Aeromonas spp.</i>	puede multiplicarse	B	A (?)	no
VIRUS				
Adenovirus	?	M	B	no
Enterovirus	P	M	B	no
Hepatitis A	?	M	B	no
Hepatitis transmitidas por vía entérica virus de la Hepatitis no A				
no B, Hepatitis E	?	?	B	no
Virus de Norwalk	?	?	B	no
Rotavirus	?	?	M	no (?)
Virus pequeños y redondos	?	?	B (?)	no
PROTOZOARIOS				
<i>Entamoeba histolytica</i>	M	A	B	no
<i>Giardia intestinalis</i>	M	A	B	si
<i>Cryptosporidium parvum</i>	P	A	B	si
HELMINTOS				
<i>Dracunculus medinensis</i>	M	M	B	si

? No conocido o no confirmado

a Período de detección de la fase infecciosa en al agua a 20°C: breve hasta 1 semana, moderada de 1 semana a un mes; prolongada mas de un mes

b Cuando la fase infecciosa se encuentra en estado libre en el agua tratada con dosis y tiempos de contacto tradicionales. Resistencia moderada: el agente puede no quedar completamente destruido; resistencia baja: el agente queda completamente destruido

c La dosis necesaria para causar la infección en el 50% de los voluntarios adultos sano, en el caso de algunos virus, puede bastar con una unidad infecciosa

d Según los resultados de experimentos con seres humanos voluntarios (vease la sección 2.1.7)

A = alto

M = moderado

B = bajo

P = prolongado

ANEXO 2

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE DIFERENCIACION DE *Escherichia coli*

PRUEBAS	E. coli %	E.coli INACTIVA %
Producción de Indol	98*	80*
Rojo de Metilo	99	95
Voges Proskauers	0	0
Citrato de Simmon's	1	1
Hidrólisis de Urea	1	1
Lisina Descarboxilasa	90	40
Movilidad a 36 °C	95	95
Utilización de Malonato	0	40
Fermentación D-glucosa	95	5
Fermentación de Lactosa	95	25
Fermentación D-manitol	98	93
Fermentación de Sorbitol	94	75
Oxidasa Kovac's	0	0
ONPG	95	0
Sulfuro de Hidrógeno TSI	1	1

* porcentaje de reacción

Tabla tomada de Standard Methods for Examination Water Wastewater 18 th edic. 1992 pp-9-66. Modificad con información del Manual del FDA 7a. edic. 1992. pp 38.

ANEXO 3

**CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS QUE DIFERNECIAN ESPECIES DE
ESTREPTOCOCOS FECALES Y GRUPO ENTEROCOCO**

GRUPO ESTREPTOCOCOS FECALES						
GRUPO ENTEROCOCO						
TEST	<i>S. faecalis</i>	<i>S. faecium</i>	<i>S. avium</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. bovis</i>	<i>S. equinus</i>
Catalasa	-	-	-	-	-	-
40% Bilis	+	+	+	+	+	+
Esculina						
Crecimiento a 45°C	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en NaCl al 6.5 %	+	+	+	+	-	-
Crecimiento a 10 C	+	+	+	+	-	-
Utilizacion de piruvato	+	-	-	-	-	-
Actividad fosfatasa	+	-	+	+	-	-
Hidrolisis arginina	+	+	_d	-	-	-
Fermentacion lactosa	-	-	+	-	-	-
Arabinosa	-	+	+	-	-	-

+ = 90 % de positividad

- = 90% de negatividad

d = reaccion variable

EJEMPLO DE OBJETIVOS DE ELIMINACION DE LA TURBIDEZ Y LAS BACTERIAS COLIFORMES
 TERMORRESISTENTES EN EL TRATAMIENTO DEL AGUA A PEQUEÑA ESCALA

FASE Y PROCESO	TURBIDEZ		BACTERIAS COLIFORMES TERMORRESISTENTES	
	ELIMINACION %	CARGA MEDIA (UNT) b	CARGA MAXIMA (UNT)b	ELIMINACION a %
microtamizado	NA c	NA	NA	NA
Tratamiento previo	NA	NA	NA	>99.9
Coagulación/d sedimentación e	90	50	300	NA
Filtración rápida e	>80	5	30	80
Cloración final	Nac	1	5	>99.9
Distribución a tuberías maestras	NA	>1	>5	NA

a. Resultados que han de obtenerse

b. UNT: unidades nefelométricas de turbidez

c. NA: no aplicable. Proceso no destinado a eliminar la turbidez o las bacterias. El microtamizado elimina las microalgas y el zooplacton

d. Los tratamientos previos pueden reducir significativamente el número de bacterias coliformes termorresistentes, son el almacenamiento en depósitos durante 3 ó 4 semanas y la desinfección previa.

e. Conjuntamente, se puede esperar que la coagulación, la sedimentación y la filtración rápida elimine el 99.9% de las bacterias coliformes termorresistentes.

Tabla tomada de Guías para la Calidad de Agua Potable vol. 2. pp 27.

ANEXO 5

FRECUENCIA MINIMA DE LA TOMA DE MUESTRA DEL AGUA DE BEBIDA EN EL SISTEMA DE DISTRIBUCION

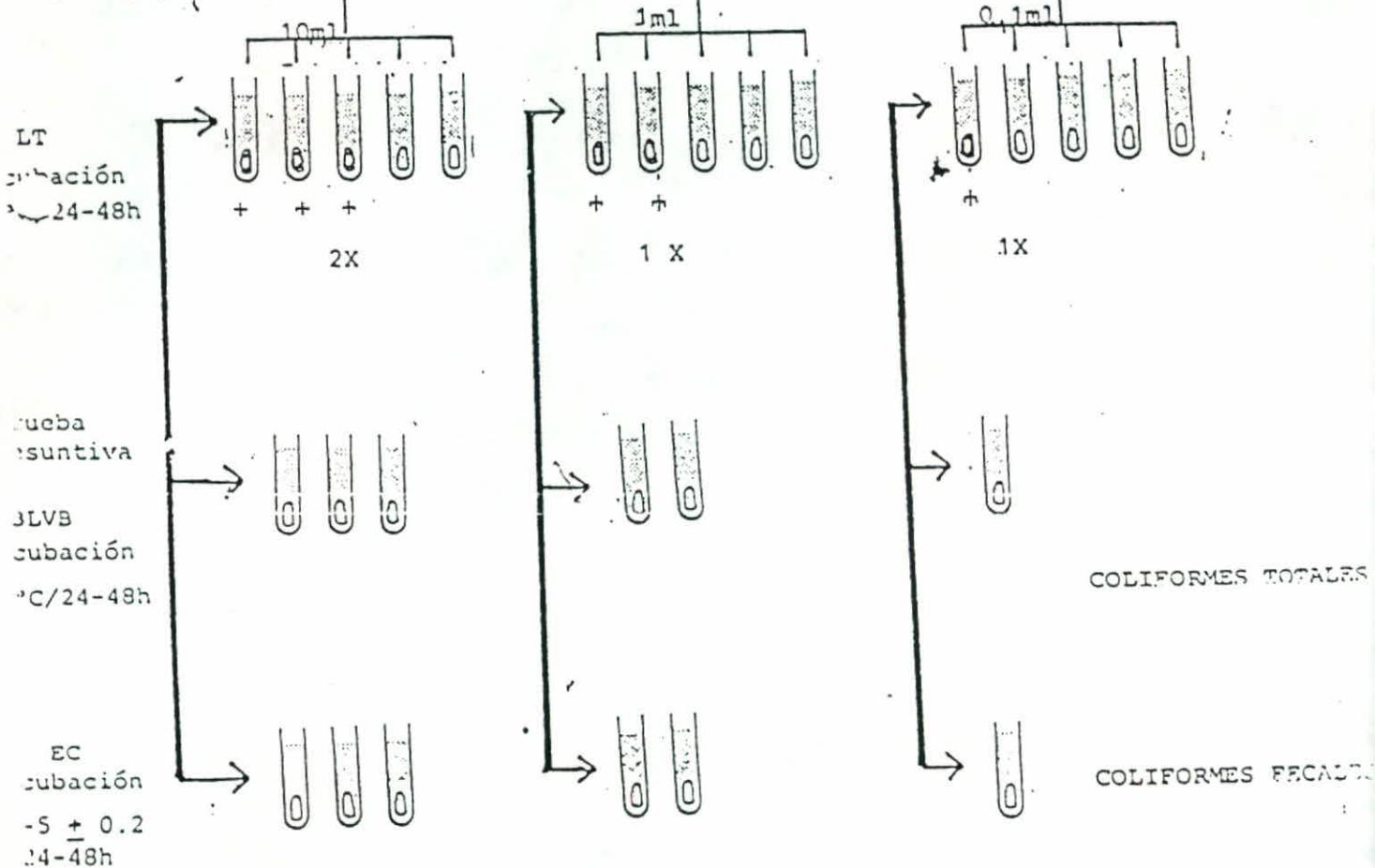
POBLACION ABASTECIDA	No. DE MUESTRAS MENSUALES
Menos de 5,000	1 Muestra
5000 a 10,000	1 Muestra por 5,000 usuarios
Mas de 100,000	1 Muestra por 100,000 usuarios Mas de 10 muestras adicionales

Tabla tomada de Guías para la Calidad de Agua Potable Vol. 2 . pp. 27

PROCEDIMIENTO
TUBOS DE FERMENTACION MULTIPLE PARA
COLIFORMES EN AGUA
(Prueba de 15 tubos)



PRUEBA PRESUNTIVA



- LT 2X = Caldo Lauril Triptosa Doble Concentración
- LT 1X = Caldo Lauril Triptosa Simple
- BLVB = Caldo Bilis Lactosa Verde Brillante
- EC = Caldo E-C

ANEXO 7

FORMULACION FINAL DEL MEDIO DE CULTIVO PARA 50 ml DE AGUA

COMPONENTES	FORMULACION FINAL Gramos
Triptona	5
Extracto de Levadura	1
Lactosa	5
Lauril Sulfato	1
Tiosulfato de Sodio	0.3
K ₂ HPO ₄	0.1
NaCl	0.5

pH final del medio 6.8 ± 1

ANEXO 8

INTERPRETACION DE LA FORMULA PARA DETERMINAR EL NUMERO DE MUESTRAS ANALIZADAS

$Z1 - 2a / 2 + Z1 - B =$ intervalo de confianza

a = límite de confiabilidad (95%)

B = límite de error permitido

S2 = desviación estándar

p = probabilidad de muestras (0.5)

q = 1-p

ANEXO 9

DETERMINACION DE LOS VERDADEROS POSITIVOS Y NEGATIVOS PARA ESTABLECER EL NIVEL DE
CONCORDANCIA DE LA METODOLOGIA EVALUADA PARA COLIFORMES TOTALES
CON EL METODO DE FERMENTACION DE TUBOS MULTIPLES (NMP)

N= 280

NUMERO MAS PROBABLE (NMP)

METODOLOGIA
EVALUADA

	+	-
+	152	5
-	12	111

positivos verdaderos= 152

negativos verdaderos=111

falsos positivos= 5

falsos negativos=12



Br. Byanca R. I. Ortiz Ruiz
Autora



Licda. Florida Cano
Asesora



Licda. Teresita Aguitar de Miranda
Asesora



Licda. Heidi Logemann
Directora



Licda. Hada Marieta Alvarado
Decana