

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a seated man, likely a saint or scholar, holding a book. Above him is a crown. To the left is a castle, and to the right is a lion. The seal is surrounded by Latin text: 'CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA' at the top and 'CIVITAS SAN CAROLINIENSIS' at the bottom. The text 'SIBI' is also visible on the left side.

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UNA PRUEBA DE FÁCIL  
APLICACIÓN PARA DETERMINACIÓN DE ENTEROCOCOS EN  
AGUA DE CONSUMO HUMANO**

**Informe de tesis**

Presentado por

**REBECA ARACELY MÉNDEZ VERAS**

Previo a optar al título de

**Química Bióloga**

Guatemala, octubre de 2004

## ÍNDICE

I. Resumen	3
II. Introducción	5
III. Antecedentes	7
A. Generalidades	7
B. Infecciones transmitidas por agua	7
C. Microorganismos indicadores de contaminación fecal	8
1. <i>Escherichia coli</i>	9
2. Bacterias coliformes termotolerantes	9
3. Coliformes totales	10
4. Streptococos fecales	10
5. Clostridios reductores de sulfito	12
6. Colifagos	12
7. Otros indicadores alternativos	13
D. Examen bacteriológico del agua	13
1. Frecuencia de muestreo	13
2. Recolección de la muestra	14
3. Transporte y recepción de la muestra	15
4. Métodos de detección de enterococos en agua	15
a. Técnica de Filtración por Membrana	15
b. Técnica de Tubos Múltiples (NMP)	17
c. Otros métodos de detección de enterococos	17
IV. Justificación	19
V. Hipótesis	21
VI. Objetivos	22
VII. Materiales y Métodos	23
VIII. Resultados	29
IX. Discusión de resultados	42
X. Conclusiones	50
XI. Recomendaciones	51
XII. Referencias	52
XIII. Anexos	56

## I. RESUMEN

El agua es una de las formas más efectivas de transmitir agentes infecciosos, por lo que los estudios que demuestren su calidad microbiológica cobran gran importancia, especialmente en países como Guatemala, donde las condiciones ambientales y de saneamiento son todavía deficientes. Sin embargo, en estos países donde la evaluación de la calidad del agua es una necesidad vital, no se cuenta con la capacidad de analizar el agua de consumo al alcance de la mayor parte de la población, debido a que se carece de infraestructura, material, equipo y personal calificado para llevar a cabo las pruebas de identificación de microorganismos indicadores de contaminación.

El objetivo principal de esta investigación era desarrollar una metodología de fácil aplicación y bajo costo que permitiera la identificación de enterococos en agua para consumo humano, como indicador microbiológico de contaminación fecal; además, de realizar su validación comparado con el método estándar, la filtración por membrana. La metodología fue realizada con base al estudio de Ortiz en el 2000 (9), donde se desarrolló una prueba rápida cualitativa de presencia-absencia para la detección de coliformes totales en agua por medio de la detección de viraje de pH ocasionado por fermentación de la glucosa. La prueba para enterococos, de forma similar, está basada en la capacidad de estas bacterias de hidrolizar la esculina en presencia de bilis.

La prueba de tipo cualitativo presentó una alta sensibilidad (99.3%, 95.5-100.0) especialmente a 42° C y a las 48 horas de incubación. Estos resultados se obtuvieron por el análisis de 310 muestras provenientes de diversas fuentes de agua del país. La especificidad aunque fue menor a la esperada (81.7%), se debió a que existen otras bacterias que hidrolizan la esculina y que pueden dar reacción cruzada cuando se encuentren en agua, como algunas de los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Aeromonas* y *Serratia*. Sin embargo, los objetivos del estudio se alcanzaron ya que se logró desarrollar una prueba de fácil aplicación y de bajo costo que puede ser utilizada en el campo para realizar tamizajes de la calidad microbiológica de las aguas utilizadas para consumo humano.

La metodología desarrollada es de fácil aplicación para lugares que carecen de los elementos necesarios para realizar análisis de calidad microbiológica del agua por los

métodos tradicionales, lo que resulta de suma importancia para que se promueva el uso de pruebas sencillas en laboratorios pequeños del interior del país y en las Municipalidades y Centros de Salud que deben velar por la calidad microbiológica del agua. Esta prueba cualitativa de presencia-ausencia se recomienda para ser utilizada en la determinación de enterococos en agua y en la vigilancia microbiológica de la calidad del agua para consumo humano.

## II. INTRODUCCIÓN

El agua es considerada como uno de los alimentos y productos de mayor consumo en el mundo. Sin embargo es también uno de los vehículos más efectivos como transmisor de infecciones, ya que se han encontrado muchos agentes patógenos en abastecimientos de agua, supuestamente potable. El mayor riesgo de infecciones gastrointestinales asociado al agua para consumo humano son las enfermedades causadas por bacterias, parásitos y virus. Estos son transmitidos por el agua y por las heces de origen humano o animal que la contaminan. El uso de esta agua para consumo, preparación de alimentos, utilización durante lavado o baño e incluso la inhalación de sus vapores o aerosoles, puede causar una infección (1, 2).

La forma más sensible y específica de asegurar la calidad higiénica y potabilidad del agua para consumo humano es por medio de la determinación de organismos indicadores de contaminación fecal. El principal indicador es *Escherichia coli* y las bacterias coliformes termotolerantes. Sin embargo, para la identificación completa de *E. coli* se requiere de tiempo, diversos medios de cultivo y equipo especializado, aunado a un costo relativamente elevado, lo cual resulta muy complicado o económicamente inaccesible para uso rutinario en laboratorios pequeños. Estudios recientes han demostrado que *E. coli* y las bacterias coliformes totales y termotolerantes no siempre se encuentran en ambientes contaminados con heces fecales, lo que hace controversial su papel como bacterias indicadoras. Por lo que se hace necesaria la utilización de otros microorganismos indicadores más específicos de contaminación fecal (1, 6, 23).

Otras bacterias utilizadas como indicadoras de contaminación fecal son aquellas del género *Enterococcus* que se encuentran presentes en heces de humanos y animales. Los enterococos son más persistentes en el ambiente que *E. coli* y los coliformes termotolerantes, por lo que pueden ser utilizados como buenos indicadores de la calidad microbiológica de agua para consumo humano y el monitoreo de la eficacia de los tratamientos de desinfección utilizados para garantizar la potabilidad (3,4). Debido a su resistencia ante condiciones ambientales adversas, se les considera como los principales microorganismos indicadores en aguas recreacionales dulces y marinas. Los enterococos también tienen la ventaja de que los métodos utilizados para su detección y enumeración no presentan alto grado de complejidad, ni se necesita infraestructura,

material o equipo de gran especialización, como es requerido para identificar a otros microorganismos indicadores tales como colifagos o clostridios y bacterias anaerobias (1, 7,8,11).

La alta incidencia de enfermedades gastrointestinales transmitidas a través del agua, especialmente en niños y en países con un saneamiento ambiental deficiente, hace necesario que se efectúe un análisis frecuente del agua para determinar su potabilidad. Sin embargo, el alto costo y la complejidad de los métodos actuales para detección de indicadores de contaminación fecal no permiten que estos análisis se realicen rutinariamente en los laboratorios del país. Por esta razón es necesario desarrollar pruebas más sencillas, rápidas y de bajo costo que contribuyan a evaluar la calidad microbiológica del agua para consumo humano, principalmente, en las comunidades rurales de Guatemala.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Generalidades

El agua para consumo es aquella utilizada en alguna actividad como preparación de alimentos, bebida, aseo personal, comercio, fabricación de bebidas, etc. El agua potable se define como la que es apta para consumo humano y que no posee elementos químicos, físicos o microbiológicos que alteren su composición. También se consideran constituyentes indeseables del agua aquellos elementos capaces de causar un impacto negativo en la salud pública (1).

Los consumidores no tienen la capacidad de conocer la calidad del agua a menos que ésta se encuentre alterada en su composición física, cuando ocasiona cambios perceptibles por los sentidos (1). Sin embargo, existen parámetros físicos que orientan a conocer la calidad del agua, como son el color, sabor, olor, temperatura y turbidez. Si alguno de éstos se ve alterado puede ser un indicador potencial de contaminación o tratamiento deficiente del agua (1,3).

Los agentes infecciosos causantes de gastroenteritis son transmitidos principalmente por excretas de humanos o animales. Uno de los vehículos más apropiados para transportar agentes infecciosos es el agua y la utilización de agua contaminada en una comunidad puede dar como resultado infecciones en sus habitantes (1-3).

#### B. Infecciones transmitidas por el agua

Los organismos patógenos que presentan un alto riesgo de causar infección gastrointestinal, si se encuentran presentes en agua utilizada para consumo humano, son los siguientes: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* enteropatógena, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Giardia* spp., *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Dracunculus medinensis*, Rotavirus, Adenovirus y Enterovirus. La mayor parte de ellos suelen provenir de heces fecales (1, 2).

Además, existen otros microorganismos que se encuentran de manera natural en el ambiente pero son considerados oportunistas debido a que presentan baja patogenicidad y solamente afectan a individuos inmunosuprimidos. Entre éstos puede mencionarse:

*Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium* spp., *Acinetobacter* spp, *Serratia* spp, *Aeromonas* spp y algunas micobacterias (1, 2).

Los organismos patógenos después de abandonar su hospedero pierden viabilidad y capacidad infectiva; este descenso es de manera exponencial, por lo que transcurrido cierto tiempo éstos pueden ser no detectables. Los patógenos con baja capacidad de persistencia deben encontrar rápidamente un nuevo hospedero para sobrevivir. Generalmente este tipo de agentes se encuentran en fluidos corporales y son transmitidos de persona a persona o por medio de agua y alimentos contaminados. Debido a que las heces se dispersan rápidamente en superficies acuáticas, los patógenos más comunes transmitidos por el agua son aquellos con la mayor persistencia y capacidad infectiva. La persistencia en el agua puede ser afectada por factores como temperatura, concentración de cloro, cantidad de materia orgánica, etc. (1, 2).

Los métodos utilizados para el aislamiento y recuento de microorganismos patógenos pueden no ser efectivos o eficaces debido a la baja cantidad de los mismos que estén presentes en el agua. Existen algunos patógenos que no pueden detectarse en laboratorios que no cuenten con la capacidad para aislarlos, como es el virus de hepatitis A. Sin embargo, es de menor complejidad detectar otros microorganismos cuya presencia y persistencia indica contaminación fecal o inadecuada eficacia de procedimientos de desinfección del agua (1,3).

### **C. Microorganismos indicadores de contaminación fecal**

Los microorganismos indicadores son aquellos cuya presencia significa que la muestra estuvo expuesta a condiciones que pudieron determinar la llegada o acceso de microorganismos patógenos (3).

Los indicadores microbiológicos de contaminación deben cumplir algunos requisitos para ser considerados como tales: estar presentes en grandes cantidades en heces humanas o animales, ser detectados por métodos sencillos y no multiplicarse en agua; además su persistencia y susceptibilidad de eliminación debe ser similar a la de los microorganismos patógenos (1).

La mayor parte de ensayos utilizados para evaluar la calidad microbiológica del agua se han diseñado para la determinación de microorganismos indicadores más que

para patógenos, ya que la detección de estos indicadores es la manera más eficiente de asegurar la calidad higiénica del agua (1,3).

Los microorganismos indicadores más frecuentes son los siguientes: *Escherichia coli*, bacterias coliformes (totales y termotolerantes), estreptococos fecales, clostridios reductores de sulfito, colifagos y algunos otros de menor importancia (1-3).

### 1. *Escherichia coli*

Esta bacteria es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae* y se caracteriza por poseer las enzimas  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucuronidasa. Crece a 44-45 °C en medios tensoactivos, fermenta la lactosa y el manitol con producción de ácido y gas, e indol a partir del triptófano. Algunas cepas crecen a 37 °C pero no a 44-45 °C y otras no producen gas (1-3).

*E. coli* está presente en heces humanas y de animales en concentración de 10 bacterias por gramo y es considerada como el mejor indicador de contaminación fecal. Además, se encuentra en drenajes, aguas residuales y suelos susceptibles a contaminación. Debido a que las heces fecales de animales pueden transmitir microorganismos patógenos infectivos para el hombre, nunca debe menospreciarse la presencia de *E. coli* en una muestra de agua (1, 2).

### 2. Bacterias coliformes termotolerantes (o coliformes fecales)

Estas son bacterias Gram negativo, aerobios o anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa en forma de gas cuando en un medio de cultivo se incuban a 44-45 °C. Comprende los géneros *Escherichia* y especies de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Las bacterias termotolerantes diferentes a *E. coli* pueden encontrarse en aguas con materia orgánica y vegetal, efluentes industriales y suelos. Por esta razón se recomienda no utilizar el término coliformes fecales (1,3).

La concentración de coliformes termotolerantes y *E. coli* está directamente relacionada. Debido a que la presencia de coliformes termotolerantes puede ser detectada fácilmente y en poco tiempo, éstas representan un papel secundario como indicadores de contaminación fecal y de eficiencia en los tratamientos de desinfección del agua (1, 2).

### 3. Coliformes totales

Estas son bacterias Gram negativo capaces de crecer en presencia de sustancias tensoactivas con propiedades inhibitorias como las sales biliaras. Fermentan la lactosa a 35-37 °C con producción de ácido, gas y aldehído en un período comprendido de 24 a 48 horas. Incluye a las bacterias del género *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Las bacterias *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii* pueden encontrarse en heces y en ambientes como suelos y aguas con exceso de nutrientes y materia orgánica (1, 2, 4,5).

Las bacterias coliformes totales son ampliamente utilizadas como indicadores debido a su presencia abundante en heces. La desventaja de estos microorganismos es que el encontrarlos no siempre es indicativo de contaminación fecal o presencia de patógenos en agua (1, 6). Sin embargo, varios estudios han demostrado que *E. coli* y las bacterias coliformes son menos resistentes a condiciones adversas que otros microorganismos indicadores, como son los estreptococos fecales, enterococos y clostridios reductores de sulfito (1, 6,7).

La utilización de coliformes totales como indicadores de contaminación fecal se ve muy limitada debido a que este grupo comprende bacterias de origen fecal y no fecal. Sin embargo la presencia de estas bacterias sugiere un tratamiento inadecuado del agua, contaminación post tratamiento o presencia de exceso de nutrientes orgánicos en el agua. Si se encuentra coliformes totales en ausencia de *E. coli* y coliformes termotolerantes, debe identificarse a las especies de bacterias presentes o buscar otros microorganismos indicadores (1).

### 4. Estreptococos fecales

Los estreptococos fecales están presentes en heces de humanos y animales de sangre caliente, por lo que han sido considerados como buenos indicadores de contaminación fecal en agua, principalmente en ríos, lagos, estuarios, etc. (5).

Los estreptococos fecales comprenden microorganismos del género *Enterococcus* y algunas especies de estreptococos: *Streptococcus bovis* y *S. equinus*. Todos pertenecen al grupo D de Lancefield (1,5).

Los enterococos son un subgrupo de los estreptococos fecales con morfología cocoide, Gram positivo, catalasa negativo, anaerobios facultativos cuya temperatura de

crecimiento oscila entre 10 y 45 °C, siendo el óptimo a 35 °C. La mayoría de enterococos crecen en caldos de cultivo conteniendo 6.5% de cloruro de sodio, a pH 9.6 e hidrolizan la esculina en presencia de 40% de bilis o 4% de sales biliares. Algunas especies son móviles. La mayor parte de estas bacterias hidrolizan la pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida (PYR) y todas las cepas producen leucin amino peptidasa (LAP). Son homofermentativos, sin producción de gas, obteniendo ácido láctico al final de la fermentación de la glucosa. Resisten temperaturas de 60 °C durante 30 minutos y reducen 0.1% de azul de metileno. Los enterococos hidrolizan sustancias como el 4-metilumbelifenil- $\beta$ -D-glucósido (MUD) por la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa con producción de fluorescencia azul a 366 nm. También son capaces de crecer en presencia de acetato de talio, ácido nalidíxico y cloruro de 2, 3,5-trifeniltetrazolio (TTC) en diferentes medios de cultivo (1, 8,9).

La taxonomía de los enterococos ha cambiado recientemente. Todos los estreptococos que comparten las propiedades bioquímicas descritas anteriormente son parte del género *Enterococcus* y que presentan amplia tolerancia a condiciones adversas de crecimiento. Incluye a las especies mencionadas en el anexo 1. La mayor parte de estas especies se encuentran en heces y pueden ser consideradas como indicadoras de contaminación fecal humana y animal. Las especies de enterococos más frecuentemente encontradas en agua son *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* y *E. mundii* (1, 4, 8,9).

Los enterococos presentan ciertas ventajas como indicadores de contaminación fecal, siendo las siguientes:

- se encuentran en grandes cantidades en excretas de humanos y animales de sangre caliente,
- se han aislado en aguas de desecho y con alto grado de contaminación,
- no se han encontrado en aguas limpias, suelos y ambientes sin contacto de vida humana o animal,
- son persistentes sin multiplicarse en el ambiente,
- su aislamiento y cultivo es fácil de realizar,
- pueden ser utilizados para conocer el origen de la contaminación (7,11).

Los enterococos son más persistentes que *E. coli* y bacterias coliformes en condiciones ambientales adversas; además, son altamente resistentes a la desecación

por lo que son de gran utilidad como indicadores microbiológicos de contaminación para el control de sistemas de distribución de agua (3).

#### **5. Clostridios reductores de sulfito**

Estas son bacterias anaerobias esporoformadoras que fermentan la lactosa, sucrosa e inositol con producción de gas. *Clostridium perfringens* está normalmente presente en heces pero en menor cantidad que *E. coli*. Los clostridios también se encuentran en el ambiente por lo que su origen no es necesariamente fecal. Las esporas que producen pueden resistir la desinfección y su presencia en aguas desinfectadas indica tratamientos inadecuados. Los clostridios no son recomendados en uso rutinario para monitorear la calidad de los sistemas de distribución de agua (1, 2).

#### **6. Colifagos**

Los bacteriófagos han sido propuestos como indicadores de calidad del agua debido a su similitud con los enterovirus humanos y por su facilidad de detección en agua (1, 2).

Los colifagos infectan y se multiplican en bacterias sensibles a ellos, lo que provoca lisis celular y liberación de partículas virales que infectan a bacterias adyacentes. En medios de cultivo sólido aumenta la lisis bacteriana y se forman zonas claras conocidas como playas de lisis entre el crecimiento confluyente de la bacteria utilizada (3). Actualmente se han estudiado dos grupos de bacteriófagos: aquellos que infectan a *E. coli* por poseer receptores de pared celular y los ARN-F específicos que infectan cepas por medio del pili sexual F (1-3).

Los colifagos son indicadores de contaminación del agua con desechos residuales y, por su mayor persistencia que las bacterias, también son indicadores de la eficacia de tratamiento de los sistemas de agua (1).

Los colifagos presentan la desventaja de ser afectados por una gran cantidad de factores que alteran su sobrevivencia e incidencia en ambientes acuíferos, como son la temperatura, pH y densidad bacteriana. La detección de colifagos en agua requiere técnicas que aún no se han desarrollado de manera completa y uniforme, por lo que esta metodología aun requiere de más investigación (11).

## 7. Otros indicadores alternativos

Existen otras bacterias que han sido utilizadas como indicadores de calidad microbiológica del agua por encontrarse abundantemente en heces; tal es el caso del grupo de bifidobacterias y *Bacteroides fragilis*. Sin embargo no han sido considerados como buenos indicadores de contaminación fecal debido a que su persistencia en el agua es baja y los métodos de detección aún no han sido estandarizados (1).

### D. Examen bacteriológico del agua

#### 1. Frecuencia de muestreo

La frecuencia de la toma de muestra está determinada por el total de la población servida pero se realiza dependiendo de los recursos disponibles. Sin embargo, mientras más frecuentemente se analiza una fuente de agua mayor es la probabilidad de detectar contaminación. Esta probabilidad aumenta si la muestra es recolectada a diferentes horas en un mismo día o durante diferentes días en una semana. También es más valioso realizar pruebas periódicas por un método sencillo, que exámenes menos frecuentes por técnicas complejas (1).

La frecuencia de muestreo de fuentes de aguas dependerá de factores establecidos por las instituciones de saneamiento ambiental con base a normas y guías del país (1). En el caso de Guatemala es la norma **COGUANOR** CDU 637:148 en vigencia la que establece los estándares requeridos (12).

Para el caso de aguas en procesos de tratamiento, la frecuencia de muestreo depende de la fuente inicial del agua y el tipo de tratamiento. El muestreo mínimo que debe realizarse es de una muestra cada dos semanas para aguas de una fuente subterránea; y una muestra cada semana en el caso de aguas provenientes de superficies. La frecuencia de muestreo debe ser mayor cuando la cantidad de personas que serán abastecidas es grande, debido a que aumenta el número de personas en riesgo. En el Anexo 3 se presenta un cuadro de frecuencia de muestreo recomendado de acuerdo al número de habitantes de una población (1).

## 2. Recolección de la muestra

Una muestra de agua se recolecta siguiendo los mismos pasos que para cualquier otra muestra, cuidando el recipiente, volumen y etiquetado. La muestra debe tomarse en recipientes limpios, estériles, de boca ancha o bolsas de plástico estériles. La recolección de la muestra debe hacerse de manera rápida y cuidadosa. El volumen mínimo requerido es de 100 mL y debe llevar una etiqueta con datos de origen de la muestra, fecha y hora de recolección, naturaleza del agua y datos sobre su transporte. El recipiente recolector se abre únicamente al momento de introducir la muestra y se cierra de inmediato. Se debe dejar siempre un espacio de aire para facilitar la agitación de la muestra y es importante evitar el contacto de la misma con el exterior o con las manos de la persona que lleva a cabo la recolección (2, 13, 14).

Si se requiere tomar una muestra de agua proveniente de un grifo, éste debe limpiarse previamente con algodón y alcohol al 70%. El procedimiento requiere de lo siguiente: se abre la llave del grifo dejando correr el agua durante dos o tres minutos; luego se abre el recipiente recolector llenándolo las tres cuartas partes de su capacidad. Se cierra el frasco y se envía al laboratorio entre las 6 y 8 horas de recolección. Si se sospecha que el agua contiene cloro es necesario inactivarlo previamente mediante la adición de tiosulfato de sodio al 10% (13).

El procedimiento para recolectar aguas provenientes de fuentes abiertas y depósitos es el siguiente: se sumerge un recipiente estéril de acero inoxidable en la fuente de agua y se toma la muestra. Si es agua proviene de un río, la muestra se debe tomar en sentido contrario a la corriente. Seguidamente se vierte el agua al frasco estéril evitando la contaminación en el trasvase. En caso de no contar con el recipiente de acero inoxidable, se debe sumergir el propio frasco estéril rápidamente en el tanque y cerrar lo más pronto posible. Cuando el muestreo se hace en un conducto de salida se deja correr una parte del agua para limpiar la salida de la misma (13).

Para recolectar y tomar muestras provenientes de aguas superficiales y recreacionales se utiliza el mismo procedimiento descrito para ríos, con la diferencia de que se debe obtener las muestras de diferentes puntos de acuerdo al objetivo de los análisis y se debe establecer una frecuencia de muestreo. En el caso de aguas profundas se sumerge el recipiente de 30 centímetros a 1 metro de profundidad y se gira el frasco hasta que quede con la abertura contra la corriente. De no haber corriente se mueve

horizontalmente. El frasco al estar lleno se saca inmediatamente y se cierra. Si se requiere una muestra a mayor profundidad es necesario colocar un peso al recipiente para sumergirlo. Luego se debe enviar la muestra al laboratorio siguiendo las mismas precauciones mencionadas para el transporte de agua de grifo (13, 14).

### **3. Transporte y recepción de la muestra**

En caso de no ser posible enviar la muestra inmediatamente al laboratorio donde será analizada, ésta debe refrigerarse después de la recolección y ser transportada a una temperatura menor de 10 °C. Si la muestra no es enviada al laboratorio en 6 a 8 horas luego de ser recolectada, se recomienda que el tiempo máximo permisible sea de 24 horas para que el resultado obtenido sea válido. Todas las muestras deben estar rotuladas correctamente al llegar al laboratorio. En ese momento debe llenarse un formulario de solicitud que indicará el tipo de análisis, fecha, hora y tiempo de entrega de resultados (14).

### **4. Métodos de detección de enterococos en agua**

El análisis de microorganismos indicadores en muestras de agua tiende a determinar la calidad sanitaria de la misma. Los métodos utilizados están diseñados para detectar el grado de contaminación del agua con desechos de origen humano y/o animal (1, 3).

Los métodos más utilizados para la determinación de enterococos en agua son la técnica de tubos múltiples y filtración por membrana. Ambas pruebas pueden ser utilizadas tanto para aguas frescas como aguas marinas (8).

#### **a. Técnica de filtración por membrana**

Se basa en la filtración de una muestra de agua para concentrar células (bacterias) viables sobre la superficie de una membrana y transferirlas a un medio de cultivo apropiado para contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) desarrolladas luego de un período de incubación (15). El método de filtración por membrana para detectar enterococos es utilizada desde 1985 para monitorear la calidad del agua. El análisis se realiza en 24 horas y es aplicable a aguas potables y recreacionales (2, 15).

Por este método se obtiene un conteo o recuento directo de bacterias en aguas, basado en el crecimiento de colonias en la superficie de un filtro de la membrana. La muestra es filtrada a través de la membrana que retiene las bacterias. Luego de la filtración se coloca la membrana sobre un medio selectivo y es incubado por 24 horas a 41 °C. Se ha propuesto una gran variedad de medios selectivos para identificar enterococos como Slanetz-Bartley (SB), Pfizer selective enterococcus (PSE), mE agar, KF *streptococcus* agar y agar Kanamicina-Esculina (KAA). En el Anexo 4 se muestran los principios de reacción de algunos medios de cultivo para aislamiento de enterococos. Estudios anteriores han demostrado que los medios SB, mE agar y KAA presentan la mayor especificidad (5). Si se utiliza agar mE las colonias de enterococos presentan un halo azul. Después de la incubación se cuentan las colonias y se escogen aquellas cajas que contengan entre 20 a 60 colonias de bacterias. Para realizar el conteo, es aconsejable utilizar una lámpara fluorescente y un magnificador logrando así una mayor visibilidad de las colonias (16, 17).

Luego de obtener crecimiento bacteriano en el medio selectivo se verifica que las bacterias sean enterococos. Se seleccionan algunas colonias y se inoculan en caldo y en agar BHI, incubándose por 48 horas a  $35 \pm 0.5$  °C. Después se transfieren colonias a los siguientes medios de cultivo: Agar Bilis Esculina (BEA) y se incuba por 48 horas a  $35 \pm 0.5$  °C; caldo BHI con 6.5% de cloruro de sodio a  $35 \pm 0.5$  °C por 48 horas y en caldo BHI a  $45 \pm 0.5$  °C durante 48 horas. Se observa el crecimiento y se realizan frotis para tinción de Gram. Si se observan cocos Gram positivo que crecen en BEA, caldo BHI con 6.5% NaCl, caldo BHI a 45 °C e hidrolizan la esculina, son confirmados como enterococos (4, 9, 17).

Para calcular la cantidad de enterococos presente en la muestra de agua analizada se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Enterococos/100 mL} = \frac{\text{(número de colonias contadas)}}{\text{(volumen de agua filtrada en mL)}} * 100$$

El resultado se reporta como enterococos por 100 mL de muestra (3). El tiempo que aproximadamente tarda una muestra en ser procesada, siguiendo la técnica de filtración por membrana, es de 72 a 96 horas con la verificación de los enterococos pero sin identificar la especie. El proceso de identificación de género y especie se lleva a cabo por medio de pruebas bioquímicas especializadas que aumentan el tiempo y costo de procesamiento de la muestra (8, 9, 17). A pesar del tiempo implicado en el

procedimiento, y del alto costo del material y equipo requerido, la técnica de filtración por membrana es considerada el método de referencia para la determinación de enterococos en aguas (8, 17).

**b. Técnica de Tubos Múltiples y Número Más Probable (NMP)**

La metodología de tubos múltiples y Número Más Probable se fundamenta en la producción de turbidez en un caldo selectivo para enterococos, luego de 24-48 horas de incubación a 35 °C. Consta de dos etapas, la presuntiva y la confirmatoria (8).

La precisión de este método depende del número de tubos utilizados, que pueden ser tres o cinco. Los resultados son reportados como número más probable (NMP); lo cual está basado en tablas de probabilidad estadística ya estandarizadas. Este resultado permite conocer la densidad bacteriana de enterococos en la muestra y se interpreta de manera similar a la técnica de número más probable para bacterias coliformes (10).

El procedimiento de esta técnica consiste en inocular la muestra de agua en una serie de tubos con caldo azida dextrosa en cantidades de múltiplos de 1 en decimales. Cuando se trabaja con 10 mL de muestra (que es la mayor cantidad que puede inocularse) se utiliza doble concentración de caldo. Los tubos se incuban a  $35 \pm 2$  °C y se observa turbidez en 24-48 horas. En la fase confirmatoria se siembra una porción de muestra de los tubos positivos en un medio selectivo como agar Pfizer selectivo enterococos (PSE). Se incuba a 35 °C por 24 horas; y las colonias negruzcas con halos color café se transfieren a un tubo de caldo BHI con 6.5% NaCl y se incuban a 45 °C. El crecimiento en este último es confirmatorio para enterococos. Al analizar muestras de agua por este método el resultado se obtiene después de 72 horas, debido a los diferentes tiempos de incubación requeridos (8).

**c. Otros métodos de detección. Pruebas de presencia-ausencia**

El tiempo extenso que es requerido para realizar los métodos de detección de enterococos en agua ha impulsado al desarrollo de pruebas rápidas. Uno de estos métodos está basado en el uso de compuestos cromogénicos que son adicionados a medios de cultivo convencionales. Las sustancias cromogénicas son modificadas por enzimas o metabolitos bacterianos y después de esta modificación se da un cambio de

color o fluorescencia perceptible. El tiempo requerido para la realización de este método varía entre 14 y 18 horas (11).

Estos métodos, llamados de presencia-ausencia, poseen substratos enzimáticos específicos que permiten identificar la bacteria que se busca. Para la determinación de enterococos se ha desarrollado una prueba presencia-ausencia que utiliza como substrato indicador al 4-metilumbeliferona- $\beta$ -D-glucosidasa, que fluoresce cuando es metabolizado por los enterococos. El metilumbeliferona es altamente sensible y específico, fácilmente detectable con lámparas de luz ultravioleta (8, 17, 18).

Los métodos de presencia-ausencia, tanto para enterococos como para coliformes totales, han mostrado una buena correlación con los métodos tradicionales de filtración por membrana y Número Más Probable cuando son utilizados en aguas potables y recreacionales (11, 17).

## IV. JUSTIFICACIÓN

El mayor impacto negativo que el agua puede tener sobre la salud pública se da a través del agua utilizada para bebida, cuya fuente puede estar contaminada por la escorrentía pluvial, aguas residuales municipales, agua de retorno del riego agrícola, desperdicios del procesamiento de los alimentos y desechos de origen humano y animal. Estos últimos contaminan el agua con diversos agentes patógenos que ocasionan enfermedades e incluso muertes a nivel mundial, principalmente en niños (19).

En Guatemala las enfermedades diarreicas son la segunda causa de morbilidad y mortalidad infantil en niños menores de 5 años de edad, debido principalmente, a la falta de servicios de agua potable y saneamiento básico. De acuerdo a la “Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos Familiares 1998-1999”, sólo el 58.5% de las viviendas en el país cuentan con estos servicios. El 89.6% de las viviendas del área urbana cuentan con una red de distribución de agua, mientras que en el área rural solamente es sólo del 43.6%. En el área urbana el 73.3% de las viviendas están conectadas a una red de distribución de desagües y escasamente el 1.4% lo están en el área rural (20).

Según la “Evaluación de los Servicios de Agua Potable y Saneamiento 2000 en las Américas”, el sistema de disposición de excretas y desechos sólidos en Guatemala es deficiente, debido a que en muchos lugares la disposición se efectúa en canales abiertos, o fosas sépticas; además, la mayoría de los alcantarillados desembocan en cuerpos receptores de agua, aumentando el riesgo de adquirir infecciones por medio del consumo de la misma. Esto indica que, en Guatemala, como en otros países en vías de desarrollo, pocas personas tienen acceso al agua potable, segura e inocua, y que existe una alta probabilidad de que esa agua esté contaminada, ya sea por desechos sólidos o por excretas de humanos o animales (20).

La detección, remoción e inactivación de los agentes patógenos en agua potable es esencial para proteger a los consumidores de brotes de enfermedades transmitidas por la misma. Sin embargo, la identificación de los agentes patógenos no se realiza rutinariamente; la contaminación fecal se detecta por medio de la presencia de microorganismos indicadores (21).

Ninguno de los microorganismos indicadores de contaminación fecal ha sido catalogado como el indicador “ideal”, debido a que en su totalidad no reúnen los

criterios para ser considerado como tal. *E. coli* y las bacterias coliformes son ampliamente utilizadas como indicadores de contaminación fecal debido a su presencia abundante en heces y a que cumplen con la mayoría de los parámetros de un microorganismo indicador. La desventaja de estas bacterias es que el encontrarlas no siempre son indicadoras de contaminación fecal o presencia de patógenos en agua (1, 6, 22). Varios estudios han demostrado que *E. coli* y las bacterias coliformes son menos resistentes a condiciones adversas que otros microorganismos indicadores, además, su presencia no permite conocer el origen de la contaminación. Por lo que se han realizado estudios para evaluar la eficacia de otros microorganismos como indicadores de la calidad microbiológica de agua y la eficiencia de los tratamientos (1, 6-8, 11).

Las diferentes guías de calidad microbiológica del agua para consumo humano consideran a *E. coli* y a los enterococos como los mejores indicadores de contaminación fecal en Estados Unidos de América y en diferentes países de Europa. Las normas de dichos lugares establecen que para agua de consumo humano debe encontrarse 0 colonias en 100 mL, tanto de *E. coli*, como de coliformes y enterococos (1, 23). En Guatemala la norma **COGUANOR** vigente solamente incluye estándares para *E. coli* y bacterias coliformes (termotolerantes y totales), pero no considera a otros microorganismos como indicadores de contaminación fecal en agua (ver Anexo 2) (12).

Por lo que es necesario que se establezcan mejores criterios microbiológicos de calidad del agua para consumo humano de acuerdo a los problemas especiales y necesidades de cada país (6). Sin embargo, esto sólo puede realizarse con base a estudios que demuestren la situación real de la calidad microbiológica del agua que se consume en cada lugar. Considerando que los métodos rutinarios de detección de contaminación microbiológica en el agua requieren infraestructura, material, equipo y personal especializado, es importante el desarrollo de métodos sencillos, rápidos y de bajo costo para determinar la calidad microbiológica del agua, principalmente en el interior del país, y así disminuir la incidencia de infecciones y muertes ocasionadas por el uso o consumo de agua contaminada.

## V. HIPÓTESIS

Por ser descriptivo este estudio no incluye hipótesis.

## VI. OBJETIVOS

### A. General

1. Desarrollar una prueba de fácil aplicación para la detección de contaminación fecal en agua para consumo humano mediante la determinación de enterococos.

### B. Específicos

1. Desarrollar una prueba rápida para determinar la presencia de enterococos en agua para consumo humano.
2. Determinar la especificidad, sensibilidad, valores predictivos negativo y positivo de la prueba para determinar la presencia de enterococos en agua y realizar el proceso de validación de la misma.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo

Se analizó un total de 310 muestras de agua, provenientes de diferentes lugares de la ciudad capital y el país, que fueron transportadas al Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) para determinar la presencia de enterococos.

### B. Materiales

#### 1. Instrumentos

- Gradillas
- Asas bacteriológicas
- Pinzas
- Cajas de Petri
- Algodón
- Papel filtro Whatman No.3
- Bolsa plástica Nasco de 4 onzas
- Papel parafilm
- Papel parafinado
- Filtros Millipore de 25 mm de diámetro con poro de 0.45  $\mu\text{m}$
- Masking tape
- Marcadores
- Guantes descartables

#### 2. Cristalería

- Tubos de vidrio con tapón de rosca
- Pipetas de volumen 0.1, 1.0 y 10 mL
- Erlenmeyers
- Probetas
- Frascos de vidrio o plástico autoclaveables de 100 mL

### 3. Equipo

- Autoclave
- Estufa
- Campana de flujo laminar
- Incubadora a 36 °C
- Incubadora de 45 °C
- Nefelómetro de McFarland (0.5)
- Refrigeradora
- Balanza
- Vortex
- Filtros para agua
- Bomba de vacío
- Mechero Bunsen

### 4. Reactivos

- Agua destilada
- Cloruro de sodio
- Bilis de buey
- Esculina
- Citrato férrico amónico
- Peptona
- Extracto de levadura
- Azida de sodio
- Tiosulfato de sodio
- Caldo infusión de cerebro corazón (BHI)
- Agar infusión de cerebro corazón (BHI)
- Agar Bilis Esculina Azida (BEA)

## 5. Microorganismos:

- *Enterococcus faecalis* ATCC 25925
- *Enterococcus faecium* INV 19856
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Enterobacter cloacae* INV 84569
- *Klebsiella pneumoniae* INV 87486
- *Vibrio cholerae* ATCC 9459
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

## C. Metodología

### 1. Formulación del medio de cultivo

Para desarrollar la prueba rápida presencia-ausencia para detección de enterococos en agua se formuló un medio de cultivo con base en los medios de cultivo comerciales. Luego se impregnó 1 mL del medio formulado a un disco de papel filtro Whatman No. 3 de 4 cm. de diámetro, con base al estudio realizado por Ortiz (2).

### 2. Evaluación de las condiciones de almacenamiento

Luego de impregnar el disco con el medio formulado, se realizaron pruebas para evaluar la influencia de factores ambientales sobre el almacenamiento del mismo, relacionando los factores tiempo y temperatura sobre la apariencia, color y funcionalidad del disco.

### 3. Validación de la prueba

Se analizaron un total de 310 muestras de agua por medio de la nueva metodología desarrollada, en correlación con el método de filtración por membrana para enterococos descrito en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (8). Las muestras de agua se obtuvieron de diferentes fuentes: grifos de los departamentos de Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez y Zacapa; de piscinas de los departamentos de Escuintla, Guatemala y Petén; de pozos artesanales cuya agua es utilizada para consumo humano en los departamentos de Chimaltenango, El Progreso,

Escuintla, Izabal, Guatemala, Sacatepéquez, Sololá y Zacapa; además de ríos de los departamentos de Escuintla, Izabal, Guatemala, Sacatepéquez y Zacapa, y lagos de los departamentos de Guatemala, Izabal, Petén, Sololá y Zacapa. La obtención de las muestras se realizó durante los meses de agosto a diciembre de 2003 y se siguió el procedimiento descrito en la literatura para recolección de muestras de agua dependiendo de la fuente que se tratase. Para todas las muestras se utilizaron frascos estériles, de plástico y boca ancha, que eran debidamente rotulados y transportados al laboratorio para su análisis. Previo al análisis de las muestras se homogenizaban vigorosamente y 100 mL eran depositados en el contenedor del equipo de filtración en el caso de la metodología estándar, y aproximadamente 25 mL en la bolsa para la prueba desarrollada. Con los resultados obtenidos se realizó el procedimiento de validación de la misma.

#### **4. Técnicas para determinación de enterococos**

##### **a. Técnica de Filtración en Membrana para enterococos**

- Filtrar 100 mL de agua a través de filtros Millipore con poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Transferir el filtro a cajas de Petri con agar selectivo para enterococos. Dejar las cajas en reposo por 30 minutos.
- Incubar por 48 horas a  $35 \pm 2$  °C.
- Realizar un conteo de colonias obtenidas después de la incubación. Utilizar, de preferencia, una lámpara fluorescente y lentes de aumento para el conteo. Contar las colonias de enterococos en rangos de 20-60 colonias por caja, si se desea. El resultado se reporta en número de colonias por 100 mL de agua.

##### **b. Prueba confirmatoria**

- Seleccionar colonias típicas de la membrana e inocular para aislamiento en agar infusión de cerebro corazón (BHI). Incubar a  $35 \pm 0.5$  °C por 24 a 48 horas.
- Transferir colonias a tubos de caldo BHI e incubar a  $35 \pm 0.5$  °C por 24 horas.
- Realizar la prueba de catalasa a las colonias aisladas. Un resultado negativo indica que la colonia es miembro del grupo de estreptococos fecales.
- Realizar la tinción de Gram a las colonias aisladas. Los estreptococos fecales y enterococos son cocos Gram positivo en cadenas cortas o en pares.

- Transferir colonias del caldo BHI a los siguientes medios: Agar Bilis Esculina y caldo BHI con 6.5% NaCl e incubar  $35 \pm 0.5$  °C por 48 horas, además de caldo BHI incubando a  $45 \pm 0.5$  °C por 48 horas.
- El crecimiento de cocos Gram positivo, catalasa negativo, en agar Bilis Esculina, BHI a 45 °C y en BHI con 6.5% NaCl indica que la colonia aislada pertenece al grupo de enterococos.

#### D. Diseño de la investigación

##### 1. Muestra y diseño de muestreo

El número de muestras a analizar inicialmente fue de 280 y se obtuvo por la siguiente fórmula:

$$\text{Intervalo de confianza} = Z_{1 - \alpha/2} + Z_{1 - \beta}$$

$$\text{Límite de confiabilidad (95\%)} = \alpha$$

$$\text{Desviación estándar} = s^2$$

Valores supuestos de:

$$\text{Respuesta binomial (0.5)} = p \text{ y } q$$

$$q = 1 - p$$

Entonces,

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

$$NC = Z_{1 - \alpha/2} + Z_{1 - \beta}$$

$$NC = 3.33$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\beta = 0.20$$

$$\nabla = 0.05$$

$$s^2 = p(q)$$

$$p = 0.5$$

$$q = 0.5$$

$$n = (3.33)^2(0.25)^2 / (0.05)^2$$

Por lo tanto,

$$n = 277.22$$

Aproximando, el número de muestras final era de 280, sin embargo el total de las muestras analizadas fue 310.

## **2. Análisis estadístico**

Para llevar a cabo el proceso de validación de la prueba desarrollada se analizó 310 muestras de agua provenientes de diferentes sectores de la ciudad capital y del interior del país. A las muestras se les determinó la presencia de enterococos por la prueba de presencia-ausencia y por medio de filtración por membrana. Mediante el análisis estadístico en el programa Epi Info 6.0 se obtuvo valores predictivos positivo y negativo, sensibilidad y especificidad de la prueba desarrollada. La concordancia entre ambas metodologías se comparó estadísticamente por la prueba de *Kappa*.

## VII. RESULTADOS

### A. Formulación del medio de cultivo

El medio de cultivo fue formulado tomando como base los siguientes medios comerciales para identificación de enterococos: Slanetz-Bartley, agar Azida Dextrosa, agar Bilis Esculina, agar Azida Púrpura de Bromocresol, agar Kanamicina Esculina y agar KF, que presentan diferentes principios de reacción. Se realizaron varias pruebas combinando concentraciones de los componentes de los medios de cultivo y se observó que la hidrólisis de la esculina es una de las reacciones más sensibles para la detección de enterococos, por lo que se tomó como base para el medio a desarrollar. En la Tabla 1 se presentan las combinaciones de componentes de los medios de cultivo, desde las que tenían como base la fermentación de glucosa e inhibición de bacterias Gram negativo por azida de sodio; hasta las diferentes pruebas que se realizaron utilizando la hidrólisis de esculina.

Se escogieron los ingredientes que formarían parte del medio y se combinaron varias concentraciones, que se confrontaron a las diferentes bacterias con el objetivo de observar si eran capaces de dar una reacción positiva que se interpretaba como un color negro en el medio: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Vibrio cholerae* ATCC 9459, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* INV 87486, *Enterococcus faecalis* ATCC 25925 *Enterococcus faecium* INV 19856 y *Enterobacter cloacae* INV 84569. En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos con las combinaciones de ingredientes sobre las bacterias en estudio.

Los componentes finales del medio formulado fueron: peptona, extracto de levadura, azida de sodio, cloruro de sodio, bilis, esculina, citrato férrico amónico y tiosulfato de sodio. En la Tabla 3 se presentan las concentraciones de cada componente.

Posteriormente se impregnó el medio formulado en discos de papel filtro Whatman No. 3 de 4 cm de diámetro, como describe Ortiz (2). Previo a impregnar el medio, se realizaba el procedimiento de esterilización de la campana de flujo laminar con alcohol etílico al 70%, luego se colocaba papel aluminio y el papel filtro se dejaba irradiar por luz ultravioleta durante 30 minutos. Después se sumergían los discos en el medio de cultivo para que absorbieran aproximadamente 0.50 mL del mismo. Los discos tomaron

un color verde en una tonalidad pálida. Luego se dejaron secar sobre el área cubierta con papel aluminio por 20 minutos. Finalmente los discos se colocaron, en condiciones estériles, en bolsas Nasco de 4 onzas y se almacenaron a temperatura de refrigeración (4-8° C).

Se realizaron pruebas para evaluar la funcionalidad de la unidad disco-bolsa relacionando el efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento. Se almacenaron varias unidades durante tres meses a temperatura ambiente (25° C) y en refrigeración (4-8° C), evaluándose quincenalmente la funcionalidad del disco, enfrentándolo con agua previamente inoculada con *Enterococcus faecalis* como control positivo y con *Escherichia coli* como control negativo. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos a diferentes tiempos de almacenamiento de los discos. Los discos pueden ser almacenados por dos meses a temperatura ambiente y aún conservar la capacidad de dar una reacción positiva; sin embargo si son refrigerados esta capacidad se mantendrá por un período mayor de tres meses.

Al obtener la unidad disco-bolsa se realizaron pruebas para evaluar la capacidad del medio de reaccionar con agua contaminada, para lo cual se inoculó 1 mL de diluciones decimales de las bacterias en estudio anteriormente mencionadas, en aproximadamente 19 mL de agua estéril, que después se añadían a la unidad disco-bolsa. Este se incubó a 36° C por un período de 24 a 48 horas y al final del cual se interpretó el resultado. Se consideró que la concentración del medio era la adecuada cuando se obtuvo una reacción positiva sólo con enterococos y negativa con las otras bacterias. La reacción se interpretó como positiva cuando el agua se tornaba negra y negativa cuando era amarilla. El nombre de la prueba fue *disco-bolsa-enterococos* y se abrevió DBE.

#### **B. Evaluación de los límites de detección de la prueba**

Para conocer la capacidad de detección de la prueba se realizaron diluciones decimales (1:10<sup>2</sup> a 1:10<sup>6</sup>) de *Enterococcus faecalis* ATCC 25925 y *Enterococcus faecium* INV 19856 a partir de un estándar de McFarland 0.5. Se inoculó 1 mL de cada dilución en 19 mL de agua para obtener un volumen final de 20 mL. La unidad disco-bolsa se incubó por un lapso de tiempo de 24 a 48 horas a 36° C y 42° C. Los enterococos estudiados dieron reacción positiva a ambas temperaturas y tiempos de incubación.

Para conocer el número exacto de bacterias presentes en las diluciones decimales se filtró 1 mL de las mismas a través de una membrana Millipore de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro; y que se colocó en agar Bilis Esculina Azida (BEA) para contar las bacterias por mililitro. Se obtuvo 4 UFC/mL de *E. faecium* correspondiente a la dilución 1:10<sup>6</sup> y de *E. faecalis* fue 2 UFC/mL a la misma dilución. Por lo tanto, la prueba fue bastante sensible para detectar estas dos especies del grupo enterococos.

### C. Validación de la prueba

Para validar la metodología desarrollada se analizaron 310 muestras de agua siendo las siguientes: 174 provenientes de grifos, 25 de piscinas, 42 de pozos artesanales, 29 de lagos y 40 de ríos. La recolección de las muestras se realizó en frascos de plástico, de boca ancha, estériles y de la manera descrita en la literatura para cada una de las fuentes analizadas (14). Las muestras fueron transportadas en refrigeración al laboratorio para su posterior análisis. Para cada una de las 310 muestras se realizó la determinación de enterococos por filtración por membrana y la prueba desarrollada de presencia-ausencia, incubando esta última a 36° C y 42° C por 24 a 48 horas.

Se consideró un resultado como positivo por la metodología DBE, cuando después de 48 horas de incubación, el agua contenida en la unidad disco-bolsa tomaba un color negro; el resultado era negativo, cuando después 48 horas de incubación, el color del agua era amarillo. Se interpretó un resultado positivo por filtración por membrana cuando se obtenían colonias rojas características después de 48 horas de incubación a 42° C, y que posteriormente eran identificadas como bacterias del grupo *Enterococcus* por el procedimiento descrito en la metodología. Se obtuvo un total de 141 muestras positivas por filtración por membrana y 169 negativas. La prueba BDE dio como resultado 170 muestras positivas a las 24 horas de incubación a 36° C, y 189 positivas a las 48. A 42° C se obtuvo 159 y 171 muestras positivas a las 24 y 48 horas de incubación, respectivamente; los resultados se muestran en la Tabla 5.

Se realizó la determinación de cloro residual a 149 muestras de grifos; de las cuales en 21 fueron positivas por filtración por membrana y 47 lo fueron por DBE. De las muestras positivas por filtración por membrana 20 presentaron una concentración de cloro menor o igual a 0.5 mg/L y solamente 1 presentó más de 0.5 mg/L de cloro. En la Tabla 6 se muestran los resultados.

Para obtener la especificidad y sensibilidad de la metodología se utilizó el programa Epi info 6.0. La sensibilidad obtenida fue de 95.0% tanto a 36° C como a 42° C a las 24 horas de incubación; a las 48 horas aumentó a 98.6% a 36° C y 99.3% a 42° C. La especificidad a las 24 horas fue de 78.7% a 36° C y de 85.2% a 42° C; y a las 48 horas fue de 70.4% a 36° C y de 81.7% a 42° C. Los resultados de validación se presentan en la Tabla 7.

Con la metodología de DBE se obtuvo un total de 53 falsos positivos, de los cuales se logró recuperar e identificar a 23 muestras por medio de la metodología automatizada Microscan Dade Behring®. Las bacterias identificadas fueron *Enterobacter cloacae* (17.4%), *Klebsiella rhinoscleromatis* (13.0%), *Aeromonas xylosoxidans* (13.0%), *Serratia marcescens* (8.70%), *Escherichia coli* (4.3%), *Streptococos* del Grupo viridans (13.0%) y *Enterococcus* spp. (30.4%); los resultados se presentan en las Tablas 8 y 9.

**Tabla 1**

**Formulaciones del medio de cultivo desarrollado para la unidad disco-bolsa para enterococos (DBE)**

Identificación de las formulaciones																		
Ingredientes g/100 mL	110	210	310	111	211	311	411	511	611	711	112	212	312	412	103	203	303	403
Azida de sodio	0.06	0.74	0.3	0.01	0.01	0.03	0.04	0.06	0.03	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.4	0.8	1
Bilis de buey	----	----	4	0.4	2	4	2	2	4	4	4	----	4	4	4	8	8	8
Citrato férrico amónico	----	----	0.05	0.01	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.1	0.2	0.05	0.05	0.05	0.6	1	1	1
Cloruro de sodio	6.5	7.5	6.5	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	6.5	6.5	0.1	0.1	0.65	0.65	1	1	1
Dextrosa	5	5	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Esculina	----	----	0.1	0.03	0.06	0.05	0.1	0.1	0.1	0.5	0.2	0.1	0.1	0.1	1	0.6	1	1
Extracto de levadura	2	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	5	5	----	5	10	10	10
Fosfato di potásico	0.2	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Glicerol	0.5*	1*	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Peptona	2	5	5	0.5	1	1	1	1	1	5	5	5	5	10	2.5	10	10	10
Púrpura de Bromocresol	4.5*	1*	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Sales biliares	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	4	----	----	----	----	----	----
Tiosulfato de sodio	0.58	0.64	0.56	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6
Tween 80	0.2*	0.2*	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
ph	----	6.56	6.93	6.79	7	6.91	6.8	6.87	6.86	6.12	6.37	6.07	6.10	6.81	6.10	5.94	6.07	6.02

110 - 403: lotes de medio de cultivo preparado, \* cantidad expresada en mL

Fuente: datos experimentales

Tabla 2

**Resultados cualitativos de las formulaciones del medio para la unidad disco-bolsa para enterococos (DBE) desarrollado con diferentes bacterias**

Identificación de las formulaciones																		
Bacterias a prueba	110	210	310	111	211	311	411	511	611	711	112	212	312	412	103	203	303	403
<i>Aeromonas hydrophila</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N
<i>Enterobacter cloacae</i>	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N
<i>Enterococcus faecalis</i>	N	N	P	DP	P	P	P	P	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P
<i>Enterococcus faecium</i>	N	N	P	DP	P	P	P	P	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P
<i>Escherichia coli</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	---	---	---	---
<i>Staphylococcus aureus</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	---	---	---	---
<i>Vibrio cholerae</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	---	---	---	---

110 - 412: lotes de medio de cultivo preparado; N: negativo (color amarillo), P: positivo (color negro intenso), DP: reacción débil positivo (color negro tenue)

Fuente: datos experimentales

**Tabla 3****Composición final del medio de cultivo  
unidad disco-bolsa para enterococos (DBE) desarrollado**

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad g/100 mL</b>
Peptona	10.0
Extracto de levadura	10.0
Bilis	8.0
Esculina	1.0
Citrato férrico amónico	1.0
Tiosulfato de sodio	0.6
Cloruro de sodio	1.0
Azida de sodio	1.0

pH  $6.07 \pm 0.5$

**Fuente: datos experimentales**

Tabla 4

**Evaluación del tiempo y temperatura de almacenamiento  
sobre la estabilidad de la prueba DBE**

Tiempo en días	25 ° C		4-8 ° C			
	Condición física de disco	CP	CN	Condición física de disco	CP	CN
15	Estable	+	-	Estable	+	-
30	Estable	+	-	Estable	+	-
45	Estable	+	-	Estable	+	-
60	Estable	+	-	Estable	+	-
75	Inestabilidad de color	+	+	Estable	+	-
90	Pérdida de humedad e inestabilidad de color	+	+	Estable	+	-

CP: control positivo *Enterococcus faecalis* ATCC 25925, CN: control negativo *Escherichia coli* ATCC 25922, +: reacción positiva (color negro intenso), -: reacción negativa (color amarillo)

Fuente: datos experimentales

Tabla 5

**Muestras positivas y negativas obtenidas por  
Filtración por Membrana y Prueba Desarrollada (DBE)**

Temperatura y tiempo de incubación												
	FM 42 ° C				DBE 36 ° C				DBE 42 ° C			
	24 horas		48 horas		24 horas		48 horas		24 horas		48 horas	
Fuente de agua	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Grifos	162	12	141	33	126	48	107	67	132	42	116	58
Piscinas	25	0	16	9	8	17	8	17	15	10	15	10
Pozos	42	0	8	34	5	37	4	38	3	39	4	38
Ríos	2	38	2	38	1	39	1	39	1	39	1	39
Lagos	8	21	2	27	0	29	0	29	1	28	1	28
<b>Total</b>	<b>239</b>	<b>71</b>	<b>169</b>	<b>141</b>	<b>140</b>	<b>170</b>	<b>120</b>	<b>190</b>	<b>152</b>	<b>158</b>	<b>137</b>	<b>173</b>

DBE: disco-bolsa-enterococos, FM: filtración por membrana, +: número de muestras que presentaron reacción positiva,  
-: número de muestras que presentaron reacción negativa

Fuente: datos experimentales

Tabla 6

**Determinación de cloro residual y su correlación con la presencia de enterococos en algunas muestras provenientes de grifos**

	FM 42 ° C				DBE 36 ° C				DBE 42 ° C			
	24 horas		48 horas		24 horas		48 horas		24 horas		48 horas	
Concentración de cloro residual	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
≤ 0.5	95	8	83	20	71	32	57	46	79	24	66	37
> 0.5	46	0	45	1	45	1	45	1	44	2	44	2
Total	141	8	128	21	116	33	102	47	123	26	110	39

FM: filtración por membrana, DBE: prueba desarrollada, +: número de muestras positivas, -: número de muestras negativas

Fuente: datos experimentales

Tabla 7

**Resultados de validación de la prueba desarrollada por los diferentes tiempos y temperaturas de incubación**

	N de muestras a diferentes condiciones de incubación			
	36 ° C/24 horas	36 ° C/48 horas	42 ° C/24 horas	42 ° C/48 horas
VP	134	139	134	140
VN	133	119	144	138
FP	36	50	25	31
FN	7	2	7	1
S	95.0% (89.7-97.8)	98.6%(94.4-99.8)	95.0%(89.7-97.8)	99.3%(95.5-100.0)
E	78.7 % (71.6-84.5)	70.4%(62.8-77.1)	85.2%(78.7-90.0)	81.7%(74.8-87.0)
VPP	78.8%(71.8-84.6)	73.5% (66.6-79.6)	84.3%(77.5-89.4)	81.9%(75.1-87.2)
VPN	95.0%(89.6-97.8)	98.3% (93.6-99.7)	95.4%(90.3-98.0)	99.3%(95.5-100.0)
K	0.72 (0.65-0.80)	0.67 (0.58-0.75)	0.80 (0.73-0.86)	0.81 (0.73-0.85)

VP: verdaderos positivos, VN: verdaderos negativos, FP: falsos positivos, FN: falsos negativos, S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, K: índice Kappa

Fuente: datos experimentales

Tabla 8

## Microorganismos que presentaron reacción cruzada con la prueba DBE

Bacteria	Fuente de muestras					Total N (%)
	Grifos N (%)	Piscinas N (%)	Pozos N (%)	Ríos N (%)	Lagos N (%)	
<i>Aeromonas xylosoxidans</i>	3 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (13.0)
<i>Enterobacter cloacae</i>	4 (17.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (17.4)
<i>Enterococcus</i> spp.	6 (26.1)	0 (0.0)	1 (4.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (30.4)
<i>Escherichia coli</i>	0 (0.0)	1 (4.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.3)
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.7)	1 (4.3)	0 (0.0)	3 (13.0)
<i>Serratia marcescens</i>	1 (4.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.3)	2 (8.7)
<i>Streptococcus</i> grupo viridans	2 (8.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.3)	0 (0.0)	3 (13.0)
<b>Total</b>	<b>16 (69.6)</b>	<b>1 (4.3)</b>	<b>3 (13.0)</b>	<b>2 (8.7)</b>	<b>1 (4.3)</b>	<b>23 (100.0)</b>

Fuente: datos experimentales

Tabla 9

Número de muestras que presentaron reacción cruzada (resultado falso positivo) por la prueba DBE en los diferentes tiempos y temperaturas de incubación

Bacteria	36 ° C		48 ° C	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
<i>Aeromonas xylosoxidans</i>	2	1	1	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	3	1	0
<i>Enterococcus spp.</i>	4	1	3	2
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	0
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	1	0	1	0
<i>Serratia marcescens</i>	2	0	0	0
<i>Streptococcus grupo viridans</i>	1	0	1	1

Fuente: datos experimentales

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo de esta investigación fue desarrollar una metodología de fácil aplicación y bajo costo que permitiera la detección de enterococos en agua para consumo, basado en el estudio de Ortiz (2). La metodología consistió en un disco de papel filtro que contenía impregnado un medio de cultivo el cual permitió la identificación de los enterococos. El disco estaba contenido dentro de una bolsa plástica estéril a la cual se añadió aproximadamente 20 mL del agua para análisis.

Al entrar en contacto el agua con el disco, ésta tomó un color amarillo pálido. Dicho color se intensificó conforme aumentó el tiempo de incubación y se mantuvo si la muestra no contenía enterococos interpretándose como un resultado negativo. Si el agua contenía bacterias del grupo *Enterococcus* la reacción fue positiva y se observó de color negro.

Para formular el medio de cultivo se tomó como base la composición de los medios de cultivo comerciales para identificación de enterococos, tanto en caldo de cultivo como en agar. Los principios de reacción de algunos de estos medios de cultivo se presentan en el Anexo 4. Al inicio se utilizó como fundamento la fermentación de la glucosa pero con ésta no se logró ningún resultado satisfactorio. Se eligió entonces, como reacción fundamental del medio, la hidrólisis de la esculina por ser una de las que mejor evidencia la presencia de enterococos y se tomó como base la composición de los medios de cultivo que la tuvieran como principio. En presencia de bilis los enterococos, principalmente, hidrolizan la esculina en glucosa y esculina que reacciona con los iones férricos aportados por el citrato férrico amónico formando un complejo de color negro que se difunde en el área. Se realizaron pruebas con diferentes ingredientes para definir cuales serían los que formarían parte del medio, que permitiera que sólo los enterococos evidenciaran una reacción positiva. Estos componentes se mezclaron en agua destilada que se calentaron hasta ebullición para su disolución. Al inicio las pruebas eran en tubos con 5 mL de caldo, a cada uno de los cuales se les inoculó una bacteria de prueba. Estas bacterias eran *S. aureus* y *E. coli* como controles negativos, *A. hydrophila*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae* y *P. aeruginosa* como otras bacterias que hidrolizan la esculina; finalmente se utilizaron dos especies de enterococos, *E. faecalis* y *E. faecium*. Todas se incubaron por 48 horas a 36° C. Al

establecer los componentes que formarían parte del medio, se procedió a impregnar los discos de papel filtro con el medio formulado, y posteriormente se realizaron pruebas en agua inoculada *in vitro* con las bacterias en estudio con el objetivo de observar si el medio era capaz de evidenciar la presencia de enterococos e inhibir a las otras bacterias. Después de varias pruebas el disco funcionó adecuadamente siendo los enterococos los únicos que daban reacción positiva. Los componentes finales del medio fueron: extracto de levadura y peptona como nutrientes; bilis, citrato férrico amónico y esculina como ingredientes fundamentales de la reacción; tiosulfato de sodio para inactivar el cloro y así poder utilizar la prueba en aguas cloradas; también se utilizó azida de sodio y cloruro de sodio como sustancias inhibidoras. La azida de sodio es un inhibidor de bacterias Gram negativo y sirve para evitar reacciones falsas positivas, además, es un preservante que aumenta el tiempo de vida de la prueba. Sin embargo la azida sódica es tóxica y requiere extrema precaución al momento de su manipulación. Algunos autores han revelado que altas concentraciones de azida de sodio pueden resultar inhibitorias para algunos estreptococos fecales, y aunque no se dice claramente que en los enterococos tenga el mismo efecto, no se consideró adecuado seguir aumentando su concentración debido a su toxicidad (5).

Después de obtener la composición final del medio y de realizar la evaluación del límite de detección se concluyó que la prueba es capaz de detectar 2 UFC/mL de *E. faecalis* equivalente a una dilución de 1:10<sup>8</sup> bacterias y 4 UFC/mL de *E. faecium*, que también correspondió a un factor de dilución de 1:10<sup>8</sup>. El medio es altamente sensible a concentraciones bajas de enterococos y esto pudo evidenciarse en el proceso de validación.

Se realizaron evaluaciones periódicas sobre el medio de cultivo para conocer su capacidad de detección después de ser almacenado a diferentes tiempos y temperaturas. La temperatura óptima de almacenamiento fue de 4 a 8 ° C por un período hasta de tres meses. Si la unidad se almacenaba a temperatura ambiente el disco se opaca y endurece su textura, perdiendo la funcionalidad. Este cambio en el comportamiento del disco puede deberse a que los componentes del medio de cultivo son inestables luego de cierto tiempo de almacenamiento a temperaturas más altas de 8 ° C. Por ejemplo, la esculina es un derivado glucosídico de la cumarina (6-B-glucósido-

7-hidroxycumarina). Los dos residuos de la molécula (glucosa y 7-hidroxycumarina) se encuentran unidos por una unión éster de oxígeno. Es posible que la estructura química de la esculina, -que es un componente esencial para la reacción- sea susceptible de reaccionar con algún otro elemento presente en la muestra o incluso en el mismo medio de cultivo. También se ha reportado cambios en la concentración de azida de sodio en los medios de cultivo dependiendo de la temperatura a la que estos sean sometidos (34). Almacenado a temperatura ambiente el disco mantuvo su capacidad de reacción por dos meses, pero pasado este tiempo aumentó la probabilidad de presentar falsos positivos. Por lo tanto es recomendable utilizar el disco antes de tres meses de su fabricación y que sea almacenado a temperaturas de refrigeración (4-8 ° C).

Para la validación de la metodología se analizarían, en un principio, 280 muestras tanto por la prueba DBE como por filtración por membrana que es el método estándar para identificación de enterococos. Sin embargo, el número de muestras aumentó ya que se obtuvieron varios resultados falsos positivos. Finalmente se analizaron 310 muestras las cuales provenían de grifos (56.1%), piscinas (8.1%) pozos (13.5%), ríos (12.9%) y lagos (9.4%) de diferentes lugares del país. Se escogieron esas fuentes por considerarse que a nivel nacional la mayor parte de la población utiliza agua de consumo proveniente de alguna de ellas. Los grifos y pozos son fuentes directas de consumo humano y las piscinas, ríos y lagos son considerados como aguas recreacionales y los enterococos son los microorganismos indicadores, por excelencia, en este tipo de aguas (1, 3, 11, 21,23).

El comportamiento de la prueba varió según las diferentes fuentes de las muestras de agua. En el Anexo 8 se presentan los resultados obtenidos a 42° C a las 48 horas de incubación. Entre las muestras de grifos se encuentran el mayor número de falsos positivos (43.4%). Las aguas de pozos también presentaron falsos positivos, pero solamente un 9.4%. Con estos resultados no puede llegarse a conclusiones válidas debido a que el número de muestra es muy pequeño. Para validar la prueba DBE por fuente de agua debe aumentarse la cantidad de muestras a estudiar, principalmente en aquellas en que los falsos positivos sean mayores. Lo que si puede concluirse con las tabulaciones presentadas en el Anexo 8 es que la prueba DBE presenta alta capacidad para detectar pequeñas concentraciones de enterococos en aguas de consumo provenientes de cualquier fuente.

No se observó una influencia marcada de la concentración de cloro residual en las muestras de grifos a las que se les determinó la concentración de este elemento. Incluso muestras que presentaron concentraciones mayores a 0.5 mg/L fueron positivas con la metodología DBE. Esto indica que altas concentraciones de cloro no interfieren con el medio de cultivo y que la metodología puede utilizarse en aguas cloradas. Sin embargo es necesario realizar un análisis de mayor profundidad de la influencia de cloro residual sobre la prueba para llegar a conclusiones mayores.

Los factores de tiempo y temperatura de incubación fueron decisivos. Según los resultados obtenidos por filtración por membrana, los verdaderos positivos fueron 141. Con la metodología DBE, a 36° C a las 24 horas de incubación, se obtuvo 134 muestras positivas y 139 a las 48 horas de incubación. Esto significa que 5 muestras requirieron de 24 horas más de incubación para que la prueba las detectara como positivas y 2 (falsos negativos) nunca llegaron a serlo. Las muestras negativas a 36° C a las 24 horas fueron 133; y a las 48 horas fueron 119 de las 169 reportadas en la filtración por membrana. Por lo tanto los falsos positivos a esta temperatura fueron 50, de los cuales 36 fueron positivos a las 24 horas de incubación y otras 14 muestras lo fueron a las 48 horas. Al aumentar el tiempo de incubación se incrementó también la posibilidad de que otras bacterias que hidrolizan la esculina reaccionaran con el medio de cultivo dando resultados falsos positivos. Esto se evidenció de mejor manera al observar los valores de sensibilidad y especificidad a las 24 horas de incubación que corresponden a 95.0% y 78.7%; comparándolos con los resultados obtenidos a las 48 horas que son de 98.6% y 70.4% (ver Tabla 7).

Los resultados positivos obtenidos a 42° C fueron 134 y 140 a las 24 y 48 horas de incubación. Esto equivale a 7 falsos negativos a las 24 horas y 1 falso negativo a las 48 horas. Los falsos positivos aumentaron de 25 a 31 a los diferentes tiempos. El comportamiento observado, a ambas temperaturas, fue que conforme aumentaba el tiempo disminuyó la especificidad y aumentó la sensibilidad de la prueba. A 42° C los resultados de sensibilidad y especificidad a las 24 horas fueron de 95.0% y 85.2%; y los obtenidos a las 48 horas correspondieron a 99.3% de sensibilidad y 81.7% de especificidad (ver Tabla 7). Al igual que a 36° C, a mayor tiempo de incubación, aumentó la probabilidad de encontrar reacciones falsas positivas y disminuir la especificidad. El incremento en la temperatura fue un factor decisivo en la

especificidad de la prueba y no afectó a los enterococos, ya que estos crecen fácilmente a 42° C como se manifiesta en varios medios de cultivo utilizados para su identificación (ver Anexo 4). A esta temperatura se presentaron menos falsos positivos; y la sensibilidad de la prueba fue mayor, principalmente a las 48 horas de incubación. Estos valores de sensibilidad y especificidad significaron que si en la muestra se encuentran bacterias del género *Enterococcus*, éstos serán detectados por la prueba DBE, aún en concentraciones pequeñas. Pero algunas veces, otras bacterias presentes en el agua podrían dar un resultado positivo. La mayor parte de las reacciones falso positivo se dieron a 36° C por ser esta una temperatura a la que la mayoría de las bacterias presentan su crecimiento óptimo (9). Estos resultados se presentan en las Tablas 8 y 9.

El número de muestras falsas positivas fue 53 (17.1%), es decir, que por la metodología estándar fueron negativas, pero que dieron un viraje de color por la prueba DBE. De estas bacterias, se logró recuperar a 23 (43.4%) y se identificaron por un método automatizado (ver Tabla 8 y 9). La mayor parte de estas bacterias no pertenecieron al grupo *Enterococcus*, pero si fueron capaces de hidrolizar la esculina. De acuerdo a la literatura, un 30% de las cepas de *Enterobacter cloacae*, el 95% de *Serratia marcescens*, 30% de *Klebsiella rhinoscleromatis*, 5% de *Escherichia coli* y 5% de los estreptococos del grupo viridans son capaces de hidrolizar la esculina. Del género *Aeromonas* se reporta a la especie *hydrophila* como bilis esculina positivo. El 30% de las bacterias identificadas pertenecían al género *Enterococcus* spp. y no fueron detectadas por filtración por membrana, pero sí por la metodología DBE. Es posible que algunas cepas silvestres de enterococos se encuentren dañadas, y al ser sometidas al estrés del laboratorio no se desarrollen en medios tan selectivos como es el mE agar, utilizado como estándar para filtración (8). Estos resultados confirman la alta sensibilidad de la prueba desarrollada, que incluso fue capaz de detectar menores concentraciones de enterococos que la metodología estándar. Según la Environmental Protection Agency (EPA) de los Estados Unidos, la especificidad del medio de cultivo utilizado en la filtración por membrana presenta un 6.0 % de falsos positivos y 6.5 % de falsos negativos para aguas de diversos ambientes (3). Estos datos indican que existe probabilidad de que la prueba de referencia reporte como positivo o negativo muestras que no lo son. En este caso se reportó como negativo a muestras que en realidad sí contenían bacterias del grupo *Enterococcus*, y estas muestras si fueron detectadas como positivas por la

metodología DBE. En este tipo de metodologías, en las que se evalúa calidad del agua, es importante que la sensibilidad sea alta, debido a que las consecuencias de presentar un falso negativo son de mayor gravedad que las de un falso positivo. Al evaluar la calidad microbiológica del agua lo que se mide es la presencia o ausencia de microorganismos que vayan potencialmente a ocasionar una infección a la persona que la utiliza, y en agua potable se requiere que ni siquiera existan esos microorganismos. El hecho de que esta metodología detecte pequeñas concentraciones de enterococos, la hace útil y apta para tamizajes de aguas supuestamente potables. Una reacción negativa indica ciertamente que el agua no contiene enterococos que son indicadores de contaminación fecal de origen humano o animal; una reacción positiva manifiesta la presencia de enterococos, y que existe la probabilidad de que se encuentren otras bacterias que no pertenecen a este grupo, pero que contaminan el agua haciéndola no apta para el consumo.

Con los resultados se obtuvo el porcentaje de exactitud del método de referencia fue del 95.9% con intervalos de confianza de 92.7 a 99.1% (ver Anexo /). No es parte de los objetivos de este estudio hacer un análisis sobre la efectividad de la filtración por membrana, pero si puede mencionarse que la metodología de referencia presentó algunos fallos en cuanto a su sensibilidad. Sin embargo, para hacer afirmaciones sobre la filtración por membrana se requiere de estudios que evalúen y comparen su efectividad frente a otros métodos alternativos para la detección de los enterococos.

Estadísticamente la prueba DBE desarrollada presenta buena concordancia con la metodología estándar según el índice *Kappa*. En la Tabla 7 se presenta los diferentes valores de  $\kappa$ . La mejor concordancia entre metodologías se obtuvo a 42° C luego de 48 horas de incubación. A 36° C la concordancia fue buena, aunque no presentó un índice  $\kappa$  tan alto como el obtenido a 42° C. Lo que confirma que estas condiciones de incubación hacen más selectiva a la prueba DBE.

En cuanto al tiempo de incubación, el resultado positivo dependía de la concentración de enterococos presentes en la muestra. Cuando el número de UFC/100 mL era mayor de 3 el cambio de color se presentaba a las 24 horas. En la mayoría de muestras en que el número de bacterias aisladas fue menor de 3 UFC/100 mL el cambio de color iniciaba a las 24 horas pero la reacción era débilmente positiva. El color negro intenso aparecía hasta las 48 horas.

El medio de cultivo formulado contiene un alto porcentaje de dos elementos nutritivos: peptona y extracto de levadura. Estos favorecen el crecimiento de bacterias que pueden encontrarse en mayores concentraciones que los enterococos en el agua. La literatura reporta a varias bacterias que presentan la capacidad de hidrolizar la esculina, a pesar de que esta reacción se utiliza para identificar enterococos y estreptococos del grupo D (9). Entre estas bacterias se encuentran algunas que pueden aislarse de muestras de agua; la reacción de hidrólisis de la esculina no es exclusiva de enterococos o estreptococos fecales. De acuerdo con los resultados obtenidos se infiere que la concentración de inhibidores presentes no es suficiente para evitar que otras bacterias den resultado positivo. Estas bacterias son todas aquellas que se encuentran en grandes cantidades en la muestra, hidrolizan la esculina y no son inhibidas por la azida de sodio presente en el medio. Por lo tanto, esta metodología puede ser más aplicable para el análisis de agua de bebida en la que los criterios de calidad microbiológica son más exigentes y encontrar cualquier tipo de microorganismo es importante.

Para hacer más selectiva la prueba DBE, a la composición del medio puede agregarse algún antibiótico contra bacterias Gram negativo. No se recomienda aumentar la concentración de azida de sodio, debido a su alto costo y toxicidad, lo que implica un riesgo al manipulador. Otra alternativa para mejorar la metodología puede ser utilizar otras reacciones como principio de la prueba para lograr la identificación de enterococos. Algunas de éstas son: la fermentación de la glucosa y su detección por viraje de algún indicador de pH, resistencia de los enterococos a altas concentraciones de cloruro de sodio, reducción del cloruro de 2, 3,5- trifeniltetrazolio y la utilización de substratos cromogénicos como el 4-metilumbelifenil- $\beta$ -D-glucósido (MUD) que es hidrolizado por la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa con producción de fluorescencia azul a 366 nm. Sin embargo, la más utilizada es la hidrólisis de la esculina (8, 17, 18), por lo que la adición de un antibiótico para bacterias Gram negativo sería la mejor opción para mejorar la especificidad de la prueba.

La formulación y metodología DBE cumple en la totalidad con los objetivos propuestos. Se obtuvo una prueba de bajo costo, rápida, sencilla y de muy fácil aplicación con una alta sensibilidad para la determinación de enterococos en agua. Aunque no se obtuvo un alto porcentaje de especificidad, la prueba puede utilizarse para tamizajes y análisis de aguas supuestamente potables, las cuales no deben contener

ningún microorganismo nocivo para la salud. Además, su uso no requiere de personal altamente calificado, sino solamente con un nivel de entrenamiento básico en recolección y manejo de muestras. Esta prueba (DBE) puede utilizarse en áreas rurales en donde la mayoría de laboratorios no cuentan con el equipo e infraestructura requeridos para análisis por metodologías estándar, y sin embargo, es donde se presenta la mayor parte de contaminación microbiológica del agua para consumo.

## X. CONCLUSIONES

1. La reacción de hidrólisis de esculina fue la base para la preparación del medio de cultivo de la prueba DBE debido a su alta sensibilidad para evidenciar la presencia de enterococos.
2. Las condiciones óptimas de almacenamiento de la prueba DBE son tres meses a temperatura de refrigeración (4-8° C) y son necesarias para mantener la funcionalidad de la misma.
3. La prueba DBE puede utilizarse en aguas cloradas ya que no se observó una influencia significativa de concentraciones de cloro residual incluso mayores de 1.5 mg/L.
4. Las condiciones de incubación donde se obtuvo los más altos porcentajes de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y la mejor correlación con la metodología estándar fueron a 42° C por 48 horas.
5. La sensibilidad de la prueba DBE a 42° C y luego de 48 horas de incubación es de 99.3%; lo que le permitió detectar bacterias del grupo *Enterococcus*, inclusive en muestras reportadas como negativas por la metodología estándar de filtración por membrana.
6. La prueba DBE es una metodología de bajo costo y fácil aplicación para la determinación de enterococos en agua y es de mayor utilidad para la investigación de potabilidad de agua en lugares donde no se presentan las condiciones para realizar la metodología de análisis de referencia.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Reforzar la composición del medio de cultivo incluyendo algún antibiótico contra bacterias Gram negativo para evitar la interferencia de otras bacterias con la prueba DBE.
2. Incubar las muestras analizadas por la prueba DBE a 42 °C y descartar como negativo después de 48 horas de incubación.
3. Utilizar la metodología desarrollada para el análisis de agua de bebida en la que los requerimientos microbiológicos son altamente exigentes.
4. Realizar estudios que demuestren la eficacia de los enterococos como indicadores alternativos de contaminación fecal en Guatemala, para así lograr su inclusión en la norma **COGUANOR**.
5. Promover el uso de la prueba DBE en lugares que no reúnen las condiciones adecuadas para realizar análisis de aguas por las metodologías convencionales.
6. Desarrollar metodologías alternativas de fácil aplicación para detección de otros indicadores de contaminación fecal, facilitando el análisis microbiológico de agua en el interior del país.

## XII. REFERENCIAS

1. Guidelines for Drinking Water Quality. Geneva: World Health Organization, Doc.Tec. Voll 1, 1993. 130 pp.
2. Ortiz B. Desarrollo de una metodología sencilla para establecer la presencia de coliformes en agua de consumo humano y su correlación con el método de fermentación de Tubos Múltiples (NMP). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 2000. 58 pp.
3. United States Office of Water EPA-821-R-97-004. Environmental Protection Agency. 4305. May 1997.
4. Tejedor MT, González M, Pita ML. Identification and Antibiotic Resistance of Faecal Enterococci Isolated from Water Samples. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria: Facultad de Veterinaria. 2001. Islas Canarias, España.
5. Audicana A, Perales I, Borrego JJ. Modification of Kanamycin-Esculin-Azide Agar to improve selectivity in the Enumeration of fecal Streptococci from Water Samples. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(12):4178-4183.
6. Moe CL, Sobsey MD, Samsa GP, Mesolo V. Bacterial indicators of risk of diarrhoeal disease from drinking-water in the Philippines. *Bull World Health Org* 1991. 69(3):305-317.
7. Farrow JA, Jones BA, Collins MD. Taxonomic studies on some group D streptococci. *J Gen Microbiol* 1983;129:1423-1432.
8. American Public Health Association. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 18th. ed. section 9230. Washington, DC. 1992.
9. Facklam RR, Sahm DF. Enterococci. p. 308-314. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Tenover, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. 7th. Ed. ASM Press. Washington, DC. 1999.
10. Federal Register. National Primary drinking water regulations; Analytical Techniques; Coliform Bacteria; Final Rule. *Fed. Regist.* 56:636-346. 1991.
11. World Health Organization. Guidelines, Standard and Health: Assessment of Risk and Risk Management for Water-Related Infectious Disease. Center for Research in Environment and Health. Geneva, Switzerland.

12. Norma Guatemalteca Obligatoria. Agua potable. Especificaciones. CDU 637:148. Comisión Guatemalteca De Normas - COGUANOR. Ministerio de Economía, Guatemala C.A. Febrero, 2000.
13. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Nicaragua. <http://www.minsa.gob.ni>
14. Seminario-Taller sobre microbiología de Agua y Aspectos relacionados de Microbiología Ambiental. 2000. Manual de Laboratorio. Unidad de Entrenamiento e Investigación en Entomología Médica (MERTU/G-CDC). Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala.
15. Norma Oficial Mexicana para Determinación de Bacterias coliformes totales y coliformes fecales (método de filtración por membrana). NOM-041-SSA-1993.
16. Galli D, González E, Ortiz R, Ramos P. Análisis Microbiológico de las aguas del Lago Ypacarai. Universidad Nacional de Asunción. Departamento de Microbiología. Asunción, Paraguay. 1998.
17. Budnick G, Howard RT, Mayo DR. Evaluation of Enterolert for Enumeration of Enterococci in Recreational Waters. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62(10);3881-3884.
18. Ecker KF. Comparison of Membrane Filtration and Multiple-Tube Fermentation by Colilert and Enterolert Methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli*, and Enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in Southern Sweden. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(8);3079-3083.
19. Geldreich EE, Gunther CF. La calidad del agua potable en América Latina. Ponderación de los riesgos microbiológicos contra los riesgos de los subproductos de la desinfección química. Organización Panamericana para la Salud. Organización Mundial para la Salud. OPS/OMS. Argentina.
20. CEPIS/OPS. Consulta a Internet: <http://www.cepis.org.pe>
21. Pourcher AM, Devriese LA, Hernández JF, Delattre JM. Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and enterococci as indicators of the origin of faecal pollution of waters. *J Appl Bacteriol* 1991; 70;525-530.

22. Estrada WA. Relación entre la presencia de colifagos y Escherichia coli en diferentes fuentes de agua de la ciudad capital, y análisis por asociación de la contaminación viral de las mismas. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 2001. 47 pp.
23. Council Directive 98/83/EC of November 1998 on the Quality of Water intended for Human Consumption. Official Journal of the European Communities. Council of the European Union.
24. Centers for Disease Control and Prevention. United States of America. <http://www.cdc.gov>
25. Las Condiciones de la Salud en las Américas. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. 2da. Ed. Vol 2. 1994.
26. Ministerio de Salud Pública y AS de Guatemala. <http://www.mspas.gob.gt>
27. Paul J. Occurrence of Faecal Indicator Bacteria in Surface Waters and the Subsurface Aquifer in Key Largo, Florida. Appl Environ Microbiol 1995; 61(06);235-241.
28. AOAC International Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation. Microbiology Guidelines: Journal of AOAC International 1999; 82(2);402-408.
29. Sinton W, Davies RJ, Bell RG. Inactivation of Enterococci and Faecal Coliforms from Sewage and Meatworks effluents in Seawater Chambers. Appl Environ Microbiol 1994; 60(06); 2040-2048.
30. Sinton W, Davies RJ, Bell RG. Sunlight Inactivation of Enterococci and Faecal Coliforms in Sewage Effluent diluted in Seawater. Appl Environ Microbiol 1994; 60(6);2049-2058.
31. Devriese LA, Hommez J, Haesebrouck F. Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. J Appl Bacteriol 1991; 71;45-50.
32. Wiggins BA. Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in Faecal Streptococci, a method to differentiate human and animal sources of faecal pollution in natural waters. Appl Environ Microbiol 1996; 62(11);3997-4002.

33. Gil IP. Monitoreo y cuantificación de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*, en siete micro cuencas del Lago de Amatitlán: Chanquín, El Frutal, Guadrón, Pinula, San Lucas, Zacates y Zanjón La Palín. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 2001. 62 pp.
34. Brodsky MH, Schiemman DA. Evaluation of Pfizer Selective Enterococcus and KF media for recovery of Faecal Streptococci from water by membrane filtration. *Appl Environ Microbiol* 1976; 31(5):695-699.
35. Abshire RL. Evaluation of a new presumptive medium for Group D streptococci. *Appl Environ Microbiol* 1977;33(5):1149-1155.
36. Suárez M. Tendencia actual del estreptococo como indicador de contaminación fecal. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2002;40(1):38-43.
37. Messer JW, Dufour AP. A rapid specific membrane filtration procedure for enumeration of enterococci in recreational water. *Appl Environ Microbiol* 1997;64(2):678-680.

### XIII. ANEXOS

#### Anexo 1

#### Especies de bacterias pertenecientes al grupo *Enterococcus*

Espece	Fecha de descubrimiento
<i>E. faecalis</i>	1984
<i>E. faecium</i>	1984
<i>E. avium</i>	1984
<i>E. casseliflavus</i>	1984
<i>E. durans</i>	1984
<i>E. gallinarum</i>	1984
<i>E. malodoratus</i>	1984
<i>E. hirae</i>	1985
<i>E. mundtii</i>	1986
<i>E. raffinosus</i>	1989
<i>E. solitarius</i>	1989
<i>E. pseudoavium</i>	1989
<i>E. cecorum</i>	1989
<i>E. columbae</i>	1990
<i>E. saccharolyticus</i>	1990
<i>E. dispar</i>	1991
<i>E. sulfureus</i>	1991
<i>E. seriolicida</i>	1991
<i>E. flavescens</i>	1992

**Fuente:** Facklam, RR and Daniel F. Sahn. *Enterococcus*. In Manual of Clinical Microbiology. 7<sup>th</sup>. Ed. Washington, D.C. ASM Press.

## Anexo 2

### Comparación entre diferentes Guías de Calidad de Agua Potable

Indicadores de contaminación fecal	Normas Unión Europea /100 mL agua *	EPA Guidelines /100 mL agua *	COGUANOR NGO 29 /100 mL agua
<i>E. coli</i>	0	0	0
Bacterias coliformes	0	0	1 colonia*
Enterococos	0	0	3 NMP ∞
			NE ⊕

\* Filtración por membrana

∞ Fermentación por tubos múltiples (NMP)

⊕ No establecido en la norma

**Fuente:** World Health Organization. Guidelines for Drinking Water Quality. Council Directive 98/83/EC of November 1998 on the Quality of Water intended for Human Consumption.

Norma Guatemalteca Obligatoria. Agua potable. Especificaciones. Comisión Guatemalteca de Normas COGUANOR.

### Anexo 3

#### Frecuencia de toma de muestras para aguas de consumo humano

Población abastecida	No. de muestras que debe recolectarse mensualmente
Menos de 5,000	1 muestra
5,000-100,000	1 muestra por cada 5,000 personas
más de 100,000	1 muestra por 10,000 personas, más 10 muestras adicionales

**Fuente:** World Health Organization. Guidelines for Drinking Water Quality.

## Anexo 4

### Algunos medios de cultivo comerciales para identificación de bacterias del grupo enterococos

Nombre del Medio	Principio de reacción
Agar Azida Dextrosa	Se basa en la resistencia de los enterococos a concentraciones elevadas de sal. La microbiota acompañante se inhibe con azida de sodio
Agar Púrpura de Bromocresol	Fermentación de glucosa por los enterococos, con producción de ácido lo que hace un viraje del pH que es detectado por el indicador. La fermentación es aumentada por el glicerol.
Agar Kanamicina-Esculina	Los enterococos hidrolizan la esculina de glucósido a esculetina y glucosa. La esculetina forma complejos de color con el hierro.
Agar Bilis Esculina	Hidrólisis de esculina con formación de complejos de color negro.
Agar KF	Los enterococos reducen el TTC formando complejos de color rojo oscuro.

## Anexo 5

### COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALES g/1L

Ingredientes	AAD	mE	AKF	AKE	BEA	APB	SBA	DBE
Agar-agar		15	15	15	14.5		10	
Azida de sodio	0.2	0.15	0.4				0.4	10
Bilis de buey					40			80
Citrato férrico amónico				0.5	0.5			10
Citrato sódico				0.15				
cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio (TTC)		0.15	0.1				0.1	
D (+) glucosa	7.5					5	2	
Esculina		1		1	1			10
Extracto de carne	4.8				3			
Extracto de levadura		30	10	5		10	5	100
Fosfato dipotásico						2.7	0.4	
Fosfato potásico						2.7		
Glicerofosfato de sodio			10					
Glicerol								
Lactosa			1					
Maltosa			20					
NaCl	7.5	15	5	5		5		10
Peptona de carne					5			100
Peptona de caseína	15			20		10	15	
Peptona de soya							5	
Peptona proteosa			10					
Púrpura de bromocresol			0.015			0.032		
Sulfato de Kanamicina				0.02				
Tiosulfato de sodio								6
<b>pH</b>	7.2	7.1	7.2	7.1	6.6	7	7.1	6.02
<b>Condiciones incubación</b>	de 48h/37°	48h/42°	48h/37°	72 h/37°	72h/37°	48 h/37°	48h/37°	24h/42°

**AAD:** agar azida dextrosa, **mE:** agar mE, **AKF:** agar KF, **AKE:** agar kanamicina-esculina, **BEA:** agar bilis esculina, **APB:** agar púrpura de bromocresol, **SBA:** agar Slanetz-Bartley, **DBE:** medio formulado disco-bolsa-enterococos

## Anexo 6

### Preparación del medio de cultivo utilizado en la prueba DBE

1. Medir los componentes en las proporciones que se presentan a continuación:

Ingrediente	Cantidad g/100 mL
Peptona	10.0
Extracto de levadura	10.0
Bilis	8.0
Esculina	1.0
Citrato férrico amónico	1.0
Tiosulfato de sodio	0.6
Cloruro de sodio	1.0
Azida de sodio	1.0

2. Disolver en 100 mL de agua desmineralizada con calentamiento hasta ebullición.
3. Dejar que enfríe.
4. Ajustar el pH del medio a  $6.07 \pm 0.5$  con NaOH o HCl 1N.
5. En condiciones estériles impregnar el medio de cultivo a los discos de papel filtro.
6. Permitir que el medio se absorba al papel filtro por aproximadamente 15 minutos por cada lado de los discos.
7. Colocar en bolsas Nasco estériles y cerrar.
8. Almacenar a temperaturas de refrigeración ( $4 - 8^{\circ} \text{C}$ ) hasta durante tres meses.

## Anexo 7

Tabulación de resultados obtenidos con filtración por membrana a 42° C a 48 horas de incubación y DBE a 36 y 42° C a 24 y 48 horas de incubación

		Metodología de referencia (filtración por membrana)		N total de muestras
		+	-	
Metodología a comparar DBE	+	Verdaderos positivos	Falsos positivos	
	-	Falsos negativos	Negativos verdaderos	

		FM 42° C/48 horas		Total de muestras
		+	-	
DBE 36° C 24 horas	+	134	36	170
	-	7	133	140
Total		141	169	310

		FM 42° C/48 horas		Total de muestras
		+	-	
DBE 36° C 48 horas	+	139	50	189
	-	2	119	121
Total		141	169	310

		FM 42° C/48 horas		Total de muestras
		+	-	
DBE 42° C 24 horas	+	134	25	159
	-	7	144	151
Total		141	169	310

		FM 42° C/48 horas		Total de muestras
		+	-	
DBE 42° C 48 horas	+	140	31	171
	-	1	138	139
Total		141	169	310

Fuente: datos experimentales

## Anexo 8

### Tabulación de resultados de muestras provenientes de diferentes fuentes

#### Muestras provenientes de Grifos

		FM 42° C/48 horas		Total de muestras
		+	-	
DBE 42° C 48 horas	+	33	23	56
	-	0	118	118
Total		33	141	174

#### Muestras provenientes de piscinas

		FM 42° C/48 horas		Total de muestras
		+	-	
DBE 42° C 48 horas	+	9	1	10
	-	0	15	15
Total		9	16	25

#### Muestras provenientes de pozos

		FM 42° C/48 horas		Total de muestras
		+	-	
DBE 42° C 48 horas	+	33	5	38
	-	1	3	4
Total		34	8	42

### Muestras provenientes de ríos

		FM 42° C/48 horas		Total de muestras
		+	-	
DBE 42° C	+	38	1	39
	-	0	1	1
48 horas	<b>Total</b>	38	2	40

### Muestras provenientes de lagos

		FM 42° C/48 horas		Total de muestras
		+	-	
DBE 42° C	+	140	31	171
	-	1	138	139
48 horas	<b>Total</b>	141	169	310

Fuente: datos experimentales

## Anexo 9

### Cálculo de incertidumbre del método de referencia Resultados obtenidos por filtración por membrana (FM) y DBE a 42° C a las 48 horas de Incubación

		FM 42° C/48 horas		Total de muestras
		+	-	
DBE 42° C 48 horas	+	140	31	171
	-	1	138	139
Total		141	169	310

Falsos negativos en FM =  $6/310 = 1.94\%$

Verdaderos negativos = 163

Exactitud = (positivos por método de referencia)/total de positivos  
=  $141/147$

p = 0.9591 (95.9%)

q =  $1 - p$   
=  $1 - 0.9591$   
= 0.0409

Intervalo de Confianza 95% =  $p \pm 1.96 \sqrt{pq/n}$

=  $0.9591 \pm 1.94 \sqrt{(0.9591/0.0409)/147}$

=  $0.9591 \pm 0.0320$

= 0.9271 – 0.9911

IC 95% = 92.71 a 99.11%

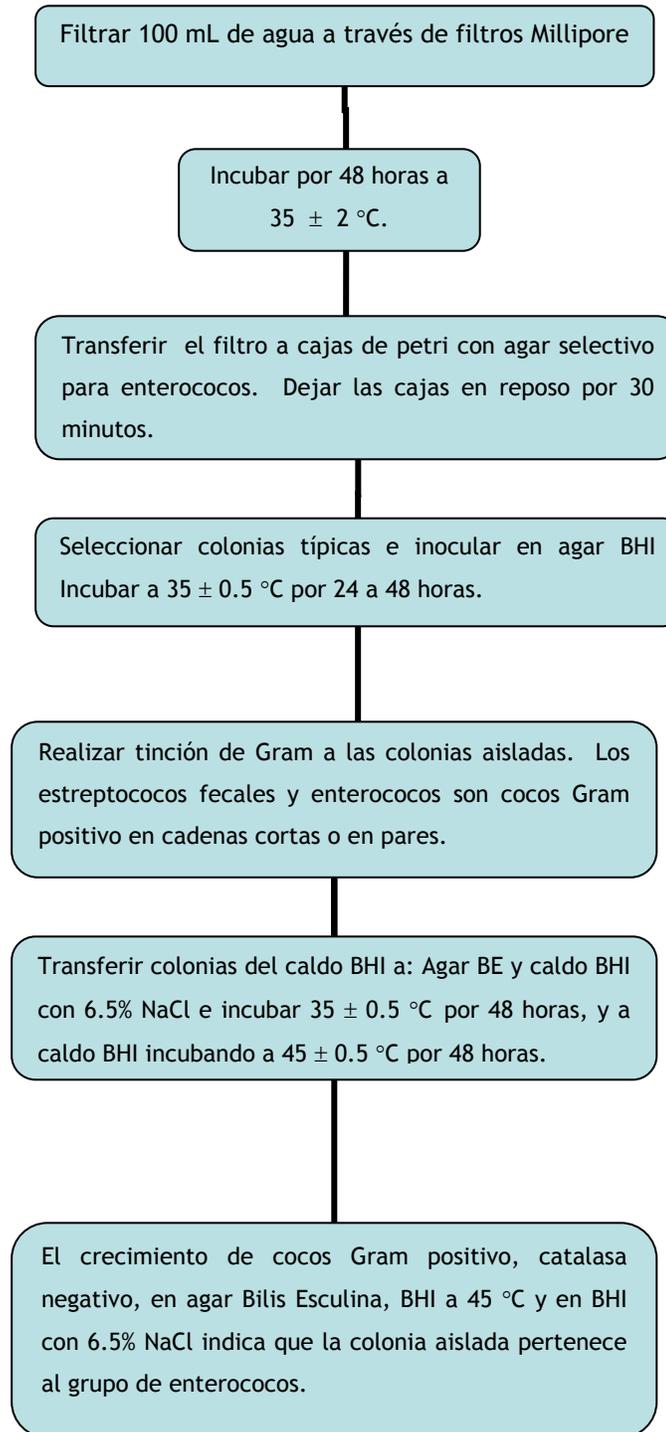
## Anexo 10

### Interpretación del índice *Kappa*

Valor de <i>Kappa</i>	Concordancia
<0.20	Concordancia deficiente
0.21-0.40	Concordancia regular
0.41-0.60	Concordancia moderada
0.61-0.80	Concordancia buena
0.81-1.0	Concordancia muy buena

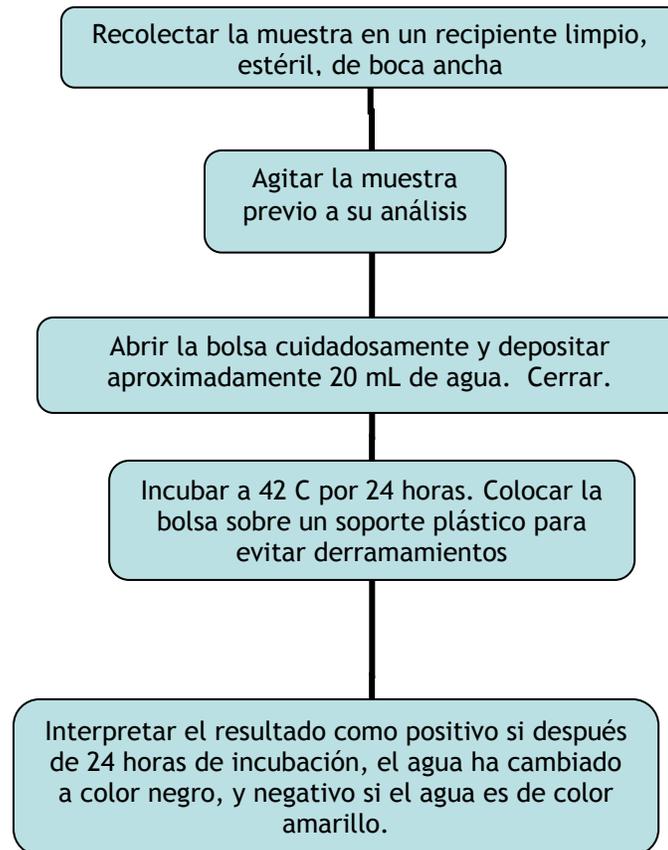
## Anexo 11

### Procedimiento de filtración por membrana para enterococos



## Anexo 12

### Procedimiento al utilizar la unidad disco-bolsa enterococos (DBE)



## Anexo 13

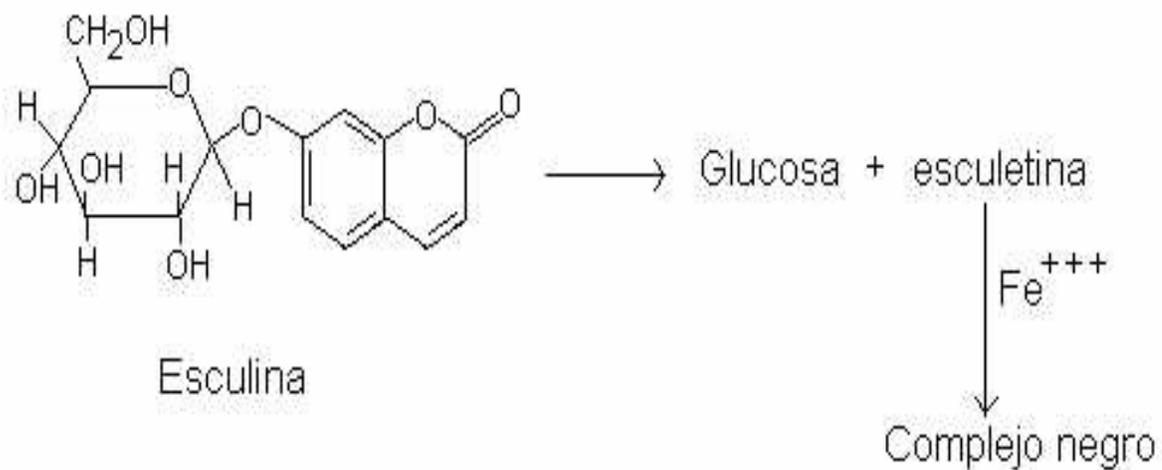
### Análisis de costos de la prueba Para 100 mL de medio de cultivo que proveen de 140 unidades de DBE

Material	Cantidad	Costo en US \$
Peptona	10.0 g	3.7
Extracto de levadura	10.0 g	2.33
Bilis	8.0 g	3.89
Esculina	1.0 g	2.63
Citrato férrico amónico	1.0 g	0.11
Tiosulfato de sodio	0.6 g	0.04
Cloruro de sodio	1.0 g	0.05
Azida de sodio	1.0 g	0.15
Agua desmineralizada	100 mL	0.01
Bolsas Nasco 4 onz	140	16.8
Discos de papel filtro	140	70
Total para 140 unidades		99.71

Costo por unidad = \$ 0.71  
= Q. 5.69

## Anexo 14

## Fundamento de la Reacción de Hidrólisis de Esculina



## Anexo 15

### Prueba Disco Bolsa Enterococos DBE

