

Guía de laboratorio para la vigilancia y control de calidad bacteriológico en muestras de agua para consumo humano

Comprende las principales y más recientes publicaciones sobre calidad bacteriológica de agua para consumo humano a nivel mundial y reúne la información técnico - científica de importancia para el sector. Es una herramienta de consulta para el personal asistencial, técnico y profesional que ejecuta los métodos de ensayo en laboratorios que realizan evaluación, vigilancia y control de calidad del agua, como autoridades sanitarias departamentales, distritales, municipales, laboratorios de salud pública, de prestadores y particulares que deseen implementar los procedimientos aquí descritos.

Fabiola Rojas Baquero – Johana Lizeth Moncada Barragán
frojas@ins.gov.co



La salud
es de todos

Minsalud

Dirección

Martha Lucia Ospina Martínez
Directora General Instituto Nacional de Salud

Coordinación

Astrid Carolina Flórez Sánchez
Directora Técnica
Dirección Redes en Salud Pública

Clara del Pilar Zambrano Hernández
Subdirectora
Laboratorio Nacional de Referencia

Carolina Duarte Valderrama
Coordinador del Grupo de Microbiología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Elaborado por

Johanna Lizeth Moncada Barragán
Fabiola Rojas Baquero
Grupo de Microbiología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Revisado por

Andrea Catherine Sánchez Alfonso. INS. Dirección Redes en Salud Pública
Gerardo Nava. INS. Dirección Redes en Salud Pública
Marysol González Hormiga. INS. Dirección Redes en Salud Pública
Grupo Evaluación de Riesgos en Inocuidad de Alimentos (ERIA) y Plaguicidas
Aida Juliana Martínez León. Centro de Investigaciones en Ingeniería Ambiental Universidad de Los Andes

©
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, Colombia
Av. Calle 26 No. 51-20



El documento requirió revisión por la Oficina Asesora de Jurídica SI NO x

El documento requirió revisión por una instancia externa asesora SI NO x



Tabla de contenido

1.	Definiciones, siglas, abreviaturas y acrónimos	7
2.	Objetivos de la guía.....	9
3.	Alcance	9
4.	Nota Aclaratoria.....	10
5.	Introducción.....	10
6.	Monitoreo de calidad de agua	12
6.1	Directrices a nivel mundial	12
6.2	Antecedentes y marco normativo de la vigilancia y control de la calidad del agua de consumo humano en Colombia.....	14
7.	Responsables del control y vigilancia del agua para consumo humano en Colombia	19
8.	Calidad bacteriológica del agua.....	22
8.1	Monitoreo de calidad bacteriológica del agua	22
8.2	Microorganismos indicadores	25
8.2.1	Coliformes termotolerantes y <i>Escherichia coli</i>	26
8.2.2	Coliformes totales	29
8.2.3	Bacterias heterótrofas.....	31
8.2.4	<i>Clostridium perfringens</i>	32
8.2.5	<i>Enterococcus</i> spp. y <i>Streptococcus</i> spp.....	33
8.3	Microorganismos asociados a transmisión hídrica - Patógenos	33
8.3.1	<i>Acinetobacter</i> spp.	34
8.3.2	<i>Aeromonas</i> spp.....	36
8.3.3	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	37
8.3.4	<i>Campylobacter</i> spp.	38
8.3.5	<i>Escherichia coli</i> . STEC	39
8.3.6	<i>Helicobacter pylori</i>	41
8.3.7	<i>Klebsiella</i> spp.....	42
8.3.8	<i>Legionella</i> spp.....	43
8.3.9	<i>Leptospira</i> spp.	44

8.3.10	<i>Mycobacterium</i> spp. (no tuberculosa)	45
8.3.11	<i>Pseudomonas</i> spp.	46
8.3.12	<i>Salmonella</i> spp.....	47
8.3.13	<i>Shigella</i> spp.....	49
8.3.14	<i>Yersinia</i> spp.	49
8.3.15	<i>Vibrio</i> spp.....	51
8.3.16	Otros organismos de interés	52
9.	Técnicas para la detección de microorganismos indicadores	52
9.1	Concentración de bacterias	52
9.1.1	Filtración por membrana	52
9.2	Detección de bacterias por crecimiento en medio de cultivo	54
9.2.1	Cultivo en placa empeando medios sólidos o líquidos	56
9.2.2	Determinación de Número Más Probable (sustrato enzimático).....	60
9.2.3	Ausencia – Presencia	70
9.3	Técnicas moleculares	75
9.3.1	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	75
9.3.2	Detección de bacterias por Hibridación Fluorescente In Situ (FISH)	76
9.4	Técnicas inmunológicas.....	77
9.4.1	Citometría de flujo.....	77
10.	Toma de muestras para análisis bacteriológico de agua	78
10.1	Muestras remitidas al Laboratorio Nacional de Referencia	79
11.	Control de calidad en el laboratorio de microbiología	81
12.	Referencias bibliográficas.....	86

ANEXO 1. Criterios de calidad bacteriológico en diferentes países

ANEXO 2. Tablas de interpretación Número Más Probable (NMP) con tubo múltiple

ANEXO 3. Acta de toma de muestras

ANEXO 4. Prácticas asociadas al control de calidad

Figuras

Figura 1. Marco para la seguridad del agua para consumo humano	13
Figura 2. Estructura general del marco regulatorio de agua para consumo humano en Colombia.....	18
Figura 3. Responsables del control y vigilancia del agua para consumo humano	21
Figura 4. Árbol de decisión para análisis bacteriológicos de agua.....	23
Figura 5. Monitoreo de control - Persona prestadora (Según la normatividad vigente)....	24
Figura 6. Monitoreo de vigilancia - Autoridad sanitaria (Según la normatividad vigente) .	24
Figura 7. Monitoreo y evaluación del proceso de potabilización (Guía OMS).....	24
Figura 8. Monitoreo en sistemas de distribución (Guía OMS).....	25
Figura 9. Fundamento de la técnica de filtración por membrana	54
Figura 10. Sistemas de filtración por membrana	57
Figura 11. Fundamento técnica de sustrato definido para detección de coliformes totales.	61
Figura 12. Fundamento de la técnica de sustrato definido para detección de <i>E. coli</i>	62
Figura 13. Proceso técnico para el montaje de sustrato enzimático - cualitativo	63
Figura 14. Proceso técnico para el montaje de sustrato enzimático – cuantitativo	64
Figura 15. Interpretación del resultado de coliformes totales para la técnica sustrato definido	67
Figura 16. Interpretación de resultados para determinación de <i>E. coli</i> por la técnica sustrato definido	67
Figura 17. Técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa	76
Figura 18. Técnica FISH	77
Figura 19. Técnica Citometría de flujo.....	78
Figura 20. Cinta testigo de autoclave	81

Tablas

Tabla 1. Microorganismos indicadores sugeridos por la OMS.....	26
Tabla 2. Indicaciones de preparación para las suspensiones de Tiosulfato de sodio	80

1. Definiciones, siglas, abreviaturas y acrónimos

Definiciones

- **Agua cruda:** es el agua natural que no ha sido sometida a tratamientos para su potabilización.
- **Agua para consumo humano:** es aquella que, por cumplir las características físicas, químicas y microbiológicas, en las condiciones señaladas en las normas que la reglamenten, es considerada como apta para consumo humano. Se utiliza en bebida directa, en la preparación de alimentos o en la higiene personal [1].
- **Agua tratada:** agua sometida a operaciones unitarias y procesos que implican tratamientos físicos y químicos sobre el agua cruda, cambiando sus características iniciales y optimizándolas para hacerla apta para consumo humano.
- **Análisis microbiológico del agua:** son los procedimientos de laboratorio que se efectúan a una muestra de agua para consumo humano para evaluar la presencia o ausencia, tipo y cantidad de microorganismos [2].
- **Calidad del agua:** es el resultado de comparar las características físicas, químicas y microbiológicas encontradas en el agua, en relación con la normatividad vigente que regula la materia [1].
- **Fuente de abastecimiento:** depósito o cuerpo de agua superficial o subterránea, utilizada en un sistema de suministro a la población, bien sea de aguas atmosféricas, superficiales, subterráneas o marinas [1].
- **Laboratorio de análisis del agua para consumo humano:** es el establecimiento público o privado, donde se realizan los procedimientos de análisis de las características físicas, químicas y microbiológicas del agua para consumo humano [1].
- **Mapa de riesgo:** instrumento que define las acciones de inspección, vigilancia y control del riesgo asociado a las condiciones de calidad de las cuencas abastecedoras de sistemas de suministro de agua para consumo humano, las características físicas, químicas y microbiológicas del agua de las fuentes superficiales o subterráneas de una determinada región, que puedan generar riesgos graves a la salud humana si no son adecuadamente tratadas, independientemente de si provienen de una contaminación por eventos naturales o antrópicos [1].
- **Medio de cultivo selectivo:** solución líquida o gelatinosa que contiene nutrientes y factores de crecimiento que favorecen el crecimiento específico de cierto tipo de microorganismos y evita o minimiza el desarrollo de bacterias diferentes al microorganismo de interés.

- **Persona prestadora que suministra o distribuye agua para consumo humano (persona prestadora):** son aquellas que, acorde con la Ley 142 de 1994, suministran agua para consumo humano tratada o sin tratamiento [1]
- **Pruebas bioquímicas:** conjunto de ensayos químicos realizados con base en las propiedades metabólicas de cada tipo de bacteria con la finalidad de identificarlas; está determinación generalmente se evidencia por un cambio visible en el medio de cultivo.
- **Riesgo:** probabilidad que un agente biológico o una sustancia química produzca o genere una alteración a la salud como consecuencia de una exposición al mismo [1].
- **Validación de métodos de ensayo:** es el proceso de caracterización primaria del método de ensayo por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Se lleva a cabo para métodos propios o modificados.
- **Verificación de métodos de ensayo:** es el proceso por el cual se ejecuta una segunda caracterización del método en un laboratorio específico y se genera evidencia objetiva de que los requisitos especificados en la caracterización original han sido cumplidos y el método puede ser ejecutado bajo las condiciones evaluadas. Se lleva a cabo para métodos estándar previamente validados.
- **Vigilancia de la calidad del agua para consumo humano:** es el conjunto de acciones periódicas realizadas por la autoridad sanitaria o por las personas prestadoras que suministran o distribuyen agua para consumo humano, para comprobar y evaluar el riesgo que representa a la salud pública la calidad del agua distribuida por los sistemas de suministro de agua para consumo humano, así como para valorar el grado de cumplimiento de las Buenas Prácticas Sanitarias [1]

Siglas, abreviaturas y acrónimos

- AVP: Años de Vida Perdidos
- CRA: Comisión Reguladora de Agua Potable y Saneamiento
- DANE: Departamento Administrativo Nacional de Estadística
- DRSP: Dirección de Redes en Salud Pública
- EDA: Enfermedad Diarreica Aguda
- ICBF: Instituto Colombiano de Bienestar Familiar
- INS: Instituto Nacional de Salud
- ISO: Organización Internacional para estandarización (en inglés International Organization for Standardization ISO)
- IVC: Inspección, Vigilancia y Control
- LNR: Laboratorio Nacional de Referencia
- LSP: Laboratorio de Salud pública
- LSPD: Laboratorio de Salud Pública Departamental o Distrital

- MUG: 4-metiumbelliferil β -D-glucuronidasa
- NMP: Número Más Probable.
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OPS: Organización Panamericana de la Salud
- ONGP: orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
- PDA: Plan Departamental de Aguas
- PICCAP: Programa Inter laboratorio del Control de Calidad de Agua Potables
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- SIVIGILA: Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública
- SIVICAP: Sistema de Información de la Vigilancia de Calidad del Agua Potable
- SM: Métodos estándar para el análisis de agua y aguas residuales (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, por sus siglas en inglés SM)
- SSPD: Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios
- UNICEF: Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia, siglas en inglés.

2. Objetivos de la guía

- Describir los criterios técnicos básicos para definir los ensayos a realizar en muestras de agua cruda y tratada destinadas a consumo humano, según el objeto del análisis, incluyendo indicadores convencionales de calidad y patógenos de importancia en salud pública asociados a transmisión hídrica.
- Precisar los fundamentos técnico - científicos y lineamientos de las principales técnicas de ensayo de laboratorio, empleadas para el análisis bacteriológico de calidad de agua para consumo humano, teniendo en cuenta la implementación de estándares de calidad.
- Describir las generalidades normativas asociadas al monitoreo de calidad de agua para consumo humano en Colombia
- Contribuir como documento técnico referente del proceso analítico para la vigilancia y control de calidad de agua en el país.

3. Alcance

La presente guía está dirigida como material de consulta para el personal asistencial, técnico y profesional que ejecute los métodos de ensayo en laboratorios que realicen evaluación, vigilancia y control de calidad bacteriológica del agua para consumo humano, como autoridades sanitarias departamentales, distritales, municipales, laboratorios de

salud pública, de prestadores y particulares que deseen implementar los procedimientos aquí descritos.

4. Nota aclaratoria

Este documento se considera un breve compendio de las principales y más recientes publicaciones sobre la materia a nivel mundial y se presenta como un resumen de la información técnico - científica de importancia para el sector. La información aquí registrada es un aporte emitido por el Instituto Nacional de Salud de Colombia y no representa obligatoriedad por parte de ninguna entidad. Así mismo, su omisión o desconocimiento no genera incumplimiento, sanción o implicaciones legales. No sustituye las indicaciones provistas por legislación, documentos estándar o normas técnicas nacionales e internacionales asociadas a laboratorios de ensayo de calidad bacteriológica de agua para consumo humano.

Si a futuro se presentan cambios en la normatividad aquí relacionada, se realizarán los respectivos ajustes y complementos considerando los cambios efectuados, y se publicará una nueva versión.

“El agua contaminada puede transmitir enfermedades como la diarrea, el cólera, la disentería, la fiebre tifoidea y la poliomielitis. Se calcula que unas 842 000 personas mueren anualmente a causa de diarrea como consecuencia de la insalubridad del agua, de un saneamiento insuficiente o de una mala higiene de las manos. Sin embargo, esta afección es prevenible y la muerte de unos 361 000 niños menores de cinco años se podría prevenir cada año si se abordaran estos factores de riesgo”

OMS, 2019 

5. Introducción

El agua es un recurso esencial, por tanto, disponer de un abastecimiento continuo, seguro y suficiente genera bienestar en el desarrollo de una comunidad. Su abundancia y amplia disponibilidad no implica que resulte totalmente apta para consumo, pues las características propias del agua y el efecto de las actividades antrópicas en su naturaleza han hecho de éste un recurso escaso y vulnerable, exponiendo así a la población a riesgos prevenibles.

De esta manera, el monitoreo de las características fisicoquímicas y microbiológicas que se puedan evaluar en el agua destinada a consumo humano, mediante el uso de métodos estandarizados, definirán parcialmente el nivel de riesgo para la salud humana [1]. No obstante, es importante considerar que la vulnerabilidad difiere según las etapas de la vida en las que se encuentren los individuos expuestos, siendo los menores de 5 años, adultos mayores e individuos con compromiso inmune, aquellos con mayor riesgo a enfermar por condiciones asociadas a deficiencia en su calidad [3].

Se ha llegado a asociar que la carga de morbilidad por EDA corresponde hasta en 94% a la ausencia de un recurso hídrico de calidad [4]. En países con economías de ingresos bajos y medios, los problemas de calidad de agua llegan a causar enfermedad diarreica en un porcentaje hasta 150 veces mayor con respecto a los casos reportados en países con economías de ingresos altos. Además, se calcula que los AVP por habitantes en estas regiones por enfermedad diarreica puede llegar a ser incluso cinco veces mayor en niños de 0 a 5 años con respecto al resto de la población [4], por esto, la distribución de agua apta para consumo humano, el adecuado monitoreo y la vigilancia sanitaria de los procesos relacionados, se consideran medidas costo efectivas en salud pública, ya que ayudan a reducir la carga de morbilidad originada por causas asociadas [5].

En Colombia, dadas las características geográficas que limitan el acceso a algunas regiones y la falta de acueducto en zonas rurales, es común que para algunas poblaciones sus fuentes de consumo de agua procedan principalmente de pozos sin bomba, jagüey, agua superficial, agua lluvia, carro tanque o aguatero, exponiendo a la población a riesgos microbiológicos y fisicoquímicos prevenibles asociados a este tipo de fuentes denominadas no mejoradas.

Según el más reciente informe de carga de enfermedad ambiental en Colombia, realizado por el Observatorio Nacional de Salud del INS, el consumo de agua no mejorada es considerada un factor de riesgo para diarrea (OR: 1,9 a 2,5). En cuanto a la carga de enfermedad atribuida al agua se reportó que el 51,1% de las muertes por EDA están asociadas a consumo de agua de calidad insuficiente, principalmente a los grupos de edad extremos, con 22 departamentos donde esta fracción atribuible supera el 85%, como el caso de Nariño (94,5%), Vichada (92,45%), Caldas (86,6%), Huila (85%) y Chocó (85%). Para EDA, el 50,2% de la carga de enfermedad es atribuible a agua insegura, el 26,6% a problemas de saneamiento y el 22,4% a la deficiencia

"En un análisis por enfermedad se observó que para EDA, el 50,2% de la carga de enfermedad es atribuible a agua insegura, el 26,6% a problemas de saneamiento y el 22,4% al lavado de manos. De forma combinada la carga de EDA en Colombia se atribuye a estos tres factores de riesgo ambiental en un 68,2%."



INS, 2019

en el lavado de manos. De forma combinada la carga de EDA en Colombia se atribuye a estos tres factores de riesgo ambiental en un 68,2% [6].

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, favorecer el acceso a agua para consumo humano segura reduce la exposición de la población, lo que puede impulsar el crecimiento económico de un país y contribuir a la reducción de la pobreza, al convertirlos en individuos económicamente más productivos que incurren en menos gastos médicos. Así mismo, fortalecer los programas de control y vigilancia asegura la trazabilidad de los procesos y facilita la identificación del o los patógenos implicados en brotes, mejorando así los registros por enfermedades relacionadas con agua insegura. De esta manera, el apoyo brindado por los laboratorios de calidad de agua en la ejecución de programas de control o vigilancia, mediante la ejecución de ensayos analíticos aportará información sobre la calidad de agua, favoreciendo la generación de estrategias que reduzcan el impacto en salud para la población; garantizando así intervenciones oportunas que facilitarán el proceso de toma de decisiones en la cadena productiva del agua.

6. Monitoreo de calidad de agua

6.1. Directrices a nivel mundial

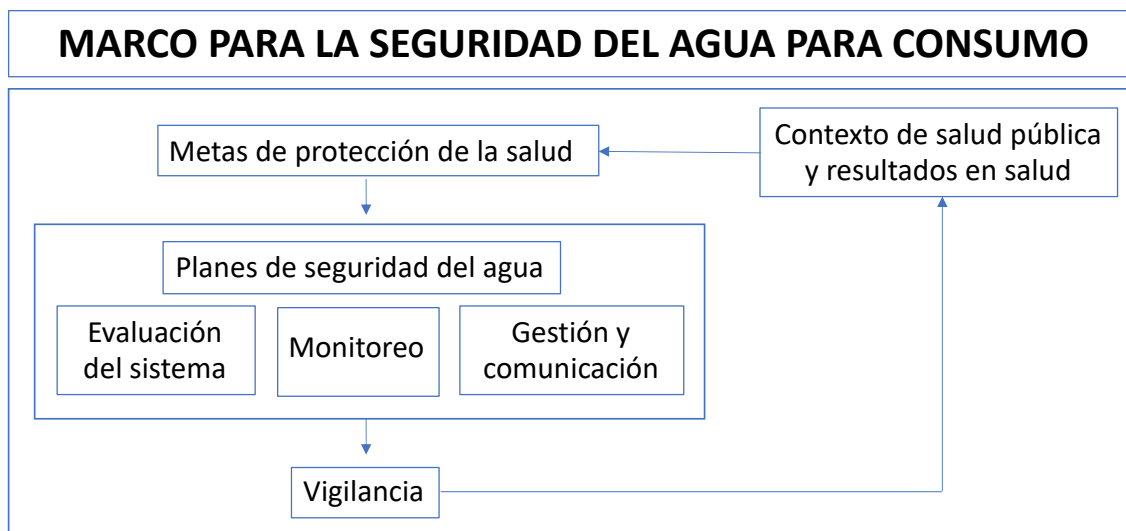
Existen diferentes entidades y comunidades que brindan directrices en cuanto a calidad de agua para consumo humano, entre las que cabe resaltar la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Unión Europea (UE), la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y el Consejo Nacional de investigación Médica y de Salud de Australia. De manera general todas las entidades presentan lineamientos con base en sus condiciones locales y dictan las pautas para la ejecución de los análisis de calidad del agua para consumo humano en su región.



Fuente: propia

Los lineamientos implementados en un país no pueden ser transferidos a otro, pues los requerimientos de calidad pueden variar según el contexto medioambiental, social, económico, cultural y dietético de cada región, por lo que es indispensable que de manera independiente se identifiquen los aspectos de interés prioritarios, como la capacidad técnica y económica para dar cumplimiento a los requerimientos. Pese a las diferencias, el diseño e implementación de la normatividad asociada en cualquier lugar del mundo debe procurar que la población acceda a agua con la mejor calidad posible.

La OMS, presenta recomendaciones generales, con el fin de estandarizar el aseguramiento de calidad del agua para consumo a la que tienen acceso en diferentes regiones del mundo. Dentro de la cuarta y última versión de su guía para la calidad del agua de consumo humano, presenta estrategias de gestión de riesgo que buscan garantizar la seguridad del abastecimiento de agua por medio del control de los componentes con potencial efecto en salud [7]; de esta manera, plantea abordar el tema desde una perspectiva preventiva, cuya gestión conduzca a la implementación de un marco para la seguridad del agua para consumo, que incluya de manera general: la descripción de metas de protección de la salud, planes de seguridad del agua y la implementación de un sistema de vigilancia independiente, de manera que se asegure un plan de trabajo intersectorial con el fin de minimizar efectos adversos en la salud de la población.



Fuente: OMS [7]

Figura 1. Marco para la seguridad del agua para consumo

Dentro del plan de seguridad del agua se encuentra la evaluación y gestión de riesgos en el sistema de abastecimiento, asegurando infraestructura suficiente, monitoreo constante, planificación y gestión efectivas, respaldado por la normatividad local y monitoreado por la autoridad sanitaria correspondiente. Además de la verificación o monitoreo de la calidad del agua para consumo y la gestión y comunicación de los aspectos clave identificados en los procesos descritos con anterioridad.

El prestador debe monitorear constantemente las fuentes, entendiendo que deben conocer las condiciones del agua que ingresa en sus sistemas de abastecimiento mediante una caracterización constante de la fuente de captación, que permita determinar la presencia y cantidad de microorganismos patógenos presentes en el agua captada, esto debido a la dinámica de la contaminación generada ya sea de forma natural o por intervención antropogénica. Dada la ubicación geográfica y condiciones ambientales de algunos países el acceso a fuentes de abastecimiento es limitado, por lo que se debe asegurar que en caso de tener presencia de microorganismos patógenos, se establezcan programas de monitoreo permanentes para aplicar correctivos adecuados y verificar que el tratamiento sea efectivo respecto a su remoción [7], así como fomentar medidas que mitiguen la contaminación en la fuente en un trabajo conjunto con la autoridad ambiental que corresponda. También, es importante conocer el comportamiento epidemiológico de las enfermedades asociadas a transmisión hídrica endémicas de la región, con el fin de reducir el impacto en salud pública y mejorar las condiciones de la comunidad. Por esta razón se recomienda que la persona prestadora trabaje en conjunto con las entidades territoriales de salud, conociendo de primera mano la realidad epidemiológica de su comunidad.

Las recomendaciones dadas por las guías internacionales como la OMS, UE, EPA, entre otras, son la base para que cada país diseñe sus propios planes y establezca sus valores de referencia, priorizando aquellos aspectos endémicos característicos de la región, adaptados a las circunstancias y condiciones locales, basado en metas realistas y viables económicamente para toda la población, aplicable tanto a grandes sistemas de abastecimiento como pequeñas comunidades. En el anexo 1 del presente documento se describen algunos criterios de calidad bacteriológico dispuestos diferentes países.

Teniendo en cuenta la información de los principales documentos y guías de calidad de agua a nivel internacional y nacional, el presente documento se constituye como un breve compendio de las principales y más recientes publicaciones sobre la materia a nivel mundial.

6.2. Antecedentes y marco normativo de la vigilancia y control de la calidad del agua de consumo humano en Colombia

La calidad del agua potable es un tema de interés general a nivel mundial por su impacto en la salud de la población, es así como el término de vigilancia de la calidad del agua para consumo se introduce en 1976 por la OMS, como la *“evaluación y examen, de forma continua y vigilante, desde el punto de vista de la salud pública, de la inocuidad y aceptabilidad de los sistemas de abastecimiento de agua de consumo”*; en este sentido, y

con el propósito de proteger la salud pública, se debe tener en cuenta que en la **vigilancia y el control de la calidad del agua**, se diferencian claramente las funciones y responsabilidades de los prestadores de los servicios de acueducto y las autoridades sanitarias responsables de la vigilancia.

La protección y control de la calidad del agua en Colombia, está enmarcada en diversos documentos normativos que buscan garantizar la integridad de su cadena productiva, incluyendo desde la conservación de los recursos naturales implicados en su nacimiento hasta su disposición final.

La Constitución Política de Colombia, declara en varios de sus artículos el compromiso del estado en la protección de la diversidad e integridad del ambiente, lo que incluye áreas naturales de importancia ecológica propias del territorio nacional donde surgen fuentes hídricas (Art 79), así mismo declara su compromiso para cubrir las necesidades insatisfechas en salud, educación, saneamiento ambiental y de agua potable priorizando planes y presupuesto nacional y territorial para estos fines (Art 366) [8]. Presupuesto que según el Sistema General de Participaciones descrito en la Ley 715 de 2001, favorece la destinación específica de recursos para el sector de agua potable y saneamiento básico [9].

Así mismo, el código sanitario nacional, declarado en el marco de la Ley 9 de 1979 presenta en su primer título, medidas sanitarias asociadas a la protección del ambiente, donde se incluye la regulación de actividades asociadas a fuentes de agua, con el fin de asegurar la conservación del recurso y dar un punto de inicio para el desarrollo de normas de protección de calidad, facultando así al Ministerio de Salud para establecer las características deseables y admisibles que deben tener las aguas para efectos de control sanitario, enfocado en el mejoramiento de sus características naturales para alcanzar estándares de suficiencia y aptitud para consumo [10].



Fuente: Propia

Por su parte, y dando continuidad a lo mencionado con anterioridad, se abre la puerta para que posteriormente en la Ley 142 de 1994, en el marco del régimen de los servicios públicos domiciliarios se declare como esencial la prestación del servicio de acueducto o servicio domiciliario de agua potable, incluyendo la distribución municipal de agua apta para consumo humano, su conexión y medición, así como las actividades complementarias asociadas al ciclo productivo como la captación de agua, su procesamiento, tratamiento, almacenamiento, conducción y transporte [11].

La vigilancia de la calidad del agua en Colombia inicia de manera voluntaria en 1994; posteriormente, para dar cumplimiento al artículo 44 del Decreto 475 de 1998 se genera en el año 2001 el sistema SIVICAP y se realiza un programa voluntario, en prueba piloto hasta junio de 2007, allí se consolidaba la información enviada al INS por parte de los LSPD con los resultados de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos de las muestras de agua. Es a partir del 2007 que el registro en el SIVICAP se vuelve obligatorio con el Decreto 1575 de 2007 y la Resolución 2115 del mismo año, de los actuales Ministerios de Salud y Protección Social y Vivienda, Ciudad y Territorio, que reglamentan el sistema de información SIVICAP[1], [2].

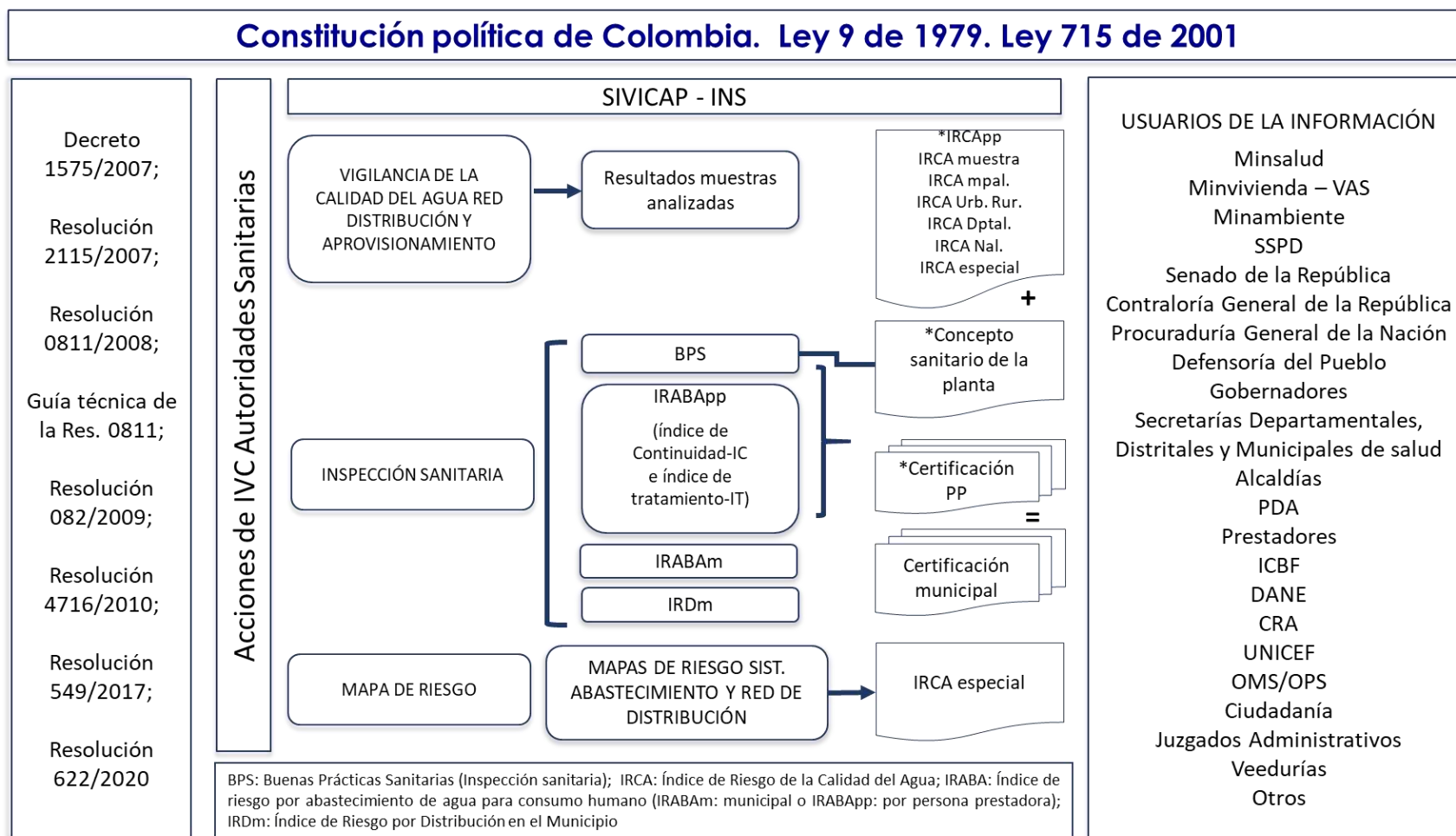
Teniendo en cuenta lo anterior, además de la obligación que tiene la persona prestadora del servicio público de acueducto de garantizar el suministro de agua apta para el consumo humano, se encuentra la obligación que tienen las direcciones departamentales y municipales de salud, de ejercer la vigilancia a la calidad del agua distribuida a la población en sus áreas de influencia. Lo anterior, se materializa con la recolección y análisis de muestras que realizan las autoridades sanitarias denominadas **muestras de vigilancia** y **las muestras de control** que son tomadas por la persona prestadora. Las muestras de vigilancia se reportan por las autoridades sanitarias en el SIVICAP y las muestras de control se reportan al Sistema Único de Información (SUI) por parte de los prestadores, en los términos y plazos establecidos por parte de la Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios (SSPD).

En la actualidad, la información de la vigilancia de la calidad del agua es reportada en línea por parte de las autoridades sanitarias departamentales, municipales (categorías especial, 1, 2 y 3) y distritales, a través de la versión web de SIVICAP, sistema en el cual se reporta la información de la calidad del agua del país, con la generación de varios indicadores e instrumentos como: el Índice de Riesgo de la Calidad del Agua para Consumo Humano (IRCA), el Índice de Riesgo Municipal por Abastecimiento de Agua para Consumo Humano (IRABAm), el Índice de Riesgo por Abastecimiento de Agua por Persona Prestadora (IRABApp), el Índice de Tratamiento (IT), el Índice por Continuidad (IT), el Índice de Riesgo por Distribución en el municipio (IRDm), las Buenas Prácticas Sanitarias (BPS) y el mapa de riesgo de la calidad del agua (ver figura 2).

El SIVICAP cuenta con un número importante de usuarios directos representados en las autoridades sanitarias en sus distintas áreas (salud ambiental, laboratorio de salud pública, Secretarías de Salud Municipales, áreas de vigilancia, entre otras) y un número mayor de usuarios indirectos, entre los cuales se encuentran órganos nacionales (ej. Congreso, Ministerios), entidades de control (ej. SSPD, Procuraduría General de la Nación, Contraloría General de la Republica, Personería, Veedurías) ciudadanos, comunidades, universidades, organizaciones y agremiaciones, entre otros, que usan a diario la

información e indicadores generados a través del **SIVICAP** para la toma oportuna de decisiones en sus respectivos ámbitos de competencia y acorde con los hallazgos o resultados de la vigilancia de la calidad del agua reportada en cada uno los municipios.

De otra parte, según lo establecido en el artículo 3 de la Resolución 811 de 2008 del Ministerio de Salud y Protección Social y Ministerio de Vivienda, Ciudad y Territorio, las muestras deben ser tomadas en puntos concertados entre la persona prestadora del servicio público de acueducto y la autoridad sanitaria sobre la red de distribución, para que se haga efectiva la toma de muestras. La persona prestadora debe realizar la materialización de dichos puntos mediante la construcción de cajillas a través de las cuales se instala un grifo o dispositivo conectado directamente a la red de distribución que permita la toma de la muestra.



Fuente: Propia - INS (DRSP)

Figura 2. Estructura general del marco regulatorio de agua para consumo humano en Colombia

7. Responsables del control y vigilancia del agua para consumo humano en Colombia

Según el decreto 1575 de 2007, la vigilancia y control de la calidad del agua para el consumo humano, es el conjunto de acciones periódicas realizadas por la autoridad sanitaria y por las personas prestadoras que suministran o distribuyen agua para consumo humano, para comprobar y evaluar el riesgo que representa a la salud pública la calidad del agua distribuida por los sistemas de suministro, así como para valorar el grado de cumplimiento de las Buenas Prácticas Sanitarias.

Las autoridades responsables de la **vigilancia** realizan acciones de IVC sanitaria de la calidad del agua en sus respectivas jurisdicciones; su principal responsabilidad es promover el mejoramiento de la calidad del abastecimiento de agua mediante auditorias y seguimientos periódicos, para ello recopilan medios de prueba que soporten lo consignado en los formularios de IVC de la calidad del agua, requieren información adicional, imponen medidas de control y sanitarias y articulan las acciones con el plan territorial respectivo. Los principales responsables son las autoridades sanitarias departamentales, distritales y municipales correspondientes. Con respecto a las entidades con rol institucional de **control de calidad del agua**, su principal responsabilidad es asegurar las prácticas operativas, evaluar los sistemas y mediante un monitoreo estricto de su producto garantizar el suministro de agua segura, continua y suficiente a la población. Los principales responsables de su ejecución son las entidades prestadoras de servicios, que de acuerdo con la ley 142 de 1994 suministran agua para consumo mediante acueductos o sistemas de aprovisionamiento de agua para consumo humano mediante soluciones alternativas.

La responsabilidad de los prestadores es exigible hasta el punto donde se encuentren instalados dispositivos para regular o medir el agua consumida por los usuarios, lo que se conoce como la red pública de acueducto, hasta donde la tubería ingrese a propiedad privada o hasta donde se encuentren llaves de paso ubicadas por los prestadores como punto final de la red de distribución. A partir de este punto, la responsabilidad de los **usuarios** es mantener en condiciones sanitarias adecuadas las instalaciones de distribución y almacenamiento de agua para consumo humano a nivel intradomiciliario, lo que incluye asegurar el mantenimiento y conservación locativa, realizando el lavado y desinfección de sus tanques de almacenamiento y redes internas, como mínimo cada seis (6) meses, además de mantener en adecuadas condiciones de operación la acometida y las redes internas domiciliarias para preservar la calidad del agua suministrada.

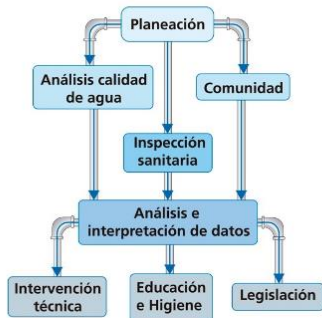
Las responsabilidades de cada uno de los entes nacionales o territoriales con relación al tema de calidad de agua para consumo humano se describen al detalle en el decreto 1575 de 2007 y se resumen a continuación en la figura 3.

Control y vigilancia de la calidad del agua para consumo humano y doméstico en el país

Decreto 1575 de 2007
y Decreto 1898 de 2016.



Etapas claves en el desarrollo de la vigilancia en el suministro del agua y estrategias para mejorarla, OMS 1976, 1997



ESQUEMA RESPONSABILIDADES DE CADA INSTITUCIÓN		
Niveles de Gobierno	¿Qué hace?	¿Cómo lo hace?
Nación	La vida y el agua son de todos. Ministerio de Salud Políticas, programas, proyectos y regulación para acceso de la población a agua potable y saneamiento básico.	- Reglamenta y apoya financieramente a municipios cuando se requieran. - Define los criterios para evaluación del agua y las actividades mínimas de los planes y programas de reducción de riesgo.
	El ambiente es de todos. Ministerio de Ambiente Rector de la gestión del ambiente y los recursos naturales.	Ejerce la inspección y vigilancia sobre las corporaciones autónomas regionales quienes evalúan la calidad hídrica en su jurisdicción.
	La salud es de todos. Ministerio de Salud Promueve la salud pública, con políticas y estrategias de intervención colectiva e individual, involucran al sector salud y otros sectores.	- A través del Sistema Nacional de Inspección, Vigilancia y Control sanitario (IVC) - Reglamenta y asiste técnicamente a municipios cuando se requieran. - Define los criterios para evaluación del agua y las actividades mínimas de los planes y programas de reducción de riesgo. - Consolida el informe nacional de agua para Colombia y - Publica la lista de laboratorios idóneos para ser contratados por acueductos
	Superservicios Evalúa la gestión de los prestadores de servicios públicos domiciliarios, de acuerdo con el marco normativo vigente.	Realiza visita de inspección a los operadores, alertas en sus indicadores, denuncia prestación del servicio y verifica acciones correctivas pertinentes.
	INSTITUTO NACIONAL DE SALUD Responsable de la coordinación técnica de los Laboratorios Departamentales de Salud pública.	- Lineamientos técnicos para LDSP. - Programa de evaluación externa del desempeño PICCAP - Valida y revalida métodos analíticos
Departamento	Direcciones Territoriales de Salud (Departamentales, Distritales y Municipales) En Salud Pública, coordina sistema operativo de redes de vigilancia, asistencia técnica y capacitación en su territorio.	- Realiza inspección, vigilancia y control de la calidad del agua para consumo humano en sus áreas de influencia. - Calcula el IRCA - Elabora mapas de riesgo - Elabora planes de mejora - Diligencia SIVICAP - Vigila los laboratorios contratados por el acueducto, a través del LDSP - Informa a la comunidad la calidad del agua y los planes de acción
Municipio	ACUEDUCTOS MUNICIPALES Captación de agua cruda, procesamiento, almacenamiento, conducción y tratamiento y distribución municipal de agua para el consumo humano.	- Planeación técnica y financiera; priorizando cobertura, calidad, continuidad y eficiencia de la prestación del servicio. - Contrata laboratorio que cumple requisitos y es publicado por el ministerio, para que vigile la calidad del agua. - Realiza los procesos químicos de tratamiento del agua
Otros	Confederación Colombiana de Consumidores Responsables de mantener en condiciones sanitarias adecuadas, instalaciones de distribución y almacenamiento de agua a nivel intradomiciliario.	- Evita problemas de salud pública. - Lava y desinfecta tanques de almacenamiento, redes y preserva calidad del agua suministrada.
	CONASA CONASA. Analizar problemática del agua para consumo humano y coordinar acciones integrales de mejora en el país.	COTSA. Coordinando la gestión intersectorial, para la toma de decisión sobre la gestión del agua para consumo humano a nivel territorial.
Usuarios		

Fuente: Propia - INS

Figura 3. Responsables del control y vigilancia del agua para consumo humano

8. Calidad bacteriológica del agua

8.1. Monitoreo de calidad bacteriológica del agua

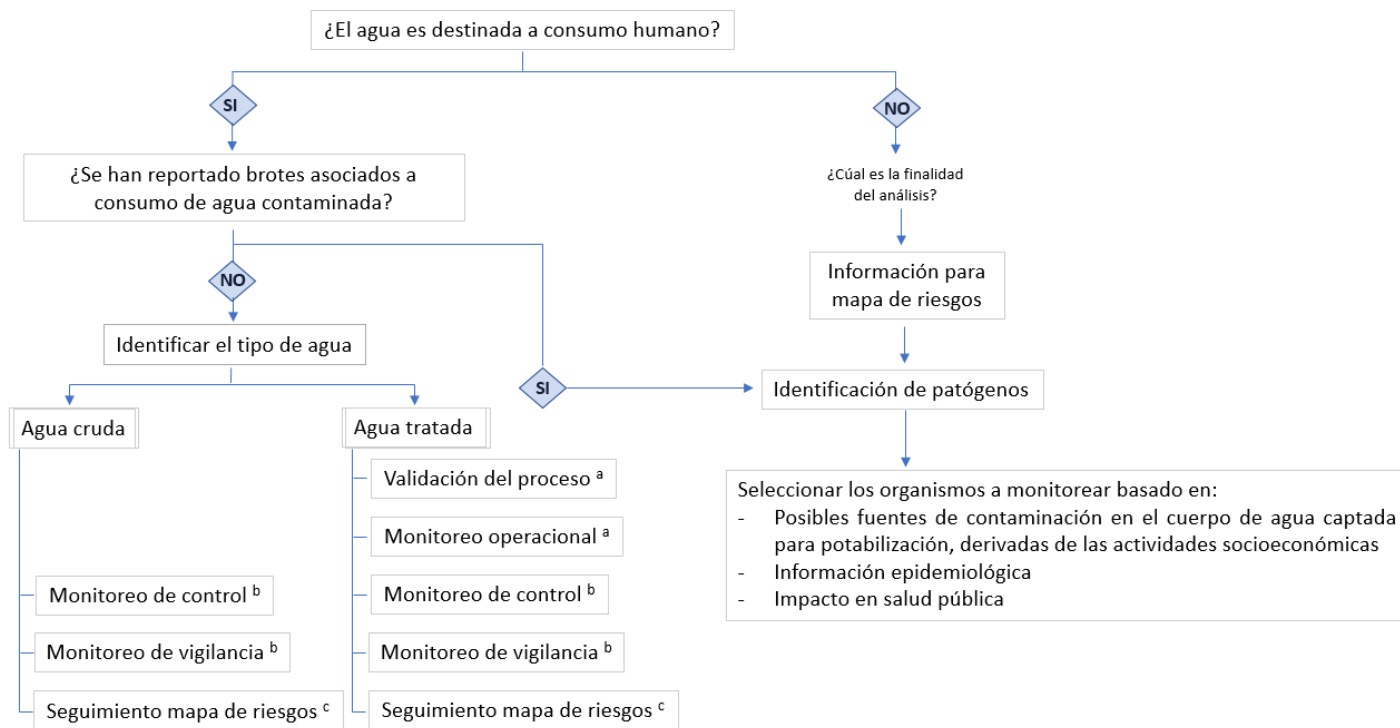
La determinación de los diferentes parámetros depende del objeto del análisis y el tipo de agua a analizar. La necesidad de monitorear diferentes indicadores o patógenos definen el tipo de caracterización que se debe realizar. Si la finalidad de la muestra de agua remitida al laboratorio es realizar vigilancia, se deben analizar los microorganismos indicadores definidos por la normatividad vigente según lo descrito en las figuras 5 y 6.

Si el agua remitida al laboratorio de salud pública es destinada a consumo humano, es imperativo conocer si proviene de una fuente que se haya relacionado con brotes epidemiológicos por enfermedades de origen hídrico, de manera que se dé prioridad al monitoreo de los patógenos asociados.

En la figura 4, se presenta un resumen general de un árbol de decisión donde se describe cómo proceder para definir el tipo de microorganismos a identificar en una muestra de agua (cruda/tratada).

Tanto para monitoreo de control por parte de la persona prestadora como el monitoreo de vigilancia por parte de la autoridad sanitaria, los valores máximos aceptables así como la frecuencia y el número mínimo de muestras a analizar están dados por lo descrito en la normatividad nacional vigente, en este caso definida por la población atendida, el contexto abastecido y el sistema de distribución de agua, para zona rural o urbana, según corresponda [2], [12]. Los microorganismos patógenos se definen según lo identificado en los mapas de riesgo para cada fuente que abastece la fuente de suministro.

ÁRBOL DE DECISIÓN PARA EJECUCIÓN DE ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE MUESTRAS DE AGUA CRUDA/TRATADA



Fuente: Propia

^a La persona prestadora define que ensayos realizar según las características de sus sistemas de tratamiento

^b Los lineamientos para estos monitoreos están dados por las resoluciones 2115 de 2007 y 622 de 2020

^c Según la caracterización de la cuenca abastecedora y lo definido en el mapa de riesgo

Figura 4. Árbol de decisión para análisis bacteriológicos de agua

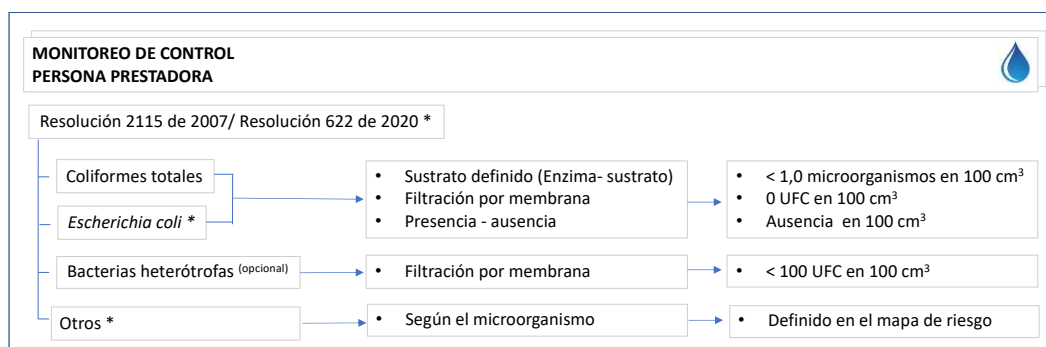


Figura 5. Monitoreo de control - persona prestadora (según la normatividad vigente)

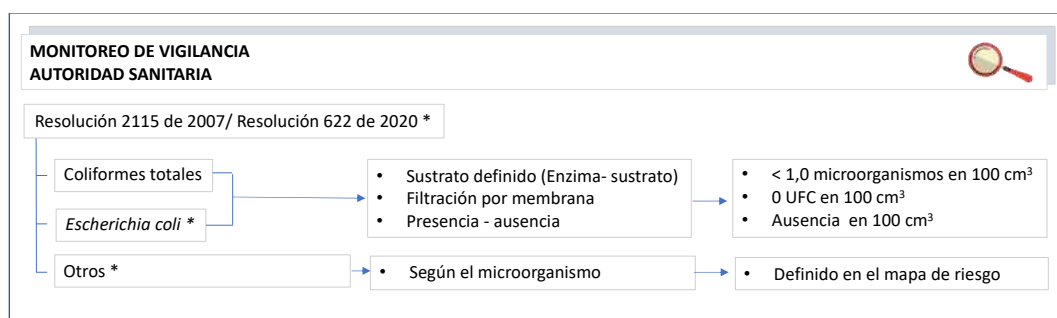


Figura 6. Monitoreo de vigilancia - autoridad sanitaria (según la normatividad vigente)

Con respecto al monitoreo y evaluación del proceso de potabilización, no hay lineamientos nacionales al respecto, por lo que se sugiere que, según la calidad de agua de la fuente abastecedora y el sistema de tratamiento empleado, se definan internamente los valores esperados para cada indicador y se realicen monitoreos constantes que permitan verificar la efectividad de su proceso. A continuación, se presentan los indicadores sugeridos para estos monitoreos según la OMS.

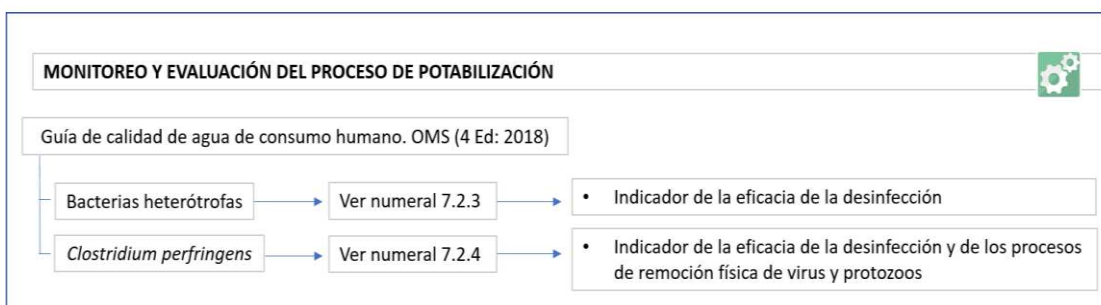


Figura 7. Monitoreo y evaluación del proceso de potabilización (Guía OMS)

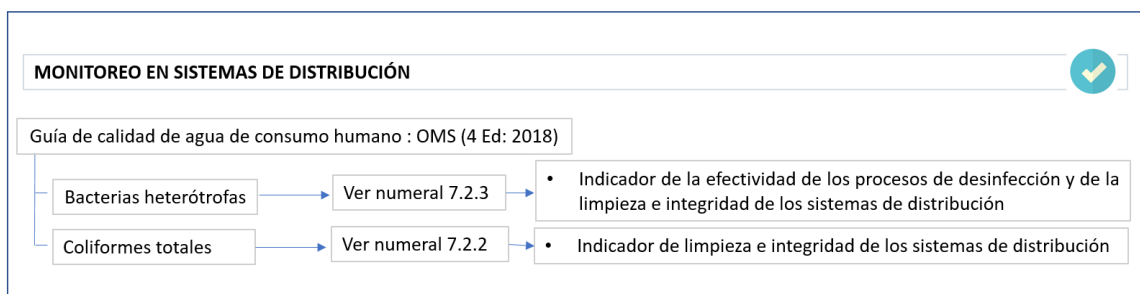


Figura 8. Monitoreo en sistemas de distribución (Guía OMS)

8.2. Microorganismos indicadores

Son empleados para verificar la calidad microbiológica del agua para diferentes fines, entre ellos:

- Monitorear la presencia de contaminación fecal
- Indicar la eficacia de los procesos asociados a la potabilización
- Controlar la integridad y limpieza de los sistemas de distribución

Para ser considerados indicadores, los microorganismos deben cumplir los requisitos mencionados a continuación [7]:

- Ser microorganismo de origen fecal, en este caso, ser parte de la microbiota intestinal de animales de sangre caliente.
- No multiplicarse en aguas naturales pero permanecer en ellas
- Estar ausente en agua para consumo humano y presente cuando la fuente contiene microorganismos patógenos de interés en salud pública; en cuyo caso debe estar presente en mayor cantidad que estos.
- Responder de manera similar a los microorganismos patógenos ante los tratamientos.
- Ser relativamente inocuo, reduciendo así el riesgo de exposición de los analistas.
- Ser detectable por métodos rápidos, selectivos, cuantificables y de bajo costo.

La presencia de microorganismos indicadores se asocia con la presencia de microorganismos patógenos. Sin embargo, su ausencia no asegura en todos los casos la ausencia de estos, ya que algunos microorganismos presentan mayor adaptación a condiciones adversas y resistencia a desinfectantes.

Los valores máximos aceptables para dichos microorganismos dependen principalmente de los objetivos establecidos por los entes reguladores nacionales, de acuerdo con las condiciones locales. El monitoreo debe ser constante, y suele realizarse por la persona prestadora y por entes que ejercen responsabilidades de IVC [19].

Se emplean diferentes tipos de microorganismos para distintos fines, según la OMS se sugiere el monitoreo de las diferentes fases del proceso, según el objetivo a verificar diferenciado en operacional o de control / vigilancia. A continuación, se presentan las bacterias sugeridas a monitorear:

Tabla 1. Microorganismos indicadores sugeridos por la OMS

Microorganismo	Tipo de monitoreo		
	Validación del proceso	Operacional	Control / Vigilancia
<i>E. coli</i> (o coliformes termotolerantes)	No aplicable	No aplicable	Indicador fecal
Coliformes totales	No aplicable	Indicador de limpieza e integridad de los sistemas de distribución	No aplicable
Recuento de organismos heterotróficos	Indicador de la eficacia de la desinfección	Indicador de la efectividad de los procesos de desinfección y de la limpieza e integridad de los sistemas de distribución	No aplicable
<i>Clostridium perfringens</i>^a	Indicador de la eficacia de la desinfección y de los procesos de remoción física de virus y protozoos	No aplicable	No aplicable ^b

Fuente: OMS [7]

^a Según el tipo de tratamiento empleado

^b Se puede emplear cuando se conoce que las fuentes están contaminadas con protozoos intestinales, como indicador indirecto de la presencia de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. o en general cuando hay sospecha de contaminación fecal.

8.2.1. Coliformes termotolerantes y *Escherichia coli*

E. coli es por excelencia el indicador de contaminación fecal para verificar la calidad de agua debido a su presencia inequívoca en el intestino humano y de los animales de sangre caliente, donde usualmente es inocuo. Por su parte, los coliformes termotolerantes suelen

ser empleados como alternativa a la determinación de *E. coli* en agua en algunas circunstancias en las que la determinación directa no es posible; su monitoreo brinda un alto grado de seguridad, debido a que su presencia es inminente en aguas contaminadas con materia fecal, ya que se componen predominantemente de *E. coli*.

En general los coliformes termotolerantes, son microorganismos capaces de fermentar lactosa a 44 – 45 °C. *E. coli* particularmente tiene la capacidad de producir Indol a partir de triptófano o por la producción de las enzimas B-galactosidasa y B-glucuronidasa [14]. No obstante, existen microorganismos con mayor resistencia a condiciones ambientales y a las tecnologías empleadas en el marco de los tratamientos de potabilización, por lo que su ausencia no implica que el agua este completamente libre de bacterias patógenas, de esta manera, se recomienda mantenerlo en el control e incluir microorganismos más resistentes como complemento al monitoreo [15].

E. coli o cualquier coliforme termo tolerante debe estar ausente en cualquier caso en 100 ml de muestra analizada correspondiente a agua destinada para consumo, agua que ingresa al sistema de distribución o agua dispuesta en el sistema de distribución. En caso de que se detecte *E. coli* en cualquiera de los puntos mencionados con anterioridad se deben tomar acciones inmediatamente e investigar el origen [7]. Si se obtienen resultados positivos para coliformes se deben realizar los ensayos de confirmación pertinentes según el método empleado [13]. En algunos países se dictan las directrices puntuales sobre cómo proceder en caso de obtener resultados positivos, responsabilizando a la persona prestadora de apoyar a las autoridades sanitarias en la vigilancia de cualquier posible brote asociado al consumo de agua contaminada [15].

Métodos de análisis: se realiza en 100 ml de muestra, empleando diversas técnicas basadas principalmente en la evidencia del desarrollo microbiano mediada por la producción de ácido y gas a partir de la lactosa o de la producción de la enzima B-glucuronidasa cuando se emplean medios selectivos (ver numeral 8). Se pueden emplear conforme a lo descrito por la normatividad vigente: técnicas de filtración, sustrato enzimático o presencia - ausencia, también existen métodos para determinación por número más probable, técnicas moleculares o inmunológicas [13].

Por lo general se pueden analizar por métodos económicos y simples, que se pueden ejecutar en un laboratorio básico de análisis microbiológico con las debidas precauciones de bioseguridad. Cada laboratorio establece qué método de ensayo desea emplea según sus condiciones particulares. Algunos de los métodos estandarizados para determinación de *E. coli* y coliformes termotolerantes en agua para consumo humano incluyen, pero no se limitan a los descritos a continuación:

- ISO 9308-1:2014/AMD 1:2016. Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora — Amendment 1
- ISO 9308-2:2012. Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 2: Most probable number method
- ISO 9308-3:1998/COR 1:2000. Water quality — Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of *E. coli* in surface and waste water — Technical Corrigendum 1
- US. EPA. Method 1604:2002. Total Coliforms and *Escherichia coli* in Water by Membrane Filtration Using a Simultaneous Detection Technique (MI Medium)
- AOAC INTERNATIONAL 991.15 (18th Ed. Rev 2) For the detection and enumeration of total coliforms and *E. coli* in water
- SM. 2017 (23rd Ed.) 9211 B. Seven hours Fecal coliform test.
- SM. 2017 (23rd Ed.) 9221. Multiple tube fermentation technique for members of the coliform group.
 - 9221 C. Standard total coliform fermentation technique. Estimation of bacterial density + 9221 F. *Escherichia coli* procedure using fluorogenic substrate ó 9221 G. Other *Escherichia coli* procedures.
 - 9221 D. Standard total coliform fermentation technique. Presence-Absence (P-A) Coliform test. + 9221 F. *Escherichia coli* procedure using fluorogenic substrate ó 9221 G. Other *Escherichia coli* procedures.
 - 9221 E. Thermotolerant (fecal) coliform procedure.
- SM. 2017 (23rd Ed.) 9222. Membrane filter technique for members of the coliform group.
 - 9222 B. Standard total coliform membrane filter procedure using ENDO Media + Confirmación de coliformes termotolerantes o confirmación *E. coli*.
 - 9222 D. Thermotolerant (fecal) coliform membrane filter procedure
 - 9222 G. Partitioning thermotolerant coliforms from MF total coliform using EC broth.
 - 9222 H. Partitioning *E. coli* from MF total coliform using EC-MUG Broth.
 - 9222 I. Partitioning *E. coli* from MF total coliforms using NA-MUG Agar.
 - 9222 J. Simultaneous detection of total coliform and *E. coli* by dual-chromogen membrane filter procedure.
 - 9222 K. Simultaneous detection of total coliform and *E. coli* by fluorogen/chromogen membrane filter procedure.
- 9222 B. Standard total coliform membrane filter procedure
- SM. 2017 (23rd Ed.) 9223. Enzyme substrate coliform test
- EPA 40 CFR 141.21.

8.2.2. Coliformes totales

Grupo amplio de bacilos Gram negativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, que incluye bacterias termo tolerantes y bacterias de origen fecal, así como microorganismos que pueden ser aislados de fuentes ambientales, de manera que su presencia no indica obligatoriamente contaminación fecal en la muestra [13]. Son comunes en regiones tropicales y suelen estar presentes en casi todos los sistemas de abastecimiento que no cuentan con tratamiento. Bajo condiciones de laboratorio, los coliformes totales se desarrollan en medios de cultivo que contengan lactosa a una temperatura entre los 35 °C a 37 °C en un lapso de 18 a 48 horas, el crecimiento se identifica por la producción de ácido y gas a partir de la fermentación de la lactosa. Son bacterias oxidasa negativos, reductores de nitrato y crecen en presencia de sales biliares [7].

Los géneros pertenecientes al grupo coliforme son: *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. y *Citrobacter* spp., recientemente se han incluido otros géneros como *Serratia* spp. y *Hafnia* spp. [7]. La presencia de coliformes en el agua indica fallas en los procesos de potabilización o contaminación en las redes de distribución, donde crecen formando biopelículas. Su presencia puede alertar a la persona prestadora con el fin de mejorar las condiciones de operación [13]. Se encuentran ampliamente en sistemas de abastecimiento rurales, sobre todo en regiones tropicales. Su presencia debe alertar sobre la búsqueda de *E. coli* o coliformes termotolerantes, reduciendo así el riesgo de consumo de agua contaminada [16].

La mayoría de las normas internacionales requieren ausencia de coliformes totales al menos en el 95% de las muestras analizadas en el sistema de distribución. No obstante, cuando se emplean como indicador de eficiencia del tratamiento se espera ausencia en el 100 % de las muestras, en caso de obtener resultados positivos se deben realizar las correcciones respectivas (Ver anexo 1 del presente documento).

Métodos de análisis: Se realiza en 100 ml de muestra, empleando diversas técnicas basadas principalmente en la evidencia del desarrollo microbiano mediada por la producción de ácido a partir de la lactosa o de la producción de la enzima B-galactosidasa, empleando medios selectivos. Se pueden emplear conforme a lo descrito por la normatividad vigente: técnicas de filtración, sustrato enzimático o ausencia-presencia, también existen métodos para determinación por número más probable o técnicas moleculares [13](Ver numeral 8).

Generalmente se pueden analizar por métodos económicos y simples, que se pueden ejecutar en un laboratorio básico de análisis microbiológico con las debidas precauciones

de bioseguridad [7]. Cada laboratorio establece qué método de ensayo desea emplea según sus condiciones particulares. Algunos de los métodos estandarizados para determinación de coliformes totales en agua para consumo humano incluyen, pero no se limitan a los descritos a continuación:

- ISO 9308-1:2014/AMD 1:2016. Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora — Amendment 1
- ISO 9308-2:2012. Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 2: Most probable number method
- ISO 9308-3:1998/COR 1:2000. Water quality — Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of *E. coli* in surface and wastewater — Technical Corrigendum 1
- US. EPA. Method 1604:2002. Total Coliforms and *Escherichia coli* in Water by Membrane Filtration Using a Simultaneous Detection Technique (MI Medium)
- AOAC INTERNATIONAL 991.15 (18th Ed. Rev 2) For the detection and enumeration of total coliforms and *E coli* in water
- SM. 2017 (23rd Ed.) 9221. Multiple tube fermentation technique for members of the coliform group
 - 9221C. Standard total coliform fermentation technique. Estimation of bacterial density
 - 9221D. Standard total coliform fermentation technique. Presence-Absence (P-A) Coliform test.
- SM. 2017 (23rd Ed.) 9222. Membrane filter technique for members of the coliform group.
 - 9222 B. Standard total coliform membrane filter procedure using ENDO Media
 - 9222 J. Simultaneous detection of total coliform and *E. coli* by dual-chromogen membrane filter procedure.
 - 9222 K. Simultaneous detection of total coliform and *E. coli* by fluorogen/chromogen membrane filter procedure.
- SM. 2017 (23rd Ed.) 9223. Enzyme substrate coliform test
- EPA 40 CFR 141.21

8.2.3. Bacterias heterótrofas

Su presencia indica deterioro de la calidad del agua tratada. La evaluación de bacterias heterótrofas evidencia el contenido general de bacterias en el agua capaces de desarrollarse y evidenciar crecimiento de colonias visibles en medios nutritivos, sin inhibidores, bajo unas condiciones establecidas de tiempo y temperatura, generalmente a 22°C y a 37°C para evaluar bacterias relacionadas con origen fecal. No obstante, la población recuperada puede diferir según el método y las condiciones aplicadas [7].

Su resultado tiene poca relevancia sanitaria, ya que en el agua pueden estar presentes un gran número de microorganismos tanto aerobios como anaerobios, pero solo una pequeña porción se desarrolla en medios de cultivo artificiales [16]. Sin embargo, puede resultar útil como monitoreo a largo plazo del tratamiento empleado, específicamente en procesos de coagulación, filtración, sedimentación y desinfección, donde el objetivo es mantener los recuentos lo más bajos posibles. En algunos casos, la filtración con arena o el uso de carbón activado biológicamente sustenta la proliferación de este tipo de microorganismos, pero tratamientos de desinfección como cloración, ozonización y radiación UV reducen su concentración [17]. En los casos que el desinfectante residual se reduce, o aumenta la disponibilidad de nutrientes es más probable que se favorezca el desarrollo de este tipo de microorganismos, indicando deterioro del recurso. En plantas de tratamiento, los recuentos suelen ser bajos, mantener los datos históricos permite que al visualizar cambios en los recuentos se generen alertas oportunas en el proceso. En algunos países se emplea este indicador para evaluar la integridad de la red de distribución y la idoneidad del agua para su uso en industrias alimenticias o de productos de bebida [16].

Métodos de análisis: suelen ser métodos económicos, simples, que se pueden ejecutar en un laboratorio básico de análisis microbiológico con las debidas precauciones de bioseguridad. Se requieren temperaturas e incubación desde los 20°C hasta los 37°C y periodos de incubación desde pocas horas hasta siete días o más [7]. Cada laboratorio establece qué método de ensayo desea emplea según sus condiciones particulares. Algunos de los métodos estandarizados para determinación de bacterias heterótrofas en agua cruda y agua para consumo humano incluyen, pero no se limitan a los descritos a continuación:

- SM. 2017 (23rd Ed.) 9215. Heterotrophic plate count
- ISO 6222:1999. Water quality — Enumeration of culturable micro-organisms — Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium

8.2.4. *Clostridium perfringens*

Bacilo Gram positivo, esporulado, anaerobio y sulfitorreductor. Es considerado un excelente indicador de contaminación fecal dada su amplia resistencia a condiciones ambientales como desecación, ausencia de nutrientes, exposición a procesos de desinfección, cambios de pH, temperatura y exposición a radiación UV, entre otros. Resistencia mediada por su capacidad de generar esporas [13]. Dadas estas características particulares y su incapacidad para multiplicarse en medios acuáticos es posible emplearlo como indicador, principalmente de la presencia de microorganismos protozoarios como quistes de *Giardia* spp. u ooquistes de *Cryptosporidium* spp. [7]. No suele ser usado como indicador en la red de distribución, ya que dada su alta capacidad de supervivencia puede ser detectado aún a largas distancias del evento contaminante generando falsas alarmas [16].

Su presencia en aguas cloradas se asocia a fallas en el proceso de filtración. Hace parte de la microbiota intestinal del 13 al 35% de los animales de sangre caliente, incluido el ser humano, sin embargo, la cantidad de *Clostridium perfringens* excretada por las heces es menor con respecto a *E. coli* [13]. Su monitoreo no está incluido como obligatorio en la normatividad colombiana, por lo que la información aquí suministrada es netamente de consulta técnica.

Métodos de análisis: se pueden ejecutar en un laboratorio básico de análisis microbiológico con las debidas precauciones de bioseguridad, siempre que se cuente con suministros para cultivo de organismos anaerobios. Cada laboratorio establece qué método de ensayo desea emplea según sus condiciones particulares. Algunos de los métodos estandarizados para determinación de *Clostridium perfringens* en agua incluyen, pero no se limitan a los descritos a continuación:

- ISO 6461-1:1986. Water quality — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) — Part 1: Method by enrichment in a liquid medium
- ISO 6461-2:1986. Water quality — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) — Part 2: Method by membrane filtration
- ISO 14189:2013. Water quality — Enumeration of *Clostridium perfringens* — Method using membrane filtration

8.2.5. *Enterococcus* spp. y *Streptococcus* spp.

Cocos Gram positivos, anaerobios facultativos formadores de cadenas, de origen fecal [13]. Los integrantes del género *Enterococcus* spp. son relativamente tolerantes a medios con altas concentraciones de cloruro de sodio y pH alcalinos, en su mayoría son de origen fecal y para fines prácticos suelen ser considerados como indicadores específicos de contaminación fecal humana [7].

Suelen ser más resistentes a los procesos de desinfección que *E. coli* u otras bacterias coliformes, por lo que los enterococos se emplean como un indicador complemento de *E. coli* en sistemas de captación en áreas del trópico, donde también se suele emplear como indicador de la eficiencia del tratamiento [16]. Su monitoreo no está incluido como obligatorio en la normatividad colombiana, por lo que la información aquí suministrada es netamente de consulta técnica.

Métodos de análisis: suelen ser métodos económicos, simples, que se pueden ejecutar en un laboratorio básico de análisis microbiológico con las debidas precauciones de bioseguridad. Cada laboratorio establece qué método de ensayo desea emplear según sus condiciones particulares. Algunos de los métodos estandarizados para determinación de *Enterococcus* spp. y *Streptococcus* spp. en agua incluyen, pero no se limitan a los descritos a continuación:

- SM. 2017 (23rd Ed.) 9230. Fecal *Enterococcus* /*Streptococcus* groups
- ISO 7899-2: Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci — Part 2: Membrane filtration method.

8.3. Microorganismos asociados a transmisión hídrica - Patógenos

Lo referido en este numeral es netamente de carácter informativo, por lo que no se considera necesario que cada prestador analice en su totalidad la presencia de microorganismos patógenos en el agua de consumo humano suministrada. Se considera importante que la autoridad sanitaria conozca las principales bacterias patógenas asociadas a brotes epidemiológicos por consumo de agua contaminada y cómo identificar estos posibles agentes etiológicos en caso de ser necesario.

La determinación de patógenos en agua se limita principalmente a su evaluación en agua cruda o a su monitoreo puntual en casos de brotes asociados a consumo de agua, debido a la complejidad de algunos métodos, los altos costos, la oportunidad en la generación de resultados, la sensibilidad en la detección, el riesgo para los analistas, entre otros, hacen

que este monitoreo no sea una opción viable para el control y vigilancia constante de la calidad del agua en muchos países.

La ubicación geográfica, en conjunto con el cambio estacionario o el periodo de lluvias y las actividades antrópicas desarrolladas en el área, puede generar alteraciones de calidad en las fuentes ocasionando mayor o menor exposición a ciertos patógenos. Por ello, caracterizar la microbiota presente en las fuentes permite determinar el nivel de exposición de la población, además de conocer si un proceso es eficaz o no para eliminar los organismos indeseados.

Existe una amplia variedad de microorganismos patógenos que se pueden encontrar en medios acuáticos. Sin embargo, la selección del organismo a monitorear se debe realizar con base en la probabilidad de presencia en la fuente, su impacto en salud pública y de ser posible, con datos epidemiológicos asociados a enfermedades de origen hídrico en la región [7].

La presencia de microorganismos en el agua puede generar diferentes efectos sobre el ser humano, desde gastroenteritis leves hasta la muerte, la gravedad de la enfermedad depende en gran medida del potencial patógeno del organismo, la exposición y el estado del hospedero[13]. Las vías de infección suelen variar según el microorganismo, y aunque la contaminación oro-fecal suele ser la más frecuente, algunas bacterias como *Acinetobacter* spp., *Legionella* spp., *Burkholderia pseudomallei* y micobacterias atípicas pueden crecer en el agua y en el suelo, por lo que las vías alternas como inhalación o contacto directo con la piel o mucosas, pueden generar también infecciones importantes en tracto respiratorio, lesiones en la piel o el cerebro [7]. Estas últimas se incluyen en el presente documento dado su impacto en salud pública recientemente reportado en otros países.

A continuación, se listan algunos de los microorganismos con potencial patógeno que se pueden encontrar en el agua, como se mencionó previamente, la selección del organismo a monitorear varía según la fuente a analizar, entre otros aspectos a tener en cuenta.

8.3.1. *Acinetobacter* spp.

Es un género ubicuo, que suele estar presente en forma natural en suelos, aguas naturales, aguas residuales, océanos, sedimentos e incluso áreas contaminadas con hidrocarburos. Es un género conformado por coco bacilos Gram negativos, oxidasa negativos y estrictamente aerobios. Miden entre 0,9 a 1,6 μm de diámetro por 1,5 a 2,5 μm de longitud, su temperatura óptima de crecimiento es de 33 a 35°C, pero sobreviven en el ambiente por

periodos prolongados dada su capacidad de formar biopelículas [13]. Hace parte de los microorganismos cuya transmisión a través del agua para consumo humano se ha sugerido, pero no hay pruebas concluyentes al respecto[7].

Importancia en salud: pueden causar enfermedades en población vulnerable como adultos mayores, neonatos y menores de 5 años, pacientes con quemaduras o heridas extensas, pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores, con enfermedades autoinmunes, en individuos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o en pacientes hospitalizados [13], puede producir infecciones en vías urinarias, neumonía, meningitis secundaria e infectar heridas complejas [7]. Se ha reportado que cepas de *Acinetobacter baumannii* (complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*) causan enfermedades nosocomiales con altas tasas de mortalidad debido a la capacidad de los microorganismos de adquirir resistencia a múltiples antibióticos [18].

Fuente: son microorganismos ubicuos, se han llegado a identificar en agua para consumo en unidades médicas y hogares con características frecuentes de resistencia a antibióticos potencialmente adquiridas en redes de distribución, que les confieren mayor resistencia a betalactamasas y sulfonamidas [18]. Este tipo de microorganismos es frecuentemente encontrado formado biopelículas en red, en muestras con altas concentraciones de nitratos [19]. En agua de distribución se ha evidenciado que corresponden del 1 al 5,5% de los microorganismos detectados mediante recuento en placa de bacterias heterótrofas. Suelen ser microorganismos naturales de la microbiota de la piel humana y en ocasiones del sistema respiratorio de personas sanas [7].

Vías de exposición: el contacto con agua para consumo en centros hospitalarios y la transmisión de persona a persona, son las fuentes principales de contaminación para los pacientes en estado de mayor vulnerabilidad. Se ha asociado también a brotes por uso de humidificadores de habitaciones. No se relaciona como agente causal de infecciones gastrointestinales, tampoco se ha considerado que la ingestión de agua con presencia del microorganismo sea fuente habitual de infección para personas sanas. Sin embargo, es preciso que para centros hospitalarios o donde se encuentre población vulnerable se evalúen medidas para minimizar la exposición. En las plantas de tratamiento, la coagulación y filtración pueden remover en gran proporción la concentración de *Acinetobacter* spp. presente inicialmente en el agua cruda, adicionalmente dada su baja resistencia al cloro se puede considerar que la presencia de desinfectante residual puede reducir su proliferación [7].

8.3.2. *Aeromonas* spp.

Bacilos Gram negativos, no esporulados y anaerobios facultativos. El género originalmente fue ubicado en la familia Vibrionaceae, que también incluía los géneros *Vibrio* spp., *Photobacterium* spp. y *Plesiomonas* spp., las investigaciones filogenéticas posteriores indicaron que el género *Aeromonas* spp. no está estrechamente relacionado con los vibrios, sino con una unidad monofilogenética en el subgrupo -3 de la clase Proteobacterias [20]. Dadas las conclusiones, fue transferido a una nueva familia las Aeromonadaceae. Dentro de las especies consideradas de importancia potencial para la salud humana, se encuentran *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae* [21] [22]. Dichas bacterias viven de manera habitual en el agua dulce, están presentes en el agua, en el suelo y en algunos alimentos, especialmente en la carne y la leche [7].

Efectos en salud: el género *Aeromonas* spp. comprende importantes patógenos humanos que causan septicemia primaria y secundaria en individuos inmunocomprometidos, infecciones graves de heridas en individuos sanos y otras afecciones como peritonitis, meningitis e infecciones de los ojos, las articulaciones y los huesos [7]. La gastroenteritis, es la manifestación clínica más común, a pesar de tener descritos algunos casos de gastroenteritis asociada a *Aeromonas* spp., aún no se ha demostrado si la mayoría de los aislamientos recuperados de personas sintomáticas son el agente etiológico [23].

Fuente: las *Aeromonas* spp. han sido aisladas de suministros clorados de agua potable; aunque dichas bacterias son susceptibles a la desinfección, se ha demostrado que son capaces de crecer y persistir formando biopelículas en los sistemas de distribución de agua para consumo humano. Se ha comprobado que el contenido de materia orgánica, la temperatura, el tiempo de residencia del agua en la red y la baja cantidad de cloro residual libre, favorecen el tamaño de las poblaciones microbianas. [7] [17].

Vías de exposición: Las infecciones de heridas se han asociado a contacto directo con suelos y aguas contaminadas con este microorganismo, sobre todo cuando se realizan actividades acuáticas como la natación, el buceo, la navegación recreativa y la pesca. Los pacientes con inmunosupresión pueden sufrir septicemia originada por *Aeromonas* spp. presentes en su propio tracto digestivo [7].

Importancia en el agua para consumo humano: A pesar de que se han aislado con frecuencia *Aeromonas* spp. en el agua para consumo humano, la evidencia científica no apoya de manera significativa su transmisión por el agua. El ingreso de *Aeromonas* spp. en los sistemas de distribución se puede minimizar aplicando tratamientos de remoción de carbono orgánico, disminuyendo el tiempo de permanencia del agua en los sistemas de distribución y manteniendo un nivel adecuado de desinfectante residual. Este

microorganismo se ha encontrado en redes hospitalarias, donde puede representar riesgo para individuos con condiciones de salud vulnerables, por lo que asegurar un nivel de cloro residual libre suficientemente alto bajo los criterios normativos es importante. El método de recuento en placa permite detectar *Aeromonas* spp., y puede utilizarse como parámetro indicador de la proliferación de estos microorganismos. El análisis de *E. Coli* no debe utilizarse como indicador de la presencia o ausencia de *Aeromonas* spp. [7] [17].

En el documento *Métodos estándar para el análisis de agua y aguas residuales (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, por sus siglas en inglés SM)* se describe un método estandarizado para su determinación en aguas: SM. 2017 (23rd Ed.) 9260 L. *Aeromonas* [24].

8.3.3. *Burkholderia pseudomallei*

Bacilo Gram negativo, tolerante al ácido, de lento crecimiento y requerimientos nutricionales exigentes; frecuentemente hallado en suelo, aguas turbias y predominante en regiones tropicales. Agente etiológico de la melioidosis, una enfermedad endémica del norte de Australia y del sudeste asiático [7]. Se estima que a nivel mundial anualmente ocurren cerca de 165.000 casos, de los cuales 89.000 resultan fatales. Se han reportado casos fuera del territorio asiático – pacífico por lo que mejorar el seguimiento de la enfermedad en Colombia se ha convertido en un reto en salud pública, dado que después de Brasil es el segundo país en Suramérica en reportar mayor cantidad de casos [25].

Efectos en salud: La melioidosis es una enfermedad pulmonar cuya principal consecuencia es una neumonía que puede llegar a ser mortal si no es diagnosticada y tratada oportuna y adecuadamente. También suele generar úlceras o abscesos en la piel y tejidos blandos, infecciones genitourinarias, bacteriemia primaria, infecciones osteoarticulares, abscesos en órganos internos y enfermedades neurológicas atípicas. Afecta en gran medida a pacientes con condiciones de base como diabetes mellitus, enfermedad pulmonar crónica, enfermedad renal crónica, abuso de alcohol, talasemia, cáncer, o con condiciones de inmunosupresión, individuos que pueden complicar su estado fácilmente, pero también puede cursar de manera asintomática en pacientes sanos. La temporada de lluvias facilita la adquisición de la infección, el periodo de incubación es en promedio de 9 días [25].

Fuente: sobrevive en aguas con ausencia de nutrientes durante largos periodos de tiempo, se ha reportado su presencia en aguas con lodo acumulado. Puede llegar a contaminar

sistemas de abastecimiento. A la fecha no se conoce la dosis mínima infecciosa necesaria para causar infección.[7]

Vías de exposición: la mayoría de las infecciones se generan por contacto de la piel lacerada con agua contaminada, en menor medida el contagio se asocia a inhalación o ingestión. Se han reportado brotes asociados a agua para consumo cuya contaminación fue originada tras la sustitución de tuberías, seguido de fallas en el proceso de cloración, por lo que asegurar la integridad de las redes minimiza su presencia [25]. Dada la naturaleza ubicua del microorganismo, la determinación de *E. coli* o coliformes fecales en agua no es indicador de su presencia o ausencia en el agua analizada [7].

8.3.4. *Campylobacter* spp.

Son bacilos Gram negativos, espirales y curvados, microaerófilos y capnófilos que poseen un flagelo polar único. *Campylobacter jejuni* es la especie que se aísla con mayor frecuencia en pacientes con diarrea aguda, también se han aislado cepas de *C. coli*, *C. laridis* y *C. fetus* en una pequeña proporción de casos [26]. Las especies de *Campylobacter* son ampliamente consideradas como la causa bacteriana más frecuente de gastroenteritis en humanos en todo el mundo. Su principal ruta de transmisión es la vía oro fecal, a través del consumo de alimentos y agua con contaminación de origen fecal [27].

Efectos en salud: *C. jejuni* se caracteriza por su infectividad en comparación con otras bacterias patógenas; tan solo 1000 microorganismos pueden causar una infección. La mayoría de las infecciones sintomáticas se producen en la lactancia y en la primera infancia. El periodo de incubación suele ser de 2 a 4 días. Los síntomas clínicos característicos de la infección por *C. jejuni* son dolor abdominal, diarrea, vómitos, escalofríos y fiebre, también genera meningitis [7], [28]. La infección se resuelve de forma espontánea y desaparece de 3 a 7 días, algunos de los enfermos no tratados pueden sufrir recidiva en el 5 al 10% de los casos. Varios informes han asociado la infección por *C. jejuni* con el síndrome de Guillain-Barre, una enfermedad desmielinizante aguda de los nervios periféricos [28].

Fuente: se encuentra presente en diversos ambientes siendo el agua una fuente importante, se ha comprobado que la presencia de estos microorganismos en aguas superficiales está fuertemente ligada a las lluvias, la temperatura del agua y la presencia de aves acuáticas [27]. Los animales silvestres y domésticos, en especial las aves de corral, las aves silvestres, el ganado y las mascotas son reservorios. Los alimentos,

incluidas la carne y la leche no pasteurizada, son fuentes importantes de infección [7]. Se han descrito brotes asociados con *C. jejuni* aislado del agua de los ríos y las aguas subterráneas, se ha aislado del efluente de aguas residuales y aguas de lagunas, lo que sugiere que el organismo persiste durante algún tiempo en ambientes acuáticos [29]. La contaminación fecal de las fuentes de agua por esorrentía de desechos agrícolas, excrementos de aves o salida de aguas residuales y el agua subterránea contaminada, pueden servir como fuente de inoculación de las aguas potables con *C. jejuni* o la introducción del organismo en las poblaciones de ganado donde el agua subterránea se usa como fuente de agua potable y para riego [29][30]. Se ha encontrado que *C. jejuni* puede entrar en un estado de supervivencia viable pero no cultivable, estado que contribuye a que permanezca durante períodos de tiempo prolongados en aguas superficiales y subterráneas, generando una supervivencia prolongada en condiciones desfavorables [31].

Vías de exposición: *Campylobacter* spp es común en el medio ambiente y se han registrado brotes transmitidos por el agua. La mayoría de las infecciones se reportan como esporádicas y los alimentos se consideran la fuente de infección más frecuente. La supervivencia de *C. jejuni* en el agua subterránea puede estar favorecida por las condiciones ambientales, el bajo potencial redox, las bajas temperaturas, falta de exposición a los rayos UV y la desecación. La detección en aguas subterráneas sugiere que este organismo exhibe un movimiento vertical significativo en el medio ambiente [31], posiblemente debido a la repulsión electrostática de la bacteria y las partículas de suelo cargadas negativamente [32]. Se han detectado brotes ocasionados por el consumo de agua para consumo humano contaminada y sus fuentes fueron aguas superficiales no cloradas o cloradas de forma insuficiente y la contaminación de embalses de almacenamiento de agua con heces de aves silvestres [27].

Tanto *International Organization for Standardization* (ISO) como el documento *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* describen algunos métodos estandarizados para su determinación en aguas, siendo estos: ISO 17995:2019. Water quality — Detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp y SM. 2017 (23rd Ed.) 9213 G, *Campylobacter* [24].

8.3.5. *Escherichia coli*. STEC

Bacilo Gram negativo, fermentador de lactosa, algunas cepas pueden causar diarrea aguda [16]. De acuerdo con los factores de virulencia puede clasificarse, identificando su repercusión en eventos epidemiológicos. Se han identificado varios tipos de *E. coli*

enteropatógenos y se clasifican según sus factores de virulencia: *E. coli* Enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* Enterotoxigenica (ECET), *E. coli* Enteropatógena (ECEP), *E. coli* Enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* Enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD), siendo los primeros cuatro serotipos los más frecuentes [7][33]. Se considera un agente patógeno que puede ser transmitido a través del agua potable; algunos estudios reportan multi resistencia a antibióticos por parte de las cepas aisladas en agua para consumo [34].

Efectos en salud: suelen generar enfermedades extraintestinales graves como infecciones urinarias, meningitis y bacteriemias. Algunos serotipos de *E. coli* STEC (ECEH) como O157:H7 y O111, producen infecciones gastrointestinales que pueden ser desde muy leves hasta altamente hemorrágicas, generando como consecuencia en algunos casos síndrome urémico hemolítico (SHU), un padecimiento potencialmente mortal, como consecuencia de la expresión de la toxina Shiga; puede causar enfermedad con una dosis mínima infectiva hasta de 10 células [35]. Por su parte, *E. coli* ECET produce toxinas termolábiles o termoestables que producen una elevada secreción de electrolitos y agua a través de la activación de la adenilato ciclasa y la guanilato ciclasa de los enterocitos, generando diarrea acuosa, cólicos y náuseas. Este grupo es considerado el principal agente etiológico de la diarrea del viajero y enfermedad gastrointestinal en menores de 5 años en países con economías en desarrollo, donde se han llegado a reportar anualmente cerca de 21 millones de casos [33]. Por su parte, las cepas de *E. coli* ECEP generan diarrea principalmente en lactantes con condiciones de vulnerabilidad [7]. Las cepas de *E. coli* ECEI producen episodios diarreicos desde leves hasta hemorrágicos, mediados por su capacidad de invadir y multiplicarse dentro de las células de la mucosa intestinal en el colon ocasionando la destrucción de estas [33].

Fuente: independientemente del factor de virulencia que las caracteriza, todas las cepas patógenas de *E. coli*, al ser microorganismos entéricos son detectables en medios acuáticos, donde son clara evidencia de contaminación fecal. El hombre es el principal reservorio de las especies patógenas de *E. coli*, excepto de la ECEH, cuyo principal reservorio es el ganado bovino [13].

Vías de exposición: contacto persona - persona, vía oro – fecal, contacto con animales e ingesta de agua contaminada. Es importante considerar la protección de las fuentes de abastecimiento de agua con el fin de minimizar el riesgo de contaminación con residuos humanos y animales y asegurar un tratamiento eficiente incluyendo procesos de desinfección químicos. La respuesta de las cepas convencionales (no enteropatógenas) de *E. coli* es similar en la mayoría de los casos a la de las cepas enteropatógenas, por ello los tratamientos y métodos convencionales empleados para su detección en aguas son un

indicativo de serotipos de importancia clínica. Sin embargo, los métodos convencionales no detectan las cepas de *E. coli* ECEH [7]

En el documento *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* se describen algunos métodos estandarizados para su determinación: SM. 2017 (23rd Ed.) 9260 F. Diarrheagenic *Escherichia coli* [24]. Se pueden detectar también por técnicas moleculares.

8.3.6. *Helicobacter pylori*

Bacteria Gram negativa, micro aerófila, espiral, móvil y capaz de sobrevivir en medios ácidos. La infección ha sido asociada en repetidas ocasiones a limitaciones en el acceso a agua limpia y adecuadas condiciones de saneamiento. Ha sido detectada en agua para consumo humano, confirmando que esta puede actuar como un potencial vehículo de transmisión, sin embargo, el potencial infectivo de estas cepas aún se encuentra en estudio [36][37][38].

Efectos en salud: se asocia a gastritis crónicas que pueden desencadenar en patologías crónicas como úlceras que afectan el epitelio intestinal [13]. Su relación con el cáncer gástrico es un tema de interés que se encuentra en estudio [7].

Fuente: el ser humano es el huésped principal, se encuentra normalmente en el estómago y puede generar infecciones asintomáticas. Son comunes las agrupaciones interfamiliares de casos. Es sensible a condiciones ambientales, pero se ha reportado su supervivencia hasta tres semanas en biopelículas y de 20 a 30 días en aguas superficiales [7].

Vías de exposición: la contaminación del ambiente puede ser producto de contacto con heces de niños con diarrea o vómito, siendo la transmisión oral-oral y en menor medida fecal-oral una fuente de contagio [7]. A la fecha no hay relación entre la presencia de *H. pylori* y *E. coli* o coliformes fecales, ni con parámetros fisicoquímicos en agua para consumo [39].

Son microorganismos difíciles de cultivar, por lo que se identifican principalmente por técnicas moleculares o inmunológicas.

8.3.7. *Klebsiella* spp.

Bacilo Gram negativo, inmóvil, anaerobio facultativo, fermentador de lactosa, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* e incluida dentro del grupo de bacterias coliformes totales [13]. Formado por varias especies, incluidas *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. terrigena*, las dos primeras especies se han identificado como patógenos de importancia clínica. Es comúnmente excretada en las heces de los seres humanos y animales de sangre caliente saludables. Aproximadamente el 60 – 80 % de las cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de heces humanas son positivas en el test de coliformes termo tolerantes [24].

Efectos en salud: puede generar infecciones oportunistas en tracto genitourinario, respiratorio y enfermedades gastrointestinales agudas y crónicas, además suele desarrollar una amplia resistencia a los antibióticos [13]. Su colonización en individuos vulnerables como personas con condiciones de inmunosupresión o en extremos de la vida puede dar lugar a infecciones masivas [7].

Fuente: se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, en matrices medio ambientales como suelo, agua y vegetación en general. Se ha reportado que efluentes de industrias relacionadas con pulpa de madera, papel, textiles y caña de azúcar pueden llegar a contener concentraciones entre 10^4 a 10^6 por 100 ml, siendo el coliforme predominante en este tipo de aguas residuales [24].

Vías de exposición: su transmisión se da principalmente por contacto directo persona-persona y manipulación de alimentos con manos sucias. La capacidad para formar biopelículas facilita su presencia en redes de distribución y tanques de almacenamiento de agua potable, sobre todo en aquellos sistemas que cuentan con condiciones de vulnerabilidad como intermitencia en el servicio, rupturas repetitivas, intervenciones ilegales de redes o tratamientos inadecuados. Algunas especies se vuelven más resistentes al cloro al asociarse a sedimentos, macroinvertebrados, residuos de organismos o encapsulándose [13]. La ejecución de un tratamiento efectivo en las plantas de potabilización, reducción del tiempo de residencia del agua en los sistemas, así como la disposición de desinfectante residual en red, pueden reducir su presencia y proliferación [7]. Es un organismo fácil de identificar por métodos convencionales para determinación de coliformes[24].

8.3.8. *Legionella* spp.

Bacilos Gram negativos, aerobios, no esporulados, de difícil crecimiento que requieren de L- cisteína para su desarrollo. Miden entre 0,3 a 0,9 μm de diámetro por 1 a 20 μm de longitud, son motiles debido a la presencia de uno o más flagelos polares o laterales. Miembro de la familia *Legionellaceae*, formado por al menos 50 especies, su identificación y diferenciación se suele llevar a cabo por pruebas serológicas. Proliferan a temperaturas mayores a 25°C. Es considerado un agente patógeno transmitido a través del agua potable. [7]. *L. pneumophila* causa aproximadamente el 90% de todos los casos documentados de legionelosis; solo esta especie cuenta con cerca de 15 serogrupos, sin embargo, el 82% de los casos reportan como agente causal al serogrupo 1 [24].

Efectos en salud: la legionelosis ocurre cuando un número suficiente de microorganismos dispersos en microgotas o aerosoles provenientes de agua contaminada son inhaladas por huéspedes susceptibles. La enfermedad se relaciona con dos formas clínicas: Enfermedad de los legionarios, siendo ésta la forma más severa de legionelosis con un periodo de incubación de 3 a 6 días que resulta en una neumonía complicada en pacientes con condiciones de vulnerabilidad; y Fiebre de Pontiac, una enfermedad autolimitada que se manifiesta entre 3 horas a 5 días después de la exposición cuyos síntomas son similares a una gripe. Estudios de seroprevalencia han demostrado que muchas infecciones transcurren de manera asintomática [7]. Algunos estudios de vigilancia sobre incidencia de neumonías en Estados Unidos, han evidenciado que únicamente en este país se reportan entre 8.000 y 18.000 casos de legionelosis anualmente [40]. Normalmente las fuentes de contagio son difíciles de identificar en gran medida por la naturaleza ubicua del microorganismo [24].

Fuente: el agua es el mayor reservorio de *Legionella* spp. y ha sido identificada en aguas naturales alrededor del mundo, suele estar en pequeñas concentraciones en zonas naturales, pero los medios acuáticos creados por el hombre favorecen su proliferación, como es el caso de los sistemas de aire acondicionado, las torres de enfriamiento, bañeras de hidromasaje, entre otros, brindando condiciones adecuadas para su desarrollo a temperaturas entre los 25 y 50°C, donde además se facilita la formación de biopelículas [13]. El microorganismo sobrevive comúnmente en medio líquido, pero no puede crecer ni multiplicarse fácilmente allí, debido a sus estrictos requerimientos nutricionales. Por esta razón se han convertido en parásitos intracelulares de protozoos de vida libre (*Acanthamoeba* spp., *Hartmanella* spp. y *Naegleria* spp.), infectándolos mediante mecanismos similares a los empleados cuando infecta macrófagos humanos, condición que favorece su desarrollo [24]. El microorganismo se detecta con mayor facilidad cuando se toman muestras con hisopos en agua corriente [7].

Vías de exposición: se han identificado como potenciales fuentes de contaminación aquellas que generan aerosoles de agua potable contaminada, como duchas, grifos, fuentes decorativas, generadores de niebla, humidificadores, equipos de terapia respiratoria, y aquellos que generan aerosoles de agua no potable como torres de enfriamiento, sistemas de agua caliente, spa con hidromasajes, condensadores evaporativos o jacuzzis [24]. La inhalación de estos aerosoles es la principal vía de exposición, se han reportado algunos casos de transmisión de persona a persona pero no suele ser la principal fuente de contaminación [41]. Se recomienda mantener la temperatura del agua fuera del rango ideal para el microorganismo, $<25^{\circ}\text{C}$ o $> 60^{\circ}\text{C}$ o prestar más atención a los protocolos de desinfección y a las estrategias empleadas para limitar la aparición de biopelículas. La presencia de *E. coli* o coliformes termo tolerantes en el agua no es indicador de este microorganismo [7].

Tanto *International Organization for Standardization* (ISO) como el documento *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* describen algunos métodos estandarizados para su determinación, siendo estos: ISO 11731:2017. Water quality - Enumeration of Legionella y SM. 2017 (23rd Ed.) 9260 J. Legionella [24].

8.3.9. *Leptospira* spp.

Espiroquetas móviles y aerobias. Su tamaño suele ser de $0,1\ \mu\text{m}$ de diámetro y $5 - 25\ \mu\text{m}$ de largo. *L. interrogans* es el principal agente causal de la leptospirosis, enfermedad zoonótica importante. Se han identificado más de 200 serovares patógenos, divididos en 25 serogrupos basados en su relación serológica. Sus principales reservorios son animales domésticos y salvajes, sobre todo roedores (*Rattus norvegicus*) [7] [13].

Efectos en salud: la leptospirosis ocurre con mayor frecuencia en áreas con climas tropicales. La enfermedad y sus complicaciones varían entre individuos. Puede producir leptospirosis o enfermedad de Weil, meningitis, hemorragias, afecciones en riñón, pulmones, hígado y sistema nervioso central. Se disemina por torrente sanguíneo y afecta principalmente a personas que están en estrecho contacto con animales o laboran en redes de alcantarillado [7], [13]. Los síntomas pueden parecerse a varias enfermedades, por lo que un diagnóstico diferencial adecuado y oportuno evita la complicación de los casos o la generación de brotes epidémicos, los cuales se deben evitar principalmente cuando se presentan inundaciones o huracanes [42]. Aunque los datos epidemiológicos no son precisos, se estima que anualmente hay $0,1 - 1$ caso por cada 100.000 personas en zonas tropicales [7]. Es considerada en Colombia como un evento de notificación obligatoria e individual al SIVIGILA desde el año 2007. La incidencia de la enfermedad por 100.000

habitantes en el año 2019 fue de 0,20, siendo Bogotá, Risaralda y Tolima las entidades territoriales que más casos reportaron ese periodo [43].

Fuente: las leptospiras pueden vivir días o semanas en el agua a pH neutro o ligeramente alcalino, pero no toleran medios ácidos. El principal medio de ingreso al huésped es por contacto con orina infectada o aguas contaminadas con dicha orina, penetrando por heridas cutáneas o tejidos mucosos [13]. Suelen mantenerse en los túbulos renales de huéspedes animales, generando excreción persistente del microorganismo, por lo que el agua es el medio ideal para que la bacteria sobreviva siempre que no sea expuesta a condiciones adversas [7].

Vías de exposición: puede ingresar al cuerpo a través de mucosas o laceraciones en la piel, no se transmite vía fecal oral. Se asocian de manera importante como riesgo para individuos que trabajan en contacto con animales o realizando actividades al aire libre como trabajo en alcantarillado, pesqueros, productores de leche, personal militar, veterinarios, zootecnistas o mineros [44]. También se asocia a exposición por contacto con aguas recreativas contaminadas o en inundaciones por eventos naturales. Teniendo en cuenta su sensibilidad a los desinfectantes, esta puede ser considerada como una medida de control, sobre todo en eventos fortuitos [24]. La presencia de *E. coli* o coliformes en agua no es indicativo de *Leptospira* spp. en el medio [7].

En el documento *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* se describen algunos métodos estandarizados para su determinación: SM. 2017 (23rd Ed.) 9260 I. *Leptospira* [24].

8.3.10. *Mycobacterium* spp. (no tuberculosa)

Bacilos aerobios estrictos, no motiles, no formadores de esporas, ácido resistentes debido al alto contenido lipídico en su pared celular. *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. intracellulare* y *M. avium*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* son algunos ejemplos de especies de micobacterias no tuberculosas o atípicas que habitan naturalmente en medios acuáticos. Son considerados agentes patógenos transmitidos a través del agua potable [7].

Efectos en salud: pueden generar afectación de la piel, tejidos blandos, sistema genitourinario, digestivo y respiratorio. Suelen ser una de las principales causas de infecciones en pacientes con inmunosupresión en quienes se desarrolla lentamente. En niños menores de 5 años *M. avium* genera inflamación de ganglios linfáticos [24].

Fuente: Son altamente resistentes a los procesos de desinfección y se han logrado detectar en sistemas de abastecimiento de agua para consumo humano en muestras hasta con 2,8 mg/L de cloro residual libre [7]. Se ha reportado crecimiento de la especie *Mycobacterium marinum* en agua hasta con 10 mg/L de cloro residual libre [13]. Se desarrollan en agua con alto contenido de materia orgánica y elevadas concentraciones de Zinc y cobre, lo que favorece la formación de biopelículas en ambientes acuáticos y tuberías con estos componentes [13][19].

Vías de exposición: son principalmente la inhalación y la ingestión de agua contaminada. Se han reportado casos de infección relacionados con uso de agua contaminada en tinas de hidromasaje. No hay evidencia de contaminación persona-persona. Teniendo en cuenta su alta resistencia a tratamientos químicos, se recomienda controlar su presencia en redes de distribución tomando medidas que minimicen el crecimiento de biopelículas.

Son microorganismos de lento crecimiento, por lo que aislarlos en sistemas de distribución puede resultar complicado, la formación de una sola colonia puede llevar hasta siete días de incubación [13]. En el documento *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* se describen algunos métodos estandarizados para su determinación: SM. 2017 (23rd Ed.) 9260 *M. Mycobacterium* [24].

8.3.11. *Pseudomonas* spp.

Bacilos Gram negativos aerobios, no fermentativos que poseen un flagelo polar, cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente[13]. Su cápsula de polisacárido les permite adherirse a las superficies, el contacto con los sistemas de suministro de agua y las condiciones favorables promueven su rápida multiplicación generando consecuentemente la formación de biopelículas [45]. Están muy extendidos en el suelo, el agua y otros ambientes húmedos. Una de las especies más relevantes por su capacidad para causar enfermedades en humanos es *Pseudomonas aeruginosa*, dada su resistencia innata y adquirida a muchos antimicrobianos y desinfectantes [46].

Efectos en salud: *P. aeruginosa* es la especie más frecuentemente asociada con enfermedad en humanos, donde actúa como un patógeno oportunista con el potencial de causar infecciones en casi cualquier órgano o tejido, especialmente en pacientes comprometidos por enfermedad subyacente o inmunodeficiencia [45]. Las infecciones oculares, las foliculitis y las otitis relacionadas con el agua se asocian con ambientes húmedos y cálidos, como las piscinas y bañeras de hidromasajes. Muchas cepas son

resistentes a diversos agentes antimicrobianos, lo que puede aumentar su relevancia en el ámbito hospitalario [7].

Fuente: es un microorganismo común en el ambiente y puede encontrarse en las heces, el suelo, el agua y las aguas residuales. Puede multiplicarse en ambientes acuáticos, así como en la superficie de materias orgánicas. En contraste con otros patógenos transmitidos por el agua, *P. aeruginosa* prospera en el medio ambiente en un amplio rango de temperaturas y es capaz de sobrevivir en circunstancias relativamente pobres en nutrientes [47]. *P. aeruginosa* es una fuente conocida de infecciones intrahospitalarias y puede producir complicaciones graves. Se han aislado en gran variedad de ambientes húmedos, como lavamanos, baños de agua, sistemas de distribución de agua caliente, duchas y bañeras de hidromasaje [7]. Existe evidencia de estudios prospectivos que sugiere que las fuentes ambientales, especialmente el agua, pueden tener importancia en la epidemiología de las infecciones esporádicas por *P. aeruginosa* en entornos hospitalarios, incluidas las unidades de cuidados intensivos [47].

Vías de exposición: la ingesta de agua para consumo humano contaminada con *Pseudomonas* spp. es una vía de infección importante y el principal medio para la exposición de tejidos vulnerables, en particular heridas y membranas mucosas, sobre todo en aquellos casos en los que se utiliza para lavar heridas o quemaduras o para desinfectar dispositivos médicos como endoscopios y catéteres. La limpieza de lentes de contacto con agua contaminada puede causar queratitis ocular, por ello, el agua utilizada para estos fines debe requerir procesamiento adicional, como la microfiltración o esterilización [48].

Tanto *International Organization for Standardization* (ISO) como el documento *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* se describen algunos métodos estandarizados para su determinación en aguas, siendo estos: ISO 16266:2006. Water quality — Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* — Method by membrane filtration y SM. 2017 (23rd Ed.) 9213 E, Membrane filter technique for *Pseudomonas aeruginosa* y SM. 2017 (23rd Ed.) 9213 F. Multiple-tube technique for *Pseudomonas aeruginosa* [24].

8.3.12. *Salmonella* spp.

Bacilos Gram negativos móviles, anaerobias facultativas, no fermentadores de lactosa, productores de sulfuro de hidrógeno o gas por efecto de la fermentación de carbohidratos, miden de 2 a 5 µm de longitud y 0,8 a 1,5 µm de ancho [13]. Perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, comprende siete grupos filogenéticos y es comúnmente clasificada en

dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Los géneros incluyen más de 2000 serotipos en función de sus antígenos somáticos (O) y flagelares (H). Agente patógeno transmitido a través del agua potable [24].

Efectos en salud: pueden producir gastroenteritis, bacteriemia o septicemia, fiebre tifoidea o paratifoidea. Se pueden clasificar en dos tipos principalmente: los serotipos tifoideos (*Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi) y serotipos no tifoideos. Los serotipos tifoideos infectan únicamente al ser humano, tienen un periodo de incubación de 1 a 14 días, generan fiebre, fatiga, dolor abdominal y estreñimiento o diarrea, la infección es potencialmente mortal; por su parte, los serotipos no tifoideos generan gastroenteritis con un periodo de incubación de 6 a 72 horas, con episodios de diarrea autolimitante acompañada de fiebre y dolor abdominal que suele durar de 3 a 5 días [7].

Fuente: Las serovariedades *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis de la especie *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, infectan personas y múltiples especies animales como aves de corral, vacas, cerdos, ovejas e incluso reptiles, adquieren el microorganismo generalmente por consumo de agua contaminada. El patógeno llega a los sistemas de distribución de agua principalmente por contaminación fecal de las fuentes de abastecimiento.

Vías de exposición: la principal vía de transmisión es fecal-oral, por contacto persona-persona (principalmente serotipos no tifoideos), consumo de agua y alimentos contaminados. La infección por salmonelas tifoideas suele ocurrir exclusivamente por el consumo de agua (no potable) o alimentos contaminados, no es muy frecuente la contaminación persona-persona en estos casos. Se han relacionado casos de fiebres no tifoideas asociadas a consumo de aguas subterráneas y superficiales contaminadas con heces de animales, principalmente aves de corral. Son microorganismos sensibles a desinfección química, por lo que asegurar un adecuado tratamiento primario seguido de un proceso de desinfección que asegure concentración residual puede favorecer su remoción. El análisis de *E. coli* o coliformes termo tolerantes suele ser un indicador de la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en los sistemas de abastecimiento y distribución de agua [7].

Tanto *International Organization for Standardization* (ISO) como el documento *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* se describen algunos métodos estandarizados para su determinación, siendo estos: ISO 19250:2010. Water quality - Detection of *Salmonella* spp. y SM. 2017 (23rd Ed.) 9260 B. *Salmonella* [24].

8.3.13. *Shigella* spp.

Bacilos Gram negativos, no esporulados, inmóviles, aerobios facultativos, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Se han identificado cuatro especies, tres de las cuales se dividen por el grupo de antígenos O somáticos: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*. Es considerado un agente patógeno transmitido a través del agua potable [13].

Efectos en salud: invade la mucosa intestinal produciendo disentería, caracterizada por dolor abdominal, tenesmo y diarrea sanguinolenta. La dosis mínima infecciosa es baja, con solo 10 a 100 microorganismos, en 24 a 72 horas puede desencadenar la enfermedad [24]. Anualmente se reportan más de dos millones de infecciones ocasionando cerca de 600.000 muertes asociadas. La shigelosis causada por *S. sonnei* suele ser la de resolución más rápida y mejor pronóstico; por el contrario, la infección por *S. dysenteriae* puede generar úlceras con diarrea hemorrágica y alta concentración de neutrófilos en las heces fecales como resultado de la producción de la toxina Shiga [7].

Fuente: los seres humanos son los huéspedes por excelencia de *Shigella*, los brotes suelen ocurrir en centros de alta población, con medidas de higiene deficientes. Una persona infectada puede excretar 10⁹ bacterias por gramo de heces [13].

Vías de exposición: la infección persona-persona es viable y ocurre con frecuencia, sobre todo en menores de 10 años. El acceso a aguas contaminadas con heces, recreación en aguas naturales contaminadas y las conexiones cruzadas entre tubería de agua residual y redes de distribución de agua potable, son las principales causas de shigelosis cuando se hace referencia como enfermedad de transmisión hídrica [24]. Su presencia en muestras de agua para consumo indica contaminación reciente, pues no suelen ser estables en medios acuáticos. Son microorganismos altamente sensibles a la desinfección química. El análisis de *E. coli* y coliformes termo tolerantes es un buen indicador de la presencia o ausencia de *Shigella* en agua [7].

En el documento *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* se describen algunos métodos estandarizados para su determinación: SM. 2017 (23rd Ed.) 9260 E. *Shigella* [24].

8.3.14. *Yersinia* spp.

Bacilos Gram negativos, móviles a 25 °C pero no a 37 °C, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y comprende siete especies. Las especies *Y. pestis*, *Y.*

pseudotuberculosis y ciertos serotipos de *Y. enterocolitica* son bacterias patógenas para el ser humano. Hace parte de los microorganismos cuya transmisión a través del agua para consumo humano se ha sugerido, pero no hay pruebas concluyentes al respecto [7]. La mayoría de las cepas patógenas humanas se encuentran entre distintos serogrupos (por ejemplo, O: 3, O: 5,27, O: 8, O: 9) y contienen factores de virulencia mediados por cromosomas y plásmidos que son ausentes en “cepas avirulentas” [49].

Efectos en salud: *Yersinia enterocolitica* penetra en las células de la mucosa intestinal y produce úlceras en el íleo terminal. La yersiniosis se manifiesta generalmente en forma de gastroenteritis aguda con diarrea, fiebre y dolor abdominal, causa variedad de síntomas clínicos intestinales y extraintestinales de severidad variable que va desde gastroenteritis leve hasta linfadenitis mesentérica. La infección también puede conducir a secuelas inmunológicas post infección, incluido eritema nudoso, artritis y glomerulonefritis [50].

Fuente: se ha detectado *Y. enterocolitica* en aguas residuales y en aguas superficiales contaminadas, hay una variedad de cepas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza en medios acuáticos como en ecosistemas terrestres. Parece que al menos algunas especies pueden reproducirse en medios acuáticos si contienen al menos cantidades suficientes de nitrógeno orgánico, incluso a temperaturas bajas de 4°C [51]. Los animales domésticos y silvestres son el reservorio principal de *Yersinia* spp.; los cerdos son el reservorio principal de *Y. enterocolitica* patógena, mientras que los roedores y otros animales pequeños son el reservorio principal de *Y. pseudotuberculosis* [7]. Se han informado infecciones por *Y. enterocolitica* donde se identificó como un factor de riesgo el consumo de agua contaminada y agua no tratada, y como fuentes de infección esporádica con el serotipo O:3. En infección para el serotipo O:8 se involucra principalmente la ingesta de agua contaminada, alimentos lavados con agua contaminada y productos lácteos [49].

Vías de exposición: se transmiten principalmente por vía fecal-oral, se considera que la fuente de infección principal son los alimentos, en particular la carne y los productos lácteos, la ingesta de agua contaminada y alimentos lavados con agua contaminada. Se ha comprobado la transmisión directa persona - persona y de animales a personas [50].

En el documento *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* se describen algunos métodos estandarizados para su determinación: SM. 2017 (23rd Ed.) 9260 K. *Yersinia enterocolitica* [24].

8.3.15. *Vibrio* spp.

Bacilo Gram negativo, curvo, halófilo, perteneciente a la familia *Vibrionaceae*. El género *Vibrio* incluye más de 60 especies de las cuales solo 12 son de carácter patógeno para el hombre; la mayoría de las infecciones están relacionadas con la exposición de agua, o por consumo de organismos contaminados, como peces y mariscos. *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* son los principales agentes causantes de diarrea, *V. cholerae* posee gran potencial epidémico y pandémico, asociado a una alta mortalidad sino se da el manejo adecuado, por ello es considerado un agente patógeno transmitido a través del agua potable [24].

Efectos en salud: Los serogrupos O1 y O139 de *V. cholerae*, producen una potente enterotóxina denominada la toxina del cólera que invade las células del lumen intestinal, responsable de los síntomas letales de la enfermedad [52]. Los síntomas iniciales del cólera son: aumento del peristaltismo, seguido de deposiciones acuosas y mucosas que contienen pequeños gránulos, generando consecuente deshidratación. La tasa de letalidad es variable, pero se estima que hasta el 60% de los enfermos fallecen a causa del desbalance osmótico ocasionado por la excesiva pérdida de electrolitos. Cepas no toxigénicas de *V. cholerae* pueden causar infección, pero suelen generar gastroenteritis de resolución espontánea, infecciones de heridas y bacteriemia [7]. Más recientemente, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio hollisae* y *Vibrio mimicus* también han sido implicados como causantes de diarrea, pero son menos comunes [24]. Datos recientes sugieren que hay aproximadamente 2,9 millones de casos de cólera en 69 países endémicos cada año, lo que resulta en 95.000 muertes, principalmente en África Subsahariana, donde aproximadamente el 60% de los casos y 68% de las muertes ocurren anualmente [53]. En 2017 la Organización Mundial de la Salud fue notificada de 1.227.391 casos reportados por 34 países, resultando en 5654 muertes [54].

Fuente: las cepas no toxigénicas de *V. cholerae* están distribuidas en el medio ambiente, por fortuna, la distribución de cepas toxigénicas es menos frecuente, aunque su presencia suele aumentar en aguas residuales cuando hay brotes. Todas las especies de *vibrio* son principalmente acuáticos, la distribución de especies depende principalmente de la temperatura, concentración de sodio y nutrientes en el agua, plantas y animales presentes, son comunes en ambientes de estuario y en la superficie y tracto intestinal de animales marinos. Algunos *vibrios* no halófilos pueden llegar a ser aislados en fuentes naturales de aguas dulces [24].

Vías de exposición: la concentración de *Vibrio* spp. en organismos acuáticos suele ser mayor a la concentración en la masa de agua y su prevalencia disminuye en aguas con temperaturas inferiores a 20°C. Su transmisión suele ser fecal-oral, debido a la alta dosis

infecciosa requerida para la infección, por esta razón, la transmisión persona-persona no es común [7].

En el documento *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* se describen algunos métodos estandarizados para su determinación en aguas: SM. 2017 (23rd Ed.) 9260 H. *Vibrio* spp. [24].

8.3.16. Otros organismos de interés

Cianobacterias: Durante el transcurso de los últimos años, varios países han reportado problemas sanitarios asociados a la presencia de toxinas producidas por este tipo de algas o bacterias con capacidad fotosintética en el agua potable, tal como se ha llegado a describir en países como Australia, Brasil, China, Inglaterra, Sudáfrica y Estados Unidos. Incluso un 75% de las especies de cianobacterias que forman floraciones superficiales cuentan con capacidad metabólica de producir subproductos tóxicos, por lo que su presencia se suele relacionar con un problema de calidad químico del agua.

Se ha reportado que las cianotoxinas tienen una variedad de efectos sobre la salud. Los síntomas reportados incluyen fiebre, gastroenteritis, irritación de mucosas y la piel, daños hepáticos e incluso neurotoxicidad. Las cianobacterias no se multiplican en el cuerpo humano y por tanto no se consideran agentes infecciosos [].

9. Técnicas para la detección de microorganismos indicadores

9.1. Concentración de bacterias

9.1.1. Filtración por membrana

Es una técnica de microbiología tradicional, útil para concentrar microorganismos presentes en agua para consumo humano y aguas naturales de las que se presume un bajo nivel de contaminación; es aceptada por la legislación colombiana según lo descrito en el artículo 11 de la resolución 2115 de 2007 para evaluar las características microbiológicas del agua para consumo humano, incluyendo coliformes totales, *E. coli* y bacterias heterótrofas [2]. Así mismo, es posible utilizar esta técnica para identificar otros

microorganismos, su selectividad depende de las condiciones de incubación y del medio de cultivo empleado para el crecimiento del microorganismo concentrado sobre la membrana. Según el tipo de agua a analizar se puede utilizar para examinar volúmenes de muestra relativamente grandes.

Una de sus principales limitaciones es el análisis de muestras con alta turbiedad, dado que pueden colmatar la membrana rápidamente dificultando el proceso y afectando su integridad, por lo que en estos casos se recomienda el uso de múltiples membranas por muestra y la ejecución de diluciones seriadas según la carga estimada del organismo a cuantificar [16]. La técnica tampoco es recomendable en aguas con altos contenidos de metales tóxicos o fenoles, porque la membrana puede concentrar dichas sustancias inhibiendo consecuentemente el desarrollo de los microorganismos [24].

A. Fundamento:

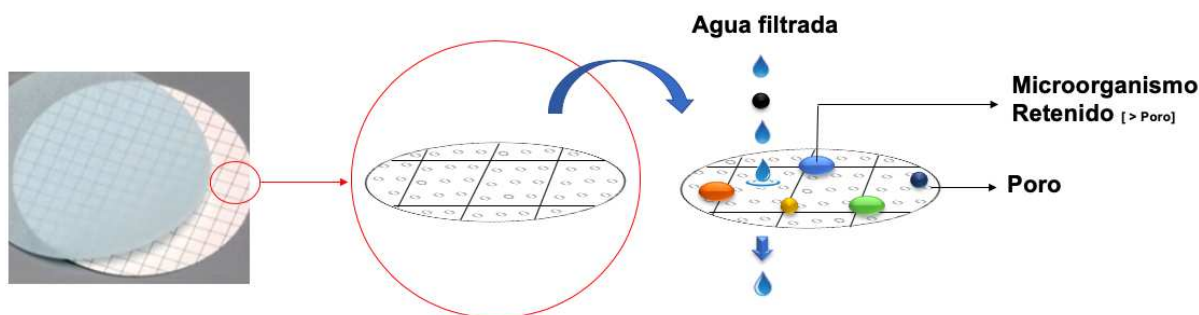
La técnica de filtración por membrana facilita la retención de los microorganismos en el filtro debido a que el tamaño del organismo blanco supera el diámetro del poro. Se emplean membranas con poros desde 0,02 hasta 12 μm dependiendo del organismo que se desee retener. Por lo general en los métodos de detección de microorganismos indicadores bacteriológicos se emplean membranas de 0,45 μm con diámetro de 47 mm. El paso del agua se suele efectuar favorecido por el efecto del vacío generado por una bomba, un dispositivo de succión o la gravedad [16].

Una vez se pasa el volumen de agua por la membrana, se remueve de la placa porosa del receptáculo y se superpone en un medio de cultivo que contiene los nutrientes específicos para el fin seleccionado. En este caso, por ejemplo, un medio de cultivo no selectivo, pero con las condiciones nutricionales adecuadas e incubado a 35°C podría permitir el desarrollo de bacterias heterótrofas; mientras un medio de cultivo selectivo incubado a una temperatura dada permitiría únicamente el desarrollo de un organismo específico.

El volumen estándar de muestra a filtrar es de 100 ml para muestras de agua potable; si es necesario, puede distribuirse entre múltiples membranas. Sin embargo, para propósitos especiales de monitoreo, por ejemplo, para solucionar problemas de calidad del agua o para identificar el avance de coliformes, coliformes termotolerantes y *E. coli* presentes en bajas concentraciones en aguas tratadas, se pueden analizar muestras de 1 L, divididas en cuatro porciones de 250 ml, teniendo presente hacer un total de los recuentos de coliformes en cada membrana para informar el resultado por 1 L o 100 ml según sea requerido [24].

En el numeral 9.2.1 se describe al detalle el procedimiento de análisis para la concentración de bacterias más utilizado en los laboratorios de análisis de calidad bacteriológico de agua para consumo humano, cuando se desea detectar el organismo de interés por crecimiento en medio de cultivo.

En algunos casos, la recuperación de bacterias viables en las membranas puede ser poco significativa debido a la condición que poseen algunos microorganismos de encontrarse en estado viable pero no cultivable (VBNC por sus siglas en inglés). Condición que se da a causa del estrés fisiológico por exposición prolongada a condiciones adversas, característico de microorganismos que habitan medios acuáticos expuestos a cambios extremos de temperatura, pH, exposición a radiación solar, con residuos de desinfectantes, iones metálicos o trazas de sustancias tóxicas [55]. El estado VBNC ha sido reportado en una amplia variedad de géneros que incluyen, *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Legionella* spp., *Micrococcus* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Vibrio* spp. Cuando se contempla realizar el método de filtración por membrana es recomendable mejorar la recuperación bacteriana utilizando un método diseñado para ésta finalidad o utilizar otras alternativas de identificación, como las técnicas moleculares [24].



Fuente: Propia

Figura 9. Fundamento de la técnica de filtración por membrana

9.2. Detección de bacterias por crecimiento en medio de cultivo

Los métodos de detección por cultivo son sensibles, económicos y fáciles de ejecutar, por lo que son los más frecuentemente utilizados a nivel mundial. Estas técnicas hacen posible la detección de una pequeña fracción (0,01-1%) de las bacterias viables presentes en la

muestra y no generan resultados tan rápidos como se desea para favorecer la toma de decisiones sanitarias, ya que se debe esperar mínimo 18 horas para visualizar el desarrollo microbiano sobre las matrices empleadas, pero su adecuada ejecución permite la recuperación de microorganismos clave en la evaluación de calidad de agua. Se suelen emplear diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación para la determinación de los diferentes géneros de microorganismos [14].

Existen métodos de detección basados en el uso de medios cromogénicos para la identificación de diferentes bacterias blanco. Son altamente selectivos y facilitan la identificación de los microorganismos indicadores, algunos no requieren confirmación de resultados positivos, lo que implica resultados más precisos en menos tiempo. Una desventaja de estos métodos es que existen algunas bacterias no específicas capaces de generar enzimas que degradan el sustrato, generando falsos positivos.

La estandarización de los métodos de ensayo internacionales empleados para este fin, es de gran importancia para asegurar que las condiciones locales de trabajo son suficientes para generar resultados válidos. Existen métodos estandarizados como los descritos por la Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés), los descritos por el documento SM de la Asociación Americana de Salud Pública (American Public Health Association APHA), Asociación Estadounidense de Obras Hidráulicas Sanitarias (American Water Works Association AWWA) y la Federación Ambiental del Agua (Water Environment Federation WEF) o por entidades reguladoras internacionales como la Agencia de Protección Ambiental (U.S Environmental Protection Agency EPA). De cualquier manera, se debe asegurar que bajo las condiciones propias de cada laboratorio independientemente de su ubicación geográfica, pueda ejecutar ensayos de acuerdo con los lineamientos, y sean capaces de generar resultados repetibles.

Para cualquier método analítico empleado, si un laboratorio no lo ha utilizado anteriormente, se deberá realizar la **verificación** en caso de que estos sean métodos estándar o **validar** en caso de ser métodos propios o modificados por el laboratorio (ver numeral 10). Adicionalmente, es recomendable que se realicen pruebas paralelas con el método empleado a la fecha para demostrar aplicabilidad y concordancia. Las tasas de falsos positivos y negativos pueden diferir entre cada medio de cultivo, por lo que los usuarios deben seleccionar cuidadosamente el medio y el procedimiento que mejor se adapte a sus necesidades.

9.2.1. Cultivo en placa empleando medios sólidos o líquidos

Una vez se realiza el proceso de concentración de los microorganismos por la técnica de filtración por membrana es posible evidenciar el crecimiento microbiano cuando se emplean medios de cultivo selectivos o no selectivos según el objetivo del análisis. Para ello se sigue el procedimiento descrito a continuación:

A. *Procedimiento de análisis*

- Antes de iniciar se debe asegurar que el ensayo se lleve a cabo en un área limpia, idealmente en cabina de bioseguridad. Si el sistema de filtración cuenta con placas porosas metálicas, estas deben esterilizarse en cada uso y desinfectarse entre muestras en caso de que se empleen consecutivamente en un mismo día; existen sistemas que emplean suministros desechables. Para asegurar las condiciones de esterilidad del proceso se debe asegurar que el resto del sistema de filtración no se encuentre contaminado, por ello es importante mantenerlo bajo condiciones adecuadas entre cada análisis, sobre todo cuando estos no se realizan frecuentemente, pues se puede generar contaminación cruzada fácilmente.
- Retirar del refrigerador el agua reactivo 30 minutos antes de dar inicio al ensayo. De la misma manera, retirar la muestra del refrigerador aproximadamente 10 minutos previa ejecución del ensayo.
- Agitar la muestra para promover una distribución homogénea de los microorganismos. Para esto se debe asegurar que cuente con al menos 1 pulgada (2,54 cm) de espacio de aire entre la superficie del líquido y la tapa del recipiente. Agite de atrás hacia adelante mínimo durante 7 segundos o 25 veces [24].
- Si el sistema de filtración cuenta con placas porosas metálicas (porta filtros): Ubique las placas porosas estériles sobre los soportes del equipo, procure emplear pinzas estériles o desinfectadas para su manipulación. Destape el empaque en el que viene la membrana y retírela con pinzas estériles. Ubique la membrana sobre el porta filtro y asegure el embudo sobre este. Adicione la muestra al embudo y proceda a iniciar la filtración.

Si el sistema de filtración cuenta con suministros desechables: Bajo condiciones asépticas ajuste el adaptador del embudo sobre el sistema de vacío, la membrana debe quedar en la base del sistema. Retire la tapa del embudo, vierta la muestra y proceda a iniciar la filtración.

- Por cada muestra a procesar, se debe medir el volumen de muestra establecido en el proceso (100, 300, 500 ml) según el método a ejecutar y la matriz a analizar. Emplear para ello un recipiente aforado o probeta, estériles.
- Aplicar vacío mientras se filtra la muestra, durante este proceso las llaves del Manifold, colector o sistema de filtración deben estar abiertas.
- Una vez termine de filtrar todo el volumen, cerrar las llaves y apagar la bomba de vacío o dispositivo de succión (verificar si el método de referencia requiere lavados).
- Si el sistema de filtración cuenta con placas porosas metálicas (porta filtros): retirar el embudo y con pinzas estériles retire la membrana, colóquela en la caja de Petri sobre el medio de cultivo seleccionado, asegurándose de no dejar aire atrapado en el medio, no olvide tapar inmediatamente.

Si el sistema de filtración cuenta con suministros desechables: retirar el plástico del embudo y cubrir la caja de Petri con la tapa. Retirar la membrana del adaptador y colocar un tapón en el puerto del fondo para proteger de contaminación el sistema de filtración.

- Invertir las placas e incubar a la temperatura especificada en el método seleccionado (según el organismo blanco y el medio de cultivo empleado).
- Una vez finalizado el tiempo de incubación, examinar la membrana y contar las colonias que tengan las características propias del medio de cultivo empleado.



Fuente: Merck Millipore®

Figura 10. Sistemas de filtración por membrana

B. Interpretación de resultados

La lectura e interpretación de resultados se realiza con base en lo descrito en el método de referencia, basado principalmente en el fundamento del medio de cultivo empleado. Para asegurar el adecuado reporte de resultados tener en cuenta el volumen total de muestra analizada.

C. Reporte de resultados

La técnica permite realizar la evaluación cuantitativa de los parámetros, el resultado se reporta como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) del microorganismo identificado en el volumen de muestra analizada. Ejemplo: UFC de coliformes totales y/o *E. coli* por 100 ml de muestra analizada. El límite superior de la técnica depende principalmente del método ejecutado y del tamaño de la membrana empleada. El límite inferior depende de lo definido en las características de desempeño publicados en la norma de referencia.

En cuanto a la determinación de microorganismos indicadores en agua para consumo humano, la resolución 2115 de 2007 permite reportar el resultado del monitoreo en UFC, siendo un resultado óptimo 0 UFC/ 100 ml tanto para coliformes totales como para *E. coli* [2].

D. Control de calidad

Independiente del método de referencia a emplear, antes de iniciar un nuevo lote de reactivo se debe verificar el desempeño de este mediante la preparación de un control negativo y un control positivo empleando para ello material de referencia. Cada método indica las cepas a emplear para sus respectivos controles. Para la determinación de coliformes totales se recomienda como control positivo inocular el medio con una cepa trazable de *E. coli* y un coliforme total diferente a *E. coli* (Ej.: *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.). Como control negativo se debe inocular el medio de cultivo con un microorganismo no coliforme (Ej.: *Pseudomonas* spp.).

Se recomienda evaluar la esterilidad del material a emplear para la ejecución de los ensayos (botellas de muestreo, botellas de dilución). Almacene los reactivos siguiendo las instrucciones del fabricante y empléelo antes de su fecha de caducidad, evite su exposición a condiciones extremas ya que esto puede afectar sus propiedades, descártelo si observa cambios en las características macroscópicas del mismo (Ej: cambio de color, textura) [24].

En el marco de ejecución de actividades de control de calidad en el laboratorio de microbiología, se recomienda realizar como mínimo los controles descritos en el documento *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* capítulo 9020 B. Guías de control de calidad intra - laboratorio. Numeral 9. Procedimientos de control de calidad analíticos para métodos establecidos [24]:

- **Variabilidad de recuento de colonias:** como evaluación rutinaria se recomienda realizar mensualmente el recuento duplicado de (mínimo) una muestra positiva, por uno o más analistas. El ejercicio debe realizarse sobre la misma placa obteniendo correspondencia hasta del 5% (repetibilidad en el recuento) cuando el ejercicio lo realiza el mismo analista y correspondencia hasta del 10% (reproducibilidad en el recuento) cuando el ejercicio lo realizan dos analistas.
- **Cultivo (control) positivo:** cada vez que se realicen siembras, se procesa por último 100 ml de agua grado reactivo con adición de una concentración microbiana conocida del o los microorganismos control seleccionados. Este control debe ser manipulado de igual forma que las muestras e incubado con las mismas. El material de referencia idealmente deben ser cepas certificadas producidas por fabricantes nacionales o internacionales que cumplan con los requisitos de la norma ISO 17034 en su versión vigente, las cepas de trabajo no deben tener más de cinco pases. Los cultivos cepas obtenidas en pruebas Inter laboratorio o evaluaciones de desempeño no son consideradas material de referencia adecuado.
- **Control de medios de cultivo:** como pruebas de desempeño del medio de cultivo se recomienda que cada lote de medio sea sometido a pruebas que incluyan evaluación de la productividad, selectividad y especificidad.
- **Análisis duplicados:** se deben ejecutar análisis duplicados al menos una vez al mes o si se requiere más seguido según lo indique el método de referencia. Algunos métodos sugieren analizar por duplicado el 10% de las muestras, otros una muestra duplicada por lote o corrida analítica.
- **Verificación de esterilidad del medio de cultivo:** para el control de esterilidad coloque una o más placas del medio de cultivo a emplear en la incubadora, bajo las condiciones de incubación del método de referencia (Ejemplo 35°C por 24 horas para coliformes totales). La ausencia de crecimiento indica esterilidad de las placas con el medio de cultivo.
Previamente se debió haber verificado la esterilidad de la caja de Petri si se le realizó un proceso de esterilización o si proviene de un lote comercial al cual se le han verificado y certificado sus condiciones de esterilidad.
- **Control de esterilidad de las membranas:** coloque una o más membranas en placas de un medio de cultivo no selectivo e incube las placas a $35 \pm 0,5$ °C durante 48 h. Asegúrese previamente que el lote del medio de cultivo a utilizar cumple con las condiciones de esterilidad requeridas. En este caso, la ausencia de crecimiento sobre el medio indica esterilidad de las membranas. Registre la información manteniendo trazabilidad del lote monitoreado.
- **Control de esterilidad del proceso:** durante la ejecución de los ensayos, filtrar un volumen de 100 ml de agua de dilución estéril antes de comenzar las filtraciones de muestra, durante la ejecución del proceso y después de completar la totalidad de las

filtraciones. Si se realizan pausas superiores a 30 minutos entre ensayos repita la prueba de esterilidad. Estos blancos deben ser manipulados de igual forma que una muestra, la matriz analizada en este caso será únicamente agua grado reactivo estéril filtrada. Colocar las membranas resultantes en diferentes cajas de Petri con el medio de cultivo indicado en el método de referencia, identifíquelas como control de esterilidad o blanco, indicando fecha, hora de incubación y líder técnico que procesa. Asegúrese previamente que el lote del medio de cultivo a utilizar cumple con las condiciones de esterilidad requeridas. El resultado esperado es 0 UFC.

- **Control de precisión cuantitativos – repetibilidad:** el laboratorio debe establecer la metodología por la cual establece el control de precisión. Para más información puede remitirse al capítulo 9020 B. Guías de control de calidad intra-laboratorio. numeral 9. Procedimientos de control de calidad analíticos para métodos establecidos ítem e. Precisión de métodos cuantitativos en el documento normativo SM [24].
- Asegure que todos los datos de control de calidad se registran y controlan adecuadamente.

9.2.2. Determinación de Número Más Probable (sustrato enzimático definido)

Técnica recomendada para análisis de agua para consumo humano, natural y residual. Es aceptada por la legislación colombiana según lo descrito en el artículo once (11) de la resolución 2115 de 2007 para evaluar las características microbiológicas del agua para consumo humano; permite la identificación simultánea de microorganismos pertenecientes al grupo coliforme total y *E. coli* en la misma muestra, sin necesidad de preparar medios de cultivo ni realizar pruebas confirmatorias, con tiempos de incubación dentro de lo esperado para métodos microbiológicos convencionales.

Si un laboratorio no ha utilizado la técnica anteriormente, se deberá realizar la **verificación** en caso de que estos sean métodos estándar o **validar** en caso de ser métodos propios o modificados por el laboratorio. Adicionalmente, es recomendable que se realicen pruebas paralelas con el método empleado a la fecha para demostrar aplicabilidad y concordancia. Las tasas de falsos positivos y negativos pueden diferir entre cada medio de cultivo, por lo que los usuarios deben seleccionar cuidadosamente el medio y el procedimiento que mejor se adapte a sus necesidades.

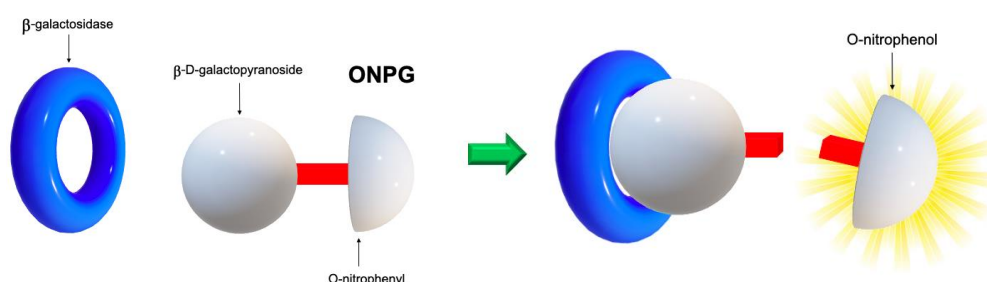
Con este método se puede realizar evaluación cuantitativa o cualitativa de los parámetros según el análisis que se requiera. La resolución permite reportar el resultado de ambas maneras, siendo un resultado óptimo < 1,0 microorganismo en 100 ml o ausencia en 100

ml tanto para coliformes totales como para *E. coli*. A continuación, se presenta la descripción del método 9223 B del documento SM.

A. Fundamento de la técnica:

Este tipo de medios de cultivo emplea sustratos cromógenos y fluorógenos específicos para identificar el desarrollo de bacterias coliformes y *E. coli* en las muestras a analizar.

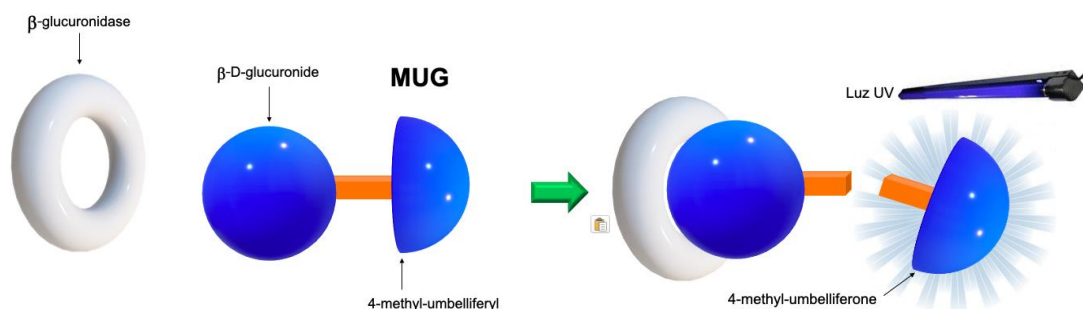
El indicador ONPG (Orto-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido), actúa como fuente principal de carbono para el desarrollo de bacterias coliformes. El sustrato es metabolizado con ayuda de la enzima B-galactosidasa, presente exclusivamente en este grupo, generando como resultado un producto cromóforo que genera un cambio de color en el medio.



Fuente: propia

Figura 11. Fundamento de la técnica de sustrato definido para detección de coliformes totales

Por otra parte, la identificación de *E. coli* en el mismo medio se realiza mediada por la presencia del sustrato MUG (4-metil-umbelífero-beta-D-glucorónido), el cual al ser metabolizado por la enzima B-glucuronidasa presente exclusivamente en este microorganismo, libera el sustrato fluorógeno que bajo luz UV (365-266 nm) generando una fluorescencia característica. Cabe recordar que *E. coli* es un microorganismo perteneciente al grupo de los coliformes, por lo que su presencia en el medio además de la fluorescencia también va a generar cambio de tonalidad en el medio de cultivo.



Fuente: Propia

Figura 12. Fundamento de la técnica de sustrato definido para detección de *E. coli*

Este método es altamente específico y los reactivos pueden emplearse en análisis cuantitativos o cualitativos.

B. **Procedimientos de análisis**

• **Determinación de Presencia/Ausencia (P/A)**

- Retirar del refrigerador el agua reactivo 30 minutos antes de dar inicio al ensayo. De la misma manera, retirar la muestra del refrigerador aproximadamente 10 minutos previa ejecución del ensayo.
- Agitar la muestra para promover una distribución homogénea de los microorganismos. Para esto se debe asegurar que cuente con al menos 1 pulgada (2,54 cm) de espacio de aire entre la superficie del líquido y la tapa del recipiente. Agite de atrás hacia adelante mínimo durante 7 segundos o 25 veces [24].
- Medir asépticamente 100 ml de la muestra empleando un recipiente aforado o una probeta estériles.
- Golpear la base del blíster ligeramente contra una superficie asegurando que todo el reactivo en polvo se dirija al fondo del empaque.
- Abrir el blíster.
- Agregar el contenido del blíster a 100 ml de la muestra contenida en el recipiente.
- Tapar bien el recipiente y agitar invirtiéndolo suavemente varias veces para facilitar la disolución del reactivo.
- Incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por el tiempo dispuesto por el fabricante del reactivo. La muestra debe incubarse dentro de los 30 minutos posteriores a la adición del medio.



Fuente: propia

Figura 13. Proceso técnico para el montaje de sustrato enzimático - cualitativo

- **Cuantificación en dispositivos multi-pozo**

- Retirar del refrigerador el agua reactivo 30 minutos antes de dar inicio al ensayo. De la misma manera, retirar la muestra del refrigerador aproximadamente 10 minutos previa ejecución del ensayo.
- Agitar la muestra para promover una distribución homogénea de los microorganismos. Para esto se debe asegurar que cuente con al menos 1 pulgada (2,54 cm) de espacio de aire entre la superficie del líquido y la tapa del recipiente. Agite de atrás hacia adelante mínimo durante 7 segundos o 25 veces [24].
- Medir asépticamente 100 ml de la muestra empleando un recipiente aforado o una probeta estériles.
- Golpear la base del blíster ligeramente contra una superficie asegurando que todo el reactivo en polvo se dirija al fondo del empaque.
- Abrir el blíster.
- Agregar el contenido del blíster a 100 ml de la muestra contenida en el recipiente.
- Tapar bien el frasco y agitar invirtiéndolo suavemente varias veces para facilitar la disolución del reactivo.
- Adicionar la mezcla de muestra/reactivo en una bandeja de cuantificación.
- Tocar suavemente los pozos pequeños 2 o 3 veces para liberar pequeñas burbujas que hayan quedado atrapadas, es normal que se genere algo de espuma.
- Colocar la bandeja en el caucho dispuesto para el proceso de sellamiento, inserte los pozos con la cara hacia abajo y proceda a sellar el dispositivo.
- Incubar la bandeja sellada a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por el tiempo dispuesto por el fabricante del reactivo. La muestra debe incubarse dentro de los 30 minutos posteriores a la adición del medio.



Fuente: Propia

Figura 14. Proceso técnico para el montaje de sustrato enzimático – cuantitativo

- **Cuantificación en tubo múltiple**

1. **Usando 5 o 10 tubos (5 series de tubos de 20 ml o 10 series de tubos de 10 ml)**

- Este procedimiento se suele emplear para cuantificar muestras con recuentos bajos.
- Retirar del refrigerador el agua reactivo 30 minutos antes de dar inicio al ensayo. De la misma manera, retirar la muestra del refrigerador aproximadamente 10 minutos previa ejecución del ensayo.
- Agitar la muestra para promover una distribución homogénea de los microorganismos. Para esto se debe asegurar que cuente con al menos 1 pulgada (2,54 cm) de espacio de aire entre la superficie del líquido y la tapa del recipiente. Agite de atrás hacia adelante mínimo durante 7 segundos o 25 veces [24].
- Medir asépticamente 100 ml de la muestra empleando un recipiente aforado o una probeta estériles.
- Golpear la base del blíster ligeramente contra una superficie asegurando que todo el reactivo en polvo se dirija al fondo del empaque.
- Abrir el blíster.
- Agregar el contenido del blíster a 100 ml de la muestra contenida en el recipiente.
- Tapar bien el frasco y agitar invirtiéndolo suavemente varias veces para facilitar la disolución del reactivo.
- Adicionar asépticamente los 100 ml de la mezcla de muestra/reactivo en un rack de 5 tubos estériles, 20 ml en cada uno o en un rack de 10 tubos, 10 ml en cada uno.
- Incubar los tubos a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por el tiempo dispuesto por el fabricante del reactivo. La muestra debe incubarse dentro de los 30 minutos posteriores a la adición del medio.
- Para la lectura refiérase a la tabla de NMP adjunta en el anexo 2 del presente documento.

2. Usando 15 tubos (3 sets de 5 tubos con diferentes diluciones)

- Este procedimiento se suele emplear para muestras con alta concentración de microorganismos. Ej: agua natural o agua residual.
- Para evitar interacciones indeseadas con el medio de cultivo, las diluciones se deben realizar únicamente empleando agua destilada estéril.
- Retirar del refrigerador el agua reactivo 30 minutos antes de dar inicio al ensayo. De la misma manera, retirar la muestra del refrigerador aproximadamente 10 minutos previa ejecución del ensayo.
- Agitar la muestra para promover una distribución homogénea de los microorganismos. Para esto se debe asegurar que cuente con al menos 1 pulgada (2,54 cm) de espacio de aire entre la superficie del líquido y la tapa del recipiente. Agite de atrás para adelante mínimo durante 7 segundos o 25 veces [24].

OPCIÓN 1. Emplear tubos comerciales desechables que contienen el medio en la medida necesaria

- i. Serie no diluida: Pipetear asépticamente 10 ml de la muestra homogenizada previamente y dispensar el volumen en 5 tubos que contengan el medio. Tapar los tubos y agitar vigorosamente hasta su disolución.
- ii. Serie con dilución 1:10: Preparar previamente un recipiente estéril con 90 ml de agua destilada estéril. Pipetear asépticamente 10 ml de la muestra homogenizada y mezclar con los 90 ml dispuestos en el recipiente preparado con anterioridad. Homogenizar y pipetear 10 ml de esta suspensión en cada uno de los 5 tubos que contengan el medio. Tapar los tubos y agitar vigorosamente hasta su disolución.
- iii. Serie con dilución 1:100: Preparar previamente un recipiente estéril con 90 ml de agua destilada estéril. Pipetear asépticamente 10 ml de la suspensión preparada anteriormente en la preparación de la serie dilución 1:10 y mezclar con los 90 ml dispuestos en el recipiente preparado anteriormente. Homogenizar y pipetear 10 ml de esta suspensión en cada uno de los 5 tubos que contengan el medio. Tapar los tubos y agitar vigorosamente hasta su disolución.

OPCIÓN 2. Emplear blíster de reactivo que contienen el medio

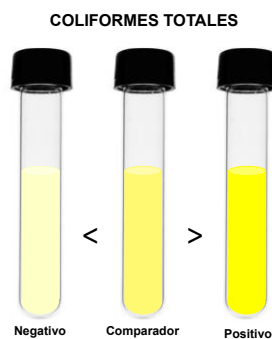
- i. Serie no diluida: Adicionar un blíster de reactivo a un recipiente con 100 ml de la muestra debidamente homogenizada. Tapar y agitar vigorosamente hasta su disolución. Pipetear asépticamente 10 ml de la mezcla muestra/reactivo en cada uno de los 5 tubos estériles no fluorescentes dispuestos para este set.

- ii. Serie con dilución 1:10 y 1:100: Adicionar un blíster de reactivo a un recipiente con 100 ml de agua destilada estéril. Tapar y agitar vigorosamente hasta su disolución. Pipetear asépticamente 9 ml de la mezcla agua/reactivo en 10 tubos estériles no fluorescentes dispuestos para estos dos sets (5 para dilución 1:10 y 5 para dilución 1:100).
 - Dilución 1:10: Pipetear 1 ml de la mezcla muestra/reactivo preparada para la serie no diluida y dispensar en cada uno de los 5 tubos que contienen 9 ml de medio preparado. Tapar y homogenizar.
 - Dilución 1:100: Preparar previamente un recipiente estéril con 90 ml de agua destilada estéril. Pipetear asépticamente 10 ml de la mezcla muestra/reactivo de la serie no diluida y mezclar con los 90 ml dispuestos en el recipiente anteriormente mencionado. Homogenizar y pipetear 1 ml de esta suspensión en cada uno de los 5 tubos que contienen 9 ml de medio preparado. Tapar y homogenizar.
- En cualquier caso (opción 1 o 2) incubar los tubos a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por el tiempo dispuesto por el fabricante del reactivo. La muestra debe incubarse dentro de los 30 minutos posteriores a la adición del medio.
- Para la lectura refiérase a la tabla de NMP adjunta en el anexo 2 del presente documento. El valor de NMP obtenido, deberá multiplicarse por el factor de dilución empleado para obtener resultados cuantitativos adecuados.

C. Interpretación de resultados

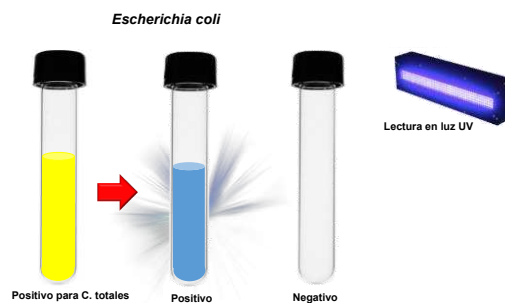
- Coliformes totales: la degradación de ONPG genera cambio de tonalidad en el medio de cultivo después del tiempo mínimo de incubación. Si al momento de la lectura el color no es uniforme, mezcle la muestra por inversión suavemente antes de proceder. Use un comparador de color (producto comercial) para identificar con mayor facilidad la tonalidad de las muestras positivas. Si el tono generado por la muestra es más intenso que el del comparador se considera una muestra positiva para coliformes totales, de lo contrario será considerada negativa para el mismo parámetro. Si la respuesta cromógena no es suficientemente clara tras el periodo de incubación, deje la muestra un máximo de 4 horas adicionales para intensificar el color y dar claridad al resultado. No se recomienda superar este tiempo pues después de estas 4 horas adicionales de incubación los resultados negativos son considerados válidos pero los positivos no.

- *E. coli*: el sustrato fluorogénico MUG es hidrolizado por la enzima bacteriana B-D-glucuronidasa generando una fluorescencia característica, visible tras la exposición a luz UV (365-366 nm) cuando se expone ante una bombilla de 6-W a 5 pulgadas (12,7 cm) de distancia de la muestra en un ambiente oscuro. Adicionalmente, por ser perteneciente al grupo coliforme total, *E. coli* degrada el sustrato ONPG, generando cambio de tonalidad en el medio de cultivo. De esta manera, las muestras que evidencian simultáneamente cambio en la coloración del medio y fluorescencia con exposición a luz UV tras el tiempo mínimo de incubación, son consideradas positivas para *E. coli*; si únicamente presentan cambio en la tonalidad del medio de cultivo son consideradas negativas. Si la muestra no evidencia cambio de tonalidad en el medio como reacción positiva de la B-galactosidasa, es considerada también como *E. coli* negativa.



Fuente: propia

Figura 15. Interpretación del resultado de coliformes totales por la técnica sustrato enzimático definido



Fuente: propia

Figura 16. Interpretación del resultado para determinación de *E. coli* por la técnica sustrato enzimático definido

Algunos microorganismos no coliformes como *Aeromonas* spp. *Flavobacterium* spp. y algunas especies de *Pseudomonas* spp., pueden producir mínimas cantidades de la enzima B-D-Galactosidasa. El crecimiento de estos en el medio de cultivo suele ser suprimido y generalmente no generan falsos positivos a menos que se encuentren en concentraciones superiores a 10^6 UFC/100 ml en la muestra. Microorganismos pertenecientes al género *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. pueden generar fluorescencia pero no cambio de color en el medio de cultivo debido a que son B-galactosidasa negativo, por lo que al momento de realizar la lectura son considerados como *E. coli* negativo [24].

D. Reporte de resultados

- **Ausencia/presencia:** Reporte el total de coliformes totales y *E. coli* presente o ausente en 100 ml de muestra.
- **Cuantificación en tubo múltiple:** Determine el valor de NMP con los resultados de las tablas dispuestas en el anexo 2 del presente documento, según el número de tubos positivos.
- **Cuantificación en dispositivos multi-pozo:** Determine el valor de NMP con los resultados de las tablas apropiadas dispuestas por el fabricante según el número de pozos grandes y pequeños positivos. Reporte el resultado en unidades NMP/100 ml.

E. Control de calidad

Independiente del método de referencia a emplear, antes de iniciar un nuevo lote de reactivo se debe verificar el desempeño de este mediante la preparación de un control negativo y un control positivo empleando para ello material de referencia. Cada método indica las cepas a emplear para sus respectivos controles. Para la determinación de coliformes totales se recomienda como control positivo inocular el medio con una cepa certificada de *E. coli* y un coliforme total diferente a *E. coli* (Ej.: *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.). Como control negativo se debe inocular el medio de cultivo con un microorganismo no coliforme (Ej.: *Pseudomonas* spp.). Algunos reactivos comerciales indican exactamente la referencia de la cepa a emplear, tener en cuenta estas recomendaciones.

Se recomienda evaluar la esterilidad del material a emplear para la ejecución de los ensayos (botellas de muestreo, botellas de dilución, dispositivos de cuantificación, tubos) y confirmar ausencia de auto fluorescencia en los recipientes empleados para la lectura de *E. coli*.

Almacene el reactivo siguiendo las instrucciones del fabricante y empléelo antes de su fecha de caducidad. Evite la exposición prolongada del reactivo a la luz directa del sol, ya que esto puede afectar sus propiedades y descártelo si observa cambios en las características macroscópicas del mismo (Ej: cambio de color, textura) [24].

En el marco de la ejecución de actividades de control de calidad en el laboratorio de microbiología, se recomienda realizar como mínimo los controles descritos en el documento *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater capítulo 9020 B. Guías de control de calidad intra – laboratorio, numeral 9*. Procedimientos de control de calidad analíticos para métodos establecidos [24]. Asegure que todos los datos de control de calidad se registran y controlan adecuadamente.

- **Variabilidad de recuento de pozos:** como evaluación rutinaria se recomienda realizar mensualmente el recuento duplicado de (mínimo) una muestra positiva, por uno o más analistas. El ejercicio debe realizarse sobre el mismo dispositivo obteniendo correspondencia hasta del 5% (repetibilidad en el recuento) cuando el ejercicio lo realiza el mismo analista y correspondencia hasta del 10% (reproducibilidad en el recuento) cuando el ejercicio lo realizan dos analistas.
- **Cultivo (control) positivo:** cada vez que se realicen siembras, se procesa por último 100 ml de agua grado reactivo con adición de una concentración microbiana conocida del o los microorganismos control seleccionados. Este control debe ser manipulado de igual forma que las muestras e incubado con las mismas. El material de referencia deben ser cepas certificadas producidas por fabricantes nacionales o internacionales que cumplan con los requisitos de la norma ISO 17034 en su versión vigente, las cepas de trabajo no deben tener más de cinco pases. Los cultivos y cepas obtenidas en pruebas inter-laboratorio o evaluaciones de desempeño no son consideradas material de referencia adecuado.
- **Control de medios de cultivo:** como pruebas de desempeño del medio de cultivo se recomienda que cada lote de reactivo sea sometido a pruebas que incluyan evaluación de la productividad, selectividad y especificidad.
- **Análisis duplicados:** se deben ejecutar análisis duplicados al menos una vez al mes o si se requiere más seguido según lo describa el método de referencia. Algunos métodos sugieren analizar por duplicado el 10% de las muestras, otros una muestra duplicada por lote o corrida analítica.
- **Control de esterilidad del dispositivo de recuento:** coloque en uno o más dispositivos de recuento 100 ml de caldo no selectivo e incube a $35 \pm 0,5$ °C durante 48 h. La ausencia de crecimiento en el medio indica esterilidad del dispositivo, verifique esterilidad del medio de cultivo empleado. Registre la información manteniendo la trazabilidad del lote monitoreado.

- **Control de esterilidad del proceso:** durante la ejecución de los ensayos, adicione un blíster del reactivo a 100 ml de agua destilada estéril. Estos blancos deben ser manipulados de igual forma que una muestra. Identifique las placas como control de esterilidad o blanco, indicando fecha, hora de incubación y líder técnico que procesa. Asegúrese previamente que el lote de agua destilada cumple con las condiciones de esterilidad requeridas. El resultado esperado es <1.0 NMP/100 ml.
- **Control de precisión cuantitativos – repetibilidad:** el laboratorio debe establecer la metodología por la cual establece el control de precisión. Para más información puede remitirse al capítulo 9020 B. Guías de control de calidad intra - laboratorio, numeral 9. Procedimientos de control de calidad analíticos para métodos establecidos ítem e. Precisión de métodos cuantitativos en el documento normativo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* [24].

9.2.3. Ausencia – Presencia

Técnica recomendada para análisis de agua para consumo humano. Es aceptada por la legislación colombiana según lo descrito en el artículo 11 de la resolución 2115 de 2007 para evaluar las características microbiológicas del agua para consumo humano. Según el reactivo empleado puede realizarse la identificación simultánea de microorganismos pertenecientes al grupo coliforme total y *E. coli* en la misma muestra, sin necesidad de preparar medios de cultivo ni realizar pruebas confirmatorias, con tiempos de incubación desde las 16 horas emitiendo resultados cualitativos. El resultado óptimo en este caso según lo especificado en la resolución es ausencia de coliformes totales y *E. coli*.

El único método sustrato enzimático aceptado por el referente normativo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* es el descrito en el numeral 8.1.2, capaz de emitir resultados cuantitativos y cualitativos (ausencia-presencia). Sin embargo, existen varios reactivos con esta tecnología empleados para este ensayo que se encuentran aprobados por instituciones de referencia (Ej. EPA), pero que al no corresponder a métodos estandarizados deberán pasar por un proceso de validación previo uso en el laboratorio. Así mismo, hay otros medios deshidratados que se pueden emplear para este fin como el medio lauril triptosa, que son aceptados por referentes normativos estándar, pero requieren pruebas confirmatorias complementarias durante su ejecución, ejercicio que retrasa el proceso y hace más demorada la respuesta, situación no deseada en caso de emergencia sanitaria.

Estudios comparativos con métodos que emplean la técnica de filtración por membrana, indican que la técnica presencia-ausencia puede maximizar la detección de organismos

coliformes en muestras con alta carga interferente, microorganismos que suelen crecer sobre las colonias de coliformes y generar problemas en la lectura e interpretación [24].

A. **Fundamento de la técnica:**

Este tipo de medios de cultivo permite obtener información cualitativa a partir de una porción grande de muestra. Teniendo en cuenta que en la totalidad de la muestra de agua para consumo no debe haber coliformes totales ni *E. coli*, el sustrato brinda condiciones óptimas para el crecimiento de estos microorganismos, si se desarrollan estos crecen en la totalidad del recipiente, en caso contrario el medio permanecerá igual y el resultado será negativo para los 100 ml de muestra analizados.

Tienen un principio similar al descrito previamente en el numeral 8.1.2 pues el resultado se basa en la especificidad de los microorganismos blanco para generar reacción sobre sustratos específicos. Adicionalmente cuando se emplean algunos reactivos comerciales se deben realizar pruebas confirmatorias rápidas para asegurar los resultados, las cuales no toman tiempo adicional de incubación y permiten reportar resultados con mayor grado de confiabilidad.

B. **Procedimientos de análisis**

Empleando caldo lauril triptosa (Método 9221 D. SM)

- Preparar la formulación del caldo lauril triptosa concentración 3X (para analizar 100 ml de muestra).
- Dispensar 50 ml del medio preparado en recipientes de 250 ml de capacidad y esterilizar en autoclave. Emplear un recipiente por muestra.
- Agitar la muestra para promover una distribución homogénea de los microorganismos. Para esto se debe asegurar que cuente con al menos 1 pulgada (2,54 cm) de espacio de aire entre la superficie del líquido y la tapa del recipiente. Agite de atrás hacia adelante mínimo durante 7 segundos o 25 veces [24].
- Medir asépticamente 100 ml de la muestra en un recipiente aforado o probeta estériles.
- Inocular los 100 ml de la muestra en un recipiente previamente preparado con medio de cultivo.
- Agitar por inversión la botella una o dos veces o hasta que se evidencie que la muestra y el medio de cultivo se homogenizan.

- Incubar el recipiente a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas y 48 ± 3 horas para evidenciar las reacciones acidas.

Empleando medios comerciales listos para uso

- Agitar la muestra para promover una distribución homogénea de los microorganismos. Para esto se debe asegurar que cuente con al menos 1 pulgada (2,54 cm) de espacio de aire entre la superficie del líquido y la tapa del recipiente. Agite de atrás hacia adelante mínimo durante 7 segundos o 25 veces [24].
- Medir asépticamente 100 ml de la muestra empleando un recipiente aforado o probeta estériles.
- Agregar el contenido de la ampolla o el sobre con el reactivo a 100 ml de la muestra contenida en el recipiente
- Tapar bien el recipiente y agitar invirtiéndolo suavemente varias veces para facilitar la disolución del reactivo
- Incubar a la temperatura y el tiempo dispuesto por el fabricante del reactivo.

C. Interpretación de resultados

Empleando caldo lauril triptosa (Método 9221 D. SM)

- Coliformes totales: Si no se evidencia crecimiento ni producción de gas o ácido, incubar 24 horas más (48 ± 3 horas). Si pasado este tiempo no hay evidencia de crecimiento el resultado es negativo para coliformes totales. Si hay producción de gas o ácido se debe confirmar el resultado según lo descrito por el método de referencia (SM. 9221D) [24]. Este método se emplea para la determinación de coliformes totales en agua para consumo y la generación del reporte final de resultados puede llegar a requerir hasta tres días después del inicio del ensayo. Teniendo en cuenta el tiempo necesario para su ejecución y la demora en los resultados, se recomienda que su uso en el laboratorio sea la última opción cuando no es viable implementar las otras técnicas mencionadas en el presente documento; pues en casos de resultados positivos el agua analizada ya ha sido consumida hace varios días y la generación de alertas demoradas puede llegar a generar efectos importantes en salud pública.
- *E. coli*: Se puede confirmar la presencia de *E. coli* con medios adicionales en el marco del proceso de confirmación, lo que aumenta el tiempo de ejecución del ensayo.

Empleando medios comerciales listos para uso

- Coliformes totales: la degradación de los sustratos fluorógenos o cromógenos del medio de cultivo genera cambio de tonalidad después del mínimo tiempo de incubación. Idealmente, use un comparador de color (producto comercial) para identificar con mayor facilidad la tonalidad de las muestras positivas. Si el tono generado por la muestra es más intenso que el del comparador se considera una muestra positiva para coliformes totales, de lo contrario será considerada negativa para el mismo parámetro.
- *E. coli*: según el reactivo empleado se realizará la interpretación del resultado para este parámetro, en gran parte de los reactivos comerciales un resultado positivo es identificado mediante la emisión de una fluorescencia visible tras la exposición a luz UV (365-366 nm) cuando se expone ante una bombilla en un ambiente oscuro. Adicionalmente, en algunos casos se deben adicionar reactivos de confirmación para aumentar la confiabilidad del resultado. De esta manera, las muestras que evidencian simultáneamente cambio en la coloración del medio y fluorescencia con exposición a luz UV tras el tiempo mínimo de incubación, son consideradas positivas para *E. coli*; si únicamente presentan cambio en la tonalidad del medio de cultivo son consideradas negativas.

D. Reporte de resultados

- **Ausencia/presencia:** Reporte el total de coliformes totales y *E. coli* presente o ausente en 100 ml de muestra.

E. Control de calidad

Independiente del método o el reactivo comercial a emplear, antes de iniciar un nuevo lote de reactivo se debe verificar el desempeño de este mediante la preparación de un control negativo y un control positivo empleando para ello material de referencia. Cada método indica las cepas a emplear para sus respectivos controles. Para la determinación de coliformes totales se recomienda como control positivo inocular el medio con una cepa trazable de *E. coli* y un coliforme total diferente a *E. coli* (Ej.: *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.). Como control negativo se debe inocular el medio de cultivo con un microorganismo no coliforme (Ej.: *Pseudomonas* spp.). Algunos reactivos comerciales indican exactamente la referencia de la cepa a emplear, tener en cuenta estas recomendaciones.

Se recomienda evaluar esterilidad del material a emplear para la ejecución de los ensayos (botellas de muestreo, botellas de dilución, dispositivos de cuantificación, tubos) y confirmar ausencia de auto fluorescencia en los recipientes empleados para la lectura de *E. coli*.

Almacene el reactivo siguiendo las instrucciones del fabricante y empléelo antes de su fecha de caducidad. Evite la exposición prolongada del reactivo a la luz directa del sol, ya que esto puede afectar sus propiedades y descártelo si observa cambios en las características macroscópicas del mismo (Ej: cambio de color, textura) [24].

En el marco de ejecución de actividades de control de calidad en el laboratorio de microbiología, se recomienda realizar como mínimo los controles descritos en el documento *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater capítulo 9020 B. Guías de control de calidad intra - laboratorio, numeral 9. Procedimientos de control de calidad analíticos para métodos establecidos* [24]. Asegure que todos los datos de control de calidad se registran y controlan adecuadamente.

- **Cultivo (control) positivo:** cada vez que se realicen siembras, se procesa por último 100 ml de agua grado reactivo con adición del o los microorganismos control seleccionados. Este control debe ser manipulado de igual forma que las muestras e incubado con las mismas. El material de referencia deben ser cepas certificadas producidas por fabricantes nacionales o internacionales que cumplan con los requisitos de la norma ISO 17034 en su versión vigente, las cepas de trabajo no deben tener más de cinco pases. Los cultivos y cepas obtenidas en pruebas inter - laboratorio o evaluaciones de desempeño no son consideradas material de referencia adecuado.
- **Control de medios de cultivo:** como pruebas de desempeño del medio de cultivo se recomienda que cada lote de reactivo sea sometido a pruebas que incluyan evaluación de la productividad, selectividad y especificidad.
- **Análisis duplicados:** se deben ejecutar análisis duplicados al menos una vez al mes o si se requiere más seguido según lo indique el método de referencia. Algunos métodos sugieren analizar por duplicado el 10% de las muestras, otros una muestra duplicada por lote o corrida analítica.
- **Control de esterilidad del proceso:** durante la ejecución de los ensayos, adicione una ampolla o sobre del reactivo a 100 ml de agua destilada estéril. Estos blancos deben ser manipulados de igual forma que una muestra. Identifique las placas como control de esterilidad o blanco, indicando fecha, hora de incubación y líder técnico que procesa. Asegúrese previamente que el lote de agua destilada cumple con las condiciones de esterilidad requeridas. El resultado esperado es ausencia de coliformes totales y ausencia de *E. coli*.

9.3. Técnicas moleculares

9.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Actualmente, la mayoría de las técnicas empleadas para evaluar calidad microbiológica del agua logran la detección de los microorganismos blanco entre 24 a 72 horas, según la metodología empleada. Las técnicas moleculares generan resultados en menos de cuatro horas con altos niveles de sensibilidad y especificidad al ser métodos que no requieren cultivos, por lo que son aptos para uso con diferentes tipos de microorganismos, incluso aquellos de difícil manejo en laboratorio, dada su capacidad de identificar y cuantificar ácidos nucleicos.

Existen varios kits comerciales en el mercado para ejecutar ensayos de PCR, es necesario contar con un laboratorio con infraestructura especial para realizar ensayos moleculares, con las divisiones respectivas que minimicen la contaminación cruzada. Se requieren equipos especializados y reactivos específicos para el fin del ensayo, sondas, ácidos nucleicos, entre otros un poco más complejos que los empleados en las técnicas de ensayo de crecimiento por cultivo [14].

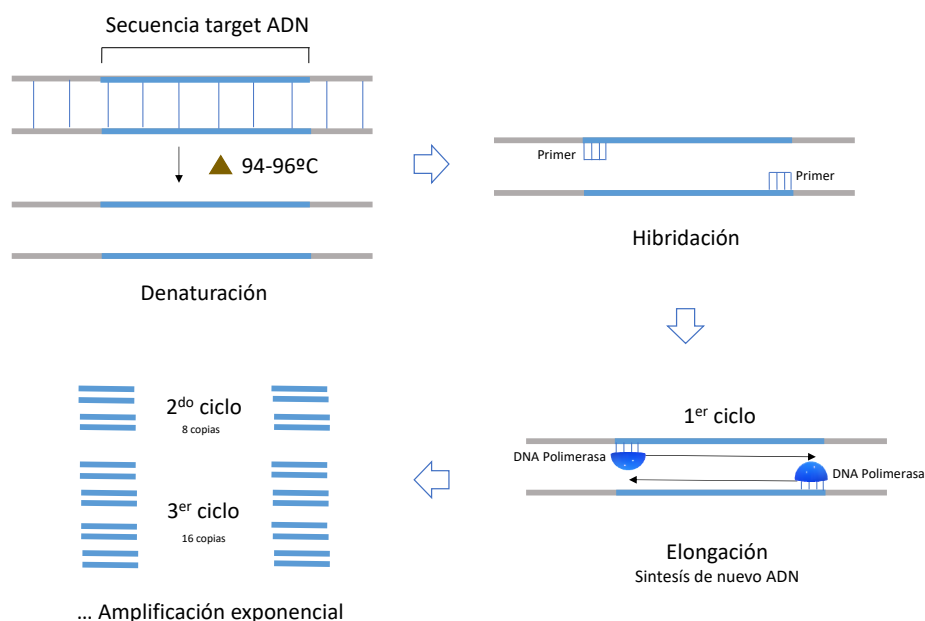
Al ser un método llevado a cabo *in vitro* que busca amplificar las cadenas de ADN (o ARN según el microorganismo) empleando sondas como plantilla y cebadores de oligonucleótidos, tiene la ventaja de ser altamente específico, pues la unión solo ocurre en secuencias complementarias bajo la guía del material genético del organismo objeto del ensayo [24].

Existen PCR dúplex o PCR multiplex, que incluyen dos o más sets de iniciadores (primers), resultando en dos o múltiples productos de amplificación, lo que permite identificar más de un organismo y más de un gen en la muestra simultáneamente. Así mismo, es posible evaluar simplemente la presencia o ausencia de los genes asociados al organismo de interés o cuantificarlos para determinar su concentración en la muestra analizada; la selección de la técnica a emplear depende del objeto del estudio y de la normatividad nacional.

El material genético puede perdurar algún tiempo aún después que la célula muere, por lo que no es posible distinguir microorganismos infectivos o no viables. Sin embargo, actualmente se encuentran disponibles varias técnicas o combinaciones de técnicas para evitar el problema infectividad/viabilidad [14].

Como desventajas de la técnica se encuentra que la reacción es sensible a la inhibición por componentes presentes principalmente en muestras ambientales, esta puede variar

entre reactivos y/o equipos; los costos de adquisición de los equipos, la estandarización de los métodos analíticos y la necesidad de grandes volúmenes de muestra cuando se presume baja contaminación y la concentración de los microorganismos es escasa, lo que requiere el empleo de métodos de concentración que pueden aumentar los costos [57].



Fuente: Propia

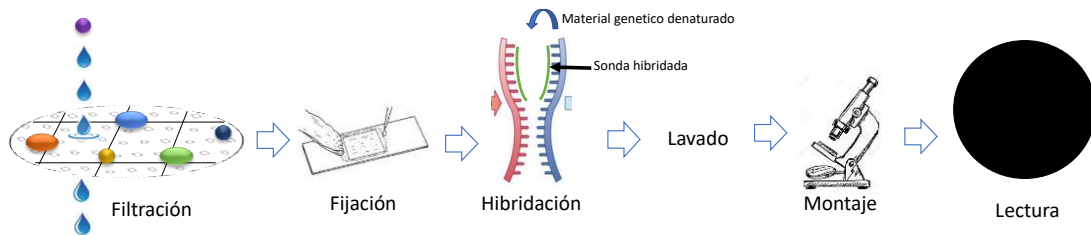
Figura 17. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa

9.3.2. Detección de bacterias por Hibridación Fluorescente in situ (FISH)

Es una técnica citogenética de detección molecular estrictamente taxonómica donde se marcan estructuras internas con sondas que emiten fluorescencia, facilitando la identificación de microorganismos en una muestra. El protocolo básico incluye la filtración inicial de la muestra de agua a través de una membrana, una posterior fijación a la misma, permeación de células, hibridación con sonda fluorescente, lavado para eliminar excesos y finalmente el examen por microscopía de epifluorescencia.

La señal de fluorescencia dada por cada célula bacteriana depende del número de blancos u objetivos dentro de la célula, por ejemplo, cuando se dirige la sonda al ARN ribosomal la señal depende del número de ribosomas de la célula, es decir, depende del estado fisiológico de la bacteria. La prueba puede llegar a requerir algunos equipos especializados y pese a que es fácil de realizar en cortos periodos de tiempo (dos a tres horas) [14], la lectura requiere que de un profesional con experiencia.

Uno de los limitantes de esta técnica es que ninguna sonda puede detectar de manera independiente los coliformes (sean fecales o no), dado que todos pertenecen a un mismo taxón molecular, pero en algunos casos pueden detectar microorganismos específicos, mientras que sus genes sean conservados y no se compartan entre especies genómicas [14] [58].



Fuente: Propia

Figura 17. Técnica Fish

9.4. Técnicas inmunológicas

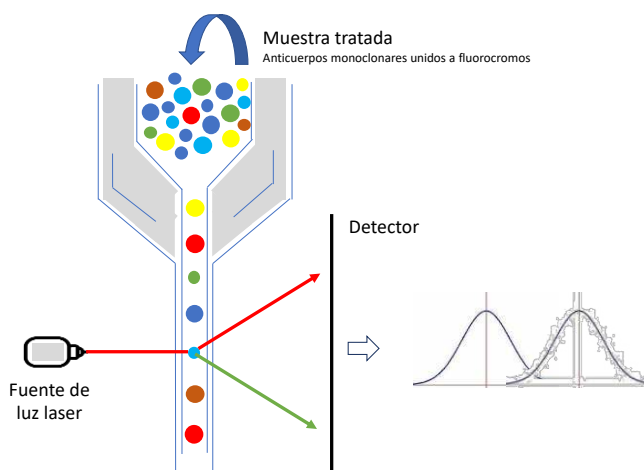
9.4.1. Citometría de flujo

Es una tecnología que permite identificar células (u otras partículas) suspendidas en un medio líquido. Las partículas fluyen una a una a través de un haz de luz en la región de detección de la cámara de flujo donde son clasificadas por su tamaño y densidad. Son visibles gracias a la especificidad de los anticuerpos empleados para generar fluorescencia sobre los componentes de interés.

Permite detectar hasta el 99% de células presentes en la muestra en poco tiempo, se puede completar un análisis en menos de quince minutos incluyendo indicadores y patógenos e incluso bacterias viables no cultivables, lo que favorece la generación de alertas

tempranas. Indica la carga bacteriológica total de la muestra dando indicios sobre su grado de contaminación. Es un método de uso limitado. Suiza fue el primer país en implementar esta técnica en el marco del control de calidad del agua para consumo humano y a la fecha otros países europeos se encuentran realizando estudios al respecto para ajustar sus protocolos [14].

Dentro de las limitantes de esta técnica se cuenta que el citómetro de flujo requiere de un operador experto, los consumibles principalmente son anticuerpos monoclonales, variables según los microorganismos a detectar, lo que puede representar inicialmente una alta inversión de capital. Aún pese a la especificidad de la técnica pueden existir partículas interferentes incluso en muestras negativas [59][60].



Fuente: Propia

Figura 18. Técnica de citometría de flujo

10. Toma de muestras para análisis bacteriológico de agua

Del adecuado proceso de la toma de muestras depende el éxito de los resultados analíticos y la calidad del proceso operativo subsecuente, por ello es indispensable que cada laboratorio establezca una serie de protocolos sobre las condiciones preanalíticas que deben cumplir sus muestras. Para la estandarización de estos protocolos se recomienda seguir lineamientos nacionales e internacionales específicos para el tipo de matriz a analizar.

De esta manera, para la toma de muestras de agua para consumo humano se recomienda seguir las indicaciones dadas en el manual de instrucciones para toma, preservación y transporte de muestras de agua para consumo humano para análisis de laboratorio en versión vigente a la fecha [61]. Así mismo, el documento normativo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* en sus numerales 9060 A y 9060 B, describe claramente los puntos clave para tener en cuenta para el procedimiento de toma y transporte de muestras de agua. Cada método normativo que el laboratorio decida seguir deberá describir en detalle características adicionales de importancia para su inclusión en los protocolos.

10.1. Muestras remitidas al Laboratorio Nacional de Referencia

El LNR del INS ejecuta análisis bacteriológicos de agua. Sin embargo, no es responsable del proceso de toma de muestras, por lo que a continuación se presentan de manera general las instrucciones al personal responsable de la toma, conservación, embalaje, remisión y transporte de muestras en cada una de las entidades territoriales de salud o usuarios interesados en remitir muestras de agua, estandarizando así el proceso de identificación de estas y la trazabilidad de la información contenida en la fase preanalítica.

Según lo descrito en el Manual de procedimientos para la toma, conservación y envío de muestras al Laboratorio Nacional de Referencia [62], las muestras deben cumplir con los requisitos descritos a continuación para aprobar el ingreso y proceder a su análisis:

- Agente etiológico a identificar: Coliformes totales y *E. coli* (métodos autorizados a la fecha para ejecución en el laboratorio de microbiología de aguas del INS).
- Técnica: Sustrato enzimático – Filtración por membrana
- Tipo de muestra: agua para consumo humano (a la salida de la planta de tratamiento, en red de distribución, intradomiciliaria) agua cruda (estanques, lagos, ríos, quebradas, subterránea, embalses, represas, pozos, nacimientos, manantiales, etc.), siempre y cuando sean de cuerpos de agua que sirvan como fuente de captación a los sistemas de abastecimiento de agua para consumo humano.
- Volumen mínimo: el volumen mínimo de la muestra recolectada debe ser de 300 ml, de manera que se cuente con cantidad suficiente para ejecutar el ensayo directo, con duplicado y se cuente con contramuestra de respaldo. Las muestras deben tener un espacio de aire de al menos 1 pulgada (2,54 cm o 25,4 mm) entre la tapa y la superficie de la muestra, manteniendo el medio oxigenado y favoreciendo su posterior agitación.

- Preservación: la muestra se debe mantener en refrigeración entre 2 y 8°C, por lo que se debe enviar en nevera de icopor con pilas refrigerantes. Se debe asegurar que el empaque evite pérdidas, derrames o contaminación de la muestra, así como posibles alteraciones debidas a acciones mecánicas, calentamiento excesivo o exposición a luz intensa. Las muestras deberán contener las etiquetas correspondientes que permitan una identificación clara e inequívoca mediante la adhesión de un rotulo que no pueda retirarse fácilmente.
- Sí la muestra ha sido tratada con cloro, el recipiente estéril en que se va a recolectar el agua deberá contener 0,1 ml de solución de tiosulfato de sodio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 3% en una botella por cada 100 ml de muestra, para neutralizar hasta 5 mg/L de cloro residual libre (aguas de consumo humano) y para muestras con mayor concentración de cloro residual libre, 0,1 ml de solución de tiosulfato de Sodio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10% por cada 100 ml de muestra, para neutralizar hasta 15 mg/L de cloro residual libre (Ej. aguas residuales tratadas, aguas de piscina) [24].

En caso de que deba preparar las suspensiones de tiosulfato de sodio tenga en cuenta las siguientes indicaciones:

Tabla 2. Indicaciones para la preparación de las suspensiones de tiosulfato de sodio

Tiosulfato de Sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	Peso del componente requerido
3% anhidrido	3 g/100mL
3% pentahidratado	4,6 g/100mL
10% anhidrido	10 g/100mL
10% pentahidratado	15,21 g/100mL

Fuente: SM. Tabla 9060

- El remitente debe registrar en la etiqueta de la muestra y en el acta de toma de muestras la concentración y el volumen de tiosulfato adicionado.
- Recipiente: Frasco de vidrio o plástico estéril (comercial). Cuando se recolecten muestras para análisis microbiológico en recipiente de borosilicato se debe asegurar que el recipiente presente marcas que evidencien su esterilidad, como la cinta testigo de autoclave (Ver figura 20).



Fuente: propia

Figura 20. Cinta testigo de autoclave

- Tiempo entre toma de muestra y procesamiento: 24 a 30 horas máximo
- Rotulado: Debe contener información sobre: Punto de toma de la muestra (dirección y ubicación); fecha y hora de recolección; tipo de muestra; nombre del solicitante; nombre de la persona que recolectó la muestra y entidad remitente.
- Documentos adjuntos: Oficio remisorio o carta de solicitud y acta de toma de muestras (Ver anexo 3 del presente documento). El acta se debe solicitar al INS vía correo electrónico, quienes remitirán el documento en su última versión vigente.
- Oportunidad en la entrega de resultados: Hasta siete (7) días hábiles contados a partir del ingreso al laboratorio.

11. Control de calidad en el laboratorio de microbiología

El aseguramiento de calidad en el laboratorio de microbiología de aguas es indispensable para afirmar que todos los procesos técnicos se llevan a cabo de manera adecuada, siguiendo procedimientos estandarizados. La implementación de un sistema de gestión de calidad en el laboratorio promueve la generación de resultados válidos en el marco de operación de un laboratorio competente y apto para la ejecución de dichos análisis [63].

Además de la correcta ejecución de los protocolos asociados a los métodos de ensayo, es indispensable que cada laboratorio realice actividades de control de calidad para monitorear la fiabilidad de sus resultados y los parámetros asociados a los mismos. Se estima que cerca del 15% del tiempo de trabajo en el laboratorio se debe emplear en actividades asociadas al control de calidad, por lo que establecer un programa de acuerdo con los requerimientos propios de cada laboratorio facilita el proceso y asegura la ejecución de dichos controles en la oportunidad requerida [24].

Se recomienda que todos los procesos sean documentados con base en la normatividad relacionada con el objeto de los ensayos realizados e incluyan como mínimo los aspectos descritos a continuación:

Personal  Aclaración de la formación del personal que ejecuta las diferentes actividades en el laboratorio y de las responsabilidades asociadas a cada rol. Procedimientos de entrenamiento y seguimiento de capacidad técnica, incluyendo supervisiones, ensayos de aptitud, evaluaciones y otras que se consideren necesarias. [24][63].
Control de calidad intra-laboratorio  El documento normativo <i>Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater</i> sugiere evaluar constantemente la variabilidad de colonias, control positivo y negativo de medios de cultivo, análisis de duplicados, controles de esterilidad y evaluación de precisión de los métodos de ensayo cuantitativos, entre otros. En el numeral 7.1 A y 7.1 B del presente documento se detallan algunos de estos controles.
Equipamiento e instrumentación  El laboratorio debe contar con equipos suficientes para ejecutar los análisis, los cuales deben estar en óptimas condiciones para su uso y se deben encontrar disponibles en el área de trabajo (Ej: incubadora en el área de microbiología). Cada uno de los equipos empleados en el laboratorio debe contar con una identificación única, de manera que se facilite la trazabilidad de la información relacionada. Se deben elaborar documentos técnicos que describan la operación de cada equipo y su constante seguimiento metrológico siguiendo los lineamientos de calidad que apliquen para cada caso.
Criterios de bioseguridad  Se debe hacer claridad sobre el nivel de bioseguridad que maneja cada laboratorio, de manera que las prácticas, el equipamiento de seguridad y el diseño de las instalaciones se describan y ejecuten de acuerdo con las necesidades específicas. Además, el personal que tenga acceso al laboratorio deberá conocer los EPP a usar en cada una de las actividades que ejecute. Para mayor información sobre este tema, el centro de

control de enfermedades de Estados Unidos (CDC) y la Organización Mundial de la Salud cuentan con documentos guía para su caracterización y prácticas estándar relacionadas [64][65]. Es importante identificar los riesgos propios del área de trabajo que permitan generar las regulaciones adecuadas para el espacio.

Ensayos inter-laboratorio - PICCAP



El programa PICCAP es un programa oficial de evaluación externa del desempeño dirigido por el INS, creado con el fin de dar cumplimiento a los numerales 3 y 5 del artículo 7 del decreto 1575 de 2007. Es considerado un requisito indispensable para la expedición de la resolución de autorización de laboratorios en Salud Pública año a año por parte del Ministerio de Salud y Protección Social (Resolución vigente No. 2625 de 2019). Este ensayo de aptitud se oferta a laboratorios de Salud Pública, laboratorios de Empresas de Servicios Públicos, laboratorios de entidades oficiales, laboratorios de Universidades, laboratorios particulares y otros que realizan análisis de aguas para consumo humano en Colombia. Para mayor información sobre los calendarios y protocolos de las rondas emitidas se puede revisar la que se encuentra disponible en el link: <https://www.ins.gov.co/TyS/programas-de-calidad/programas-directos/piccap>. Los ensayos bacteriológicos se reportan a la fecha de elaboración del presente documento como presencia – ausencia para los parámetros coliformes totales y E. coli.

Instalaciones



Es importante asegurar que las áreas donde se ejecutan los ensayos cumplan con condiciones adecuadas para la generación de resultados válidos. Entre estos aspectos se deben considerar: Minimización de potencial contaminación de áreas de trabajo, acondicionamiento de superficies de trabajo para ofrecer condiciones confortables y seguras para el personal, control de tránsito, características de las instalaciones según las actividades a realizar (Ej: paredes, pisos, techos), monitoreo de ambientes, disposición adecuada de reactivos y acceso a sus respectivas hojas de seguridad, protocolos de limpieza y desinfección, manejo y disposición de residuos e instalación de sistemas eléctricos de acuerdo a la necesidad del laboratorio [24], [63], [66].



Validación y verificación de métodos de ensayo

La evaluación de los criterios de desempeño del método de ensayo permite evidenciar que su ejecución bajo las condiciones del laboratorio genera los resultados esperados para las muestras analizadas. El reporte de resultados repetibles, con bajas tasas de falsos positivos, falsos negativos, mayor sensibilidad y mayor especificidad es un punto crítico para aportar confiabilidad al resultado generado [67].

Registros



Se debe asegurar trazabilidad de todos los procesos ejecutados en el laboratorio, así como de los registros de datos primarios y todas las actividades asociadas que se encuentren documentadas. El manejo de la información se define internamente según los lineamientos propios de cada laboratorio, pero se recomienda su almacenamiento por largos periodos de tiempo por si estos llegan a ser requeridos para algún proceso legal y se llega a considerar necesario acceder a la cadena de custodia relacionada con alguna muestra. Todas las muestras deben tener un código único de identificación, que evite confusiones y asegure su trazabilidad.

Manejo de datos



El manejo estadístico de los datos en microbiología es diferente al empleado en otras áreas de la ciencia, por ello es indispensable manejar documentación donde se indiquen los procedimientos asociados al análisis de este tipo de información. Para el seguimiento de información en el laboratorio de microbiología se recomienda revisar el documento normativo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, numeral 9020 B ítem 13, para verificación de métodos se recomienda seguir las indicaciones de la norma ISO 13843 en su última versión vigente, para el cálculo de la incertidumbre de métodos microbiológicos se recomienda revisar la norma ISO 29201:2012.

Procedimientos operativos estándar (POEs)



Estandarizar los lineamientos para la ejecución de los métodos de ensayo es indispensable para asegurar que los procedimientos se realizan de la misma manera siempre, independientemente del analista asignado. Se debe describir claramente cada

uno de los pasos a seguir con base en un documento normativo e incluir equipos, reactivos, material de referencia, indicaciones de disposición final de material y demás que el laboratorio considere pertinente para el ensayo. Los documentos deben tener revisión y aprobación previa publicación interna [24], [63].

Fuente: Propia

En el anexo 4 del presente documento se describe la tabla de resumen de prácticas de control de calidad para el laboratorio de aguas descrita en el documento normativo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* numeral 9020 B donde se incluyen los ítems a controlar, la acción a realizar y la frecuencia con la cual se recomienda su ejecución. Este documento es una guía, cada laboratorio define sus propios lineamientos y aplicación de la información aquí descrita según los equipos, métodos, reactivos y capacidad operativa disponible.

Para asegurarse que el sistema de gestión de calidad es incluyente con todos los parámetros requeridos para asegurar el correcto funcionamiento de un laboratorio de ensayo, se solicita la implementación de lo establecido en la norma NTC ISO/IEC 17025 versión vigente, documento que describe al detalle los requisitos generales para la competencia, imparcialidad y operación coherente de los laboratorios de ensayo. La acreditación de ensayos bajo esta norma confirma o reconoce la competencia técnica del laboratorio y la capacidad de este para generar resultados confiables. Esta norma incluye dentro de sus disposiciones: **Requisitos generales** (imparcialidad y confidencialidad); **requisitos relativos a la estructura**; **requisitos relativos a los recursos** (personal, instalaciones y condiciones ambientales, equipamiento, trazabilidad metrológica, productos y servicios suministrados externamente); **requisitos del proceso** (ofertas y contratos, selección, verificación y validación de métodos, muestreo, manipulación de los ítems de ensayo, registros técnicos, evaluación de la incertidumbre de la medición, aseguramiento de la validez de los resultados, informes de resultados, quejas, trabajo no conforme, control de los datos y gestión de la información) y **requisitos del sistema de gestión** alineado con los requisitos de la norma ISO 9001 (control de registros, acciones para abordar riesgos y oportunidades, mejora, acciones correctivas, auditorías internas y revisiones por la dirección).

En el proceso de acreditación, una entidad independiente o de tercera parte, evalúa la capacidad técnica del laboratorio mediante la verificación de los criterios descritos por la norma, el cumplimiento de estos genera como resultado el reconocimiento oficial del laboratorio frente a sus usuarios relacionando aquellos métodos de ensayo para los cuales cumple con la competencia técnica.

12. Referencias bibliográficas

- [1] Ministerio de La Protección Social, *Decreto 1575. Mayo 9 de 2007.*
- [2] Ministerio de la Protección Social y Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, *Resolución 2115. 22 de Junio de 2007.*
- [3] World Health Organization (WHO), “Agua. Datos y cifras,” *14 de Junio de 2019.* <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>.
- [4] A. Pruss-Ustun and C. Corvalan, “Ambientes saludables y prevención de enfermedades,” *Ginebra: OMS,* 2006. https://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/prevdiseexecsumsp.pdf?ua=1.
- [5] E. Machdar, N. P. Van der Steen, L. Raschid-Sally, and P. N. L. Lens, “Application of Quantitative Microbial Risk Assessment to analyze the public health risk from poor drinking water quality in a low income area in Accra, Ghana,” *Sci. Total Environ.*, vol. 449, pp. 134–142, 2013, doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.048.
- [6] Instituto Nacional de Salud, “Carga de enfermedad ambiental en Colombia,” *Informe Técnico Especial 10*, 2018. <https://www.ins.gov.co/Direcciones/ONS/Informes/10 Carga de enfermedad ambiental en Colombia.pdf>.
- [7] Organización Mundial de La Salud, “Guías para la calidad del agua de consumo humano. Cuarta edición,” 2018. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272403/9789243549958-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- [8] Gobierno Nacional Republica de Colombia, *Constitución Política de la República de Colombia. 1991.* 1991.
- [9] Gobierno Nacional Republica de Colombia, *Ley 715. Diciembre 21 de 2001.*
- [10] Gobierno Nacional Republica de Colombia, *Ley 009. Enero 24 de 1979.*
- [11] Gobierno Nacional Republica de Colombia, *Ley 142. Julio 11 de 1994.*
- [12] Ministerio de Salud y Protección Social y Ministerio de Vivienda Ciudad y Territorio, *Resolución 622. 20 de Abril de 2020.*
- [13] G. R. González Leal, *Microbiología del agua. Conceptos y aplicaciones*, Primera Ed. Bogotá, Colombia: Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito, 2012.

- [14] World Health Organization (WHO), “Analytical methods for microbiological water quality testing.” https://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/en/9241546301_chap8.pdf.
- [15] Health Canada (HC), “Guidelines for Canadian Drinking Water Quality. Guideline Technical Document. *Escherichia coli*,” *Water Quality and Health Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch*, 2020. www.canada.ca/en/health-canada/services/environmental-workplace-health/reports-publications/water-quality.html%0A.
- [16] IWA, “Assessing microbial safety of drinking water: Improving approaches and methods,” *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving Approaches and Methods*, 2003. https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/9241546301full.pdf?ua=1.
- [17] J. Bartram, “Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety: The Significance of HPCs for Water Quality and Human Health,” *Water Intell. Online*, vol. 12, 2013, doi: 10.2166/9781780405940.
- [18] C. Narciso-Da-Rocha, I. Vaz-Moreira, L. Svensson-Stadler, E. R. B. Moore, and C. M. Manaia, “Diversity and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. in water from the source to the tap,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 1, pp. 329–340, 2013, doi: 10.1007/s00253-012-4190-1.
- [19] J. J. Kelly, N. Minalt, A. Culotti, M. Pryor, and A. Packman, “Temporal variations in the abundance and composition of biofilm communities colonizing drinking water distribution pipes,” *PLoS One*, vol. 9, no. 5, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0098542.
- [20] R. Ruimy *et al.*, “Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences,” *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 44, no. 3, pp. 416–426, 1994, doi: 10.1099/00207713-44-3-416.
- [21] R. R. Colwell, M. T. MacDonell, and . DE Ley, “Proposal to Recognize the Family *Aeromonadaceae* fam,” *Int. J. Syst. Bacteriol.*, no. July, pp. 473–477, 1986.
- [22] A. Fernández-Bravo and M. J. Figueras, *An update on the genus Aeromonas: Taxonomy, epidemiology, and pathogenicity*, vol. 8, no. 1. 2020.
- [23] J. M. Janda and S. L. Abbott, “Evolving Concepts Regarding the Genus *Aeromonas* : An Expanding Panorama of Species, Disease Presentations, and Unanswered Questions ,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 27, no. 2, pp. 332–344, 1998, doi: 10.1086/514652.

- [24] Federation Water Environmental and American Public Health Association, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd ed. Washington, DC. USA: American Public Health Association (APHA), 2017.
- [25] J. Y. Rodríguez *et al.*, “Meloidosis en Colombia, descripción de un caso clínico y consideraciones epidemiológicas,” *Biomédica*, vol. 39, pp. 10–18, 2019, doi: 10.7705/biomedica.v39i3.4534.
- [26] P. M. F. J. Koenraad, F. M. Rombouts, and S. H. W. Notermans, “Epidemiological aspects of thermophilic *Campylobacter* in water-related environments: A review,” *Water Environ. Res.*, vol. 69, no. 1, pp. 52–63, 1997.
- [27] T. Pitkänen, “Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 95, no. 1, pp. 39–47, 2013.
- [28] J. A. Frost, “Current epidemiological issues in human campylobacteriosis,” *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.*, no. 30, pp. 85–95, 2001.
- [29] M. Ha *et al.*, “Detection and Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and Analysis of Indicator Organisms in Three Waterborne Outbreaks in Finland,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 3, pp. 1391–1396, 2003, doi: 10.1128/AEM.69.3.1391.
- [30] D. J. Bopp *et al.*, “Detection, Isolation, and Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* Associated with a Large Waterborne Outbreak,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 1, pp. 174–180, 2003, doi: 10.1128/JCM.41.1.174.
- [31] K. Stanley, R. Cunningham, and K. Jones, “Isolation of *Campylobacter jejuni* from groundwater,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 85, no. 1, pp. 187–191, 1998, doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00494.x.
- [32] C. H. Bolster, S. L. Walker, and K. L. Cook, “Comparison of *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* Transport in Saturated Porous Media,” *J. Environ. Qual.*, vol. 35, no. 4, pp. 1018–1025, 2006, doi: 10.2134/jeq2005.0224.
- [33] J. Vila Estapé and Y. Zboromyrska, “Brotos epidémicos causados por *Escherichia coli* diarreagénicas,” *Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 35, no. 2, pp. 89–93, 2012, doi: 10.1016/j.gastrohep.2011.10.007.
- [34] A. Larson *et al.*, “Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in drinking water samples from rural andean households in Cajamarca, Peru,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 100, no. 6, pp. 1363–1368, 2019, doi: 10.4269/ajtmh.18-0776.

- [35] G. A. Ngwa, R. Schop, S. Weir, C. G. León-Velarde, and J. A. Odumeru, "Detection and enumeration of *E. coli* O157: H7 in water samples by culture and molecular methods," *J. Microbiol. Methods*, vol. 92, no. 2, pp. 164–172, 2013, doi: 10.1016/j.mimet.2012.11.018.
- [36] F. J. Vesga, Y. Moreno, M. A. Ferrús, C. Campos, and A. A. Trespalacios, "Detection of *Helicobacter pylori* in drinking water treatment plants in Bogotá Colombia, using cultural and molecular techniques," *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 221, no. 4, pp. 595–601, 2018, doi: 10.1016/j.ijheh.2018.04.010.
- [37] K. F. Boehnke *et al.*, "An assessment of drinking water contamination with *Helicobacter pylori* in Lima, Peru," *Helicobacter*, vol. 23, no. 2, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1111/hel.12462.
- [38] P. Santiago, Y. Moreno, and M. A. Ferrús, "Identification of Viable *Helicobacter pylori* in Drinking Water Supplies by Cultural and Molecular Techniques," *Helicobacter*, vol. 20, no. 4, pp. 252–259, 2015, doi: 10.1111/hel.12205.
- [39] F. Vesga, Y. Moreno, M. A. Ferrús, L. M. Ledesma-Gaitan, C. Campos, and A. A. Trespalacios, "Correlation among fecal indicator bacteria and physicochemical parameters with the presence of *Helicobacter pylori* DNA in raw and drinking water from Bogotá, Colombia," *Helicobacter*, vol. 24, no. 3, 2019.
- [40] Centers for disease control and prevention, "Legionella (Legionnaires' Disease and Pontiac Fever)," *April 30, 2018*, 2018. <https://www.cdc.gov/legionella/index.html>.
- [41] A. M. Correia, J. Gonçalves, and J. P. Gomes, "Probable person-to-person transmission of Legionnaires' disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 374, no. 5, pp. 497–498, 2016, doi: 10.1056/NEJMc1505356.
- [42] Organización Mundial de la Salud, "Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control," 2008. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/WHO-Guia-Lepto-2003-Spa.pdf>.
- [43] Instituto Nacional de Salud, "Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica 15," *5 al 11 de Abril de 2020*. https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020_Boletin_epidemiologico_semana_15.pdf.
- [44] Centers for disease control and prevention, "Leptospirosis," 2019. <https://www.cdc.gov/leptospirosis/index.html>.
- [45] H. P. Loveday, J. A. Wilson, K. Kerr, R. Pitchers, J. T. Walker, and J. Browne, "Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa*

- infections: A rapid systematic review,” *J. Hosp. Infect.*, vol. 86, no. 1, pp. 7–15, 2014, doi: 10.1016/j.jhin.2013.09.010.
- [46] W. L. I. David Greenwood, Richard C B Slack, Michael R. Barer, *Medical Microbiology E-Book: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control*. Elsevier Health Sciences, 2012.
- [47] M. H. Matthias Trautmann, Philipp Lepper, “Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism,” *Am. J. Infect. Control*, vol. 33, no. 5, pp. S41–S49, 2005.
- [48] J. De Victorica and M. Galván, “*Pseudomonas aeruginosa* as an indicator of health risk in water for human consumption,” *Water Sci. Technol.*, vol. 43, no. 12, pp. 49–52, 2001, doi: 10.2166/wst.2001.0710.
- [49] E. J. Bottone, “*Yersinia enterocolitica*: The charisma continues,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 10, no. 2, pp. 257–276, 1997, doi: 10.1128/cmr.10.2.257.
- [50] M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville, *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed. Washington, DC. USA: American Society for Microbiology Press., 2001.
- [51] J. P. Falcão, M. Brocchi, J. L. Proença-Módena, G. O. Acrani, E. F. Corrêa, and D. P. Falcão, “Virulence characteristics and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia* other than *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* isolated from water and sewage,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 96, no. 6, pp. 1230–1236, 2004, doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02268.x.
- [52] K. E. Page, “Cholera: mechanism of infection, history and treatment,” *J Mol Med*, vol. 5, pp. 26–29, 2004.
- [53] M. Ali, A. R. Nelson, A. L. Lopez, and D. A. Sack, “Updated global burden of cholera in endemic countries,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 9, no. 6, pp. 1–13, 2015, doi: 10.1371/journal.pntd.0003832.
- [54] WHO, “Weekly Epidemiological Record, 21 September 2018,” *Wkly. Epidemiol. Rec.*, vol. 93, no. 38, pp. 489–500, 2018, [Online]. Available: <http://www.who.int/wer>.
- [55] J. D. Oliver, “Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 34, no. 4, pp. 415–425, 2010, doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x.
- [56] J. Oliver, “The viable but nonculturable state in bacteria,” *J. Microbiol.*, vol. 43, pp.

93–100, 2005.

- [57] D. Mendes Silva and L. Domingues, “On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on PCR-based methods,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 113, pp. 400–411, 2015, doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.12.015.
- [58] T. Garcia-Armisen and P. Servais, “Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 58, no. 2, pp. 269–279, 2004.
- [59] B. Buysschaert, L. Vermijs, A. Naka, N. Boon, and B. De Gussemé, “Online flow cytometric monitoring of microbial water quality in a full-scale water treatment plant,” *npj Clean Water*, vol. 1, no. 1, pp. 1–7, 2018, doi: 10.1038/s41545-018-0017-7.
- [60] S. Van Nevel *et al.*, “Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring,” *Water Res.*, vol. 113, pp. 191–206, 2017, doi: 10.1016/j.watres.2017.01.065.
- [61] Instituto Nacional de Salud, “Manual de Instrucciones para la toma, preservación y transporte de muestras de agua de consumo humano para análisis de Laboratorio,” 2011. [https://www.ins.gov.co/sivicap/Documentacin SIVICAP/2011 Manual toma de muestras agua.pdf](https://www.ins.gov.co/sivicap/Documentacin%20SIVICAP/2011%20Manual%20toma%20de%20muestras%20agua.pdf).
- [62] Instituto Nacional de Salud, “Manual de procedimientos para la toma, conservación y envío de muestras al Laboratorio Nacional de Referencia,” 2019. [https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/Manual-toma-envio-muestras-ins.pdf#search=Resolución 1646](https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/Manual-toma-envio-muestras-ins.pdf#search=Resolución%201646).
- [63] Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC), “NTC/ISO IEC 17025. Requisitos Generales de competencia de Laboratorios de Ensayo y Calibración,” 2017.
- [64] WHO, *Laboratory biosafety manual Third edition World Health Organization*. 2004.
- [65] U.S. Department of Health and Human Services, *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th ed. Centers for Disease Control and Prevention, 2009.
- [66] Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC), “GTC 82. Guía de buenas prácticas para laboratorios que realizan muestreo y análisis de agua,” 2002. <https://tienda.icontec.org/>.
- [67] International Organization for Standardization, “ISO 13843. Water quality - Requirements for establishing performance characteristics of quantitative

microbiological methods.," 2017. <https://www.iso.org/standard/62979.html>.

FIN DEL DOCUMENTO

ANEXO 1. Criterios de calidad bacteriológico en diferentes países

País	Norma de referencia	Coliformes totales	<i>E. coli</i>	Coliformes fecales	Bacterias heterótrofas	Otros
Colombia	Resolución 2115 de 2007	0 UFC/100 ml <1 microorganismo en 100 ml ó ausencia en 100 ml	0 UFC/100 ml <1 microorganismo en 100 ml ó ausencia en 100 ml	-	Máximo 100 UFC/100 ml	-
México	NOM-127-SSA1-1994 ^a	Máximo 2NMP/100ml O 2 UFC/100ml	-	No detectable NMP/100ml ó 0 UFC/100ml	-	-
Estados Unidos	EPA 816-F-09-004. Mayo 2009	5% ^b	cero	Cero	Se sugiere su monitoreo como control de contaminación en agua	<i>Legionella spp.</i> : Cero
Brasil	Portaria N.º 2.914. 2011	5% ^c	Agua para consumo, a la salida del tratamiento y en sistemas de distribución: Ausencia/100ml	-	-	-

Venezuela	Resolución N° SG 018 98 de 1998	5% ^d	-	ausencia en todas las muestras de 100ml	Máximo 100 UFC/100ml	-
Uruguay	UNIT N° 833:2008	ausencia en 100 ml	Ausencia en 100 ml (Coliformes fecales o <i>E. coli</i>)	ausencia en 100 ml (Coliformes fecales o <i>E. coli</i>)	Máximo 500 UFC/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : ausencia en 10 ml <i>Enterococos</i> y Clostridios sulfito reductores: ausencia en 100 ml
Uganda	US 201:2008	ausencia en 100 ml ^f	Ausencia en 100 ml		Recuento a 22°C: máx 100/ml Recuento a 37°C: máx 50/ml	<i>Staphylococcus aureus</i> , Anaerobios sulfito reductores, <i>P. aeruginosa</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Shigella</i> y <i>Salmonella</i> : Ausencia en 100ml de muestra.
Sudáfrica	SANS241:2011	< 10 /100ml	ausencia en 100 ml	ausencia en 100 ml	< 1000 /ml	-

		(control operacional)			(control operacional)	
Comunidad europea	Directiva 98/83/CE (España: Real Decreto 140/2003)	0 UFC/100 ml	0 UFC/100 ml	-	.	Enterococos 0 UFC/100 ml Clostridium perfringens (incluidas esporas) 0 UFC/100 ml
Australia	Australian Drinking-water Guidelines 6 2011	-	Ausencia en 100 ml	ausencia en 100 ml	-	
Japón	Drinking water Quality Standards - 2010	-	Ausencia en 100 ml	-	100/ml	-

- A la fecha se está elaborando un proyecto de norma para su actualización, donde se destaca el cambio de monitoreo de organismos coliformes totales únicamente a monitoreo de coliformes fecales o termo tolerantes con límite permisible <1 UFC/100ml, <1.0 NMP/100ml o ausencia según el método empleado.
- No más del 5% de las muestras analizadas mensualmente. Para sistemas de agua que recolectan menos de 40 muestras rutinariamente por mes, no más de una muestra puede resultar positiva para coliformes al mes. Todas las muestras que resulten positivas para coliformes totales deben ser analizadas para determinar E. coli y/o coliformes fecales. Si hay dos muestras consecutivas caracterizadas como positivas para coliformes totales y alguna de ellas confirma como E. coli o coliforme fecal positivo el sistema tiene una violación al nivel máximo permitido de contaminantes.
- Sistemas o soluciones alternativas colectivas que abastecen menos de 20.00 habitantes: coliformes totales. Valor máximo permitido para Máximo una muestra positiva al mes con resultado positivo // Sistemas o soluciones

alternativas colectivas que abastecen más de 20.00 habitantes: coliformes totales. Valor máximo permitido Ausencia en el 95% de las muestras analizadas mensualmente

- d. 95% de las muestras de 100 ml analizadas en red de distribución deben ser negativas por un periodo de 12 meses consecutivos
- e. No se considera viable detectar coliformes totales en dos muestras consecutivas en 100 ml provenientes del mismo sitio
- f. En agua potable entrando al sistema de distribución: ausencia de coliformes totales y *E. coli*. Agua potable en el sistema de distribución: aceptable máximo 5% de muestras positivas analizadas anualmente, asegurando ausencia en dos muestras consecutivas. En suministros sin tubería se aceptan resultados hasta de 10 microorganismos coliformes en 100 ml, pero el resultado para *E. coli* debe ser ausencia en el mismo volumen. En caso de emergencia, el agua que se suministre debe tener ausencia de coliformes totales y *E. coli*.

Fuentes:

- México: <http://www.agrolab.com.mx/sitev002/sitev001/assets/nom-127-ssa1-1994.pdf>. 01-18-96 NORMA Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- USEPA. EPA 816-F-09-004. Mayo 2009. https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-06/documents/npwdr_complete_table.pdf
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n.º 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 14 de dezembro de 2011. http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp_doctos/kit_arsesp_portaria2914.pdf
- Venezuela. <https://www.lurconsultores.com/wp-content/uploads/2018/10/Resoluci%C3%B3n-SG-018-98-Agua-potable.pdf>
- Uruguay. http://www.ose.com.uy/descargas/Clientes/Reglamentos/unit_833_2008_.pdf
- Uganda: https://members.wto.org/crnattachments/2015/TBT/UGA/15_0152_00_e.pdf
- SouthAfrica. <https://store.sabs.co.za/pdfpreview.php?hash=d3d0b4e624a31e2a7a68cf1a3f4fb181b864dcdf&preview=yes>
- España. <https://www.boe.es/buscar/pdf/2003/BOE-A-2003-3596-consolidado.pdf>

- Australia. <https://www.nhmrc.gov.au/about-us/publications/australian-drinking-water-guidelines>
- Comunidad europea: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0083&from=EN>
- Japón. https://www.mhlw.go.jp/english/policy/health/water_supply/4.html
- A global overview of national regulations and standards for drinking-water quality. https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/national-regulations-and-standards-for-drinking-water-quality/en/

Anexo 2. Tablas de interpretación número más probable con tubo múltiple

Número de tubos positivos	Índice de NMP/100mL	Límites de confianza 95%	
		Inferior	Superior
0	< 1.1	-	3.5
1	1.1	0.051	5.4
2	2.6	0.4	8.4
3	4.6	1	13
4	8.0	2.1	23
5	> 8.0	3.4	-

Índice de NMP y límites de confianza al 95% para todas las combinaciones posibles de resultados positivos y negativos cuando se inoculan 5 porciones de 20 ml cada una.

Fuente: SM (2017) Tabla 9221 II.

Número de tubos positivos	Índice de NMP/100mL	Límites de confianza 95%	
		Inferior	Superior
0	< 1.1	-	3.4
1	1.1	0.051	5.9
2	2.2	0.37	8.2
3	3.6	0.91	9.7
4	5.1	1.6	13
5	6.9	2.5	15
6	9.2	3.3	19
7	12	4.8	24
8	16	5.8	34
9	23	8.1	53
10	> 23	13	-

Índice de NMP y límites de confianza al 95% para todas las combinaciones posibles de resultados positivos y negativos cuando se inoculan 10 porciones de 10 ml cada una.

Fuente: SM (2017) Tabla 9221 III.

Combinación de tubos positivos			Índice de NMP/100mL	Límites de confianza 95%	
				Inferior	Superior
0	0	0	< 1.8	-	6.8
0	0	1	1.8	0.090	6.8
0	1	0	1.8	0.090	6.9
0	1	1	3.6	0.7	10
0	2	0	3.7	0,7	10
0	2	1	5.5	1.8	15
0	3	0	5.6	1.8	15
1	0	0	2.0	0.10	10
1	0	1	4.0	0.70	10
1	0	2	6.0	1.8	15
1	1	0	4.0	0.71	12
1	1	1	6.1	1.8	15
1	1	2	8.1	3.4	22
1	2	0	6.1	1.8	15
1	2	1	8.2	3.4	22
1	3	0	8.3	3.4	22
1	3	1	10	3.5	22
1	4	0	11	3.5	22
2	0	0	4.5	0.79	15
2	0	1	6.8	1.8	15
2	0	2	9.1	3.4	22
2	1	0	6.8	1.8	17
2	1	1	9.2	3.4	22
2	1	2	12	4.1	26
2	2	0	9.3	3.4	22
2	2	1	12	4.1	26
2	2	2	14	5.9	36
2	3	0	12	4.1	26
2	3	1	14	5.9	36
2	4	0	15	5.9	36
3	0	0	7.8	2.1	22
3	0	1	11	3.5	23
3	0	2	13	5.6	35
3	1	0	11	3.5	26
3	1	1	14	5.6	36
3	1	2	17	6.0	36
3	2	0	14	5.7	36
3	2	1	17	6.8	40
3	2	2	20	6.8	40
3	3	0	17	6.8	40
3	3	1	21	6.8	40
3	3	2	24	9.8	70
3	4	0	21	6.8	40
3	4	1	24	9.8	70
3	5	0	25	9.8	70
4	0	0	13	4.1	35
4	0	1	17	5.9	36
4	0	2	21	6.8	40

Combinación de tubos positivos			Índice de NMP/100mL	Límites de confianza 95%	
				Inferior	Superior
4	0	3	25	9.8	70
4	1	0	17	6.0	40
4	1	1	21	6.8	42
4	1	2	26	9.8	70
4	1	3	31	10	70
4	2	0	22	6.8	50
4	2	1	26	9.8	70
4	2	2	32	10	70
4	2	3	38	14	100
4	3	0	27	9.9	70
4	3	1	33	10	70
4	3	2	39	14	100
4	4	0	34	14	100
4	4	1	40	14	100
4	4	2	47	15	120
4	5	0	41	14	100
4	5	1	48	15	120
5	0	0	23	6.8	70
5	0	1	31	10	70
5	0	2	43	14	100
5	0	3	58	22	150
5	1	0	33	10	100
5	1	1	46	14	120
5	1	2	63	22	150
5	1	3	84	34	220
5	2	0	49	15	150
5	2	1	70	22	170
5	2	2	94	34	230
5	2	3	120	36	250
5	2	4	150	58	400
5	3	0	79	22	220
5	3	1	110	34	250
5	3	2	140	52	400
5	3	3	170	70	400
5	3	4	210	70	400
5	4	0	130	36	400
5	4	1	170	58	400
5	4	2	220	70	440
5	4	3	280	100	710
5	4	4	350	100	710
5	4	5	430	150	1100
5	5	0	240	70	710
5	5	1	350	100	1100
5	5	2	540	150	1700
5	5	3	920	220	2600
5	5	4	1600	400	4600
5	5	5	> 1600	700	-

Índice de NMP y límites de confianza al 95% para todas las combinaciones posibles de resultados positivos y negativos cuando se inoculan 5 tubos por dilución (10 ml, 1,0 ml y 1,0 ml).

Fuente: SM (2017) Tabla 9221 IV.

Anexo 3. Acta de toma de muestras

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO REDES EN SALUD PÚBLICA	ACTA DE TOMA DE MUESTRAS DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO PARA ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO	Versión: 00 Página 01 de 01
--	---	--	------------------------------------

ACTA No. _____

INFORMACIÓN DEL REMITENTE (Esta información la diligencia el responsable de la solicitud del servicio)

Institución remitente		
Municipio / Departamento		
Dirección		
Contacto	Nombre	
	Teléfono	
	e-mail	

INFORMACIÓN GENERAL DE LA MUESTRA (Esta información la diligencia el responsable de la solicitud del servicio)

Nombre del punto de toma de muestra (a)					
Dirección del punto de toma de muestra (b)					
Fecha de toma de muestra (AAAA-MM-DD)			Hora de toma (formato 24 horas)		
Toma de muestra con torunda (si aplica)		Inicio: _____ Fin: _____			
Código asignado por el solicitante					
Matriz (Agua)	Consumo humano	Natural superficial	Natural subterránea	Otra:	
Tipo de muestra	Simple	Puntual	Compuesta	Integrada	
Parámetros evaluados <i>in situ</i>	Cloro residual libre ____ mg Cl ₂ /L		pH ____	Otro: _____	
Esterilidad del recipiente en el que se toma la muestra (c)	Recipiente de vidrio de borosilicato con cinta indicadora ____		Recipiente de plástico (esterilidad comercial o con cinta indicadora) ____		
Preservación de la muestra (d)					
Número de recipientes	Volumen (mL) (e)				
Responsable de la toma de muestra					
Identificación del responsable de toma de muestra			Firma _____		
Objeto del análisis	Vigilancia ____	Diagnóstico ____	Control ____	Otra: ____	
Ensayos solicitados (f)	Coliformes totales	<i>Escherichia coli</i>	Otro: _____		
Método de ensayo (g)	Sustrato enzimático cualitativo	Sustrato enzimático cuantitativo	Filtración por membrana		
Responsable de la entrega de la muestra					
Identificación del responsable de la entrega de la muestra			Firma _____		
Observaciones					

a Ubicación general. Ej: Nacimiento quebrada El Dorado

b Ubicación espacial precisa. Puede ser dirección convencional, alternativa o georreferenciación

Cuando se tomen muestras para análisis microbiológico en recipientes de vidrio de borosilicato, deben estar esteriles y presentar marcas que evidencien dicha esterilidad, como la cinta testigo de autoclave. En caso de

c tomar la muestra en recipiente plástico comercial, debe adjuntar copia del certificado de esterilidad del lote de los recipientes empleados.

Si la muestra es agua para consumo humano tratada con cloro, registrar la cantidad de tiosulfato de sodio empleado. Para este caso el recipiente estéril en el que se va a recolectar el agua deberá contener 0,5 mL de

d tiosulfato de sodio al 10% por cada 100 mL de muestra. Las muestras deben ser almacenadas hasta su análisis a una temperatura <10 °C sin llegar a congelación. El transporte de la muestra se debe realizar entre 2 y 8 °C. El tiempo máximo entre la toma de la muestra y el análisis son 30 horas.

El volumen mínimo de la muestra recolectada debe ser de 250 mL, sin embargo se sugiere tomar un volumen mayor de manera que se cuente con material disponible para ejecutar el ensayo directo, con duplicado y

contar con una contramuestra de respaldo. Esta indicación no aplica para la matriz PICCAP ya que la solución que llega al laboratorio tiene indicaciones especiales de preparación al volumen definido por el fabricante del

e ítem de ensayo. IMPORTANTE: Las muestras deben tener un espacio de aire de por lo menos 1 pulgada (2,54 cm) entre la tapa y la superficie de la muestra, manteniendo el medio oxigenado y favoreciendo su posterior agitación.

f Marque con una X el ensayo solicitado.

Seleccionar el método de referencia que desea. Para determinación de coliformes totales y *E. coli* por técnica de sustrato definido basado en el método de referencia 9223 del Standard Methods for the Examination of

g Water and Wastewater, unidades de reporte presencia, ausencia o NMP/100mL marque SM 9223. Para determinación de coliformes totales y *E. coli* por técnica de filtración por membrana basado en el método de referencia norma ISO 9308-1: 2014, unidades de reporte UFC/100mL marque ISO 9308-1:2014.

El documento aquí presentado puede variar de versión y contenido según las disposiciones internas del Instituto Nacional de Salud, por lo que es necesario que se realice la solicitud oficial del documento en versión vigente previo envío de la muestra. Para ello comuníquese con el Grupo de Microbiología de la DRSP.

ANEXO 4. Prácticas asociadas al control de calidad

ÍTEM	ACCIÓN	FRECUENCIA
Aire en área de trabajo	Monitoreo de densidad bacteriana	Mensual
Autoclaves	Verificar temperatura con un dispositivo de registro máximo	Semanal
	Verificar desempeño con un bioindicador	Mensual
	Verificar tiempo	Trimestral
Balanzas	Verificar cero	Diaria, antes de cada uso
	Verificar exactitud con al menos 2 pesos *	Ver el documento de referencia
	Recalibrar	Mensual (De preferencia)
Cabinas de bioseguridad	Inspeccionar flujo de aire	Cada uso
	Certificar	Anual
Conductímetro	Calibrar	Mensual
Botellas de dilución de agua	Verificar esterilidad, pH y volumen	Cada lote
Congeladores	Verificar temperatura	Diaria
	Descongelar	Anual
Material de vidrio	Inspeccionar limpieza y grabado	Cada uso
	Verificar pH con azul de bromotímol	Cada lote lavado
	Realizar prueba de residuos inhibitorios	Previo uso inicial o nuevos procesos de lavado
	Realizar prueba de autofluorescencia	Cada lote
Horno de esterilización con aire caliente	Verificar temperatura	Cada uso
	Verificar desempeño con un bioindicador	Mensual
Incubadoras	Verificar temperatura	Dos veces al día cuando está en uso
	Verificar esterilidad, pH y apariencia	Cada lote
Medios	Verificar desempeño con cultivos de control positivos y negativos	Cada lote
	Verificar recuperación del medio nuevo Vs medio anterior	Cada lote
Sistemas de dispensación de medios	Verificar exactitud del volumen de dispensación	Cada cambio de volumen
Filtros de membrana	Verificar esterilidad y propiedades	Cada lote
Equipos de filtración de membrana	Verificar ausencia de fugas y rayones en la superficie	Cada uso
	Verificar esterilidad	Pre y post ejecución de los ensayos
	Verificación de volumen (100 mL)	Inicial
Micropipetas	Verificación de exactitud y precisión del volumen dispensado	Trimestral o con mayor frecuencia si el uso es constante
	Calibrar	Anual
Microscopios	Limpieza de sistema óptico, plataforma y verificación de alineación	Cada uso
Dispositivos multi pozo	Verificación de desempeño	Mensual
pHmetro	Estandarizar con al menos dos soluciones buffer	Cada uso
	Determinar la pendiente	Diaria
Recuento en placa	Analizar el desempeño de los duplicados	Mensual
	Repetir conteo	Mensual
Agua grado reactivo	Monitoreo de calidad	Ver el documento de referencia
Refrigerador	Verificación de temperatura	Diaria
Botellas para toma de muestras	Verificación de esterilidad	Cada lote
	Verificación de eficiencia del agente de descloración	Cada lote
	Verificación de línea de 100 mL	Cada lote
	Verificación de ausencia autofluorescencia (si se emplean para ensayos)	Cada lote
Sistemas de monitoreo de temperatura	-	-
Unidades de trabajo	Verificación de exactitud	Anual
Unidades de referencia	Recertificar	Cada 5 años
Timer	-	-
Autoclaves	Verificación del tiempo con cronómetro	Trimestral
Cronómetros	Verificación frente a un control nacional horario	Anual
Lámparas UV, onda corta	Monitoreo de uso de la lámpara	Cada uso
Desinfección	Evaluación con medidor de luz UV o verificación con exposición de placa	Trimestral
Pesos	-	-
Trabajo	Verificación con pesos de referencia	Ver el documento de referencia
Referencia	Recertificación	Anual

* Se recomienda usar pesos dentro del rango de trabajo

Fuente: SM (2017)