

VALIDACIÓN SECUNDARIA DE LA TÉCNICA FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA EVALUAR LA REMOCIÓN DE *Escherichia coli* EN MUESTRAS DE AGUAS SINTÉTICAS DESINFECTADAS CON FILTROS CASEROS EKOFIL Y EKOFIL PLUS

IVÁN MARTINEZ RIVERA¹LILIANA JANETH FLÓREZ, ESTADÍSTICA²,
ANDREA PEREZ VIDAL, INGENIERA SANITÁRIA³ SANDRA PATRICIA
RIVERA, BACTERIOLOGA⁴

RESUMEN

Introducción: Con el fin de contribuir en la competencia para que laboratorio de la universidad Santiago de Cali pueda obtener certificaciones futuras en sus técnicas microbiológicas y con el apoyo de nuevas tecnologías de desinfección y tratamiento de agua proporcionadas por la micro empresa REPLACOL con sus dos modelos de filtros caseros de olla cerámica impregnado de plata coloidal (EKOFIL) y reforzado en su interior con una columna de carbón activado granular, también impregnada de plata coloidal (EKOFIL PLUS), diseñados para eliminar partículas suspendidas en el agua incluyendo microorganismos, se busco como **Objetivo:** realizar la validación secundaria de la técnica filtración por membrana para evaluar la remoción de *Escherichia coli* en muestras de aguas sintéticas provenientes de filtros caseros EKOFIL Y EKOFIL PLUS. **Métodos:** Los experimentos se realizaron en los laboratorios de la universidad Santiago de Cali. El diseño planteado es un estudio de tipo experimental basado en los parámetros estadísticos establecidos en los lineamientos de la USP40, Invima y la ISO 17025, para determinar la reproducibilidad, repetibilidad, exactitud y precisión del método. Para la evaluación de la remoción de los filtros caseros se empleó un agua sintética inoculada con cepa de *E. coli* ATCC 25922 a una concentración de 10^3 UFC/mL; y se evaluó mediante el método microbiológico filtración por membrana; se utilizó una ANOVA para el análisis de los resultados. **Resultados:** La validación secundaria del método de filtración por membrana, permitió obtener resultados reproducibles y confiables, en cuanto a la remoción de los filtros se encontró que estadísticamente los filtros logran remover *E.coli* de las muestras de agua.

Discusión: Tanto el medio de cultivo y utilizado como las técnicas empleadas en cada una de las fases de la validación cumplieron a cabalidad con lo estipulado por algunos autores, lineamientos y guías técnicas para la validación de métodos, a pesar de que existieron algunos datos atípicos, estos no fueron relevantes estadísticamente.

Conclusión: Se entregó el método microbiológico validado de filtración por membrana para la determinación de *Escherichia coli* en una matriz de agua sintética obteniéndose resultados precisos y exactos en base a la repetibilidad y reproducibilidad.

Palabras claves: Validación, *E.coli*, calidad sanitaria, filtración, filtros caseros.

SECONDARY VALIDATION OF THE MEMBRANE FILTRATION TECHNIQUE TO EVALUATE THE REMOVAL OF *Escherichia coli* IN DISINFECTED SYNTHETIC WATER SAMPLES WITH EKOFIL AND EKOFIL PLUS HOME FILTERS.

SUMMARY

Introduction: In order to contribute with the competence so that the laboratory of the Santiago de Cali University can obtain certifications in its techniques and the support of the new technologies of disinfection and the treatment of the answers provided by the REPLACOL microenterprise with its two models of homemade ceramic pot filters impregnated with colloidal silver (EKOFIL) and reinforced inside with a column of granular activated carbon, also impregnated with colloidal silver (EKOFIL PLUS), in order to eliminate suspensions in water, microorganisms, it was searched **Objective:** the secondary validation of the technique through the membrane to evaluate the removal of *Escherichia coli* in samples of synthetic waters from home filters EKOFIL AND EKOFIL PLUS **Methods:** The experiments are carried out in the laboratories of the Santiago University From Cali. The design of the plant is an experimental study based on the statistical parameters established in the guidelines of the USP40, Invima and ISO 17025, to determine the reproducibility, repeatability, accuracy and precision of the method. For the evaluation of the removal of the homemade filters of synthetic water inoculated with strain of *E. coli* ATCC 25922 at a concentration of 10^3 CFU / mL; and was evaluated by the microbiological method of membrane filtration; An ANOVA is used for the analysis of the results. Results: The secondary validation of the membrane connection method, the follow-up of the reproducible and reliable results, regarding the removal of the filters.

Discussion: Both the culture medium and the techniques used in each of the validation phases were fulfilled with the legend of the authors, guidelines and technical guides for the validation of the methods, despite the existence of some atypical data,

these were not statistically relevant. **Conclusion:** The microbiological method was included. Validated one way for a determination of *Escherichia coli* in a synthetic water matrix obtaining precise and accurate results based on the repeatability and reproducibility.

Key words: Validation, E. coli, sanitary quality, filtration, home filters.

1. Estudiante de microbiología , Universidad Santiago de Cali , Cali Colombia, ivanmr8739@gmail.com
2. MSc Epidemiología, Universidad del Valle, Cali, Colombia. e-mail: liflorez27@hotmail.com
3. Ingeniera Sanitaria, Universidad Santiago de Cali, Cali Colombia, andreaperezvidal@hotmail.com
4. MSc Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Sandra Patricia82@gmail.com

El agua es la principal fuente de vida en nuestro planeta y es quizás el recurso más importante para todas las formas de vida que allí habitan, pero no solo es sinónimo de vida, sino también de limpieza, sus usos son tan variables y beneficiosos que puede ser utilizada para diferentes actividades, dentro de las cuales está el lavado de materiales, materia prima para la elaboración de bebidas y medicamentos(1). Al ser un compuesto tan esencial y tan altamente utilizado, los suministros naturales de agua cada vez están siendo más limitados ,a medida que las poblaciones humanas aumentan, también crecen la cantidad de residuos contaminantes que al estar dispuestos en el medio ambiente afectan directamente la calidad del agua potable(2).

En Colombia las zonas rurales son las más desfavorecidas en cuanto al consumo de agua potable , donde el 64 % del agua suministrada se cataloga entre riesgo alto y el (45%) es inviable sanitariamente, a diferencia de la zona urbana en la que solo el 16 % se clasifica entre riesgo alto (3). Estas cifras nos indican que la calidad de agua para consumo humano en áreas rurales del país es en promedio deficiente comparada con la calidad del agua en áreas urbanas lo que induce a que sean más representativos los casos de enfermedad diarreica aguda (EDA) en la población rural. Se cree que el consumo de agua contaminada es tal vez el factor más importante en la transmisión de *E. coli* entero patógena uno de los principales microorganismos que produce EDA(4). Cifras del Instituto Nacional de Salud en el año 2016 mostraron que el 28 por ciento de la población rural enfrentó una situación crítica por la falta de acueducto, por lo que miles de personas se vieron obligadas a consumir agua de afluentes cercanos como pozos y ríos, exponiéndose así a diferentes enfermedades resaltando las de origen gastrointestinal(5). Para Mayo de 2018 el IRCA (Índice de riesgo de la calidad de agua para consumo humano) clasificó los 32 departamentos de Colombia según su clase de riesgo; El **15,6%** se clasificaron en **nivel sin riesgo**, El 25.0% se clasificaron en nivel de riesgo bajo, el **47.0%**, se ubicaron en nivel de **riesgo medio** y el **12.5%** en departamentos como (Caldas, Huila, Nariño y Putumayo), se clasificó en un nivel de riesgo alto.

Según clasificación del IRCA, el Valle del Cauca se encuentra entre los departamentos con riesgo bajo y a nivel de sus 42 municipios todos reportaron información sobre la calidad de agua, solo el 33.3 % se clasificó en riesgo alto y el agua del municipio de Cali se ubico en un nivel sin riesgo. A pesar de que la autoridad sanitaria cubrió territorialmente todos los municipios para la toma de muestras, no hubo reporte de algunas zonas rurales(6).

En este orden de ideas los entes que vigilan la calidad del agua, deben incluir dentro de sus reportes, más análisis de muestras de agua provenientes de zonas rurales y los laboratorios que prestan los servicios a la comunidad en el área urbana deben implementar tecnologías y metodologías estandarizadas que le permitan realizar un control de calidad, disminuir los errores y variaciones en los diferentes número de ensayos (validación de métodos), solo así se generan resultados altamente confiables en la vigilancia y detección del los patógenos en el agua, garantizando credibilidad al laboratorio que preste el servicio y seguridad a la comunidad tanto urbana como rural al igual que la inclusión de futuras mejoras en el procesos de tratamiento. No obstante la **validación** también proporciona las competencias acerca de que el laboratorio está capacitado para cumplir las especificaciones establecidas por entes internacionales.

Al encontrarse la relación que existe entre el agua no potable y la EDA, con el transcurso de los años y teniendo como base los recientes estudios en cuanto al conocimiento de la micro flora del agua, se han diseñado técnicas a nivel del laboratorio que permitan identificar y cuantificar los posibles patógenos causantes de enfermedad en el hombre. Una de estas técnicas es NMP (Número más probable) ; técnica que ha sido usada por años para hacer control de calidad del agua potable, aunque actualmente ha sido reemplazada por la técnica Filtración por Membrana (7) por ser altamente reproducible, y obtener resultados en menor tiempo que con NMP(8) además es aceptada y utilizada a nivel nacional e internacional por entes reguladores, debido a su fácil manejo y empleo, de esta manera los laboratorios de análisis y vigilancia del agua que implementen esta técnica contribuyen a que el agua destinada al consumo humano sea de excelente calidad y que su sistema de potabilización es confiable al lograr eliminar la mayor cantidad de organismos contaminantes que pueda llegar a afectar la salud e los consumidores(9).

Muchas investigaciones se han encaminado no solo a identificar y cuantificar patógenos en el agua sino también a eliminarlos. En la actualidad se han desarrollado diferentes sistemas de tratamiento y almacenamiento de agua que han sido probados en condiciones controladas en el laboratorio e implementados en campo para evaluar su capacidad de producir agua potable de calidad microbiológica aceptable, diseñados especialmente para aquellas zonas donde el acceso al agua potable es deficiente(10). Uno de estos sistemas ha

sido la utilización de filtros caseros. Estudios realizados en Colombia especialmente en Choco, Risaralda y Norte de Santander, zonas de difícil acceso al agua potable, se evaluó la remoción de contaminación, mediante filtros impregnados con diferentes concentraciones de plata coloidal. Para todos los casos se presentó una eliminación de *E. coli* entre 99:9 y 100% del agua que paso por filtros impregnados con alguna concentración de plata(11).

En este estudio se validó secundariamente la técnica filtración por membrana para cuantificar *Escherichia coli*, presente en muestras de aguas sintéticas desinfectadas con dos modelos de filtros caseros de olla de cerámica, EKOFIL Y EKOFIL PLUS, operados bajo condiciones controladas de laboratorio.

MÉTODOS

El proyecto de investigación se realizó en las instalaciones de la Universidad Santiago de Cali en los laboratorios de Microbiología y Biotecnología. Los filtros requeridos para el diseño experimental fueron proporcionados por la empresa REPLACOL. Las fases del estudio se dividen de la siguiente manera. Estandarización de la escala de McFarland para la preparación de inoculos, Productividad y selectividad del medio de cultivo utilizado para la validación, Preparación del agua sintética y operación de los filtros y Validación secundaria de la técnica filtración por membrana.

Estandarización de la escala Mcfarland para la preparación del inoculo ; se prepararon 10 mL de una solución de BaCl₂ al 1% o 0,048M y 100 mL de una solución de H₂SO₄ al 1% o al 0,36N. El BaCl₂ es un compuesto altamente tóxico por lo que se debe utilizar todos los elementos de protección personal (incluyendo gafas, tapabocas, bata y guantes de nitrilo). Todo esto se realizó dentro de la cabina de extracción de vapores, en la preparación de los estándares de la escala McFarland, se utilizó una gradilla con 10 tubos de ensayo tapa rosca los cuales se rotularon adecuadamente, con una micro pipeta se agregó a cada tubo la cantidad indicada de BaCl₂, después con una pipeta graduada se agregó a cada tubo la cantidad necesaria de H₂SO₄. Se agito cada tubo para garantizar la uniformidad de la suspensión, se determinó la absorbancia a 620 nm de cada uno de los estándares, con los datos de la absorbancia se obtuvo la curva de calibración y la ecuación de la recta, $Y=mx+b$, la cual es la base para calcular la concentración bacteriana. Anterior a esto con la cepa del cultivo puro de la bacteria *E.coli* ATCC25922, se procedió a realizar un **lavado celular** de acuerdo a los protocolos de Rivera, 2011(12), se transfirió un asa del cultivo del 150 mL de caldo nutriente (Oxoid), se incubó por 18 horas a 35 °C. A partir de este primer caldo incubado por 18 horas, se realizó un segundo pase de 100ul a un caldo nutriente limpio con 150mL, se llevó a incubar de 18 a 24 horas, pasadas las 18 horas se sacó el caldo y se adicionaron 10 mL a tubos de centrifuga, se agitaron por 10 segundos y se centrifugaron a 3000 rpm, durante 10 minutos, se extrajo cuidadosamente, el sobrenadante con una pipeta de 10 mL (intentando tocar solo la superficie a medida que se aspiró el contenido), hasta dejar el pellet en 1mL de líquido. Luego se resuspendió el pellet, agitando en el vórtex y se aforó a 10 mL con

agua Peptonada bidestilada al 0.1% (Milli-Q). Posteriormente, se volvió a centrifugar a 3000rpm durante 10 minutos, para repetir nuevamente, dos veces los pasos ya descritos anteriormente y en la tercera lavada, el pellet celular de la bacteria se dejó en 2mL, de líquido, para luego ser resuspendida. Por último mediante el uso de un espectrofotómetro se tomó la absorbancia utilizando como blanco agua Peptonada bidestilada al 0.1% (Milli-Q).

Parámetros de interpretación. La absorbancia obtenida corresponde al valor de Y en la ecuación de la recta, al despejar X se obtiene un valor equivalente a uno de los estándares de McFarland, con la ecuación $C1XV1=C2XV2$, se puede ajustar la concentración bacteriana en un volumen deseado. De esta manera la concentración de la bacteria *E.coli* ATCC 25922 proveniente del lavado celular se estandarizó a una concentración de 10³ UFC/mL en 100 l de agua, volumen necesario para alimentar los sistemas de filtración.

Productividad y selectividad. se basó en los protocolos expuestos en la guía de aseguramiento de la calidad de medios de cultivo según el INVIMA (13) y la GTC 171 (14) , se obtienen cultivos puros de las bacterias, *E. Coli* ATCC 25922, *E. coli* K12, *E.coli* W66; estas tres cepas fueron elegidas en el método como las cepas deseadas ya que su crecimiento es específico en el medio que se pretende evaluar (Chromocult agar de Merk) mientras que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Staphylococcus aureus* ATCC 25913, son denominadas interferentes debido a que no son específicas o no deben estar presentes en el medio a evaluar . Ambos grupos de cepas se encontraban en glicerol al 30% % 1. **Reactivación de la cepa bacteriana;** Se sacaron las cepas deseadas e interferentes, preservadas de congelación y se descongelan, se agita durante 10s, Se destapó el vial con las cepas y se sembraron en agares selectivos para cada una de las bacterias .Se llevaron a encubar 35°C durante 24 horas. Se sacaron los cultivos de incubación, se inocularon por separado con un asa colonia aislada de cada una de las seis (6) cepas a seis (6) Erlenmeyer cada uno con 80 mL de caldo nutritivo (MERK) previamente rotulados con el nombre o clave de las 3 cepas deseadas y las 3 interferentes, se agitaron los caldos suavemente y se llevaron a incubar a 35°C de 18 a 24 horas. Pasadas las 18 horas se sacaron los 6 caldos de incubación, se agitaron suavemente y con un micropipeta se tomaron 100ul de cada una de las 6 cepas y se llevan a 6 nuevos caldos y se incuban nuevamente a 35°C de 18 a 24 horas. **2. El lavado celular;** Se sacaron los cultivos de incubación se agito por 10 segundos y se paso cada una de las cepas 10 a 12 mL a tubos Falcón para centrifuga, se centrifugaron a 3000 rpm, durante 10 minutos, se extrajo cuidadosamente, el sobrenadante con una pipeta de 10 mL (intentando tocar solo la superficie a medida que se aspiró el contenido), hasta dejar el pellet en 1mL de líquido. Luego se resuspendió el pellet, agitando en el vórtex y se aforó a 10 mL con agua Peptonada bidestilada al 0.1% (Milli-Q). Posteriormente, se volvió a centrifugar a 3000rpm durante 10 minutos, para repetir nuevamente, dos veces los pasos ya descritos anteriormente y

en la tercera lavada, el pellet celular de cada una de las bacterias se dejó en 2mL, de líquido, para luego ser resuspendidas. Mediante una curva de calibración de los estándares de McFarland realizada con anterioridad y el resultado de la absorbancia, se calculo mediante la ecuación de la recta la concentración de cada uno de los lavados celulares, realizados a las 6 bacterias y se ajustó a la escala # 0.5 a ($1.5 \times 10^8 \text{UFC mL}^{-1}$). 3. Se prepararon las cajas de petri, con 15 mL de medio, se seleccionó un lote de producción de 6 cajas de petri con el medio selectivo a evaluar, Chromocult agar de (Merk) y 6 cajas de petri que con el medio de referencia. (Trypticase de soya agar de Merk, se dividió cada una de las 12 cajas de petri por la parte posterior de la base marcándolas en 4 cuadrantes haciendo uso de una plantilla en cartulina que permitió una mejor visualización de los cuadrantes y mayor simetría. 4. **SIEMBRA;** con un asa calibrada, se tomó 1 ul de la suspensión bacteriana ajustada a $1.5 \times 10^8 \text{UFC/mL}$ de cada uno de los 6 tubos se Inoculó las 6 cajas de Petri que contenían el medio a evaluar (Chromocult agar) y otras 6 que contenían el medio de referencia Trypticase de soya, (se eligen 12 cajas de Petri en total: 3 que contengan el medio a evaluar y 3 con el medio de referencia para inocular las cepas deseadas. De igual forma se eligen 3 placas con el medio a evaluar para inocular las cepas interferentes y 3 con el medio de referencia para inocular las cepas interferentes). Se trazaron 5 estrías paralelas entre ellas sobre la superficie del medio en el primer cuadrante. Se repiten las 5 estrías en cada uno de los demás cuadrantes de la placa sin cargar el asa con cultivo y sin flamearla. Se trazó una última estría central en el punto donde se unen los cuadrantes. Todo esto se realizó para ambos medios, se Incubaron las placas en posición invertida de acuerdo a las condiciones en que se va a utilizar el medio de cultivo. En la prueba se considera válida cualquier estría que crezca más del 30% de la línea(14); cada estría tiene un valor de 0,2 y la estría central un valor de 1, es decir, que el crecimiento máximo que se puede presentar es de $5 (0,2 * 20 + 1) = 5$, por lo que se debe multiplicar el número de estrías que presentaron crecimiento por 0,2 y sumar 1 en caso de que se haya presentado crecimiento en la estría central, obteniendo así el índice de crecimiento absoluto (ICA). El ICA permite clasificar a los medios de cultivo: ICA = 4,5 - 5, medios altamente productivos; ICA = 2,5 - 4,5, medios medianamente productivos; ICA < 2,5, medios poco productivos; ICA = 0, medios no productivos. El ICA resultante del interferente evalúa la selectividad, por lo que a mayor selectividad, menor será el ICA: ICA = 0, medios altamente selectivos; ICA = 0 - 2,5, medios medianamente selectivos; ICA > 2,5, medios no selectivos. Se debe llevar a cabo un control en agar Trypticase de soya para determinar que el microorganismo en estudio no tiene ningún problema para crecer. Cabe anotar que el ICA obtenido en la caja de control debe ser muy similar al ICA de la caja de medio de prueba, lo cual quiere decir que el microorganismo de prueba no presenta ningún problema de crecimiento y la cepa resulta viable para el estudio, dándole así validez a la prueba. El ICR se obtiene de la división del

ICA de prueba / ICA control, y al ser crecimientos similares el valor debe estar por encima de 0,95 - 1, es decir, la prueba tiene validez si existe por lo menos un crecimiento de un 95 - 100% (13)

La preparación del agua sintética. Se empleó agua tratada del laboratorio de biotecnología de la Universidad Santiago de Cali, la

cual fue almacenada en un tanque con un volumen de 100L. Se ajustaron las variables de Turbiedad, Sólidos Disueltos Totales (SDT) siguiendo las recomendaciones del Protocolo de la EPA para la preparación de aguas sintéticas (26). Preparación de la cepa, se empleó la cepa *E. coli* ATCC 25922 siguiendo los protocolos de Rivera”(12)” que incluye, reactivación, fase estacionaria y lavado celular. 2. Calculo de la concentración bacteriana; con la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración de los estándares de McFarland se ajusto la concentración bacteriana a $e 10^3 \text{UFC/mL}$ en un volumen final de 100L.

Operación de los filtros. Se utilizaron dos modelos de filtros (EKOFIL y EKOFIL PLUS) seis de cada uno con tasas de filtración diferentes que oscilaban entre 1, 2 y 3 horas, los cuales fueron alimentados semanalmente con 7.5 L del agua sintética esta cantidad es equivalente al requerimiento mínimo de agua para el consumo humano y preparación de alimentos por persona (25). Después del tiempo determinado de filtración se recolectaron 200 mL de cada filtro, con los cuales se realizó la técnica filtración por membrana.

Validación de la técnica filtración por membrana. Se llevo a cabo por los protocolos descritos en el IDEAM E INVIMA, 1. Desinfección completa del área de trabajo. 2. Se Verificó que todo el material a utilizar estuviera completamente estéril, se desenroscó la base del filtro del embudo y con las pinzas estériles (pasada por alcohol antiséptico y un segundo por el mechero) se colocó la membrana de celulosa estéril con la cuadrícula hacia arriba sobre la friza. Con mucho cuidado se colocó el embudo sobre la friza y se fijó. Se Llenó el embudo con 100 mL de la muestra de agua, y se encendió la bomba de vacío para filtrar el agua a través de la membrana. Cuando pasó todo el líquido se adicionó agua de peptona para hacer un enjuague de las paredes del embudo y se aplicó vacío de nuevo. Cuando se terminó de filtrar se apago la bomba de vacío, se retiró el embudo, se tomó la membrana con las pinzas estériles y colocó sobre una caja de petri con medio Chromocult agar marcado con anterioridad (modelo del filtro, número del filtro y fecha del muestreo). Se incubó la caja en posición invertida 24 horas a 35°C al cabo de este tiempo se leyó el número de colonias resultantes.

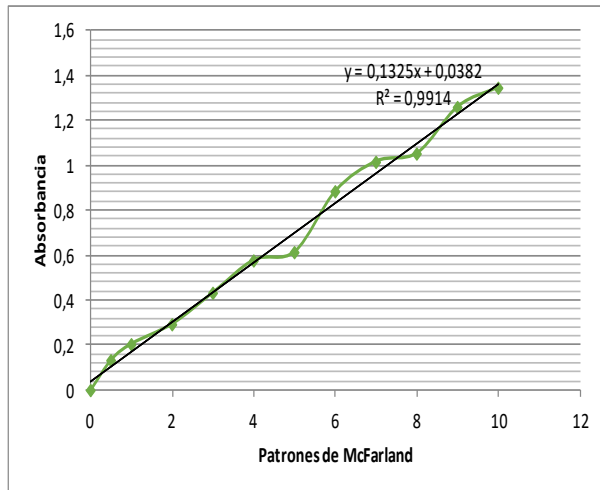
Para la validación de la técnica filtración por membrana se realizaron 11 muestreos (5 muestreos por dos analistas) y un muestreo adicional por un laboratorio externo), para un total de 5 semanas, se evaluaron 12 muestras de agua, correspondiente a los 12 filtros caseros de ambos modelos por duplicado con tasas de filtración 1, 2 y tres horas. Se realizó dos controles negativos; uno con agua de la llave y otro agua de la llave con Tiosulfato y dos controles positivos; uno con la concentración 10^3UFC/100L para garantizar que el agua fue inoculada con la concentración deseada y el otro control con el residuo que queda en el tanque después de alimentarse los filtros con el fin de conocer el comportamiento de la bacteria sin pasar por ningún filtro. Se determinaron

parámetros cuantitativos basados en las metodologías aplicadas por la USP Versión 40 vigente, la GTC 84 (15) y la ISO 17025(16), los cuales son: precisión, reproducibilidad, repetibilidad, exactitud, sensibilidad, especificidad y límite de detección.

RESULTADOS

Estandarización del inóculo. La figura 1, muestra en el resultado de cada una de las absorbancias correspondientes a los patrones de Macfarland

Figura 1. Ecuación de la recta



Los puntos corresponden a las mediciones experimentales, la línea concierne al ajuste matemático representado por la ecuación de la recta.

La curva de calibración obtenida se encuentra definida por una ordenada al origen (b) y una pendiente (m), mediante la ecuación $y = mx + b$. La grafica que se obtiene muestra que tan lineales están los datos, mientras más se acerque el coeficiente de correlación (R^2) al valor de 1 más coherentes son los valores obtenidos, se encontró que el R^2 calculado para la curva de calibración fue de 0.99 lo que sugiere que la tanda de análisis se realizó de forma correcta y la ecuación se encuentra dentro del criterio de aceptabilidad para calcular concentraciones bacterianas. Al ajustarse la concentración bacteriana proveniente del lavado celular a una concentración de 10^3 UFC/mL en 100 l de agua y realizarse el método de filtración por membrana y su posterior siembra en el medio Chromocult agar, se pudo evidenciar que la muestra presentó un número incontables de bacterias. Para poder realizar el recuento de bacterias se procedió a realizar diluciones seriadas las cuales arrojaron que la muestra se encontraba alrededor de 1000 bacterias. Este dato reitera la aceptabilidad de la curva de calibración y que el uso de los métodos espectrofotométricos son más precisos y exactos para el cálculo de concentraciones bacterianas que los métodos convencionales por turbidimetría establecidos en los protocolos descritos por Lage (2012).

Productividad y Selectividad. Según los resultados obtenidos en el método Ecométrico Tabla 1. Se encontró que el medio Chromocult agar es altamente productivo para la cepa *Escherichia coli* ATCC W65 debido a que presentó un ICA de 4.8 y medianamente productivo para las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y la cepas *Escherichia coli* ATCC K 12 con resultados del ICA de 3.8. Se evidencio que el medio de cultivo es altamente selectivo con un ICA de 0 para todas las cepas interferentes, esto reitera que el medio Chromocult agar es uno de los medios más convenientes como lo establece la ISO 9308-1(17) para la detección y enumeración de *E.coli* y bacterias coliformes por filtración por membrana. De otro lado, el valor de ICR estuvo entre 0.95 y 1, lo que demuestra la capacidad que tiene el medio selectivo de recuperar los microorganismos de interés y a su vez demostrar en el medio control que los microorganismos de prueba no presentan ningún problema de crecimiento.

La preparación del agua sintética y operación de los filtros. se realizó de acuerdo con lo recomendado en los protocolos del EPA (18) la preparación y reactivación de la cepa se basó en las metodologías expuestas anteriormente para la preparación de inóculos y la estandarización de acuerdo a la curva de calibración obtenida. La Tabla 2 muestra las cantidades adicionadas de cada uno de los ingredientes que se utilizaron en dicha preparación. Se alimento cada uno de los 12 filtros de ambos modelos con 7.5 litros del sustrato y se espero entre dos a tres horas para la obtención del agua filtrada.

Validación Secundaria. Pasadas las tres horas y al evidenciarse agua filtrada en los doce sistemas de filtración, se tomaron las muestras y se procedió a realizar el método filtración por membrana, el recuento de las bacterias se realizó mediante la fórmula:

$$\text{Recuento de colonias} = \frac{\text{UFC}}{\text{volumen de muestra filtrada}} \times 100,$$

los ensayos se realizaron por duplicado por dos analistas. Al realizar el recuento de los controles positivos en este caso, el agua con el inóculo (concentración inicial 10^3 UFC/ 100 L equivalente a 3 unidades logarítmicas). Se encontró que los recuentos de la cajas oscilaban entre 65×10^2 y 62×10^2 UFC / 100 mL de muestra, equivalente a 3.8 unidades logarítmicas concentración real en la que se encontraba el agua sintética. Una vez obtenidos todos los recuentos de las muestras de aguas desinfectadas por los filtros caseros se procedió a aplicar los criterios establecidos por el INVIMA, la USP41 y la ISO 17025, se estableció los parámetros de exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y precisión. A los resultados finales de cada analista se les determinó el promedio, criterio de precisión individual, global (desviación estándar) y el coeficiente de correlación concordancia (CCC).

Tabla 1. Productividad y selectividad del medio Chromocult agar

MEDIO	MICROORGANISMO	FUNCION	INCUBACIÓN	CONTROL CEPA	MEDIO DE REFERENCIA	METODO DE CONTROL	CRITERIO	CARACTERÍSTICAS DE LA REACCIÓN
Chromocult	<i>Escherichia coli</i>	Productividad	18 A 24 horas 35°C	<i>Escherichia coli</i> ATCC W65	TSA	Cuantitativo, Semicuantitativo y Cualitativo	PR=0.92 , ICA =4.8 , ICR=1, SCORE 2	Crecimiento de colonias azules
		Selectividad	18 24 horas 35°C	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25913		Cualitativo y Semicuantitativo	ICA=0 , SCORE =0	Total inhibición
Chromocult	<i>Escherichia coli</i>	Productividad	18 A 24 horas 35°C	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	TSA	Cuantitativo, Semicuantitativo y Cualitativo	PR=0.52 , ICA =3.8 , ICR=0.95, SCORE 2	Crecimiento de colonias azul violeta
		Selectividad	18A 24 horas 35°C	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		Cualitativo y Semicuantitativo	ICA=0 , SCORE =0	Total inhibición
Chromocult	<i>Escherichia coli</i>	Productividad	18 A 24 horas 35°C	<i>Escherichia coli</i> ATCC K12	TSA	Cuantitativo, Semicuantitativo y Cualitativo	PR=0.6 , ICA =3.8 , ICR=1, SCORE 2	Crecimiento de colonias azul violeta
		Selectividad	18 A 24 horas 35°C	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931		Cualitativo y Semicuantitativo	ICA=0 , SCORE =0	Total inhibición

Tabla 2. Resultados de la preparación del sustrato sintético para 100 litros de agua.

Variable	Valor Final	Descripción	Cantidad adicionada
Turbiedad	30 UNT	Se adicionó caolín a una concentración de 0.2g/lb	12 gramos
Sólidos Disueltos Totales SDT	1 500 mg/L	Se adicionó NaCl grado comercial en una concentración de 1,6 g/Lb	10 gramos
<i>E.coli</i>	1x10 ³ UFC/ 100L	Réplica de la cepa ATCC 25922 liofilizada marca Microbiologics® con el método de siembra por aislamiento en caja petri y reactivada en caldo nutritivo.	Dependiente de la concentración obtenida en cada lavado celular , durante los experimentos oscilo entre 20 a 30 µL de inculo
Otros	N/A	Tiosulfato de sodio para inactivar el cloro	67.3 mL,

Tabla 3. Exactitud (reproducibilidad y repetibilidad)

Analista	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de correlación concordancia (CCC)
Analista experto 1	31,44	47,5	0,966874392
Analista 2	32,7	48,5	

La exactitud del método según la USP 41, la GTC 84 y el INVIMA, se calcula comparando los datos obtenidos del método de prueba y el método estándar, tomando al analista 1 como el analista experto y el método empelado por este como el método de referencia, se determinó la exactitud la cual se determina por el grado de concordancia. En la tabla 3 se observa que la exactitud cumple de acuerdo a los resultados ya que el coeficiente de correlación concordancia (CCC) entre los conteos de ambos analistas fue muy bueno mostrando resultados sobre 96% lo que indica que no hay diferencias significativas entre los valores obtenidos entre el analista 1(referente) y el analista 2(par).

Cuando se pretende conocer la variabilidad que existe entre los datos obtenidos por un solo analista se le denomina repetibilidad, cuando se pretende conocer las variaciones de los datos obtenidos, por dos o más analistas para una misma muestra procesada en las mismas condiciones se le denomina reproducibilidad, la tabla 3 muestra que a pesar de que hay una ligera variación entre los dos analistas, esta variación no es significativa debido a que el (CCC) fue muy alto.

De igual forma no hay diferencia significativa entre los valores de las medias obtenidas por cada analista y tampoco hay diferencia significativa entre las medias obtenidas de cada analista, lo que indica que el método evaluado es reproducible y repetible y que los resultados no van a diferir si los métodos son realizados por el mismo analista el mismo día o por analistas diferentes en días diferentes.

Los resultados obtenidos frente a sensibilidad y especificidad (Tabla 4) superan el 80% lo cual se considera estadísticamente muy buenos e indica que el analista puede reportar realmente en los recuentos la cantidad de la bacteria *E.coli* que realmente está presente en la muestra (desviación positiva) y de descartar cualquier dato dentro de los recuentos que no corresponda a la presencia de la bacteria(desviación negativa).

Tabla 4. sensibilidad y especificidad

Medidas de desempeño	
Sensibilidad	Falso Negativo
0.83	0.17
Especificidad	Falso Positivo
0.99	0.01

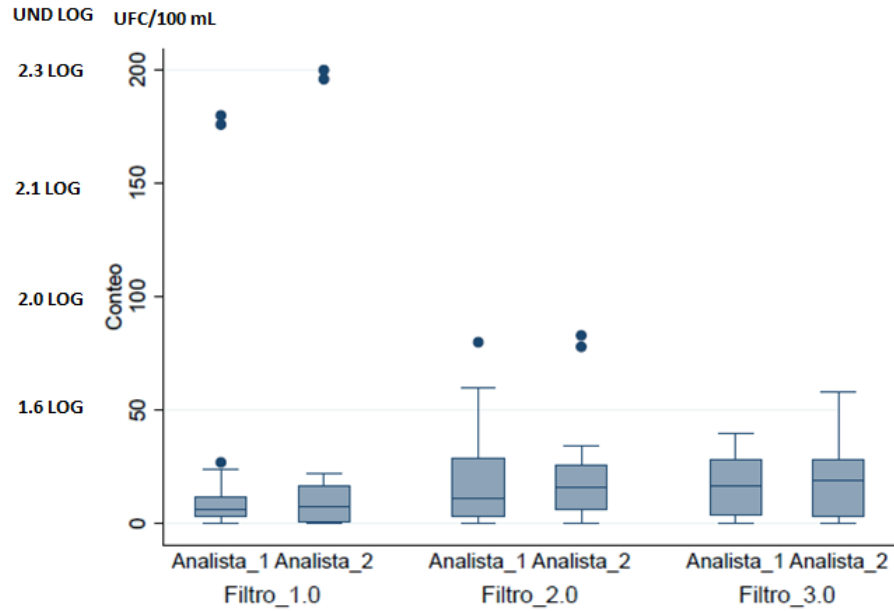
Tabla 5. Anova para el cálculo de precisión

EKOFIL
V = 472.5, p-value = 0.07455 No se rechaza Ho. Por lo tanto, las medianas son iguales.
EKOFIL PLUS
V = 670, p-value = 0.4023 No se rechaza Ho. Por lo tanto, las medianas son iguales.

Los resultados expresados en la ANOVA (**p = 0.07455 EKOFIL**) y (**p= 0.4023 EKOFILPLUS**) muestran que ambos valores de p son mayores a un nivel de significancia de 0.05 se acepta la hipótesis nula, este dato reitera que el método evaluado es preciso.

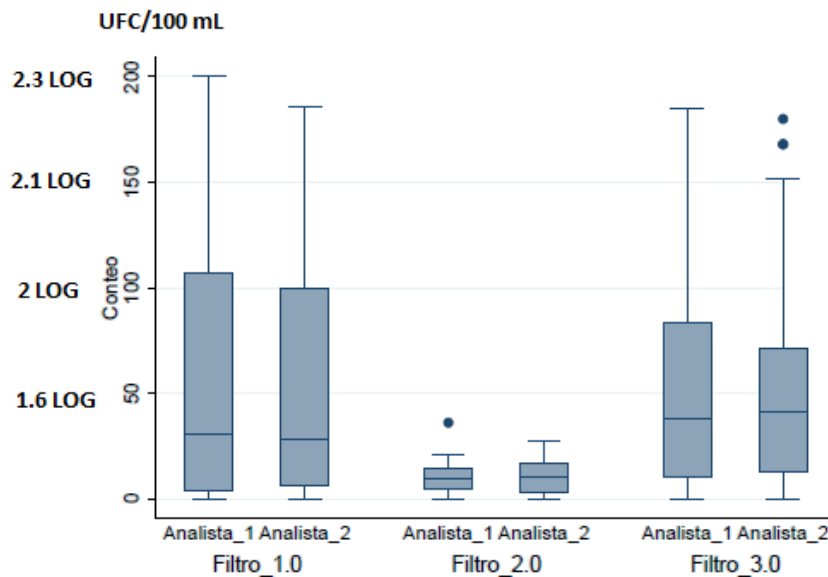
Los diagramas de Cajas y alambres Figura 2 y Figura 3 demuestran estadísticamente el comportamiento de los dos modelos de filtración (EKOFIL Y EKOFIL PLUS) para poder determinar la remoción y eficiencia de cada uno de ellos. En el modelo EKOFIL (Figura 2) muestra que el cuartil 2, 3 y 4 que equivalen al 75% de los datos reportados por ambos analistas se encuentran entre 10 y 60 UFC/mL en 100 ml de muestra, este resultado establece que los filtros EKOFIL lograron remover la bacteria *E.coli* de concentraciones de 10^3 a 10^1 .

Figura 2. Variación de los recuentos de *E. coli* en la remoción del modelo de filtro EKOFIL



La línea del centro de las cajas corresponde a las medias reportadas en los recuentos por ambos analistas, se puede evidenciar que todas se encuentran en el mismo rango, reiterando que no hay diferencia significativa en los recuentos obtenidos, este diagrama también refleja la repetibilidad y la reproducibilidad del método.

Figura 3. Variación de la recuento de *E. coli* en la remoción del modelo EKOFILPLUS



Por otro lado el 75% de los datos reportados por ambos analistas para el modelo EKOFIL PLUS se encuentran entre 10 y 200 UFC en 100 mL de muestra lo que equivale a que este modelo logró remover 10^3 a 10^2 UFC/ 100 mL. A pesar de que estadísticamente los dos modelos de filtración logran remover una cantidad considerable de la bacteria *E.coli* microbiológicamente está remoción no es viable según lo establecido en la resolución 2115 dentro de los requisitos que debe reunir el agua para consumo, estableciendo ausencia total de este microorganismo en 100 mL de muestra (19). La Tabla 6 describe detalladamente la remoción de cada modelo de filtración de acuerdo a la concentración logarítmica teniendo en cuenta que se partió de una concentración de 3.8 unidades logarítmicas en el sustrato sintético.

Tabla 6. Remoción bacteriana de los filtros caseros.

Remoción Bacteriana		
Tipo de muestra	Analista	
	Analista 1	Analista 2
Agua de la llave con Tiosulfato	0	0
Concentración inicial	3,8 log	3,8 log
Residuo	3,8 log	3,8 log
EKOFIL 1.0	1,4 log	1,4 log
EKOFIL 2.0	1,3 log	1,3 log
EKOFIL 3.0	1,2 log	1,3 log
EKOPLUS 1.0	1,8 log	1,8 log
EKOPLUS 2.0	1,0 log	1,0 log
EKOPLUS 3.0	1,7 log	1,8 log

El modelo EKOFIL con tasa de filtración 1.0, logro remover 2.4 unidades logarítmicas exactamente, los modelos de filtración EKOFIL 2.0 y 3.0 remueven 2.5 y 2.6 unidades logarítmicas respectivamente, mientras que los modelos EKOFIL PLUS 1.0 y EKOFILPLUS 3.0 remueven entre 2 y 2.1 unidades logarítmicas, por otro lado el filtro EKOFILPLUS 2.0 dentro de todos los sistemas de filtración logra el máximo de remoción de 2.8 unidades logarítmicas.

En promedio podría decirse que los filtros EKOFIL impregnados con plata coloidal, logran mayor eficiencia en remoción de la bacteria *E.coli* que los EKOFILPLUS impregnados con plata coloidal y reforzada con un cartucho de carbón activado, sin embargo si se analiza cada filtro por individual el de mayor eficiencia sería el EKOFILPLUS 2.0. Sin embargo no cumple con el 100% de remoción como lo establece Lerma 2012 en sus estudios, donde los filtros impregnados con plata coloidal lograron remover 5 unidades logarítmicas de una matriz de agua sintética(11).

Límite de detección y límite de cuantificación. Se calculó por medio de los criterios establecidos en la GTC 84(20) y la ISO 17025 (16) mediante la ecuación $P(+) = 1 - e^{-m}$.

Donde,

e: Es la base de logaritmo natural

m: en el número promedio de partículas por porción analítica.

Para el cálculo del límite de detección, se utilizó la cepa de *E.coli* ATCC 25922 proveniente de lavado celular en fase estacionaria y ajustada a la escala 0.5 de McFarland se prepararon diluciones decimales hasta 10^{-9} de acuerdo con lo establecido en las tablas de diluciones de IDEAM para el método de filtración por membrana(21) se realizó el método de filtración por membrana y se identificó el rango donde se pueden obtener recuentos confiables (de acuerdo a las limitaciones del método), se analizaron por triplicado por tres analistas como lo muestra la siguiente Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de los recuentos UFC/ 100 mL de agua en diluciones evaluadas por triplicado.

Dilución	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Promedio
1×10^{-5}	Incontable	Incontable	Incontable	-
1×10^{-6}	220	235	215	233,3
1×10^{-7}	104	98	93	98,3
1×10^{-8}	3	4	3	5
1×10^{-9}	1	1	1	1

El recuento de *E.coli* fue posible en las diluciones 10^{-6} hasta 10^{-8} .

En Concentraciones mayores, se presentó recuentos incontables,

Tabla 8. Límite de detección del método filtración por membrana

Dilución	<i>E.coli</i>	
	Promedio	$P(+) = 1 - e^{-m}$
1×10^{-6}	233,3	1
1×10^{-7}	98,3	1
1×10^{-8}	5	0,99
1×10^{-9}	1	0,63

Este parámetro contempla la probabilidad de que la detección del microorganismo sea del 95 %, $p(+) = 0,95$ lo que respecta que el límite de detección se presentó en la dilución 10^{-8} para la determinación de *E.coli* ATCC 25922 ya que en 10^{-9} la probabilidad de detección fue menor al 95 %. Los resultados del límite de detección demostraron que es posible detectar desde 1 UFC/100 ml con una probabilidad del 63 % hasta 200 UFC/100 ml de agua potable para la detección y cuantificación de *E.coli*. No obstante, se debe tener en cuenta que en los recuentos cercanos a 200 UFC se pueden presentar falsos positivos debido a que cuando hay mayor número de colonias sobre el filtro se observan colonias aglomeradas y sobrepuestas, lo cual dificulta el conteo y consecuentemente el resultado. Se recomienda que para el método

de Filtración por Membrana, el número de colonias con características típicas debe estar entre 20 y 100 UFC cuando se utilizan filtros de 47-50 mm de diámetro (22). Sin embargo, se debe tener en cuenta que en el proceso de verificación se trabajó con muestra adicionada, lo cual admitía mayor presencia de UFC, comparada con una muestra de agua potable sin inóculo.

DISCUSIONES

Estandarización de la escala de McFarland para la preparación de inoculos. De acuerdo a lo recomendado por la agencia de protección del medio ambiente EPA (siglas en inglés) se preparó un agua sintética y esta reunía ciertas características físicoquímicas y microbiológicas que se igualaban a un agua contaminada, para simular estas características de contaminación se utilizaron diferentes ingredientes, uno de estos fue la adición del inóculo, este debía estar en condiciones viables y concentraciones específicas. Para garantizar la viabilidad celular de la bacteria (inóculo) se emplearon metodologías estandarizadas por algunos autores, a pesar de que las metodologías descritas permitían el correcto desarrollo y crecimiento no permitía conocer con exactitud la cantidad de bacterias que se encontraban en el lavado celular, por ende se utilizó una de las técnicas más empleadas en microbiología para medir el crecimiento celular, como lo es la de densidad óptica por turbidez que tiene la ventaja de estimar de manera más rápida el crecimiento de una población microbiana (23). En esta fase los estándares de turbidez de McFarland se usaron como referencia para saber el número de bacterias por mililitro, sin embargo para asegurar la densidad correcta solo se pudo obtener mediante la curva de calibración de dichos estándares. A partir de la curva de calibración se determinó que la recta encontrada con los puntos experimentales se ajusta correctamente al modelo matemático de la ecuación. Debido a que el número total de los patrones de estándar de Macfarland es de 11 (0.5 a 10) la curva de calibración logra un intervalo de confianza del 99% ya que mínimo se requiere de cinco o seis puntos experimentales para que la variabilidad sea mínima y el intervalo lineal sea suficiente (de cinco puntos para un intervalo de confianza del 95 % y de ocho puntos para uno del 99 %). En este caso como el número de puntos experimentales es mayor implica que mayor es la fiabilidad en la recta de calibrado.(24)

En resumen podría decirse que la utilización de las técnicas de turbidimetría de Macfarland en sinergia con el uso del espectrofotómetro y la curva de calibración, es la herramienta más apropiada para la estandarización de inoculos, contrario con las metodologías utilizadas en las investigaciones de Carillo 2008 y Pérez 2016 (8)(25) donde calcularon la concentración del inóculo solo por comparación de la turbidez visual de los patrones de Macfarland y suspensión bacteriana obtenida.

Productividad y selectividad Algunos autores en sus investigaciones han diseñado protocolos encaminados a establecer programas de calidad que aseguren la fiabilidad de sus resultados y la disminución de los errores más significativos, como errores presentados en lo concerniente a la calibración de equipos, ruidos

instrumentales, desviaciones de temperaturas de incubación, pero no en todas las investigaciones se presta atención al óptimo funcionamiento de los medios de cultivo y como consecuencia de ello, muchas veces se emiten resultados que no son confiables. En algunos laboratorios se controla cualitativamente la productividad pero raramente se evalúa la selectividad como un elemento indispensable que casi siempre es la causa de que muchos analistas tengan dificultades en el aislamiento de algunos microorganismos, sobre todo los de requerimientos nutricionales más estrictos.(26)

Los medios de cultivos son productos compuestos por nutrientes, factores de crecimiento, inhibidores, indicadores, etc., necesarios para el desarrollo de los microorganismos, y son muy susceptibles a cambios y deterioro en sus características y propiedades físicas, químicas y biológicas por la acción de la luz, el aire, el calor, la humedad y los cambios de pH. Debido a esto ha surgido la necesidad de considerar dentro de la validación de las técnicas microbiológicas el control biológico de los medios de cultivos utilizados en dichos laboratorios y más aun lo medios destinados al análisis de experimentos. La calidad de un medio de cultivo preparado no depende exclusivamente de la garantía que representa la marca o el fabricante del medio deshidratado o del proveedor de los ingredientes del mismo, sino de igual forma, o quizás en mayor grado de su correcta preparación(27)

Según la ISO 9308- 1(2012)(17) establece al medio Chromocult agar como el medio más específico para la enumeración de *Escherichia coli* con 97% de especificidad y un 93% de sensibilidad, es por esto que muchas de las validaciones de la técnica filtración por membrana realizadas por entidades nacionales e internacionales y laboratorios de análisis de agua utilizan este medio para el reporte de sus resultados. En esta fase se utilizó el método Ecométrico para determinar la productividad y selectividad del medio Chromocult agar de Merk como prerrequisito para el desarrollo de la validación de la técnica filtración por membrana en contraste con otras validaciones como las de Carillo 2008 y las de Páez 2008(8) donde se centraron principalmente en el aseguramiento de la calidad de los ambientes y equipos dejando a un lado la calidad del medio de cultivo empleado, en este caso Chormocult agar, clasificándolo como óptimo solo con los resultados de las pruebas de esterilidad y de recuperación.

El ICA(índice de crecimiento absoluto para determinar la productividad del medio Chromocult agar de Merk en este estudio fue de 3.8 para la cepa *E.coli* ATCC 25922, clasificándolo como medianamente productivo, mientras que en los estudios realizados por Soler 2006⁽⁵⁸⁾ en la validación secundaria del método de recuento en placa profunda para coliformes totales y fecales, la productividad del medio Chromocult agar alcanzó un ICA de 4.8 clasificándolo como altamente productivo para la misma cepa de estudio, sin embargo el medio utilizado por Soler 2006 pertenecía a la comercial Oxoid. A pesar de que este medio presentó excelente productividad las pruebas de selectividad en el método Ecométrico mostraron el crecimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, cepa que fue utilizada

como interferente, arrojando un valor de 4 para el ICA, lo que indica que el medio utilizado por Soler 2006 no es selectivo a diferencia de lo encontrado en el desarrollo de esta validación donde el medio Chromocult agar de Merk logró inhibir no solo una (1) sino tres (3) cepas de interferentes seleccionadas. En resumen podría decirse que la calidad de un medio de cultivo no solo depende de una simple preparación de los ingredientes como lo estipula la guía para la preparación de medios Oxoid⁽⁵⁷⁾, la casa comercial y la marca pueden incidir significativamente en la calidad de los medios entre otros factores. El número de cepas referentes e interferentes son una clave importante para emitir resultados concernientes de productividad y selectividad de los medios de cultivo, según el INVIMA y la GTC 171 se recomienda tres (3) cepas referentes y tres interferentes (3), debido a que disminuye la posibilidad de error y garantiza junto con el medio control la viabilidad de las cepas utilizadas. En los estudios de Soler 2006 se utilizó solo una cepa de referencia y una de interferencia ocasionando limitaciones en el método y la posibilidad de que en el momento en que ocurriese un error, el analista se viera obligado en repetir el método, a diferencia de los experimentos realizados en esta validación donde se tuvieron tres opciones de cepas de *E.coli* y en todas se observó buen crecimiento y al observar en paralelo los resultados del ICA y del ICR se resalta la validez de la prueba.

Validación

Exactitud. Durante el desarrollo de este experimento se optó para que un laboratorio externo proporcionara los resultados de los recuentos que serían tomados como los resultados del ensayo estándar sin embargo los recuentos informados por este para la concentración inicial (10^3 UFC/mL) no fueron cuantificados ni informados de acuerdo a la normatividad para reporte de resultados de análisis de aguas cuando éstos superan el rango de 80 UFC en 100 mL, como acción emergente se tomaron los resultados de uno de analistas como los resultados del método de referencia y los resultados del segundo analista como los del método de ensayo. Debido a que en la exactitud se pretende medir las mismas muestras, con dos personas diferentes, para determinar si ambas personas producen resultados equivalentes (concordancias). El resultado de la concordancia obtenida para el parámetro de exactitud fue de 0.96 a lo que se le denomina concordancia sustancial o muy buena de acuerdo la clasificación del grado de concordancia según el coeficiente de Lin⁽²⁹⁾. Al comparar estos resultados con los descritos en las validaciones secundarias realizadas por Carrillo 2008 y Páez 2008 donde el coeficiente de concordancia fue de 0.99 considerada una concordancia casi perfecta, se puede resumir que los resultados de exactitud lograron satisfacer los requerimientos para que la técnica se considere exacta ya que se aprueba concordancias de 0.99 a 0.90, considerando esta última como concordancia moderada y valores menores a esta como concordancia pobre.

Repetibilidad y reproducibilidad. Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento de medición, el mismo analista, bajo las mismas condiciones, el mismo lugar, repeticiones en un período corto de tiempo, es decir, la

repetibilidad se obtiene solo con resultados de los recuentos de uno solo analista. Por el contrario, la reproducibilidad se aplica a medidas hechas en distintas condiciones (distintos operarios, distintos aparatos, épocas diferentes). En este caso, se comparan

las variaciones del analista 1 y analista 2. Se pueden elegir diferentes métodos aceptables para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad basándose en la evaluación estadística de las dispersiones de los resultados, ya sea en forma de: promedios, coeficientes de variación y ANOVAS. Los resultados contenidos en la tabla 3, muestran que las medias son casi iguales y al realizarse un Anova en la tabla 5 muestra que no hay diferencia significativa de los recuentos, sin embargo estos datos a pesar de ser globales para todos los ensayos realizados por ambos analistas, no permite conocer la interacción entre la repetibilidad y la reproducibilidad o entre el instrumento y el analista tal y como lo muestran otros autores en sus estudios de validaciones donde determinan el porcentaje de repetibilidad y reproducibilidad, por ejemplo, si la repetibilidad es mayor a la reproducibilidad las posibles causas son: que el instrumento necesita mantenimiento o el montaje del equipo o ubicación donde se efectúan las mediciones necesita ser mejorado. Si la reproducibilidad es mayor que la repetibilidad, las causas pueden ser que el operador necesita mejor entrenamiento al realizar la técnica o al leer los resultados⁽³⁰⁾.

Sensibilidad y especificidad. Los resultados de estos parámetros se calcularon en base a los recuentos reportados por el laboratorio externo (ensayo de referencia) y el analista experto (ensayo de prueba). Dependiendo del método de prueba a evaluar se puede preferir que el método sea más sensible o más específico, debido a que el método a validar (filtración por membrana) debe reportar la detección de la bacteria *E.coli* en muestras de agua, tanto la sensibilidad y especificidad deben tener valores altos. La sensibilidad varía del 0 al 1 (100%), es decir, cuanto más alto es el valor, hay una mejor capacidad en la detección del microorganismo en la muestra por medio de la prueba, en otras palabras podría decirse que la sensibilidad del método filtración por membrana proporciona el número total de colonias previamente asignadas, los resultados obtenidos fueron del 83% de sensibilidad con una desviación negativa de 17% lo que indica los fallos negativos, es decir, que en el total de los recuentos el 17% fueron reportados como negativos para *E.coli* por el método de ensayo, cuando realmente eran reportados como positivos por el método de referencia (realizado en el laboratorio externo). En comparación con los resultados de sensibilidad reportados por Tijerina 2014⁽³¹⁾ en la validación secundaria de la técnica filtración por membrana los cuales fueron del 98.3%. Podría decirse que el método realizado en esta investigación es menos sensible pero satisfactorio.

Por otro lado la especificidad se refiere a la probabilidad de que las colonias reportadas como negativas sea correctamente negativas, a pesar de que el agua fue controlada en el laboratorio e inoculada únicamente con la bacteria *Escherichia coli*, en el reporte solo debería estar presente dicha bacteria, sin embargo durante la toma de muestra o el transporte hasta las instalaciones del laboratorio externo la muestra puede adquirir contaminación por microorganismos del ambiente. La especificidad es la indicada para demostrar que tan específico es el método, que en este caso

- desempeño. 2008;24(3):1–41.
15. GTC 84 Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológicos. 2003;
 16. ICONTEC. Norma técnica Colombiana ISO 17025. Requisitos Generales para la competencia los Laboratorio, Ensayos y calibración. 20017;34.
 17. Lange B, Strathmann M, Oßmer R. Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria. Lett Appl Microbiol. 2013;57(6):547–53.
 18. (EPA). USEPA. protocolo EPA.pdf. 1987.
 19. Ministerio de Protección Social Ambiente Desarrollo y Vivienda. Resolución número 2115. Resolución 2115. 2007;23.
 20. Rojas R. Guía para la vigilancia y control de la calidad del agua para consumo humano [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2002. p. 353. Available from: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/e/fulltext/vigilancia/vigilancia.pdf>
 21. Institute of Hydrology Meteorology and Environmental Studies. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, IDEAM. 2017;
 22. Berna JB, Rodríguez CJ. Guía para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo de aguas. 2000;96.
 23. Lee GA. Turbidity Measurement. Meas Control. 1982;15(12):450–1.
 24. Dosal MA, Villanueva M. Introducción a la metodología Química. 2008;
 25. Pérez-Vidal A, Díaz-Gómez J, Salamanca-Rojas KL, Rojas-Torres LY. Evaluación del tratamiento de agua para consumo humano mediante filtros Lifestraw® y Olla Cerámica. (Spanish). Eval Drink Treat by Lifestraw® Ceram filters [Internet]. 2016;18(2):275–89. Available from: <http://10.0.60.86/rsap.v18n2.48712%5Cnhttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lth&AN=115991759&lang=es&site=eds-live>
 26. Nancy M, Lago B, Lourdes T, Abraham C. Quality control of the culture media used in environmental monitoring of the classified production areas. Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet]. 2013;51(2):155–60. Available from: <http://scielo.sld.cu>
 27. Bridson EY. The Oxoid Manual. 1998;371.
 28. Soler León JP. Validación Secundaria Del Método De Número Más Probable Y Recuento En Placa Profunda Para Coliformes Totales Y Fecales En Muestras De Alimentos Basada En La Norma ISO NTC 17025. 2006;1–81. Available from: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis273.pdf>
 29. Nickerson CAE, Dec N. A Note On " A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility " A Note on " A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility9 ". 2007;53(4):1503–7.
 30. Cuba P, Paisan Y, Moret P, Repetibilidad J La, Reproducibilidad En El Aseguramiento De La Calidad De Los Procesos De Medición. Tecnol Química [Internet]. 2010;XXX(2):117–21. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445543770014>
 31. Tijerina Rodríguez L. Validación De Un Método Basado En Filtración Por Membrana Para La Detección De Patógenos Bacterianos En Melón, Cucumis melo (L., 1753) Y CHILE JALAPEÑO, Capsicum annuum (L., 1753. 2014;131.
 32. Alfaro S, Roja M. Validación de los métodos de filtración por membrana y sustrato definido readycult, para la detección de coliformes totales y fecales . Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Microbiología Industrial [Internet]. 2006;1–64. Available from: <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8293/1/tesis271.pdf>
 33. Sepulveda M. Verificación Del Método De filtración por membrana para la detección y cuantificación de legionella spp . en agua potable. 2016;12(22):95–104.

