

Validación del método filtración por membrana para la detección de *Vibrio cholerae* en aguas marinas

Validation of the membrane filtration method for the detection of Vibrio cholerae in marine waters

DOI: <https://doi.org/10.26640/22159045.2022.590>

Fecha de recepción: 2022-02-07 / Fecha de aceptación: 2022-10-13

María Jisset Calvo-Saad¹, Karen López Suárez²

CITAR COMO:

Calvo-Saad, M. J.; López Suárez, K. (2022). Validación del método filtración por membrana para la detección de *Vibrio cholerae* en aguas marinas. *Bol. Cient. CIOH*; 41(2): 17-27. ISSN impreso 0120-0542 e ISSN en línea 2215-9045. DOI: <https://doi.org/10.26640/22159045.2022.590>

RESUMEN

En el presente trabajo se describe la validación del método de filtración por membrana para la detección de *Vibrio cholerae* en aguas marinas. Para tal fin se tuvo en cuenta el método de referencia descrito en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23th edition. 9260H. Se utilizó como medio de cultivo selectivo el agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), el medio diferencial ChromAgar *Vibrio* y como medio de enriquecimiento el Agua Peptona Alcalina al 1 % (APA). Como pruebas confirmatorias (cuerda, oxidasa y API20E). Los parámetros de validación determinados fueron límite de detección, sensibilidad, selectividad/especificidad, tasa de negativos y positivos, precisión, exactitud e incertidumbre, los cuales son recomendados para los métodos de tipo cualitativo. Los resultados demostraron un criterio de aceptación del 95 % y óptimo, este último de acuerdo con los parámetros de rendimiento. Adicionalmente, el método resulta ser sensible, reproducible y específico para el microorganismo de interés y apto para su aplicación en laboratorio en la matriz agua de mar evaluada.

PALABRAS CLAVE: validación, *Vibrio*, método cualitativo, calidad.

ABSTRACT

This work describes the validation of the membrane filtration method for the detection of Vibrio cholerae in marine waters. The reference method of the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (23rd edition) section 9260H was taken into account. The selective culture medium was Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) agar, the differential medium was CHROMagar Vibrio, and 1% Alkaline Peptone Water (APW) was used as the enrichment medium. To confirm the results, string, oxidase and API20E tests were performed. The parameters determined were detection limit, sensitivity, selectivity/specificity, negative and positive rate, precision, accuracy and uncertainty, which are recommended for qualitative methods. The parameters evaluated had an acceptance criterion of 95 %. For the performance parameters, the results obtained met the optimal acceptance criterion. The method is sensitive and specified for the mycobacterium of interest.

KEYWORDS: Validation, *Vibrio*, qualitative method, quality

¹ Orcid: 0000-0002-6968-1145. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe. Correo electrónico: jisset.calvo@gmail.com

² Orcid: 0000-0001-6206-4577. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe. Correo electrónico: klopez@dimar.mil.co

INTRODUCCIÓN

La identificación de los tipos de microorganismos existentes en un medio resulta ser de gran importancia en diferentes áreas. Por ejemplo, en muestras ambientales permite establecer la calidad del agua de una fuente superficial empleada para actividades recreativas o domésticas, como también permite conocer la dinámica de un ecosistema al identificar la microbiota existente. En el área de salud pública la detección de bacterias patógenas es esencial para prevenir brotes locales o regionales.

Con el fin de contar con procedimientos confiables y veraces que permitan el adecuado aislamiento e identificación de las diferentes bacterias, en el laboratorio se ha implementado la verificación y/o validación de métodos analíticos microbiológicos, la cual se define conforme la norma ISO 8402:1995 como "la confirmación mediante examen y provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico determinado" (ISO, 1994). También, la norma ISO/IEC 17025:2017 concreta la validación como "aportación de evidencia objetiva de que un ítem dado satisface los requisitos especificados. Cuando los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto" (ISO, 2017).

En cuanto a los métodos de análisis, pueden ser normalizados, no normalizados y alternativos. Cuando se habla de métodos normalizados se refiere a aquellos que han sido desarrollados por organismos o instituciones establecidas y reconocidas. Los métodos no normalizados son desarrollados por el propio laboratorio u otras partes, o adaptados de métodos normalizados y validados, pero con modificaciones (Dimar, 2020; Eurachem, 2005). Por su parte, los métodos alternativos son aquellos que han sido validados en comparación con un método de referencia normalizado y se reconocen como equivalentes. Un ejemplo de estos son los elaborados por los fabricantes de equipos.

Sin importar el tipo de método de análisis microbiológico que se desee implementar, se puede realizar una verificación o validación teniendo en cuenta los parámetros requeridos, siendo su determinación la evidencia del correcto desempeño del método. Dentro de los que se mencionan el límite de cuantificación y detección, exactitud, precisión, especificidad, tasa de negativos y positivos, robustez entre otros. Es importante tener claro, cuáles aplican al alcance que se requiera conseguir. De manera general, las etapas que se deben tener en cuenta para realizar una verificación y/o validación se resumen en la Figura 1.

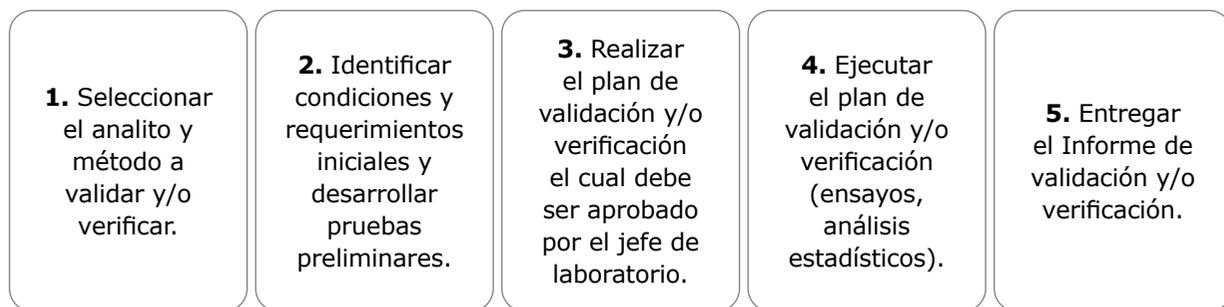


Figura 1. Etapas en el desarrollo de una validación y/o verificación.

En el laboratorio del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas (CIOH) de la Dimar se han desarrollado procesos de validación y/o verificación de diferentes métodos para la detección de microorganismos en muestras de agua marina. En este trabajo se evidencia el proceso de validación realizado para la detección de *Vibrio cholerae*, empleando el método de Filtración por Membrana, que consiste en

concentrar las bacterias contenidas en un volumen de muestra en una membrana o filtro de celulosa estéril (también puede ser de material polímero similar), con un tamaño de poro de 0.45 μm , en el cual después de un periodo de incubación en un medio de cultivo específico, según el tipo de microorganismo de interés, es posible ver la formación de colonias. Dichas colonias se contabilizan para calcular la densidad bacteriana

presente en la muestra analizada (Mulvany, 1969; Forster, 2015). Dicho método es relevante debido al ahorro de tiempo que representa con respecto al procesamiento, altamente reproducible y la posibilidad de llevarse a cabo de manera *in situ*. Siendo este último de gran impacto para los fines de investigaciones que son soportadas mediante expediciones científicas o campañas de tipo oceanográfico (Mulvany, 1969; Forster, 2015).

Vibrio cholerae se define como un bacilo móvil Gram negativo, perteneciente al género *Vibrio* de la familia *Vibrionaceae*. Es nativo de ecosistemas acuáticos y se ha logrado identificar en aguas marinas, estuarinas y fluviales. Esta bacteria se encuentra distribuida a nivel mundial y es patógeno para el ser humano, produce enfermedades diarreicas graves conocidas como vibriosis o la enfermedad del cólera, al estar presentes los serogrupos O1 y O139 (Boucher, Orata y Alam 2015; Onohuean, Agwu y Nwodo, 2022; Osunla y Okoh, 2017). La detección de esta bacteria tiene gran importancia para el sector económico, ambiental y de salud pública, ya que su presencia puede provocar brotes locales esporádicos (Escobar *et al.* 2015). Actualmente, su identificación en los laboratorios a nivel nacional para muestras ambientales es limitada, los datos recolectados en su mayoría pertenecen a muestras clínicas (INS, 2020).

Para su determinación se tuvo como referencia el método normalizado descrito por APHA, AWWA, WEF (2017): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23th edition. numeral 9260H. Los parámetros de validación determinados fueron límite de detección, sensibilidad, selectividad/especificidad, tasa de negativos y positivos, precisión, exactitud e incertidumbre, aplicables a métodos de tipo cualitativo.

METODOLOGÍA

La validación realizada para *Vibrio cholerae* se llevó a cabo empleando la metodología consignada en los procedimientos establecidos por el laboratorio del CIOH, donde se indican las etapas para la determinación y detección de *Vibrio cholerae* basadas en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 9260H (SM9260H).

Viabilidad y pureza de la cepa de trabajo

La cepa de trabajo fue adquirida por donación del INS, la cual fue sometida a las respectivas pruebas de viabilidad y pureza en el laboratorio del CIOH, con el fin de confirmar las características típicas de su especie y que fuera viable para ser empleada en el proceso de validación. Las pruebas realizadas consistieron en crecimiento en medio de cultivo agar selectivo Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), acompañada de pruebas de cuerda y Oxidasa. Crecimiento en medio de cultivo ChromoAgar, cuyas colonias fueron redondas de color turquesa o azul claro y finalmente se realizaron pruebas bioquímicas de identificación estandarizadas y miniaturizadas utilizando API 20E.

Por otra parte, se realizó una curva de crecimiento a la cepa de trabajo con el objetivo de conocer su comportamiento en condiciones de laboratorio, la metodología llevada a cabo para el fin determinado fue la medición de la masa microbiana por método óptico (turbidimétrico). Para ello se preparó una suspensión bacteriana de la cepa de *Vibrio cholerae* y se realizaron mediciones a una longitud de onda de 600 nm cada 30 minutos durante 24 horas.

Validación del método

Se evaluaron los parámetros límite de detección, sensibilidad, selectividad/especificidad, tasa de negativos y positivos, precisión, exactitud e incertidumbre, aplicables a métodos de tipo cualitativo. Para ello, se preparó una suspensión bacteriana, utilizando diluciones seriadas, partiendo de una concentración conocida de células, teniendo en cuenta el estándar de turbidez de McFarland tubo # 1. Las suspensiones se realizaron en agua de mar natural, previamente esterilizada, para el caso de los parámetros límite de detección y el desarrollo de la curva de crecimiento. Las suspensiones requeridas para los demás parámetros se prepararon en agua de mar natural con el fin de aprovechar las condiciones y microbiota acompañante.

Límite de detección

Se utilizó una dilución de 10^{-8} producto de la suspensión anteriormente mencionada. Para ello se realizaron 11 réplicas de dicha dilución, las

cuales fueron filtradas utilizando filtros estériles de nitrocelulosa con tamaño de poro 0.45 µm, con 47 mm de diámetro y, posteriormente, sembrados en agar TCBS e incubados a temperatura de 36.0 °C durante 18 a 24 horas.

Determinación parámetros de rendimiento del método

Son considerados los parámetros de precisión (concordancia), sensibilidad, especificidad/selectividad, exactitud relativa, tasa de falsos positivos y negativos (SEIMC, 2013). Para su análisis se prepararon suspensiones en la dilución 10⁻⁷ (para la cepa de trabajo corresponde a una concentración de 16 UFC/100mL). Seguido a ello, se realizó la filtración por membrana en filtros de nitrato de celulosa, con tamaño de poro de 0.45 µm de 7 muestras, las cuales posteriormente fueron sembradas en agar selectivo TCBS para determinar las cepas presuntivas positivas de *Vibrio cholerae*. Asimismo, se procesaron 7 muestras que se sembraron en agar m-FC para el aislamiento de *E. coli* como control negativo, siendo el recuento negativo. Posteriormente, se

incubaron las cajas de petri por un periodo de 18 a 24 horas a 36.0 °C para el caso de *Vibrio cholerae* y a 44.5 °C para *E. coli*. Una vez cumplido el tiempo de incubación se realizó el recuento y se diligenció la matriz 2x2 (Tabla 1).

Tabla 1. Matriz de 2x2 o tabla de contingencia para los datos de tasa de falsos positivos y negativos.

Conteo confirmado	Conteo presuntivo	
	Positivo (+)	Negativo (-)
Presuntivo (+)	a	b
Presuntivo (-)	c	d

En donde,

a: verdaderos positivos

b: falsos negativos

c: falsos positivos

d: verdaderos negativos

Una vez se obtuvieron los datos, se utilizaron las ecuaciones descritas en la Tabla 2 para la determinación de los parámetros de la validación.

Tabla 2. Relación de parámetros de validación a determinar y sus ecuaciones.

<p>Parámetro de precisión (concordancia)</p> $k = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e}$ <p>Donde, Po= (a+d)/n Pe= [(c*(a+c))+((a+b)*(b+d))]/n²</p>	<p>Parámetro de sensibilidad</p> $\text{Sensibilidad \%} = \frac{a}{a + b} * 100$
<p>Parámetro de especificidad/selectividad</p> $\text{Especificidad \%} = \frac{d}{c + d} * 100$	<p>Parámetro de exactitud relativa</p> $\text{Exactitud relativa \%} = \frac{a + d}{n} * 100$
<p>Parámetro tasa de falsos positivos</p> $\text{Tasa de falsos positivos \%} = \frac{c}{a + c} * 100$	<p>Parámetro tasa de falsos negativos</p> $\text{Tasa de falsos negativos \%} = \frac{b}{b + d} * 100$

Robustez

El ensayo se llevó a cabo teniendo en cuenta el tiempo de incubación de la etapa de enriquecimiento (6-8 horas) de *Vibrio cholerae* a una temperatura de 36.0 °C. El ensayo consistió en evaluar dos tiempos de enriquecimiento de 6 y 18 horas, con la finalidad de verificar si existía alguna diferencia en la concentración del microorganismo objeto de estudio con esta variación. Para determinar si existían diferencias significativas entre los tiempos evaluados, se realizó una prueba de ANOVA que corresponde a comparar la varianza de las medias entre cada uno de los grupos de datos a evaluar, siendo significativo cuando el valor p es mayor a 0.050. Este análisis se realizó utilizando el programa estadístico MiniTAB 19.20.

Incertidumbre

Para determinar la incertidumbre expandida (Eurachem, 2015), definida como un valor que representa la dispersión de los datos, se calcula teniendo en cuenta inicialmente el valor de la incertidumbre estándar y estándar combinada, la cual involucra las incertidumbres de los equipos, materiales, reactivos y operario que participan en la validación. Para el caso de equipos, materiales y reactivos, se toma la incertidumbre de los certificados de calibración y de análisis, según corresponda. La incertidumbre del operario se puede tener en cuenta con el coeficiente de variación que se deriva de los ensayos de repetibilidad. Una vez se cuenta con estos datos, se calcula la incertidumbre expandida con la siguiente ecuación:

$$xU = \mu_c(y) * k \quad (\text{Ecu. 1})$$

En donde,

$\mu_c(y)$: incertidumbre estándar combinada.

k : Factor de cobertura = 2 (nivel de confianza del 95 %).

Método de filtración por membrana en la detección de *Vibrio cholerae*

Una vez determinados los parámetros de la validación, se procedió a la aplicación del método descrito en el Standard Methods for

the Examination of Water and Wastewater. 23th edition. 9260H y adoptado por el laboratorio del CIOH de la Dimar. Para ello se tomaron 7 muestras de agua marina. De cada una de estas se tomaron 100 mL para el proceso de filtración, se utilizó un filtro de membrana 0.45 μm y se continuó con el proceso de enriquecimiento en Agua Peptona Alcalina (APA) al 1 %. Finalmente, fue incubada por un periodo de 18 a 24 horas a una temperatura de 36.0 °C. Trascurrido el tiempo de incubación del APA, se realizó siembra empleando Agar TCBS, el cual se llevó a incubación por 18 a 24 horas a 36.0 °C. Posteriormente, para las pruebas complementarias, se utilizó agar BHI y ChromoAgar. pruebas de cuerda, Oxidasa y API20E.

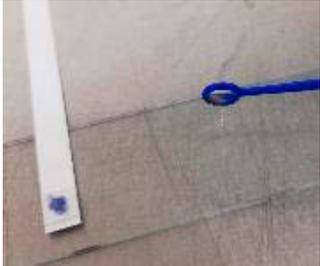
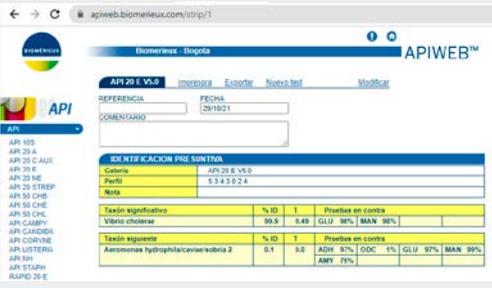
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Viabilidad y pureza de la cepa de trabajo

Las pruebas de viabilidad y pureza realizadas a la cepa de trabajo *Vibrio cholerae* MR-VcO1 fueron satisfactorias, tal como se muestran en la Tabla 3. Se obtuvieron colonias características de la especie en los 2 Agares empleados TCBS y ChromoAgar. El agar TCBS es reconocido por ser un agar selectivo, eficiente para las especies de *Vibrio* debido a su composición, en la cual el porcentaje de NaCl permite su crecimiento al ser consideradas bacteria halófila. Teniendo en cuenta que este Agar es utilizado para el aislamiento y selección de las bacterias, de acuerdo con sus características morfológicas es recomendable complementar con otras pruebas como las realizadas en este estudio, pruebas bioquímicas sacarosa (en agar TCBS), cuerda, Oxidasa y API20, las cuales arrojaron resultados positivos para la especie en estudio (Tabla 3). En cuanto al uso del ChromoAgar, al ser un medio de cromogénico, permitió seleccionar colonias de la especie en estudio de forma más selectiva.

En cuanto a la curva de crecimiento, mostró que la fase estacionaria de la cepa de *Vibrio cholerae* MR-VcO1, inicia aproximadamente desde las 15 horas de incubación (Fig. 2). De este modo se escoge para todos los ensayos de la validación trabajar el inóculo desde las 18 horas de incubación, siendo coherente con lo encontrado en otras investigaciones realizadas (Martínez, Megli y Taylor, 2010).

Tabla 3. Resultados pruebas de viabilidad y pureza cepa de trabajo *Vibrio cholerae*.

<p>Agar TCBS (tiosulfato citrato bilis sacarosa) Sacarosa (+/-)</p>	<p>Colonias redondas, bordes traslúcidos, centros opacos con tamaños aproximados de 2 mm Sacarosa (+)</p>	
<p>Oxidasa (+/-)</p>	<p>Positiva</p>	
<p>Cuerda (+/-)</p>	<p>Positiva</p>	
<p>ChromoAgar</p>	<p>Colonias de color verde azulado y/o azul turqués</p>	
<p>API 20E*</p>		

*El valor numérico obtenido de la lectura de las pruebas API20E trascurrido el tiempo de incubación (24 horas a 36.0 °C), al ser ingresado a la aplicación de BIOMEREUx, arrojó que la cepa corresponde a 99.9 % a la especie de *Vibrio cholerae*.

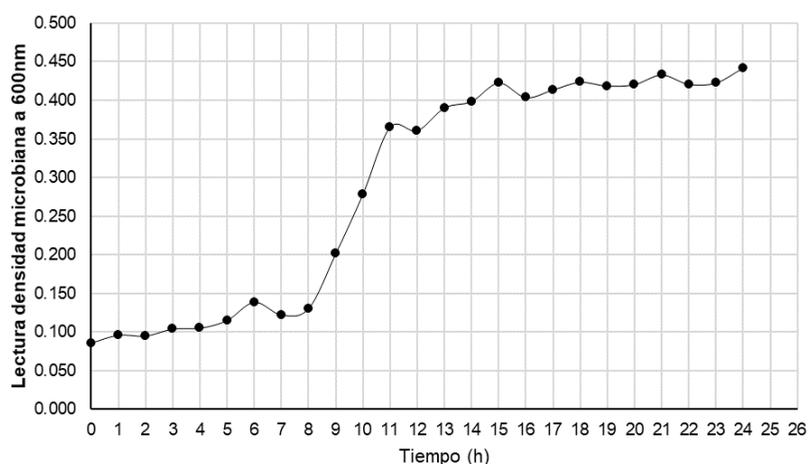


Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa de donación *Vibrio cholerae* MR-VcO1. Comportamiento para un periodo de 24 horas de lectura por intervalos de 30 minutos.

Límite de detección

El ensayo realizado proporcionó una probabilidad del 90 % de réplicas positivas (Tabla 4), es decir, con presencia de la cepa de *Vibrio cholerae*. Al lograr obtener un límite de detección bajo, como se evidencia en la Figura

3 con el crecimiento de una colonia, aumenta la probabilidad de encontrar concentraciones más bajas en las muestras analizadas, siendo importante en la detección de microorganismos potencialmente patógenos.

Tabla 4. Limite de detección determinado por dos analistas.

Límite de cuantificación			
#	Dilución base 10	1 UFC*	1 UFC
		Analista1	Analista2
1	-8	Presencia	Ausencia
2	-8	Presencia	Presencia
3	-8	Ausencia	Presencia
4	-8	Presencia	Presencia
5	-8	Presencia	Presencia
6	-8	Presencia	Presencia
7	-8	Presencia	Ausencia
8	-8	Presencia	Presencia
9	-8	Presencia	Presencia
10	-8	Presencia	Presencia
11	-8	Presencia	Presencia
# datos Presencia		10	9
# datos Ausencia		1	2
Promedio dato esperado (presencia)		9.5	
Promedio dato no esperado		1.5	
%		95 %	
Debe ser >90 %			

* Unidades formadoras de colonia (UFC).



Figura 3. Límite de detección determinado por dos analistas.

Parámetros de rendimiento del método

Los resultados se observan en la Tabla 5. Este se determinó mediante el índice de concordancia de Kappa y el resultado obtenido fue de 0.82, cuya interpretación indica que existe una muy buena concordancia entre los ensayos realizados para su determinación y el método empleado. El valor para tener un resultado satisfactorio debe ser mayor al 90 %. Se obtuvieron valores del 90 % para la sensibilidad y del 94 % para la especificidad.

Tabla 5. Recuento de cepas positivas y negativas en matriz 2x2.

Conteo confirmado	Conteo presuntivo	
	Positivo (+)	Negativo (-)
Presuntivo (+)	18	2
Presuntivo (-)	2	31

Parámetro	Resultado
Precisión (concordancia)	0.82
Sensibilidad	90 %
Especificidad/selectividad	94 %
Exactitud relativa	92 %
Tasa de falsos positivos	10 %
Tasa de falsos negativos	6.0 %

En cuanto a la exactitud relativa, al igual que los parámetros de sensibilidad y especificidad, se

espera que tenga un valor mayor a 90 %. Para el experimento desarrollado en esta validación se logró obtener un valor de 92 %, siendo un resultado aceptable y satisfactorio. Lo que indica que los medios de cultivo empleados son adecuados para el aislamiento de las bacterias objeto de estudio, ya que permiten su crecimiento, supliendo las necesidades nutricionales básicas de los microorganismos siendo específico y limitando el crecimiento a otras bacterias.

Por su parte, la tasa de falsos positivos y negativos, por el contrario de los anteriores parámetros, se espera que tenga un porcentaje bajo (< 10 %), ya que se relaciona con la capacidad tanto del método como del analista en identificar colonias típicas o no. Los resultados obtenidos corresponden a 10 % y 6 %, respectivamente, lo que indica que existe baja posibilidad en obtener falsos positivos con el método empleado. Teniendo en cuenta las características de especificidad y/o selectividad del método en cuanto al medio de cultivo seleccionado empleado, limita el crecimiento y desarrollo de otros organismos, los cuales, aunque se desarrollen con las pruebas bioquímicas complementarias, resultan ser descartados antes de ser incluidos en el cálculo final de la concentración bacteriana total.

Robustez

Los métodos microbiológicos no son robustos debido a su naturaleza, teniendo en cuenta que la mayoría de las impurezas o interferentes son organismos vivos. Aun así, para el caso del método validado, se pudo identificar la robustez realizando ensayos y empleando variables como la temperatura, tiempo de incubación, entre otros.

En la Tabla 6 se relacionan los recuentos obtenidos para el ensayo. El análisis estadístico ANOVA realizado mostró que no existen diferencias significativas entre las concentraciones, al variar el tiempo de enriquecimiento significativamente con un valor de $p=0.086$, lo que indica que las variaciones en tiempos de enriquecimiento no modifican los resultados esperados. Claro está que este tiempo de enriquecimiento, si se extiende más de 18 horas, debe ser evaluado para ampliar la hipótesis, ya que esta etapa busca recuperar las células ya existentes en la muestra, más no aumentar la masa microbiana, lo cual puede suceder con tiempos largos de enriquecimiento.

Tabla 6. Datos conteos para estimación de la robustez del método.

Tiempo enriquecimiento (horas)	Día	Réplicas	Conteo UFC	Log UFC	Promedio	Desviación	UFC Promedio final
6	Día 1	1	432	2.635	2.543	0.054	349
		2	387	2.588			
		3	297	2.473			
		4	287	2.458			
		5	311	2.493			
		6	342	2.534			
		7	415	2.618			
	Día 2	1	368	2.566			
		2	355	2.550			
		3	347	2.540			
		4	311	2.493			
		5	367	2.565			
		6	348	2.542			
		7	342	2.534			
18	Día 1	1	335	2.525	2.431	0.105	270
		2	318	2.502			
		3	390	2.591			
		4	355	2.550			
		5	287	2.458			
		6	223	2.348			
		7	245	2.389			
	Día 2	1	298	2.474			
		2	197	2.294			
		3	258	2.412			
		4	227	2.356			
		5	295	2.470			
		6	170	2.230			
		7	295	2.470			

Incertidumbre

Para el caso de métodos de análisis cualitativos, como fue el caso de la validación realizada, la incertidumbre se considera despreciable; por tanto, no se tiene en cuenta. Aun así, para obtener el resultado de este parámetro se realizó la identificación de las incertidumbres de diferentes fuentes que se ven involucradas en el ensayo, lo cual permite identificar cuáles son los instrumentos y/o equipos que aportan mayor variación al resultado. El valor obtenido para la

incertidumbre combinada fue de 1.741 y para la incertidumbre expandida fue de 3.483.

CONCLUSIONES

El proceso de validación es una forma experimental sistemática que proporciona una idea clara de las capacidades y limitaciones de un método analítico, así como también la técnica de muestra que deben contemplarse en un laboratorio de ensayos y calibración.

Conocer que la cepa de trabajo se encuentra en condiciones aptas resulta ser un paso imprescindible antes de realizar los ensayos de validación, ya que si esta ha perdido sus características genotípicas puede limitar el proceso de validación. Por su parte, el límite de detección llevado a cabo en la validación del método de detección para *Vibrio cholerae* tuvo una probabilidad para los valores del 95 %, encontrándose dentro del criterio de aceptación correspondiente al 90 %. Para los parámetros de rendimiento, los resultados obtenidos se encuentran dentro del criterio de aceptación óptimo. El método resulta ser sensible y específico para el microorganismo de interés.

Se evidenció la selectividad del medio de cultivo TCBS para la identificación de cepas presuntivas de *Vibrio cholerae* características, en el cual el control negativo (*E. coli*) no mostró crecimiento en ninguna de las diluciones realizadas, pero sí en su agar selectivo-FC. Con los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros determinados, se puede considerar que la metodología evaluada es adecuada para la detección de *Vibrio cholerae* en aguas marinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23th edition. 9260H.
- Boucher, Y.; Orata, F. D.; Alam, M. (2015). The out-of-the-delta hypothesis: dense human populations in low-lying river deltas served as agents for the evolution of a deadly pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1120. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01120>. PMID:26539168 PMCID:PMC4609888
- Dirección General Marítima. (2020). *Procedimiento técnico selección, validación o verificación de métodos de ensayo y cálculo de la incertidumbre de la medición* (M5-00-PRO-026). Dimar. Bogotá.
- Escobar, L. E.; Ryan, S. J.; Stewart-Ibarra, A. M.; Finkelstein, J. L.; King, C. A.; Qiao, H.; Polhemus, M. E. (2015). A global map of suitability for coastal *Vibrio cholerae* under current and future climate conditions. *Acta Trópica*, 149, 202-211. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.028> PMID:26048558
- Eurachem. (2005). *Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. Los Cués, Qro., México.
- Forster, B. (2015). *Bacteriological Examination of Waters: Membrane Filtration Protocol*. American Society for Microbiology. <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Bacteriological-Examination-of-Waters-Membrane-Filtration-Protocol.pdf?ext=.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. (2020). Vigilancia y análisis del riesgo en salud pública: Protocolo de vigilancia en la salud pública. Colera. *INS*, 1-15. https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/Lineamientos/Pro_Colera.pdf
- International Organization for Standardization. (1994). *ISO Guide 8402: Quality- vocabulary*. Ginebra.
- International Organization for Standardization. (2017). *ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*.
- Martínez, R. M.; Megli, C. J.; Taylor, R. K. (2010). Growth and laboratory maintenance of *Vibrio cholerae*. *Current protocols in microbiology*, 17(1), 6A-1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06a01s17> PMID:20440684 PMCID:PMC4142487
- Mulvany, J. (1969). *Chapter VII Membrane Filter Techniques in Microbiology*. Methods in Microbiology. sciencedirect. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70138-7](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70138-7). [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70138-7](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70138-7)
- Onohuean, H.; Agwu, E.; Nwodo, U. U. (2022). A Global Perspective of *Vibrio* Species and Associated Diseases: Three-Decade Meta-Synthesis of Research Advancement. *Environmental Health Insights*, 16, 11786302221099406. <https://doi.org/10.1177/11786302221099406> PMID:35601189 PMCID:PMC9121474
- Osunla, C. A.; Okoh, A. I. (2017). *Vibrio* pathogens: A public health concern in rural

water resources in sub-Saharan Africa. *International journal of environmental research and public health*, 14(10), 1188. <https://doi.org/10.3390/ijerph14101188>. PMID:28991153
PMCID:PMC5664689

SEIMC. (2013). *Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos*. ISBN-13: 978-84-616-6564-8.