

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA SENCILLA PARA ESTABLECER LA PRESENCIA DE COLIFORMES EN AGUA DE CONSUMO HUMANO Y SU CORELACION CON EL METODO DE FERMENTACION DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)

B. Ortiz, F. Cano¹ y T. Aguilar de Miranda²

1. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP)

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

Escuela de Química Biológica

Resumen

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

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

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

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

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

Metodología**Formulación del medio de cultivo**

La formulación del método de cultivo se realizó con base en los componentes del medio P-A usado en el test de Presencia-Ausencia de coliformes en agua. El método de P-A es cualitativo y permite determinar la presencia de coliformes a través de un cambio de color del medio provocado por la reacción de fermentación de la lactosa. También se tomó en cuenta un estudio realizado en la India, donde utilizaron tiras de papel filtro impregnadas con un medio de cultivo para observar la producción de H_2S . Esta reacción fue asociada con la presencia de coliformes en el agua. El medio fue formulado con los siguientes ingredientes: extracto de levadura (1g), triptona (5g), cloruro de sodio (0.5g); lauril sulfato de sodio (1g) que actúa como agente tensioactivo, fosfato de potasio monohidratado (K_2HPO_4 , 0.1g) para mantener el pH del medio, el carbohidrato de fermentación lactosa (5g) sobre el cual se fundamenta la prueba. El indicador púrpura de bromocresol sirve para manifestar o hacer visible la reacción de fermentación de lactosa y de tiosulfato de sodio (0.3g) que es usado como neutralizador de cloro. Se obtiene un pH final de 6.8 ± 1 .

Preparación del disco de papel filtro para absorber el medio de cultivo formulado

El tamaño del disco de papel filtro Whatman No. 3 se estableció, tomando como referencia el área estimada en el estudio realizado en la India donde utilizaron tiras de papel con un área de 80 cm^2 (1). Sin embargo, el tamaño del área se disminuyó a 13 cm^2 lo cual es equivalente a 4 cm de diámetro. Razón por la cual se hizo la reducción para

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

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

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

Establecimiento de el volumen de muestra.

Se estableció el volumen de agua a ser inoculado tomando como base el volumen utilizado en el estudio realizado en la India. En dicho estudio se estandarizó un volumen de 20 ml de agua. Por esa razón se utilizó el mismo volumen (1).

Evaluación, aplicación y sensibilidad de la prueba

Luego de establecer el medio de cultivo, tamaño del disco, envase y volumen muestra, se procedió a evaluar la aplicación y sensibilidad del disco. Se prepararon cultivos de cepas conocidas de bacterias coliformes: *E. coli* ATCC 25922 y cepas del género *Klebsiella ozanae* INV 870792 y *Citrobacter* sp. INV 13496, aisladas en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). Estas cepas se utilizaron para verificar la reacción de fermentación de la lactosa, y determinar el número de bacterias que la prueba es capaz de detectar, y se utilizó como control negativo (no fermentador de la lactosa) la cepa de *S. aureus* INV 13025 aislada en el laboratorio de microbiología del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP).

Las cepas utilizadas fueron aisladas en agar Muller-Hinton y MacConkey para chequear su pure: a e identificarlas. Al mismo tiempo se realizó las diferentes pruebas bioquímicas para caracterizarlas.

A partir de cultivos de 24 horas de incubación a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ en agar Muller-Hinton se hicieron suspensiones de éstas cepas con una turbidez de MacFarlan de 0.5 (aproximadamente 10⁹ bacterias/ml). A partir de ésta suspensión se realizaron las siguientes diluciones: 10², 10⁴, 10⁶, 10⁸ (1ml de suspensión + 9 ml de diluyente). A cada dilución se le cuantificó el número de células presentes filtrando 1 ml de cada una en una membrana de 0.45 μm , las que fueron colocadas posteriormente en una caja de agar ENDO e incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 24 horas. Se contó el número de colonias por dilución.

También se inoculó 1 ml en 19 ml de agua estéril y así obtener los 20 ml de agua contaminada estimados como volumen estándar que se necesita para evaluar la unidad preparada. Esto hizo establecer el número de bacterias que son capaces de fermentar la lactosa y así determinar la sensibilidad de la prueba. La dilución menor en donde se obtuvo un cambio de color estable (10⁶) determinó la sensibilidad de la prueba. Esta dilución es tomada como referencia para establecer el control positivo y el control de calidad de la prueba.

Validación de la prueba

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

Diseño Experimental

Diseño de Muestreo

El muestreo se realizó completamente al azar, y fue un estudio ciego. Se analizaron 280 muestras de agua. El número de muestra se determinó por los siguientes cálculos:

$$\begin{aligned} n &= NC^2S^2 / \nabla^2 \\ NC &= Z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta} \\ \alpha &= 0.05 \quad \beta = 0.20 \\ NC &= 3.33 \\ \nabla &= 0.05 \\ s^2 &= p \cdot q \\ p &= 0.5 \\ q &= 0.5 \end{aligned}$$

$$n = \frac{(3.33)^2 (0.25)^2}{(0.05)^2}$$
$$n = 277.22$$

Análisis de resultados

Por ser un estudio descriptivo no lleva hipótesis. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Kappa, se les determinó el índice de concordancia.

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

Resultados y discusión

Formulación del medio de cultivo

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

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

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

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

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

Preparación del disco de papel filtro para absorber el medio de cultivo formulado

El objetivo del estudio es facilitar a las comunidades que no cuentan con infraestructura, el análisis bacteriológico del

agua. Por tal razón se evaluó una forma sencilla de poder transportar y almacenar el medio de cultivo. Se estableció el uso de discos de papel filtro Whatman No. 3 con un diámetro de 4 cm. El papel filtro Whatman No. 3 posee un grosor adecuado que permite la absorción de 0.5 a 1 ml del medio al momento de impregnar el disco. Puede ser sometido a procesos de esterilización sin deteriorarse. También se realizaron pruebas con papel No. 1 y No. 2 las cuales no resultaron ser funcionales pues el grosor del papel no absorbe el mínimo de volumen del medio (0.5 ml) y se deteriora con facilidad al ser sometido al proceso de esterilización.

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

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

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

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

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

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

Evaluación de las condiciones de almacenamiento

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

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

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

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

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

Establecimiento del volumen de muestra

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

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

Aplicación y sensibilidad de la prueba

La evaluación del disco se hizo utilizando cepas control de *E. coli* ATCC 25922, y los géneros: *Klebsiella ozanae* INV 870792, *Citricoccus* spp INV 13496. Como se menciona en la metodología a partir de suspensiones y diluciones

decimales se cuantificaron las bacterias y se estableció que la menor concentración de bacterias/ml es equivalente a la dilución 10^6

A esta concentración se determinó que el número de bacterias detectadas por el método es igual 8 bacteria/ml permitiendo establecer la sensibilidad de la prueba. Para establecer el control positivo (control de calidad) se utilizó la misma dilución pues a esa concentración de bacterias la estabilidad de la reacción de fermentación es óptima en el cambio de color. Las pruebas de sensibilidad fueron realizadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ en 24 ± 1 horas de incubación. Como control negativo se utilizó cepa de *S. aureus* INV 13025 para establecer el monitoreo de las condiciones de esterilidad del medio.

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

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

La interpretación de la prueba es de carácter cualitativo: un resultado negativo se da cuando después del tiempo y temperatura de incubación no hay cambio de color (tono púrpura); un resultado es positivo cuando sucede un cambio de color púrpura a amarillo.

Es importante mencionar que la evaluación del disco se hizo para determinar coliformes totales, para los coliformes fecales se dificulta debido a que es necesario utilizar un baño de María a $44-45^{\circ}\text{C}$ ya que por definición los coliformes fecales crecen a esa temperatura.

Validación de la prueba

Se analizó un total de 280 muestras y fueron evaluadas a dos tiempos y temperaturas de incubación (24 ± 1 y 48 ± 1 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ y $25^{\circ}\text{C} \pm 1$). Ambas temperaturas resultaron óptimas ya que a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ y 24 ± 1 horas de incubación un 66 por ciento de las muestras fueron positivas y a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$

y 48 ± 1 horas la positividad de las muestras fue de un 74 por ciento. (ver Tabla 1).

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

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

Estadísticamente se comparó el estudio realizado con el método Fermentación de Tubos Múltiples para establecer el nivel de correlación (2).

La sensibilidad de la prueba es de 93 por ciento y la especificidad es de 95 por ciento (ver Tabla No.2). El índice de correlación de acuerdo a la prueba de kappa es 0.88 (ver Tabla No. 3) (2).

Estadísticamente, existe una muy buena correlación con el método fermentación de tubos múltiples, es una prueba altamente sensible y específica por lo que se cataloga como una prueba cualitativa que puede ser utilizada para el monitoreo de los sistemas de abastecimiento, a lo largo de las redes de distribución y de esa manera garantizar agua potable para consumo humano. También se determinó el valor predictivo positivo el cual es igual a 97 por ciento y el valor predictivo negativo igual a 90 por ciento (ver Tabla No.4) (2).

La validación de la prueba esta realizada para determinar coliformes totales. Como se menciona anteriormente, uno de los objetivos es facilitar a la comunidades que no cuentan con infraestructura el análisis del agua, por esa razón para determinar coliformes fecales se dificulta pues es necesario proporcionar una temperatura de $44-45^{\circ}\text{C}$ y eso conlleva a la utilización de baños de María, y no todas las comunidades, o áreas del interior de la república tienen acceso a esos recursos.

Tabla No. 1
COMPARACION DE TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACION

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

* N = 152 Muestras positivas verdaderas

Tabla No. 2
SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA

FORMULA	DESCRIPCION DE LA FORMULA	CALCULO
$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{\text{PV}}{\text{pv} + \text{FN}} \times 100$	PV = POSITIVOS VERDADEROS	$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{152}{(152+12)} \times 100 = 93\%$
$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{\text{NV}}{\text{NV} + \text{FP}} \times 100$	NV = NEGATIVO VERDADERO FP = FALSOS POSITIVOS FN = FALSOS NEGATIVOS	$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{152}{(152+12)} \times 100 = 95\%$

Tabla No. 3
 NIVEL DE CONCORDANCIA DE LA PRUEBA UTILIZANDO LA PRUEBA DE KAPPA
 CORRELACION ESTADISTICA DEL METODO EVALUADO

FORMULAS	DESCRIPCION DE LAS FORMULAS	DETERMINACION INDICE DE KAPPA:	INTERPRETACION INDICE DE KAPPA
$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$	a = positivos verdaderos	$P = \left[\frac{(152+5) \times (152 + 12)}{280} \right] \times 280 = 90.44$	<0.20 = Correlación deficiente
	d = negativos verdaderos	$N = (12+111) - \{ (152+12) - 90.44 \} = 49.44$	0.21-0.40 = Correlación regular
$Po = \frac{a + d}{n}$	n = total de muestras		0.41 - 0.60 = Correlación moderada
$Pe = \frac{P+N}{N}$	c = falsos negativos	$Pe = \frac{90.44 - 40.44}{280} = 0.50$	0.61-0.80 = Correlación buena
	b = falsos positivos		0.81-1.0 = Correlación muy buena
$P = \frac{[(a+b) \times (a+c)] \times n}{n \times n}$	p = concordancia con positivos	$Po = \frac{152+111}{280} = 0.94$ $K = \frac{0.94 - 0.1}{1 - 0.50} = \frac{0.44}{0.5} = 0.88$	
$N = (c+d) - [(a+c) - P]$	N = concordancia con negativos		

Tabla No. 4
DETERMINACIÓN DE VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y NEGATIVO

FORMULAS	CALCULOS
VALOR PREDICTIVO = $(FV)/(Pv+FP) \times 100$ POSITIVO	$152/(152+5) \times 100 = 97\%$
VALOR PREDICTIVO = $(NV)/(NV+NF) \times 100$ NEGATIVO	$111/(111+12) \times 100 = 90\%$

Tabla No. 5
DETERMINACION DE LOS VERDADEROS POSITIVOS Y NEGATIVOS PARA ESTABLECER EL NIVEL DE
CONCORDANCIA DE LA METODOLOGÍA EVALUADA PARA COLIFORMES TOTALES
CON EL MÉTODO DE FERMENTACIÓN DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)

N = 280

NÚMERO MAS PROBABLE (NMP)

METODOLOGIA
EVALUADA

	+	-
+	152	5
-	12	111

POSITIVOS VERDADEROS = 152
NEGATIVOS VERDADEROS = 111
FALSOS POSITIVOS = 5
FALSOS NEGATIVOS = 12

Ventajas

Es una prueba sencilla, de fácil manejo que no necesita de infraestructura, equipo de laboratorio y capacitado para su aplicación. Solamente en lugares en los cuales la temperatura se encuentra debajo de 20°C a 25°C es necesario el uso de una incubadora.

La unidad es práctica para su almacenamiento debido a que no ocupa mayor espacio.

El disco DAT-PA tiene incorporado tiosulfato de sodio como parte de la formulación lo cual permite el monitoreo de aguas clorinadas.

Desventajas

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

Nombre de la prueba

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

Conclusiones

Estadísticamente el método DAT-PA (disco agua test – presencia ausencia) es altamente específico y sensible para determinar coliformes totales en el agua.

Correlaciona muy bien con el método de

Fermentación de Tubos Múltiples por lo que puede ser catalogado como un sistema de monitoreo de carácter cualitativo.

El test DAT-PA es un método sencillo para monitorear la presencia de coliformes totales en los sistemas de distribución de agua a nivel rural, es de bajo costo y su transporte y almacenamiento a través del uso de bolsas plásticas estériles simplifica la ejecución de la prueba, principalmente cuando no es posible contar con la infraestructura de laboratorio.

Las temperaturas de incubación para el método evaluado son 36°C ± 1 y 25°C ± 1. Ambas son óptimas sin embargo para encubar las muestras a temperatura ambiente es necesario un tiempo de 48 horas para observar la reacción.

El tiosulfato de sodio actúa como inactivador del cloro presente en el agua, la incorporación de éste componente en la formulación del medio permite que el método DAT-PA sea utilizado para monitorear sistemas de distribución de aguas clorinadas.

El DAT-PA permanece estable durante un período de tres meses almacenado en un rango de 4°C-8°C y/o a temperatura ambiente (25°C) sin exponerse a la luz.

Referencias

1. K.S. Manja., et al. 1982. A simple field method for detection of fecal pollution in drinking water. Bull. of Wor. H. Organ. 60 (5):797-801.
2. A. E. Greenberg. et al. 1992. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 18th ed. Wasington D.C. pg. 10-130. pg. 9-45-9-63.
3. Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serología de los Bancos de Sangre. 1994. PHAO/HPC/HCT/ 94.21. Washington D.C. pg. 15 - 18 y 20 - 21