

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO
EN
GESTIÓN PARA EL DESARROLLO SUSTENTABLE**

**ESTANDARIZACIÓN DEL NÚMERO MÁS PROBABLE
MOLECULAR (NMP – LAMP) PARA DETECCIÓN DE
Escherichia coli Y *Enterococcus faecalis* EN
MICROCUENCAS HIDROGRÁFICAS DE LA REGIÓN
AMAZONAS**

Autor: Bach. Rocio Jara Vilca

Asesor (a). PhD. Alonso Rafael Tapia Limonchi

Coasesor (a). PhD. Stella Maris Chenet Carrasco

Registro: (.....)

**CHACHAPOYAS – PERÚ
2022**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



ANEXO 6-H

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS DE MAESTRÍA (X)/DOCTORADO () EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Jara Vilca, Rocío
DNI N°: 72690038
Correo electrónico: rocio.jara-rpg@untrm.edu.pe
Nombre de la Maestría (X) / Doctorado (): Gestión para el Desarrollo Sostenible

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): _____
DNI N°: _____
Correo electrónico: _____
Nombre de la Maestría () / Doctorado (): _____

2. Título de la tesis para obtener el grado académico de Maestro (X) / Doctor ()

Estandarización del número más probable molecular (NMP-LAMP) para detección de Escherichia coli y Enterococcus faecalis en micro cueros hidrográficos de la Región Amazonas

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Tapia Limenchi, Alonso Rajael
DNI, Pasaporte, C.E N°: 25770545
Open Research and Contributor-ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9670-0970> 0000-0001-7483-7729



Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: Chenet Carasco, Stelbo Maris
DNI, Pasaporte, C.E N°: 41255427
Open Research and Contributor-ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9670-0970> 0000-0002-5305-0664

4. Campo del conocimiento según Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-inmunología)

https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html
Ciencias del Medio Ambiente y Biología celular, microbiología

5. Originalidad del Trabajo


Con la presentación de esta ficha, el/ la autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

6. Autorización de publicación

El/los titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la Licencia creative commons de tipo BY-NC. Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación -RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 08 / diciembre / 2022


Firma del autor 1


Firma del autor 2


Firma del Asesor 1


Firma del Asesor 2

DEDICATORIA

A mis padres:

Heriberto Jara Huimac y María Antonia Vilca Yalta; por el apoyo constante, por ser mi fuerza e inspiración para conseguir cada una de mis metas, por los principios y enseñanzas inculcadas; ya que la verdadera sabiduría está en que uno nunca termina de aprender. Son ustedes el soporte fundamental en mi vida.

A mi hermano:

Heriberto Jara Vilca, por ser mi mejor amigo, ya que contigo comparto los recuerdos de infancia y los sueños de adultos. Por enseñarme, que cada logro comienza con la decisión de intentarlo; y que a pesar que el camino sea difícil, nada es imposible en esta vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios Por haberme dado la vida y sabiduría, que han permitido haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional; por protegerme durante todo mi camino, y brindarme fuerzas para superar obstáculos a lo largo del trayecto.

Al Proyecto Prototipo de kit para prueba en campo del número más probable (NMP) de Coliformes totales y *Escherichia coli*, y presencia de productos farmacéuticos en las principales microcuencas de la región amazonas”- N° 006-2020-fondecyt-bm, por el financiamiento de la tesis en mención.

A mi Asesor de Tesis PhD. Alonso Rafael Tapia Limonchi, agradecerle infinitamente por compartir sus conocimientos y su experiencia como investigador; por su tolerancia, compromiso y su desinteresada orientación en la elaboración de la presente tesis de investigación, que genera nuevos y valiosos conocimientos para la ingeniería ambiental en el campo de la biología molecular. A sí mismo, recalcar que la ciencia es la prosperidad y la fuente de vida para progresar.

A mi Coasesora PhD. Stella Maris Chenet Carrasco, por la paciencia y horas dedicadas de su valioso tiempo, en la colaboración y orientarme en el proceso de investigación, por la exigencia puesta hacia mi persona, y demostrarme que cada día siempre hay algo nuevo que aprender; ya que no hay investigación sin enseñanza, ni enseñanza sin investigación.

Al Instituto de Enfermedades Tropicales – UNTRM de Chachapoyas, porque en sus ambientes pude realizar satisfactoriamente la investigación, para cumplir con los objetivos y dar a conocer los resultados; debido al equipamiento que posee. Agradecer al apoyo constante y desinteresado del personal que labora en dichas instalaciones.

A la Bach. Milagros del Pilar Saavedra Samillán, por su apoyo desinteresado en la etapa de ejecución en laboratorio, así mismo por demostrar interés en la investigación realizada y por la capacidad de empatía y humildad que le caracteriza, porque no es aquel que se jacta de saber si no de entender que el conociendo es aquello que se ignora en el mar del conocimiento.

Al Bach. Julio César Sandoval Bances, por su apoyo incondicional en la etapa de ejecución de la tesis, por su paciencia y optimismo acertadas, demostrando interés, humildad y compañerismo, porque en investigación es mejor tener perspectivas diferentes en la observación de la problemática, para poder llegar a un mejor entendimiento y solución.

A la Bach. María de Fátima Ivette Burgos Huamán por su apoyo en trabajo de gabinete, demostrando compañerismo y humildad, por sus aportes valiosos en los análisis de los resultados; ya que la esencia de una investigación es la probabilidad estadística de la hipótesis a verificar.

Al investigador Mg. Jesús Rascón Barrios, por sus enseñanzas y su paciencia; por compartir sus experiencias como investigador; brindándome aportes valiosos en el proceso de ejecución de la investigación, a su vez por demostrarme de que la ciencia es la tecnología del mañana, y lo que hoy ignoramos viene a ser el motor para un mejor aprendizaje.

Al Laboratorio de Aguas y Suelos – UNTRM, Porque mediante sus análisis paralelos a la investigación, pudimos corroborar las ventajas y desventajas del método molecular y el método tradicional para el análisis microbiológico de la calidad de agua, Así mismo, se pudo verificar si el método molecular es eficaz.

Al Bach. José Carlos Santa Cruz Guerrero, por su apoyo desinteresado en el proceso de ejecución en laboratorio de la presente investigación, así mismo por su compañerismo en el trabajo en equipo, y demostrar que la investigación científica es un modo peculiar del pensamiento humano.

Al Laboratorio Referencial de Salud Pública – Amazonas, por la donación de las cepas en interés, para poder realizar la investigación siendo un punto clave para la estandarización para lograr los objetivos planteados.

Naval Medical Research Unit Six (Namru 6), por la donación generosa del buffer para la estandarización de la PCR – LAMP y del NMP – LAMP; gracias a ello se pudo cumplir con los objetivos.

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO

RODRIGUEZ DE MENDOZA

Dr. Policarpio Chauca Valqui
RECTOR

Dr. Miguel Ángel Barrena Gurbillón
VICERRECTOR ACADÉMICO

Dra. Flor Teresa García Huamán
VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN

Dr. Raúl Rabanal Oyarce
DIRECTOR(a) DE LA ESCUELA DE POSTGRADO

VISTO BUENO DEL ASEROR



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (X)/ DOCTOR ()

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (X), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Estandarización del número más probable molecular (NMP-LAMP) para detección de Escherichia coli y Enterococcus faecalis en microcuencas hidrográficas de la Región Amazonas cuyo autor Rocio Jara Vilca es estudiante del ciclo/egresado (X) de la Escuela de Posgrado, Maestría (X)/ Doctorado () en Gestión para el Desarrollo Sustentable con correo electrónico institucional rocio.jara.upg@untrm.edu.pe

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.



Chachapoyas, 09 de noviembre de 2022

Firma y nombre completo del Asesor
Asesor: ALONSO RAFAEL TAPIA LIMONDÍ

VISTO BUENO DEL COASESOR



ANEXO 6-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (X)/ DOCTOR ()

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (X), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Estandarización del número más probable molecular (NMP-LAMP) para detección de Escheria coli y Enterococcus faecalis en microorganismos hidrogénfilos de la Región Amazonas; cuyo autor Rocio Jara Ultra es estudiante del ciclo/egresado (X) de la Escuela de Posgrado, Maestría (X) / Doctorado () en Gestión para el desarrollo Sostenible con correo electrónico institucional rocia.jara.epg@untram.edu.pe

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 09 de noviembre de 2022

Firma y nombre completo del Asesor
Coasesora: Stella Maris Chenet Carrasco



JURADO EVALUADOR



M.Sc. Julio Mariano Chávez Milla
PRESIDENTE



Mg. Ernestina Rosario Vásquez Castro
SECRETARIO



Mg. Erick Stevinsonn Arellanos Carrión
VOCAL

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



ANEXO 6-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (X) / DOCTOR ()

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Estandarización del método más Probable molecular (NHP-IAMP) para detección de Escherichia coli y Enterococcus faecalis en microcultivos higrquímicos de la Región Amazónica
presentada por el estudiante () / egresado (X) Bach. Rocío Jara Vilca
de la Escuela de Posgrado, Maestría (X) / Doctorado () en Gestión para el desarrollo sustentable

con correo electrónico institucional roco.jara.epg@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:



- La citada Tesis tiene 9 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (X) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- La citada Tesis tiene _____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.

Chachapoyas, 10 de noviembre del 2022


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-S

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (X) / DOCTOR ()

En la ciudad de Chachapoyas, el día 25 de noviembre del año 2022, siendo las 09:42 horas, el aspirante Rocío Jam Vika, Asesorado por Ph.D. Alonso Rafael Tapia Limonchi, defiende en sesión pública presencial (X) / a distancia () la Tesis titulada: Estandarización del número más probable molecular CNMP-LAMP) para detección de Escherichia coli y Enterococcus faecalis en microvenenos hidrológicos de la Región Amazonas, para obtener el Grado Académico de Maestro (X)/Doctor () en Gestión para el Desarrollo Sostenible, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado Evaluador, conformado por:

Presidente: Julio Marino Chávez Milta

Secretario: Emilia Rosario Velázquez Castro

Vocal: Erick Stevenson Ardelanus Corión



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis de Maestría (X)/Doctorado (), en términos de:

A probado (X) por Unanimidad (X)/Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 9:50 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Grado Académico de Maestro (X)/Doctor ().


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

ÍNDICE DE CONTENIDO GENERAL

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA	vi
VISTO BUENO DEL ASESOR	vii
VISTO BUENO DEL COASESOR	viii
JURADO EVALUADOR.....	ix
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS	x
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS	xi
ÍNDICE DE CUADROS	xiv
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiv
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	19
II. MATERIALES Y METODOS.....	21
2.1 ETAPA DE ESTANDARIZACIÓN EN LABORATORIO	21
2.1.1 DISEÑO DE CEBADORES / PRIMERS	21
2.1.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS	22
2.1.3 CULTIVO BACTERIANO.....	23
2.1.4 ESTÁNDAR DE MACFARLAND (Anexo N° 5,6 y 7).....	24

2.1.5	EXTRACCIÓN DE ADN	24
2.1.6	CUANTIFICACIÓN DE ADN (Anexo N°11).....	25
2.1.7	PCR Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	26
2.1.8	PCR – LAMP (Anexo N°15).....	27
2.1.9	NMP – LAMP (Anexo N°16).....	28
2.2	ETAPA DE CAMPO	28
2.2.1	RECONOCIMIENTO DE ÁREA DE ESTUDIO	28
2.2.2	COLECTA DE MUESTRA DE AGUA EN CUENCAS HIDROGRÁFICAS (Anexo N°27)	29
2.3	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MUESTRAS DE AGUA.....	29
2.3.1	DILUCIONES SERIADAS (Anexo N° 28).....	29
2.3.2	NÚMERO MÁS PROBABLE CONVENCIONAL (NMP).....	30
2.3.3	METODO MOLECULAR NMP – LAMP	30
III.	RESULTADOS	31
3.1	ESTÁNDAR DE MACFARLAND	31
3.2	EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO	32
3.2	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CONVENCIONAL Y LAMP	33
3.3	NMP – LAMP.....	36
3.4	NMP CONVENCIONAL CON MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO OLIA Y RÍO VENTILLA PARA DETECCIÓN DE <i>Escherichia coli</i>	37
3.5	NMP – LAMP CON MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO OLIA Y RÍO VENTILLA PARA LA DETECCIÓN DE <i>Escherichia coli</i>	38
3.6	ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE EL NMP CONVENCIONAL vs NMP MOLECULAR EN DETECCIÓN DE <i>Escherichia coli</i>	39
3.7	NMP – LAMP CON MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO OLIA Y RÍO VENTILLA PARA LA DETECCIÓN DE <i>Enterococcus faecalis</i>	40
IV.	DISCUSIÓN	40
V.	CONCLUSIONES.....	42

VI. RECOMENDACIONES	43
VII. ANEXOS	44
VIII. BIBLIOGRAFÍA	78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°01. Cebadores usados en este estudio	21
Cuadro N° 02. Cuantificación de ADN	32

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Estándar de Macfarland para <i>E. Coli</i>	31
Gráfico 2. Estándar de Macfarland para <i>E. faecalis</i>	32
Gráfico 3. Evaluación de Métodos de Extracción de ADN.....	33

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen N° 01. PCR convencional con cebadores ColLacZ	34
Imagen N° 02. PCR convencional con cebadores ECUID	34
Imagen N°03. PCR convencional con cebadores 23S	34
Imagen N° 04. PCR - LAMP de coliformes totales	35
Imagen N° 05. PCR - LAMP de <i>Escherichia coli</i>	35
Imagen N° 06. PCR - LAMP de <i>Enterococcus faecalis</i>	35
Imagen N°07. NMP - LAMP para coliformes totales.....	36
Imagen N° 08. NMP - LAMP <i>Escherichia coli</i>	37
Imagen N° 09. NMP - LAMP DE <i>Enterococcus Faecalis</i>	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 01. Estimación cuantitativa para coliformes	36
Tabla N° 02. Estimación cuantitativa para <i>Escherichia coli</i>	37
Tabla N° 03. Estimación cuantitativa para <i>Enterococcus faecalis</i>	37

Tabla N°04. Estimación cuantitativa para <i>Escherichia coli</i> con NMP convencional.....	38
Tabla N° 05. Estimación cuantitativa para <i>Escherichia coli</i> con NMP molecular	38
Tabla N° 06. Estimación cuantitativa para <i>Enterococcus faecalis</i>	40

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.Preparación de Agar EMB y Agar Muller Hinton	44
Anexo 2.Recuperación bacteriana	44
Anexo 3.Preparación de caldo HB	45
Anexo 4.Suspensión bacteriana	45
Anexo 5.Estandarización de McFarlland.....	45
Anexo 6.Tabla de los estándares de McFarland	46
Anexo 7.Estandar de Macfarland para E. coli y e. faecalis	46
Anexo 8.Extracción de ADN por columnas de silica gel	47
Anexo 9. Extracción de ADN por Beads magnéticos	48
Anexo 10.Extracción de ADN mediante lisis celular por calor.....	49
Anexo 11.Cuantificación de ADN mediante QUBIT.....	49
Anexo 12.Preparación de gel de agarosa al 1.5%	50
Anexo 13.Electroforesis	50
Anexo 14.Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	51
Anexo 15.Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP)	51
Anexo 16.Número Mas Probable Molecular (NMP - LAMP).....	52
Anexo 17.Protocolo de PCR con cebadores LacZ	53
Anexo 18.Protocolo de PCR con cebadores Ecuid.....	54
Anexo 19.Protocolo PCR con cebadores Ef23S.....	55
Anexo 20.Protocolo PCR - LAMP con cebadores LacZ.....	56
Anexo 21.Protocolo PCR - LAMP con cebadores Ecuid.....	57
Anexo 22.Protocolo PCR - LAMP con cebadores Ef23S	58
Anexo 23.Mapa de Ubicación del distrito de Molinopampa	59
Anexo 24.Puntos de muestreo del río Ventilla	60
Anexo 25. Mapa de ubicación del distrito de Cheto.....	61
Anexo 26.Puntos de muestreo del río Olía	62
Anexo 27.Colecta de puntos de muestreo	63
Anexo 28.Dilución de muestras de agua en proporción 1/9.....	63

Anexo 29.NMP convencional grupo Coliformes	63
Anexo 30.preparación de L.S	64
Anexo 31.Preparación de caldo E.C.	64
Anexo 32.Preparación de Agar E.M.B.	65
Anexo 33.NMP convencional - Etapa presuntiva	65
Anexo 34.NMP convencional - Etapa Confirmativa – E.C.....	66
Anexo 35.NMP convencional - Etapa Confirmativa – EMB.....	66
Anexo 36.PCR - LAMP con muestras de agua	67
Anexo 37.Protocolo PCR - LAMP para muestras de agua - LacZ.....	68
Anexo 38.Protocolo PCR - LAMP para muestras de agua - Ecuid.....	69
Anexo 39.Protocolo PCR - LAMP para muestras de agua - Ef23S	70
Anexo 40.Manual Analítico Bacteriológico en su versión hoja de excel.....	71
Anexo 41. Preparación de Caldo HB.....	72
Anexo 42. Suspensión Bacteriana	72
Anexo 43. Estándares de Macfarland.....	72
Anexo 44. Extracción de ADN.....	72
Anexo 1.PCR – LAMP.....	73
Anexo 46. Electroforesis.....	73
Anexo 47. NMP – LAMP.....	73
Anexo 48. Georreferenciación.....	73
Anexo 49. Muestreo en Campo.....	74
Anexo 50. Diluciones de punto de muestreo.....	74
Anexo 51. NMP – L.S.....	74
Anexo 52. Nmp – E.C.....	74
Anexo 53. NMP – EMB.....	75
Anexo 54. NMP - LAMP para <i>E. coli</i> - Punto 01 Río Ventilla.....	75
Anexo 2. NMP – LAMP para <i>E. coli</i> - Punto 02 - Río Ventilla.....	76
Anexo 3.NMP - LAMP para <i>E. coli</i> - Punto 01 – Río Olía.....	76
Anexo 4. NMP – LAMP para <i>E. coli</i> -Punto 02 - Río Olía.....	76
Anexo 5.NMP - LAMP para <i>E. faecalis</i> - Río Ventilla.....	77
Anexo 6.NMP - LAMP para <i>E. faecalis</i> - Río Olía.....	77

RESUMEN

Actualmente, la contaminación por desechos orgánicos afecta a los cuerpos de agua, siendo un problema latente a nivel mundial. Así, el agua contaminada puede perjudicar la salud de los pobladores cuando es usada para consumo humano. Por lo cual, es necesario realizar análisis microbiológicos del agua, para determinar la presencia de coliformes como *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*, que son indicadores de la calidad del agua, y que establecen los criterios para que el recurso hídrico se puede potabilizar.

Los métodos convencionales para el análisis microbiológico del agua son: La Técnica de Filtración por Membrana (FM) y el Método del Número más Probable (NMP); estos métodos son confiables, pero demandan aproximadamente una semana para obtener resultados finales. Por esta razón, la presente tesis propone el empleo del método molecular llamado Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP), que es una variante del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La implementación de la técnica PCR – LAMP permitirá reducir el tiempo para obtener los resultados a unas pocas horas, y por su probabilidad puede ser usado en campo.

Presentamos los resultados de la estandarización de la técnica del Número Más Probable Molecular (NMP – LAMP) para la detección de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* en microcuencas hidrográficas de la Región Amazonas. Para estandarizar la técnica LAMP, Se diseñaron cebadores específicos para la detección de los genes LacZ, UidA para *Escherichia coli* y 23s rRNA de *Enterococcus faecalis*; como representantes del grupo coliformes totales. Así, la presencia de amplificación del ADN bacteriano, representado por turbidez o precipitado en el tubo de reacción. Fue indicativo de positividad del ensayo. Posteriormente, un esquema de diluciones seriadas propias de la técnica del NMP se usaron para la extracción de ADN y amplificación por LAMP. Finalmente, el ensayo fue desafiado con muestras de aguas de las cuencas hidrográficas cercanas a Chachapoyas. En este punto se compararon los resultados con la técnica del NMP convencional realizada simultáneamente; en relación de presencia o ausencia de dicho microorganismo.

Palabras claves: NMP-LAMP, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y microcuencas hidrográficas.

ABSTRACT

Currently, contamination by organic waste affects water bodies and is a latent problem worldwide. Thus, contaminated water can harm the health of the population when used for human consumption. Therefore, it is necessary to perform microbiological water analysis to determine the presence of coliforms such as *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*, which are indicators of water quality and establish the criteria for making the water resource drinkable.

The conventional methods for the microbiological analysis of water are: Membrane Filtration Technique (FM) and the Most Probable Number Method (MPN); these methods are reliable, but demand approximately one week to obtain final results. For this reason, the present thesis proposes the use of the molecular method called Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP), which is a variant of the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The implementation of the PCR - LAMP technique will reduce the time to obtain the results to a few hours, and because of its probability it can be used in the field.

We present the results of the standardization of the Most Probable Molecular Number (MPN - LAMP) technique for the detection of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in micro-watersheds of the Amazon Region. To standardize the LAMP technique, specific primers were designed for the detection of the *LacZ* and *UidA* genes for *Escherichia coli* and 23s rRNA for *Enterococcus faecalis*; as representatives of the total coliform group. Thus, the presence of bacterial DNA amplification, represented by turbidity or precipitate in the reaction tube. It was indicative of positivity of the assay. Subsequently, a serial dilution scheme typical of the MPN technique was used for DNA extraction and amplification by LAMP. Finally, the assay was challenged with water samples from watersheds near Chachapoyas. At this point, the results were compared with the conventional NMP technique performed simultaneously; in relation to the presence or absence of the microorganism.

Key words: NMP-LAMP, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and micro-watersheds.

I. INTRODUCCIÓN

El agua es la fuerza motriz para el desarrollo de la vida, la escasez de agua amenaza a los seres humanos, y esto se debe a problemas de cantidad y calidad del agua (Vliet et al., 2021). La cantidad disponible de agua para consumo humano disminuye, impulsados por: cambios en consumo de agua, aumento de huella hídrica y desarrollo socioeconómico (ONU, 2019a). Los problemas de calidad de agua están relacionados con la contaminación, originada por: residuos orgánicos, productos agropecuarios o metales pesados. La contaminación por residuos orgánicos es un problema latente, y esto se debe a descargas de aguas residuales, la intensificación de los cultivos y la ganadería, reducción de la capacidad de dilución de los ríos debido a la disminución de la escorrentía y la captación del agua (Zandaryaa & Sagasta, 2018). El agua contaminada por residuos orgánicos transmite múltiples enfermedades como: cólera, disentería, hepatitis A, fiebre tifoidea, poliomielitis y esquistosomiasis (ONU, 2019b), debido a que las aguas residuales domésticas y urbanas no se tratan antes de su liberación al medio ambiente (ONU, 2017).

Como indicadores de calidad del agua se encuentra el grupo de coliformes totales. El consumo de agua contaminada por coliformes totales ocasiona infecciones intestinales debido a que son transmitidas por vía fecal-oral (OMS, 2017). Por tal motivo, es importante realizar un adecuado análisis de la calidad microbiológica del agua, para lo cual, los métodos de referencia para la detección y aislamiento de *E. coli* y los coliformes en el agua son el Método de Filtración por Membrana (ISO 9308-1) y la fermentación en múltiples tubos conocida como el Número Más Probable (NMP, ISO 9308-2) (Price & Wildeboer, 2016), los cuales son confiables, pero se necesita por lo menos 1 semana para obtener los resultados de calidad de agua (Nurliyana et al., 2018). En la actualidad se han logrado desarrollar métodos que brindan resultados más rápidos y una mayor especificidad, como es el caso de las técnicas moleculares, que para la detección y cuantificación de bacterias son muy sensibles, rápidas y específicas, y se pueden automatizar y estandarizar, por lo que tienen algunas ventajas sobre las técnicas convencionales (Price & Wildeboer, 2016), a su vez las técnicas moleculares ofrece la posibilidad de identificar patógenos, incluida cepas nuevas, además estos métodos emergentes pueden ser realizados en campo y facilitar su portabilidad para un mejor manejo de muestras y procesamientos de datos in situ. (Mendes & Domingues, 2015).

La región Amazonas no es ajena a la mala calidad de agua de sus microcuencas para consumo humano, y esto se debe al vertimiento de residuos agropecuarios y domésticos, presencia de vertederos ilegales y canteras, y ausencia de bosques de galería (Gamarra et al., 2018); que afectan a la cuenca del río Utcubamba, que abastece de agua potable a 220, 048 habitantes en todo su recorrido. En sus aguas se han encontrado, gran concentración de coliformes totales y *E. coli* a causa de un saneamiento deficiente y falta de tratamiento de sus aguas residuales (Corroto et al., 2018). No obstante en el departamento de Amazonas, solo contamos con un laboratorio acreditado con la ISO 17025, en técnicas de análisis microbiológico de calidad de agua que, utiliza el método del Número Más Probable (NMP), este laboratorio se encuentra en la provincia de Chachapoyas, para el análisis microbiológico de la calidad de agua, las muestras deben ser procesadas dentro de aproximadamente 24 horas, siendo un inconveniente si deseamos analizar cuencas hidrográficas muy lejanas a la provincia de Chachapoyas. Por tal motivo es indispensable la implementación de una técnica molecular para obtener resultados de manera más rápida y se pueda efectuar en campo.

En base a la problemática observada se propuso como objetivo principal de la presente investigación estandarizar la técnica del número más probable molecular para la detección de *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli* en microcuencas hidrográficas de la región Amazonas. Para cumplir el objetivo general, se tuvo en cuenta tres objetivos específicos: 1) Estandarizar la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (PCR-LAMP) para muestras de coliformes totales. 2) Estandarizar el método del Número Más Probable basado en la técnica de amplificación isotérmica mediana por bucle (NMP-LAMP). 3) Evaluar el funcionamiento NMP – LAMP con muestra de agua del río Ventilla y río Olía. Se plantió con la estandarización de la técnica molecular para el análisis microbiológico de recursos hídricos, un mejor monitoreo de la calidad de agua en la región Amazonas, para poder contribuir con la gestión sustentable del recurso hídrico, y recuperar paulatinamente el equilibrio entre consumo de agua y su renovación natural, ya que el agua que se consume está siendo afectada por crecimiento poblacional, cambio climático e ineficiencia en saneamiento, así mismo podremos mitigar enfermedades producidas por vía feco – oral, que viene a ser un problema latente en Amazonas.

II. MATERIALES Y METODOS

La investigación es cualitativa dicotómica de diseño experimental; cualitativa porque nos muestra las características de detección, dicotómica porque indica ausencia o presencia de las bacterias en estudio; a su vez con diseño experimental, porque se fusiona la técnica convencional (NMP) a un método molecular (LAMP) para la detección de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* en fuentes de agua.

2.1 ETAPA DE ESTANDARIZACIÓN EN LABORATORIO

2.1.1 DISEÑO DE CEBADORES / PRIMERS

Los cebadores para el ensayo de PCR-LAMP fueron revisados y diseñados para detectar diferentes genes específicos para coliformes totales de acuerdo a lo previamente reportado (Tongphrom C, 2018 y Ahmad, F, 2017). Entre ellos el gen LacZ, que codifica a la β -galactosidasa, que es un gen conservado entre las enterobacteriáceas pertenecientes al grupo coliformes, y que permite hacer una detección general de este grupo. Además, se diseñaron cebadores para los genes UidA que codifica para la proteína β -D glucuronidasa de *Escherichia coli*, y el gen que codifica para el RNA ribosomal 23S de *Enterococcus faecalis*. El diseño de cebadores para la técnica LAMP, implica un conjunto de 4 y 6 cebadores; dos cebadores externos (F3 y B3), dos cebadores internos (Fip y Bip); y dos cebadores del bucle (LoopF y LoopB), que permiten la amplificación del ADN a una temperatura constante y por acción de la ADN polimerasa Bst.

Se mandaron a sintetizar a la empresa Invitrogen 3 juegos de cebadores: ColLacZ (coliformes totales), Ecuid (*Escherichia coli*) y Ef23S (*Enterococcus faecali*). En el cuadro 1 se listan las secuencias utilizadas en este estudio.

Cuadro N°01. Cebadores usados en este estudio

REFERENCIA	BACTERIA	GEN	CEBADOR	SECUENCIA
Tongphrom et al. (2018)	<i>Escherichia coli</i>	lacZ	ColLacZF3	ACC ATC GTC TGC TCA TCC A
	<i>C. freundii</i>		ColLacZB3	TTA AAC TGC ACA CCG CCG
	<i>Enterobacter aerogenes</i>		ColLacZFIP	CAA GCC GTT GCT GAT TCG CGT TTT TGA CCT GAC CAT GCA GAG G
	<i>Enterobacter cloacae</i>		ColLacZBIP	CCG TTC AGC AGC AGC AGA CCT TTT ACG CTG ATT GAA GCA GAA GC
	<i>K. pneumoniae</i>			
	<i>Serratia marcescens</i>			

REFERENCIA	BACTERIA	GEN	CEBADOR	SECUENCIA
Ahmad et al. (2017)	<i>Escherichia coli</i>	uidA	EcuidFIP	TAA CGC GCT TTC CCA CCA ACG GCC TGT GGG CAT TCA GTC
			EcuidBIP	TAA CGA TCA GTT CGC CGA TGC ACT GCC CAA CCT TTC GGT AT
			EcuidF3	CKG TAG AAA CCC CAA CCC G
			EcuidB3	AWA CGC AGC ACG ATA CGC
			EcuidLoopF	TCC ACA GTT TTC GCG ATC CA
			EcuidLoopB	ACG TCT GGT ATC AGC GCG AAG T
Lee a et al. (2019)	<i>Enterococcus Faecalis</i>	23S	Ef23SFIP	GCA ATC GTA ACT CGC CGG TTC AAA CCG TGT GCC TAC AAC AA
			Ef23sBIP	TCG AAG AGA CGG AGC CGC AGT GGT TTC GGG TCT ACG ACT
			Ecf23SF3	GAA AAG CAC CCC GGA AGG
			Ef23SB3	ACC TGG ACA TGG GTA GAT CA
			Ef23SLoopF	CCA TCA CTC ATT AAC GAG CTT TGA C
			Ef23SLoopB	CGA GTC TGA ATA GGG CGA ATG AGT A

Fuente: Elaboración propia

2.1.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS

2.1.2.1 AGAR EOSINA AZÚL DE METILENO (E.M.B) Y AGAR MÜLLER

HINTON (Anexo N°1)

En un matraz de vidrio esterilizado se disuelve 3g de agar en 80 ml de agua destilada (4 placas), se llevó a hervor por 3 min en una placa caliente, una vez que la solución este homogénea, se tapa el matraz con algodón y se autoclava a 121 °C por 30 min, posteriormente se vierte la solución en placas estériles y se deja solidificar.

2.1.2.2 CALDO NUTRITIVO CEREBRO – CORAZÓN (HB) (Anexo N°2)

En un matraz de vidrio estéril se diluye 37 g de caldo en 1L de agua destilada, se homogeniza la solución utilizando un agitador magnético con calefacción por 3 min,

luego se dispensa en frascos estériles de 50mL y se autoclava a 121 °C por 30 min, al finalizar el autoclavado se deja enfriar el medio y se conserva a – 4°C.

2.1.2.3 CALDO LAURIL SULFATO (LS)

Se preparó el medio en concentración simple y doble; se diluye en dos vasos precipitados de vidrio estériles 44.4 g de LS en 600 mL de agua destilada (concentración doble) y 88.8 g de LS en 2400 mL de agua destilada (concentración simple), se homogeniza las soluciones utilizando un agitador magnético por 3 min, luego se vierte 10 mL de medio en tubos de ensayo de vidrio limpios; con una campana de Durhan en su interior, posteriormente se autoclava el material a 121 °C por 30 min (Anexo 37), al finalizar el autoclavado se deja enfriar y se conserva a 4 °C.

2.1.2.4 CALDO DE *Escherichia coli* (EC)

se preparó en concentración doble y simple, para lo cual se diluye en vasos precipitados estériles 44.4 g de EC en 600 mL de agua destilada (concentración doble) y 66.6 g de EC en 1800 mL de agua destilada (concentración simple); se diluye bien utilizando un agitador magnético con calefacción, para luego verter 10 mL en tubos de ensayos esteriles, con una campana de Durhan en su interior; posteriormente se llevar autoclavar el material a 121°C por 30 min, al finalizar el autoclavado se deja enfriar y se conserva a 4 °C.

2.1.3 CULTIVO BACTERIANO

Para la estandarización de la detección específica de las bacterias coliformes, se trabajó principalmente con cepas caracterizadas de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*, que fueron donadas por el Laboratorio Referencial de Salud Pública de Amazonas. La confirmación microbiológica se realizó en el Laboratorio de Aguas y Suelos de la UNTRM, posteriormente los microorganismos fueron conservados en medios de cultivo con glicerina a – 80°C.

Las bacterias se sembraron en sus respectivas placas (EMB para *E. coli* y agar Müller Hinton para *E. faecalis*), mediante el método de agotamiento, al interior de una cabina laminar de clase II (BIOBASE, Shandong), las placas se incubaron a 37°C por 24h. Pasado el tiempo de incubación, las colonias se repican a caldo nutritivo de cerebro corazón (HB); Los medios fueron incubados a 37°C por 24h en el caso de *E. coli* y 44°C por 48h para *E. faecalis*.

Al pasar el tiempo de incubación se observó la turbidez en los medios, confirmando la presencia de las bacterias. Para determinar el crecimiento bacteriano en fase exponencial, se realizó una comparación con una escala de MacFarland, utilizando un espectrofotómetro para determinar las unidades formadoras de colonia (UFCs) por mL (Anexo 9)

2.1.4 ESTÁNDAR DE MACFARLAND (Anexo N° 5,6 y 7)

Para determinar las UFC/mL que son las unidades de microorganismos vivos presentes en un medio líquido, se procede a la estandarización de los Estándares de MacFarland en un espectrofotómetro, para lo cual se prepara cloruro de bario y ácido sulfúrico al 1%, para generar los patrones de turbidez; para la lectura de los caldos de cultivo contaminados se utilizó como punto blanco agua destilada

2.1.5 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN, se realizó mediante dos métodos con kits comerciales (columna de silica gel y perlas magnéticas), además; se evaluó el método de extracción mediante lisis celular por calor. Dichos métodos se evaluaron por triplicado.

2.1.5.1 EXTRACCIÓN DE ADN POR COLUMNA DE SILICA GEL (Anexo N°8)

Para la extracción se utilizó el Kit DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN (Hilden, Alemania) adaptado para bacterias.

- En un tubo de microcentrífuga de 2 ml agregamos 400 uL de cultivo, 400 uL de buffer AL y 40 uL de proteinasa K.
- Se homogenizo mediante vortex y se incubó a 56 °C x 30 min
- Se agregó 200 ul de etanol absoluto, luego se homogenizo la muestra mediante vortex
- Transportamos el contenido del tubo a una columna de silica gel acoplados a un tubo colector y centrifugamos a 8 000 rpm x 1 min (repetimos 2 veces en la misma columna).
- Se añadió 500 uL de buffer de lavado AW1 y centrifugamos a 8 000 rpm x 1 min.
- Se añadió 500 uL de buffer de lavado AW2 y centrifugamos a 14 000 rpm x 3 min.
- Eliminamos residuos y volvemos a centrifugar en el mismo tubo a 14 000 rpm x 1 min
- Se trasladó la columna conteniendo el ADN a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL,

- Se añadió 50 uL de buffer de elución AE e incubamos por 5 min a temperatura ambiente,
- Centrifugamos a 8 000 rpm x 1 min
- Desechamos columna y almacenamos el eluido a -20°C.

2.1.5.2 EXTRACCIÓN POR PERLAS (BEADS) MAGNÉTICOS (Anexo N°9)

Para la extracción se utilizó el **Kit for nucleic acids isolation** de Ttestgene (Ulyanovsk, Rusia) con protocolo adaptado para bacterias

- En un tubo de microcentrífuga de 2 ml agregamos 400 uL de cultivo, 400 uL de buffer de lisis y 40 uL de proteinasa K.
- Homogenizamos la muestra mediante vortex e incubamos a 56 °C por 20 min
- Realizamos spin y añadimos 200 uL de etanol de 100 %, homogenizamos muestra mediante Vortex y agregamos 200 uL de beads Magnéticos,
- Mezclamos por inversión y dejamos reposar en un rack magnético, y retiramos sobrenadante
- Añadimos 500 uL de buffer de lavado (2 lavados)
- Mezclamos por inversión y dejamos reposar en el rack magnético, retiramos sobrenadante.
- Añadimos 50 uL de buffer de elución, mezclamos por inversión e incubar por 5 min a temperatura ambiente.
- Mezclamos por inversión y dejamos reposar en el rad magnético
- Recolectamos el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y almacenamos a -20 °C

2.1.5.3 EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE LISIS CELULAR POR CALOR

(Anexo N°10)

- En un tubo de microcentrífuga de 2 mL agregamos 400 uL de muestra, y se incuba a 94°C por 10 min en un termobloque, produciendo la ruptura de la pared bacteriana dejando el material genético liberado en el sobrenadante.

2.1.6 CUANTIFICACIÓN DE ADN (Anexo N°11)

Para la cuantificación de ADN se utilizó el kit Qubit dsDNA HS y para la lectura se usó el equipo QUBIT 4.0 FLUORÓMETRO de Invitrogen (Waltham, USA).

- Primeramente, se preparó una solución stock de trabajo en tubos ependor de 5 mL; para lo cual sumamos la cantidad de muestras más dos (estándares) ($N^{\circ} + 2$); dicho resultado se multiplica por 1uL y por 199 uL para determinar el volumen de Qubit Reagent (floroforo) y Qubit Buffer respectivamente. El Qubit Reagent (floroforo) es un tinte fluorescente que se une al material genético emitiendo una señal solo cuando se une al objetivo, lo que minimizara los efectos de los contaminantes en el resultado
- Para los estándares: agregamos en dos tubos de ensayo Qubit de 500uL, 190 uL de solución stock de trabajo, más 10uL de solución estándar dsDNA HS, realizamos vortex para homogenizar e incubamos por 2 min y realizamos la lectura; esto nos ayudara a calibrar el equipo antes de comenzar hacer la lectura de las muestras,
- Para las muestras: agregamos en tubos de ensayo Qubit de 500uL, 198 uL de solución stock de trabajo más 2 uL de muestra respectivamente, homogenizamos mediante vortex e incubamos por 2 min; pasado el tiempo, se colocó en el equipo Qubit para las lecturas respectivas.

2.1.7 PCR Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Antes de realizar la PCR – LAMP, se realizó una verificación de amplificación de ADN de *E. coli* y *E. faecalis*. La PCR de punto final (endpoint) se realizó con los cebadores externos (F3 y B3) diseñados para LAMP y se utilizó el kit Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham) la relación consistió en: 0.5 uM de cebadores F3 y B3, 1X de PCR Buffer , 2 mM MgCl₂, 0.2 mM (Invitrogen, dNTPs, 5 U/uL de Taq polimerasa y 2 uL de ADN; en un volumen final de 20 uL; el ciclaje de temperatura que se utilizó fue: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 94 °C por 30 seg, hibridación a 61 °C por 1 min y finalmente 1 ciclo de extensión a 72 °C por 2 min. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % utilizando buffer TAE 1X a 90V por 40 min; para lo cual se utilizó el equipo Termociclador SimpliAmp™ de Applied Biosystems™ (México) (Anexo 12, 13 y 14)

2.1.8 PCR – LAMP (Anexo N°15)

2.1.8.1 ESTANDARIZACIÓN DE AMPLIFICACION DEL GEN ColLacZ (Anexo N° 17)

Para la estandarización se utilizó el buffer comercial de la enzima BST 3.0 (New England BioLabs, Ipswich USA): cada tubo de reacción contiene: 1X de Isothermal Amplification Buffer II con 2 mM de Mg, 8 mM de MgSo4, 1.4 mM de dNTPs, 1.6 uM de Fip y Bip, 0.2 uM de F3 y B3, 8 U/uL de en enzima BST y 5 uL de ADN; en un volumen final de 20 uL. La reacción se llevó a cabo en el equipo Termociclador SimpliAmp™ de Applied Biosystems™ (Waltham, USA) a una temperatura de 56 °C por 60 min y 100 °C de temperatura para la tapa.

2.1.8.2 ESTANDARIZACIÓN DE AMPLIFICACION DEL GEN UidA de *E. coli* (Anexo N° 18)

Para la estandarización de Ecuid se utilizó una solución tampón gentilmente elaborada y cedida por la Naval Medical Research Unit Six (NAMRU – 6) y se usó con la enzima BST 3.0 (New England BioLabs, Ipswich USA); CADA TUBO DE REACCIÓN CONTIENE: I X de buffer, 2.4 uM de Fip y Bip, 0.2 uM de F3 y B3, 0.8 uM de LoopF y LoopB, 8 U/uL de enzima BST y 5 uL de ADN; en un volumen final de 25 uL, las muestras se incubaron el equipo Termociclador SimpliAmp™ de Applied Biosystems™ (Waltham, USA) a una temperatura de 63 °C por 30 min con 100 °C de temperatura para la tapa.

2.1.8.3 ESTANDARIZACIÓN DE AMPLIFICACION DEL GEN rRNA 23S de *E.faecalis* (Anexo N° 19)

Para la estandarización se utilizó una solución tampón gentilmente elaborada y cedida por el centro la Naval Medical Research Unit Six (NAMRU – 6) de Lima y se usó con la enzima BST 3.0 (New England BioLabs, Ipswich USA); CADA TUBO DE REACCIÓN CONTIENE: 1X de buffer, 2.4 uM de Fip y Bip, 0.2 uM de F3 y B3, 0.8 uM de LoopF y LoopB, 8 U/uL de enzima BST y 5 uL de ADN; en un volumen final de 25 uL, las muestras se incubaron el equipo Termociclador SimpliAmp™ de Applied Biosystems™ (Waltham, USA) a una temperatura de 63 °C por 60 min con 100 °C de temperatura para la tapa.

2.1.9 NMP – LAMP (Anexo N°16)

Con la finalidad de evaluar la amplificación LAMP, realizaremos un ensayo de número más probable en microvolúmenes. Brevemente, en un tubo de 1.5 mL se inocula 1mL de cultivo de *E. coli* en medio HB. A partir de este tubo se realizan diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-5} ; es decir se parte de una solución concentrada y se preparan series diluidas en proporción de 1/9 con agua destilada. Luego, cada dilución se lleva a incubar en un termobloque a 94 °C por 10 min, para la lisis celular y el material genético quede libre en el sobrenadante. Inmediatamente, las muestras se conservan a 4°C; hasta que se proceda a realizar la PCR – LAMP (Anexo N°16). Cada reacción se realizó con 5uL del ADN purificado, de acuerdo a los protocolos ya descritos.

Nota: Los experimentos se realizaron por triplicado con las mismas condiciones.

2.2 ETAPA DE CAMPO

2.2.1 RECONOCIMIENTO DE ÁREA DE ESTUDIO

El distrito de Molinopampa pertenece a la provincia de Chachapoyas, y posee una extensión territorial de 333,86 km² y alberga a una población estimada de 2737 hab (IIAP, 2010); el cual se encuentra ubicado con una altitud de 2421 m s. n. m; latitud 06° 12' 20" Sur y la longitud 77° 40' 06" Oeste (Oliva, 2016). El distrito de Cheto también pertenece a la provincia de Chachapoyas, tiene una superficie de 56.97 km² y alberga a una población estimada de 642 hab (INEI, 2017); el cual se encuentra ubicado con una altitud de 2500 m s. n. m.; con coordenadas UTM 6°15'21"S 77°42'01"O (IIAP,2010), ambos distritos tienen como base fundamental de su economía la agricultura y ganadería, con producción de lácteos, a su vez el río Ventilla y río Olía cruzan el distrito de Molinopampa y distrito de cheto respectivamente, y sus aguas residuales no son tratadas, presentando déficit en saneamiento (Anexo N° 23 y 25).

Se realizó un reconocimiento del área de estudio y se georreferenciaron los puntos de muestreo, se establecieron 2 estaciones de muestreo en cada río (río Ventilla – Molinopampa y río Olía – Cheto). Las estaciones de muestreo están separadas aproximadamente 4 km, siguiendo lo establecido en la Metodología FEM (Prat et al., 2012). Estas estaciones se adaptaron a la realidad altoandina; tienen fácil acceso, corriente homogénea y poca turbulencia, para evitar aguas estancadas y poco profundas.

Las estaciones de muestro son: Punto 01 Ventilla – Sector Pampa Moreno, Punto 02 Ventilla – Sector Salida de Molinopampa, Punto 01 Olía – Sector Parte Alta de Cheto, Punto 02 Olía – Sector Salida de Cheto. Las estaciones de muestreo a su vez están designadas por alta y baja carga microbiológica presentes en dichos sectores. (Anexo 26 y 27)

2.2.2 COLECTA DE MUESTRA DE AGUA EN CUENCAS HIDROGRÁFICAS (Anexo N°27)

Para la colecta de muestras se tomó en cuenta el Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales (ANA, 2016); el protocolo realizado fue el siguiente:

- Se colectó las muestras en frascos de vidrio de 1L estériles, para evitar contaminación.
- Se recolectó la muestra a una profundidad de 12 cm en el centro de la corriente en dirección opuesta al flujo del recurso hídrico.
- La toma de muestra fue directa, cogiendo el frasco por debajo del cuello, y se recolecta el agua dejando un espacio para aireación del 10% del volumen del frasco, para asegurar un adecuado suministro de oxígeno para las bacterias.
- Una vez recolectada la muestra se cierra herméticamente el frasco, se rotula y se coloca en un cooler.
- El cooler deben mantenerse a la sombra para mantenimiento de la temperatura.
- Las muestras tomadas fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio de aguas y suelos (LABISAG) y al laboratorio de Biosensores y dispositivos del Instituto de Enfermedades Tropicales (IET) ubicados en el campus de la UNTRM, para su análisis microbiológico. Las muestras, se procesaron para realizar en simultaneo el análisis microbiológico por el método NMP convencional y el ensayo molecular del NMP – LAMP, para determinar la presencia o ausencia de coliformes.

2.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MUESTRAS DE AGUA

2.3.1 DILUCIONES SERIADAS (Anexo N° 28)

En una cabina de BIOSEGURIDAD CLASE II A2 (BIOBASE, Shandong), utilizando pipeta y tips estériles se procede a realizar las diluciones de la muestra colectada (solución madre), en un volumen final de 300 mL para cada dilución, desde 10^{-1} a 10^{-4} , en una proporción de 1/9 (30 mL de muestra con 270 mL de agua destilada estéril). (Anexo 35)

Una vez realizado todas las diluciones se procede a la par el análisis microbiológico con el NMP convencional y la técnica molecular NMP – LAMP (Anexo N° 24 y 26)

2.3.2 NÚMERO MÁS PROBABLE CONVENCIONAL (NMP)

Con las diluciones se procede a la siembra de las muestras en medio enriquecedor, este proceso se denomina prueba presuntiva.

PRUEBA PRESUNTIVA

Para realizar la confirmación de presencia de coliformes, se siembran las diluciones respectivas en medio Lauril Sulfato (LS). Antes de sembrar, se agitaron las muestras para homogenización, y con una pipeta estéril se inoculo 1 mL de solución madre en los tubos con concentración doble y 1 mL de las diluciones en los tubos con concentración simple, se inocularon las muestras por 2 días a $37\text{ °C} \pm 2\text{°C}$. (Anexo 33)

A las 24 horas se realiza una lectura rápida, para proyectar la cantidad de material a preparar para la prueba confirmativa, y a las 48 horas se examina y se separan aquellos tubos que presentan turbidez, gas dentro de la campana de Durhan y fermentación (tubos positivos). (Anexo 51)

PRUEBA CONFIRMATIVA

De acuerdo con los resultados positivos de la prueba presuntiva en medio Lauril Sulfato (tubos con turbidez y gas) (Anexo 34), se inocula 100 uL de cada tubo positivo con pipeta estéril en caldo E.C y se incuba a $44\text{ °C} \pm 2\text{°C}$ para la confirmación de coliformes fecales; pasado el tiempo de incubación se separa aquellos tubos que presentan turbidez y gas en las campanas de Durhan, para ser llevados agar Eosina Azul de Metileno (EMB). (Anexo 35).

Las placas con EMB fueron divididas en regiones, y de cada tubo positivo se sembró por estrías con una aza bacteriológica. Se incuba a $37\text{ °C} \pm 2\text{°C}$ por 24 horas; pasado el tiempo se procede a realizar la lectura de confirmación de presencia de *Escherichia coli*, se considera muestra positiva aquellas colonias que se presentan con color verde metálico y esto se debe al cambio de pH. (Anexo 52 y 53)

2.3.3 METODO MOLECULAR NMP – LAMP

Para realizar el ensayo molecular en simultaneo al NMP convencional, se trabajó con las mismas diluciones, los experimentos se realizaron por triplicado en una serie de tres

replicas. El método de extracción utilizado fue lisis por calor, por ser el más rápido. (Anexo 43).

Una vez realizado la extracción del material genético de las muestras se preserva a 4 °C, para rápidamente procede a realizar la PCR - LAMP, con cebadores ColLacz para detectar coliformes, para volver más específico el ensayo se utilizaron los cebadores ECUID para detección de *E. coli* y cebadores EF23s para detectar *E. faecalis*; en cada reacción se añadió 10 uL de templado obtenido con método de extracción. (Anexo N°36).

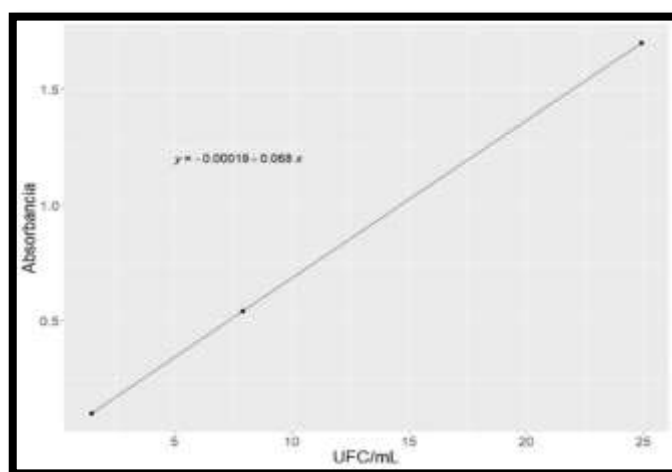
* Para una estimación cuantitativa de detección del NMP – convencional y NMP – molecular, se utilizó el Manual analítico Bacteriológico en su versión hoja de Excel, descargada de la página del FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) (Anexo N° 40).

III. RESULTADOS

3.1 ESTÁNDAR DE MACFARLAND

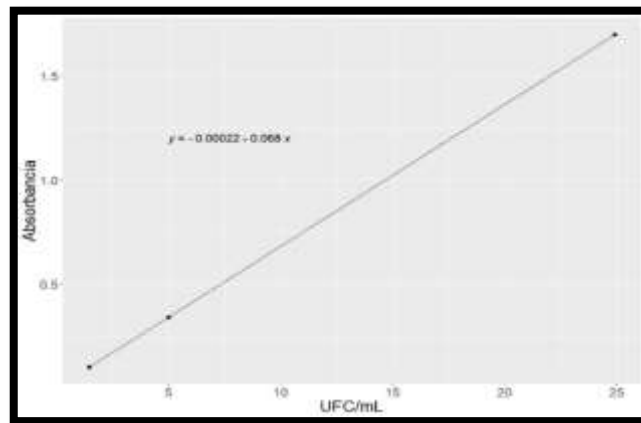
El gráfico 1 y el gráfico 2 muestran las UFC/mL de los cultivos de *E. coli* y *E. faecalis* utilizadas para la estandarización de la técnica de PCR (en punto final y LAMP); se obtuvo 16.63×10^8 UFC/mL para *E. coli* con 1.11 de absorbancia y 10.52×10^8 UFC/mL con 0.71 absorbancia para *E. faecalis*.

Gráfico 1. Estándar de Macfarland para *E. Coli*



Fuente: elaboración propia

Gráfico 2. Estándar de Macfarland para *E. faecalis*



Fuente: elaboración propia

3.2 EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO

Para poder estandarizar la PCR (de punto final y LAMP) primeramente, se evaluó los tres métodos de extracción de ADN. Para lo cual, se cuantificó las concentraciones obtenidas por cada método en ng/uL, con los resultados obtenidos de los triplicados se calculó la media aritmética y la desviación estándar, para determinar la barra de error por cada método. Los resultados obtenidos se visualizan en el Cuadro N°02.

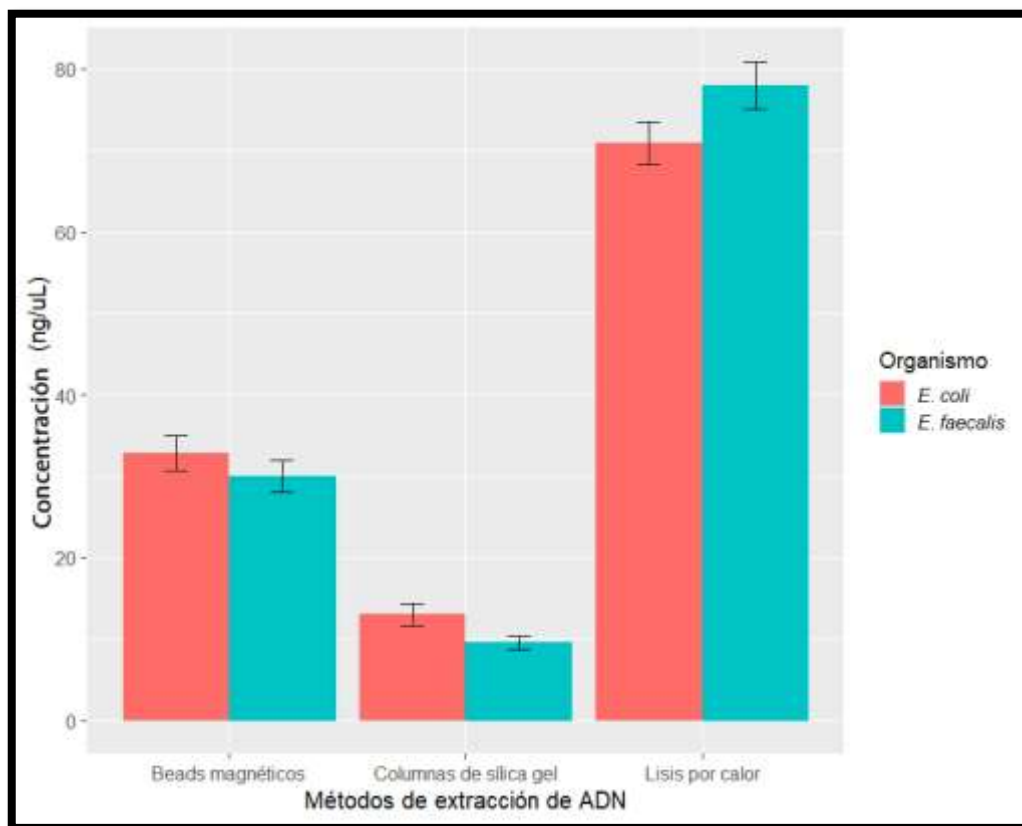
Cuadro N° 02. Cuantificación de ADN

BACTERIA	METODOS DE EXTRACCIÓN	CONCENTRACIÓN (ng/ uL)			MEDIA ARITMÉTICA (ng/ uL)	DESVIACIÓN ESTANDAR (ng/ uL)
		REPLICA 1	REPLICA 2	REPLICA 3		
<i>Escherichia coli</i>	COLUMNAS DE SILICA GEL	13.5	14.0	11.5	13	1.32
	BEADS MAGNETICAS	35.2	30.8	32.5	32.83	2.22
	LISIS POR CALOR	68.3	73.5	70.7	70.83	2.6
<i>Enterococcus faecalis</i>	COLUMNAS DE SILICA GEL	9.2	10.5	8.9	9.53	0.85
	BEADS MAGNETICOS	30.5	27.8	31.7	30	1.99
	LISIS POR CALOR	80.7	74.9	78.4	78	2.92

Fuente: Elaboración propia

Con los datos obtenidos procesamos en el programa R-studio, visualizamos la Grafica N°03, que muestra la variabilidad de los datos indicando el error o la incertidumbre; dando una idea general de la precisión del método de extracción. Se observa que el método de columna de silica gel utilizada para la extracción de *E. faecalis* muestra menor margen de error, pero se utiliza equipos sofisticados para realizar la extracción. Por lo tanto, para poder obtener ADN ambiental de cuerpos de agua se utilizará el método de lisis por calor; porque no utilizamos equipos sofisticados y el tiempo de extracción es óptimo para realizarlo en campo y la concentración de material genético es mayor.

Gráfico 3. Evaluación de Métodos de Extracción de ADN



Fuente: Elaboración propia

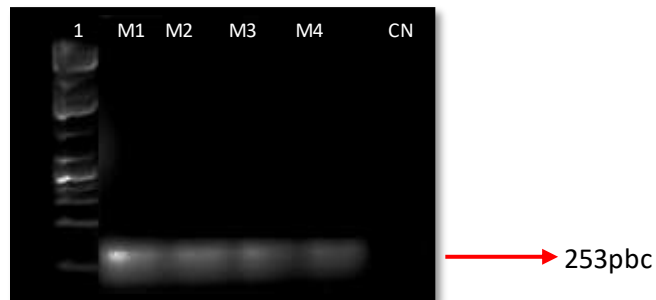
3.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CONVENCIONAL Y LAMP

Para confirmar el ADN bacteriano de *E. coli* y *E. faecalis* purificado se realizó una amplificación por PCR con los cebadores externos F3/B3 diseñados para LAMP.

En el gel de electroforesis se visualizó las bandas respectivas de 253 pb para los cebadores de *E. coli* y 115 pb para el caso de *E. faecalis*. De esta manera verificamos que los

cebadores diseñados para LAMP detectan con especificidad los genes UidA para *E. coli* y Rrna 23S para *E. faecalis*

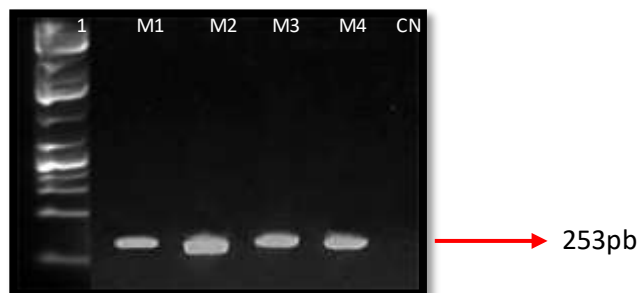
Imagen N° 01. PCR convencional con cebadores ColLacZ



1= Marcador de peso molecular de 1Kb
M1,M2,M3,M4 = Muestras
CN=Control negativo

Fuente: Elaboración propia

Imagen N° 02. PCR convencional con cebadores ECUID



1= Marcador de peso molecular de 1Kb
M1,M2,M3,M4 = Muestras
CN=Control negativo

Fuente: Elaboración propia

Imagen N°03. PCR convencional con cebadores 23S



1= Marcador de peso molecular de 100 bp
M1,M2,M3,M4. M5= Muestras
CN=Control negativo

Fuente: Elaboración propia

Luego se procedió con la técnica de LAMP usando los juegos de cebadores respectivos. En estas figuras se aprecia que el ADN de las muestras de cultivo presenta precipitado o

turbidez, indicativo de positividad de amplificación. La ausencia de precipitado indica la validez del ensayo, en el control negativo.

Imagen N° 04. PCR - LAMP de coliformes totales



CP= Muestras de ADN de *E. coli*; CN= control negativo

Fuente: elaboración propia

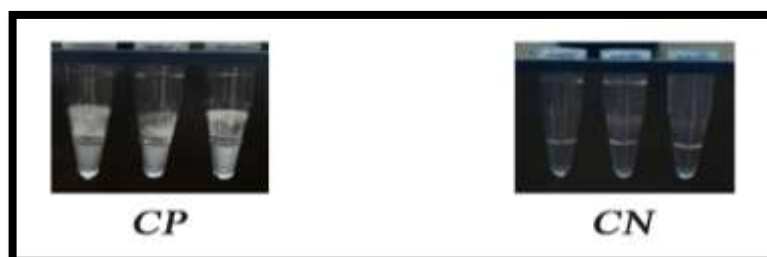
Imagen N° 05. PCR - LAMP de *Escherichia coli*



CP= Muestra de ADN de *E. coli*; CN= control negativo

Fuente: Elaboración propia

Imagen N° 06. PCR - LAMP de *Enterococcus faecalis*



CP= Muestra de ADN de *E. faecalis*; CN= control negativo

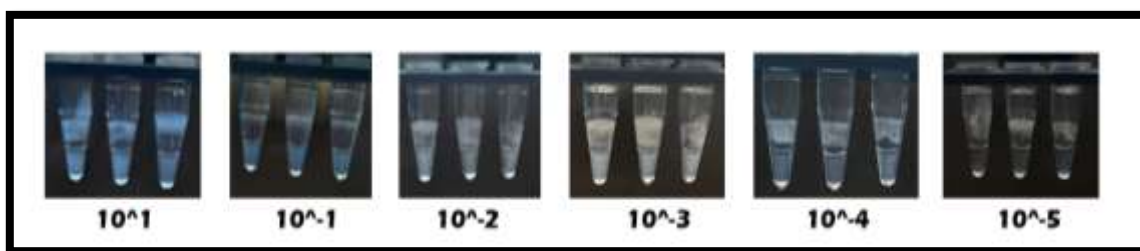
Fuente: Elaboración propia

3.3 NMP – LAMP

En los resultados de estandarización NMP molecular, se realizó las diluciones seriadas de la muestra madre que se encuentra codificado como 10^{-1} , se observa la positividad de detección de la amplificación de los genes en estudio mediante los cebadores específicos de la técnica LAMP, con la presencia de turbidez o precipitado en la solución madre y las diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-4} en el caso de E. coli; pero en el caso de E. faecalis solo se observa turbidez hasta la dilución 10^{-3} ; en las diluciones finales no hay amplificaciones; esto nos indica que se encuentra más diluido y que la presencia de la bacteria es nula, ya no se observa detección, al igual que en el control negativo que se notan transparentes.

Mediante el uso del Manual Analítico Bacteriológico (BAM) en su versión hoja de Excel (Anexo N° 39), se realizó la estimación cuantitativa del NMP/100 mL, obteniendo como resultado 223,372.21 NMP/100 mL con cebador ColLacz, 223,372.21 NMP/100 mL con cebadores ECUID y 3618.140 NMP/100 mL con cebador Ef23S.

Imagen N°07. NMP - LAMP para coliformes totales



10^1 = solución madre; $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ = diluciones seriadas

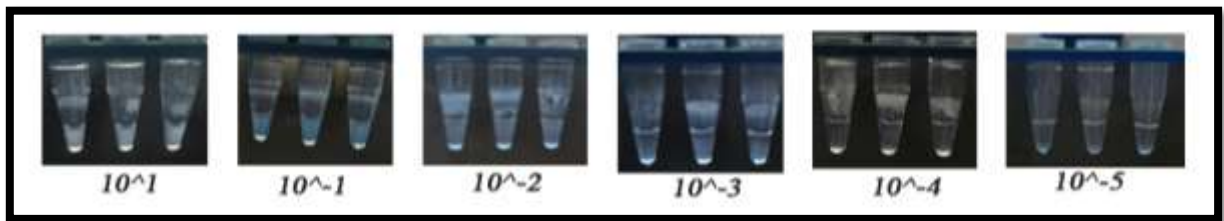
Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 01. Estimación cuantitativa para coliformes

Coliformes totales						
DILUCIONES	1	-1	-2	-3	-4	-5
N° POSITIVOS	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
NMP/ 100 mL	223372.21					

Fuente: Elaboración propia

Imagen N° 08. NMP - LAMP *Escherichia coli*



10¹ = solución madre; 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ = diluciones seriadas

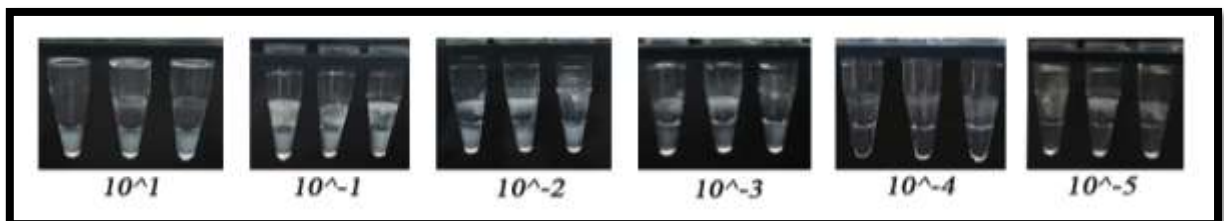
Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 02. Estimación cuantitativa para *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>						
DILUCIONES	1	-1	-2	-3	-4	-5
N° POSITIVOS	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
NMP/ 100 mL	223372.21					

Fuente: Elaboración propia

Imagen N° 09. NMP - LAMP DE *Enterococcus Faecalis*



10¹ = solución madre; 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ = diluciones seriadas

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 03. Estimación cuantitativa para *Enterococcus faecalis*

<i>Enterococcus faecalis</i>						
DILUCIONES	1	-1	-2	-3	-4	-5
N° POSITIVOS	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3
NMP/ 100 mL	3618.140					

Fuente: Elaboración propia

3.4 NMP CONVENCIONAL CON MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO OLIA Y RÍO VENTILLA PARA DETECCIÓN DE *Escherichia coli*

Mediante el uso del Manual Analítico Bacteriológico en su versión hoja de excel, tenemos una estimación de la cantidad de microorganismos de *Escherichia coli*, presentes en las muestras de agua según NMP convencional en unidades de NMP/ 100 mL.

Tabla N°04. Estimación cuantitativa para *Escherichia coli* con NMP convencional

CUENCA	REPELICIONES (NMP /100 mL)			MEDIA ARITMÉTICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
	R1	R2	R3		
VENTILLA I	24990.897	24935.433	22364.999	24097.10967	1500.308163
VENTILLA II	23939.01	23942.736	23965.532	23949.09267	14.35825649
OLÍA I	2341.139	2371.238	2343.641	2352.006	16.70231628
OLÍA II	2234.854	2165.247	2439.453	2279.851333	142.533514

Fuente: elaboración propia

Lo que podemos observar mediante el análisis microbiológico de aguas con la técnica del NMP convencional; y habiendo detección hasta la dilución 10^{-3} para el río Ventilla y 10^{-2} para el río Olía, es que el río Ventilla presenta mayor presencia de *Escherichia coli* con respecto al río Olía; ya que los Estándares de Calidad Ambiental menciona 0 NMP/100mL como límite máximo permisible.

3.5 NMP – LAMP CON MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO OLIA Y RÍO VENTILLA PARA LA DETECCIÓN DE *Escherichia coli*

Mediante el uso del Manual Analítico Bacteriológico en su versión hoja de Excel utilizado para el NMP convencional, tenemos una estimación de la cantidad de microorganismos de *Escherichia coli*, presentes en las muestras de agua según NMP molecular en unidades de NMP/ 100 mL.

NOTA: El NMP molecular no cuenta con normas técnicas que lo respaldan para análisis de calidad de agua.

Tuvimos detección hasta la dilución 10^{-3} para el río Ventilla y 10^{-2} para el río Olía; llegando a la conclusión que el río Ventilla está más contaminado que el río Olía.

Tabla N° 05. Estimación cuantitativa para *Escherichia coli* con NMP molecular

CUENCA	REPELICIONES (NMP /100 mL)			MEDIA ARITMÉTICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
	R1	R2	R3		
VENTILLA I	7921.15	3290.36	3290.36	4833.956667	2673.587853
VENTILLA II	63.64	31.15	36.76	43.85	17.36666635
OLÍA I	106.94	92.11	263.76	154.27	95.11060561
OLÍA II	171.88	2311.38	215.6	899.62	1222.815433

Fuente: elaboración propia

Observar que mediante la técnica LAMP, hay mayor sensibilidad de detección; pero cabe recalcar que en el proceso de estandarización no hemos discriminado células vivas de células muertas presentes en la solución madre.

3.6 ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE EL NMP CONVENCIONAL vs NMP MOLECULAR EN DETECCIÓN DE *Escherichia coli*

Realizamos la comparación de los resultados entre el NMP convencional y el NMP – LAMP o molecular. Para esto se realizó la distribución de probabilidad mediante el T-Student, para determinar las diferencias entre los métodos a comparar, para lo cual se utilizó el programa R studio; se consideró las siguientes hipótesis: a) que la técnica del NMP convencional es igual al método molecular del NMP (NMP – LAMP); b) Si los ríos presentaban igual grado de contaminación respecto a los métodos de análisis utilizados. Es una probabilidad, que surge del problema de estimar los métodos utilizados en la identificación de *Escherichia coli*; dándonos el valor de P o Pvalue. Para esto se considera un Pvalue < 0.05 de significancia estadística para la comprobación de la hipótesis.

- a) H₀: Método NMP convencional es igual al método molecular NMP – LAMP**
- b) H₁: Método NMP convencional es diferente al método molecular NMP - LAMP**

Mediante el uso del programa Rstudio tenemos: Pvalue = 0.004488; por lo tanto, aceptamos la H₁ ya que el Pvalue es menor a 0.05 (p=0.004488). por tanto, hay diferencias entre los métodos usados

- c) H₀: Río Olia y Río Ventilla presentan igual grado de contaminación y que no hay distinción en los métodos de análisis microbiológicos a utilizar**
- d) H₁: Río Olia y Río Ventilla presentan diferencia en grado de contaminación y que hay distinción en los métodos de análisis microbiológicos a utilizar**

Mediante el uso de Rstudio tenemos: Pvalue= 0.004461, por lo tanto, aceptamos la H₁ ya que el Pvalue es menor a 0.05; entonces concluimos que hay diferencias en grado de

contaminación entre las cuencas analizadas, y que hay mejor detección con el uso del método NMP molecular.

3.7 NMP – LAMP CON MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO OLÍA Y RÍO

VENTILLA PARA LA DETECCIÓN DE *Enterococcus faecalis*

Se observa detección en el río Ventilla hasta la dilución 10^{-2} , y en el río Olía hasta la dilución 10^{-1} . Confirmando la presencia de *E. faecalis* en las aguas de los ríos. Se realizó el experimento con una sola réplica por triplicado.

Tabla N° 06. Estimación cuantitativa para *Enterococcus faecalis*

CUENCA	REPLICACIONES (NMP /100 mL)			MEDIA ARITMÉTICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
	R1	R2	R3		
VENTILLA	2311.38	2315.38	2315.38	2314.046667	2.309401077
OLÍA	230.35	228.32	229.35	229.34	1.015036945

Fuente: Elaboración propia

IV. DISCUSIÓN

El monitoreo rápido e in situ de los patógenos transmitidos por el agua es importante para proteger la salud pública del peligro de contaminación fecal en el agua (Lee et al., 2018). Para la implementación del método molecular es indispensable la obtención de ADN íntegro y puro; para un buen desempeño de las técnicas moleculares (Tang et al. 2005, Wang et al. 2005); Una de las ventajas de utilizar métodos tradicionales para extracción de ADN, como es el caso de lisis por calor; es su bajo costo ya que no utiliza equipos ni reactivos, así como un alto rendimiento; el uso de métodos comerciales como perlas magnéticas o columna de sílica son susceptibles de contaminación, variación y errores por los múltiples pasos de manipulación (Störmer et al. 2007); esto sumado al uso de materiales y reactivos. Por lo cual en la comparación de los métodos de extracción utilizados en la investigación obtenemos mayor cantidad de material genético por lisis por calor que es una técnica convencional, además solo demoramos 10 min para obtener el ADN en el sobrenadante y no utiliza equipos sofisticados ni reactivos; así que es una técnica válida para extraer ADN y más aún si deseamos trabajar en campo.

Los métodos convencionales son confiables, pero se necesita por lo menos 1 semana para obtener los resultados de calidad de agua; además se utiliza equipos costosos, y necesitamos realizar procesos largos de enriquecimiento bacteriano (Nurliyana et al., 2018). Por tal razón, en nuestra investigación demostramos que una alternativa atractiva

viene siendo la técnica molecular del Número Más Probable (NMP – LAMP); ya que se optimiza tiempo para obtener resultados, y hay una mayor especificidad; pudiéndose reconocer hasta sepas emergentes y evaluar resistencia a fármacos.

La técnica molecular LAMP es destinado a ser utilizado como una herramienta de detección rápida, para la evaluación microbiológica de la calidad del agua en zonas de bajos recursos, ya que no se utiliza equipos sofisticados; pero LAMP no es capaz de cuantificar el número de genes diana en la muestra analizada (Martzy et al., 2017). Por lo tanto, la combinación de la técnica convencional con el método molecular (NMP – LAMP) ; si nos podría dar la estimación de la cantidad de microorganismos presentes en la muestra de agua; utilizando las tablas del Manual Analítico Bacteriológico elaborado para el NMP convencional; ya que la técnica del NMP-LAMP aún no se ha desarrollado el algoritmo de predicción. Pero a pesar de ello si sería una técnica válida para el análisis microbiológico de aguas; pero ya solo la detección de la presencia o ausencia *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*, es un indicio de contaminación, aunque se detecte en concentraciones pequeña; esa agua debe ser tratada antes de su uso como agua potable; porque según los Estándares de Calidad Ambiental mencionan una concentración de 0 NMP/100mL para ser potabilizada.

La técnica LAMP utiliza cuatro o seis cebadores dirigidos a seis u ocho regiones dentro de un segmento de ADN, con una concentración mayor que la utilizada en los métodos tradicionales de PCR. Las altas concentraciones de cebadores utilizados conducen a una mayor probabilidad de amplificación no específica inducida por dímeros de cebadores; dándonos resultados de falsos positivos (Wang et al., 2015). Siendo un problema principal dentro de la investigación, se logró controlar estrictamente las concentraciones de los cebadores, Mg²⁺, dNTP y Bst polimerasa; evitando los llamados falsos positivos; para lo cual también en este estudio, se utilizó Betaina como componente del Buffer, para poder trabajar el conjunto de 6 cebadores; y evitar la amplificación no específica; y se obtuvo como resultado la diferenciación entre control positivos y control de reactivos.

Las bacterias grampositivas y gramnegativas poseen una pared celular de peptidoglicano, proporcionándole rigidez a su estructura. La capa de peptidoglicano en bacterias Gram-positivas es más gruesa (15 nm a 80 nm) que en bacterias Gram-negativas (Huang et al., 2008). Se han informado ensayos LAMP para la amplificación de genes directamente de células procariontas y eucariotas (Iwasaki et al., 2003; Bosward et al., 2016). Sin embargo, se requería el calentamiento previo de las muestras que contenían células bacterianas a

95 °C (3-10 min) (Poon et al., 2006; Chen y Ge 2010). Para poder obtener resultados óptimos y teniendo en cuenta la presión atmosférica, nuestras muestras fueron lisadas a 94 °C por 10 min; así logramos la ruptura de la pared celular, obteniendo positividad para la amplificación del ADN bacteriano.

La técnica convencional del Número Más Probable (NMP) detecta solo células vivas, ya que se utiliza procesos de enriquecimiento bacteriano (Agurto, 2005); siendo un desafío la diferenciación de células vivas y muertas en las técnicas de detección molecular basadas en ADN (Girones et al., 2010). A pesar que los resultados de la investigación muestran semejanzas en detección de presencia y ausencia de *E. coli* y *E. faecalis* según el método convencional y molecular; las estimaciones de cuantificación de microorganismos en NMP/100mL muestran diferencia significativa; debido a que no se discriminaron células vivas de células muertas; pero el solo hecho de detectar la positividad de presencia de bacterias indicadores de calidad de agua, nos evidencia que NMP – LAMP es una alternativa viable como prueba rápida.

El éxito del método LAMP directamente de células bacterianas a una temperatura de 63 °C, podría deberse al aumento de la permeabilidad celular a esta temperatura que conduce la amplificación del ADN; además, NMP - LAMP tiene el potencial de reemplazar el método NMP convencional (Ahmad et al., 2018) y con el uso de los cebadores específicos la técnica LAMP solo detectara la bacteria en interés (Tongphrom et al., 2018); corroborando que la investigación realizada sería valiosa para su uso en campo como prueba rápida de detección de *E. coli* y *E. faecalis*.

V. CONCLUSIONES

- Que el método de extracción de ADN convencional por lisis celular por calor, es más adecuada para el uso en campo a comparación de métodos de extracción de ADN comerciales; ya que no utiliza equipos caros y el tiempo de extracción es corto.
- La técnica del PCR -LAMP para detección de presencia y ausencia de *E. coli* y *E. faecalis*; es fiable y a su vez específica y se puede utilizar como prueba rápida en campo para la detección de microorganismos indicadores de calidad de agua
- El método molecular del NMP – LAMP brinda resultados confiables, similares al método convencional del NMP: si discrimináramos células vivas de células muertas; tendríamos resultados más aceptables para el proceso de cuantificación.

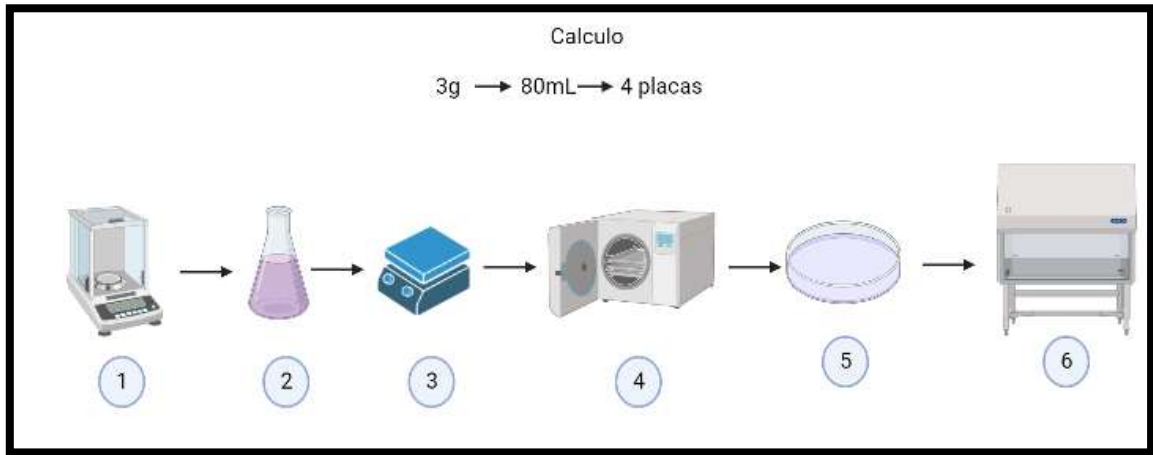
- El método del NMP – LAMP es una técnica eficaz porque pudo llegar a cumplir el objetivo de estandarización con muestras de agua de cuencas hidrográficas de la Región Amazonas.

VI. RECOMENDACIONES

- Utilizar colorante fotoreactivo que ayude a diferenciar bacterias viables y no ADN extracelular presente en las muestras de agua. Los colorantes fotorreactivos tienen alta afinidad por el ADN; estos tintes se intercalan en el ADN de doble cadena y forman un enlace covalente al exponerse a la luz ultravioleta, lo que da como resultado un ADN modificado químicamente, que no puede amplificarse mediante reacciones PCR o LAMP. Estos tintes están diseñados para ser impermeables a las células, por lo que se dirigen solo a las células muertas y al ADN extracelular, sin afectar a las células viables.
- Utilizar fluoróforos que permitan ayudar a la visualización de positivos y negativos para poder optimizar de mejor manera el método NMP – LAMP.
- Realizar mayores pruebas de ensayo con aguas de cuencas hidrográficas de Amazonas, para estandarizar la parte cualitativa del NMP – LAMP.
- Realizar el algoritmo de predicción multivariable del NMP – LAMP
- Realizar caracterización de las cepas de *E. coli* y *Enterococcus* circulantes en fuentes de agua y determinar su resistencia a fármacos; para disminuir enfermedades infecciosas por transmisión feco oral.

VII. ANEXOS

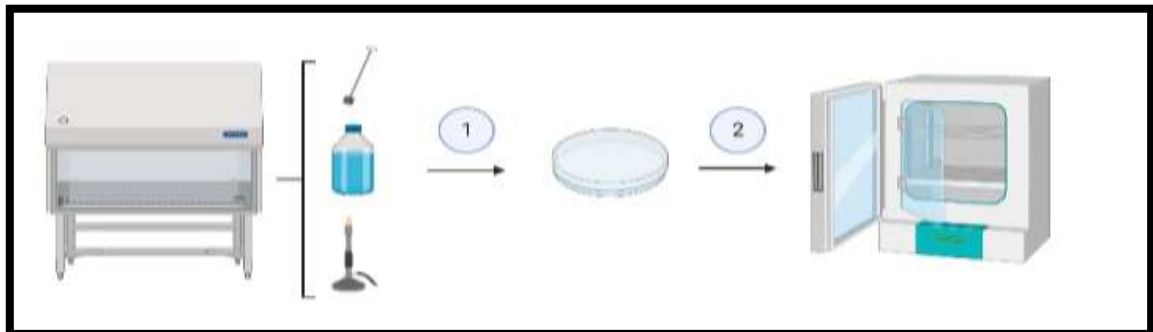
Anexo 7. Preparación de Agar EMB y Agar Muller Hinton



- 1= Pesamos el agar
- 2= Se diluye en agua destilada
- 3= Se homogeniza en placa calentadora
- 4=Se autoclava a 121 °C por 30 min
- 5= Se vierte en placas estériles
- 6= Se Uvea el material

Fuente: Elaboración propia

Anexo 8. Recuperación bacteriana



- 1= crioviales que contienen las cepas en estudio se siembra en agar mediante método de agotamiento
- 2= incubación de las plas a 37°C por 24h

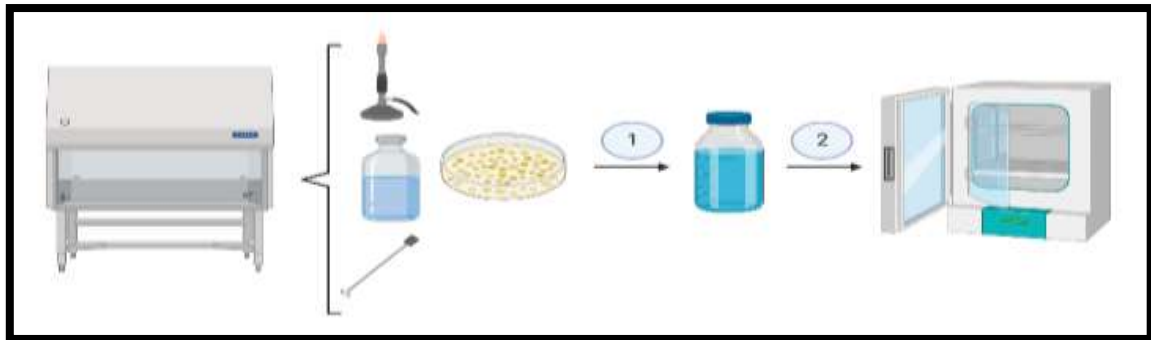
Fuente: Elaboración propia

Anexo 9. Preparación de caldo HB



Fuente: Elaboración propia

Anexo 10. Suspensión bacteriana



1= De las placas con crecimiento bacteriano se siembra en caldo HB

2=Se incuba a 37°C x 24 h para *E. coli* y 44°C x 48 h *E. faecalis*

Fuente: Elaboración propia

Anexo 11. Estandarización de McFarland



Se estandariza con cloruro de bario y ácido sulfúrico al 1%, creando turbidez

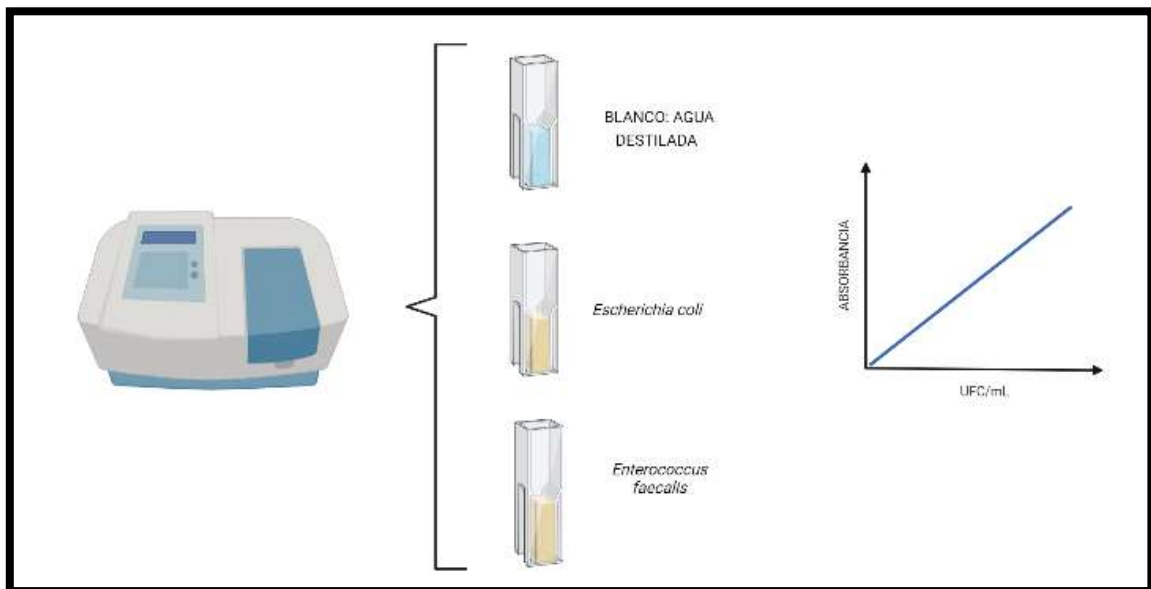
Fuente: Elaboración Propia

Anexo 12.Tabla de los estándares de McFarland

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% Cloruro de bario (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% Ácido sulfúrico (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Densidad celular aproximada (1×10^8 CFU/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Transmitancia*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbancia*	0.08 a 0.1	0.257	0.451	0.582	0.669

Fuente: Faddin (2003)

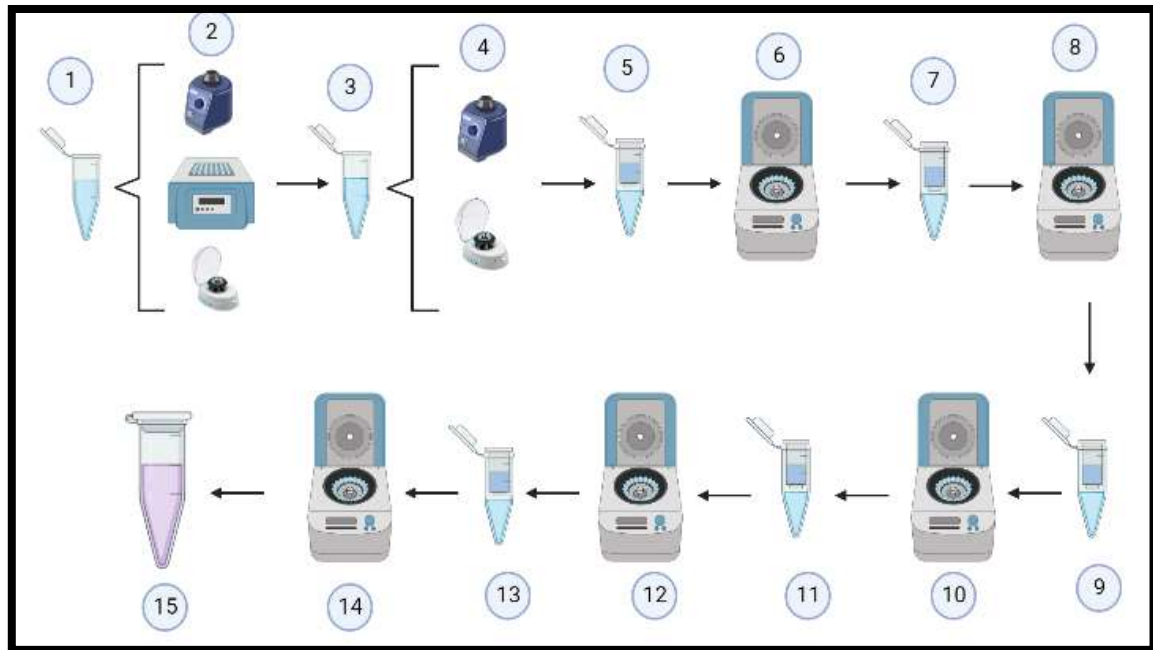
Anexo 13.Estandar de Macfarland para *E. coli* y *E. faecalis*



Utilizamos cubetas de 3 mL; donde el punto blanco es agua destilada; el punto 2 caldo con *E. coli* y mi punto 3 caldo con *E. faecalis*.

Fuente: Elaboración propia

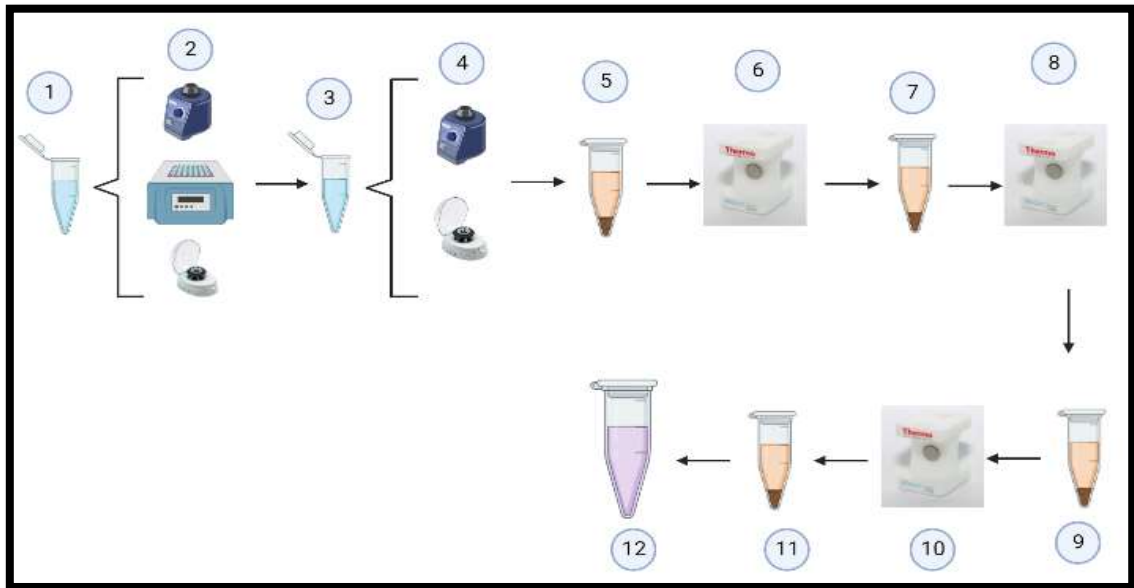
Anexo 14. Extracción de ADN por columnas de silica gel



1. Agregamos: 400 uL de cultivo, 400 uL de buffer AL y 40 uL de proteinasa K.
2. Se homogenizo mediante Vortex y se incubo a 56 °C x 30 min; realizamos spin
3. añadimos 200 ul de etanol de 100 %,
4. Homogenizamos la muestra mediante vortex y spin
5. Transportamos el contenido del tubo a columna
6. centrifugamos a 8 000 rpm x 1 min (repetimos 2 veces en la misma columna).
7. Transportamos columna al siguiente tubo recolector, añadimos 500 uL de AW1
8. centrifugamos a 8 000 rpm x 1 min.
9. Transportamos columna al siguiente tubo recolector, añadimos 500 uL de AW2 y
10. centrifugamos a 14 000 rpm x 3 min.
11. Eliminamos residuos
12. volvemos a centrifugar en el mismo tubo a 14 000 rpm x 1 min
13. Transportamos columna a tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, añadir 50 uL de AE e incubamos por 5 min a temperatura ambiente,
14. Centrifugamos a 8 000 rpm x 1 min
15. Desechamos columna y almacenamos el eluido a -20°C.

Fuente: Elaboración propia

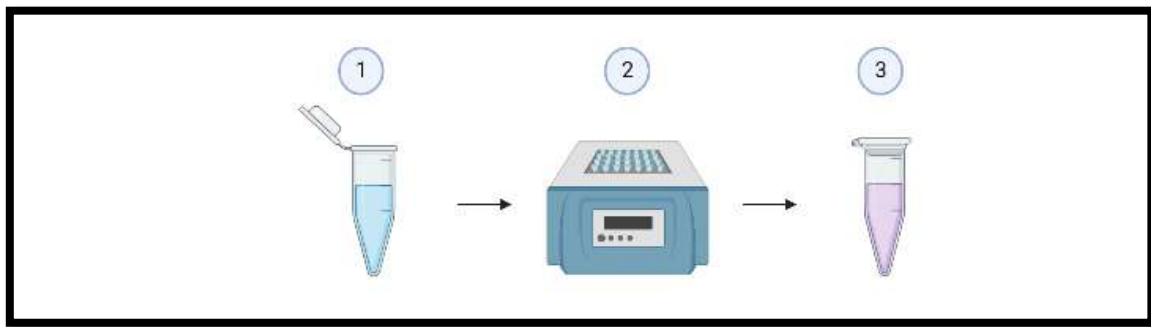
Anexo 15. Extracción de ADN por Beads magnéticos



1. agregamos 400 uL de cultivo, 400 uL de buffer de lisis y 40 uL de proteinasa K.
2. Homogenizamos la muestra mediante Vortex e incubamos a 56 °C por 20 min; luego realizamos spin
3. Añadimos 200 uL de etanol de 100 %
4. Homogenizamos muestra mediante vortex y spin
5. agregamos 200 uL de beads Magnéticos; mezclamos por inversión
6. dejamos reposar en un rack magnético, y retiramos sobrenadante.
7. Añadimos 500 uL de buffer de lavado (2 veces)
8. Mezclamos por inversión y dejamos reposar en el rack magnético, retiramos sobrenadante.
9. Añadimos 50 uL de buffer de elución, mezclamos por inversión e incubamos por 5 min a temperatura ambiente.
10. Mezclamos por inversión y dejamos reposar en el rack magnético
11. Recolectamos el sobrenadante
12. en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y almacenamos a -20 °C

Fuente: Elaboración propia

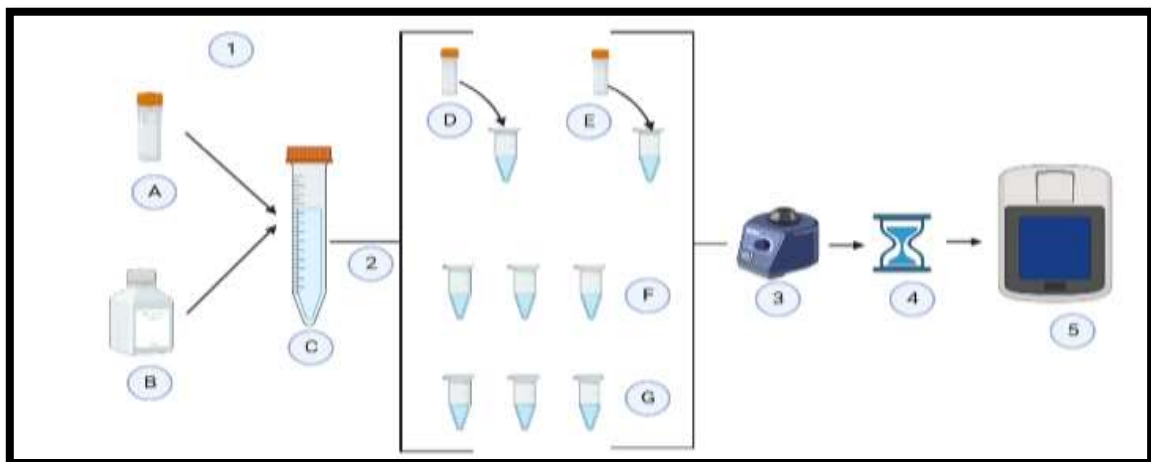
Anexo 16. Extracción de ADN mediante lisis celular por calor



1. Agregamos 400 uL de cultivo
2. Llevamos a hervor a 94 °C x 10min
3. Almacenamos a -20°C

Fuente: Elaboración propia

Anexo 17. Cuantificación de ADN mediante QUBIT



1= A: Qubit Reagent (n° muestras x 1 uL), B= Qubit buffer(n° muestras x 199 uL); C= Qubit Working (Suma cálculos A + B).

2= D: 190uL Qubit Working + 10 uL Standar 1; E: 190uL Qubit Working + 10 uL Standar 2 (Kit dsDNAHs); F: 198 uL Qubit Working + 2 uL de muestra E. coli; G: F= 198 uL Qubit Working + 2 uL de muestra E. faecalis.

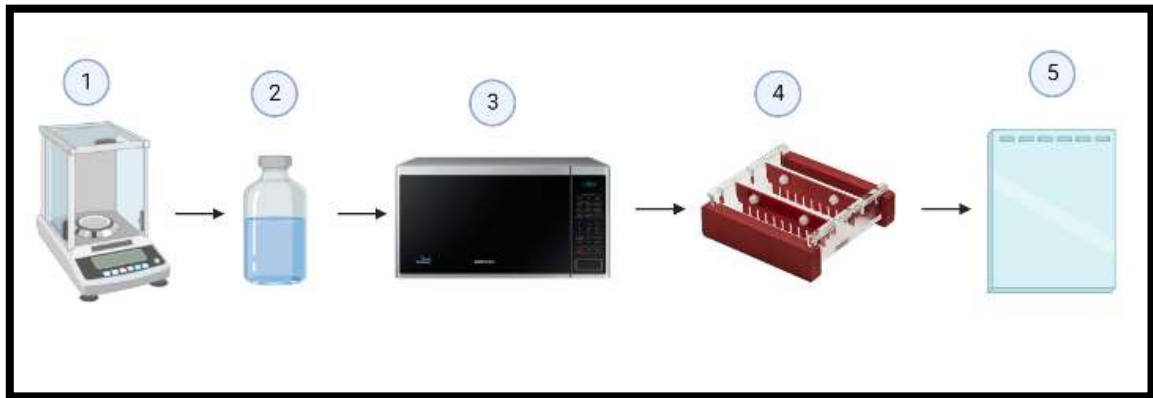
3=homogenizamos con vortex

4=incubamos por 2min

5=procedemos la lectura en el equipo

Fuente: Elaboración propia

Anexo 18. Preparación de gel de agarosa al 1.5%



1= Pesamos 1.5 g de agarosa

2= Diluimos en 75 mL TAE 1X

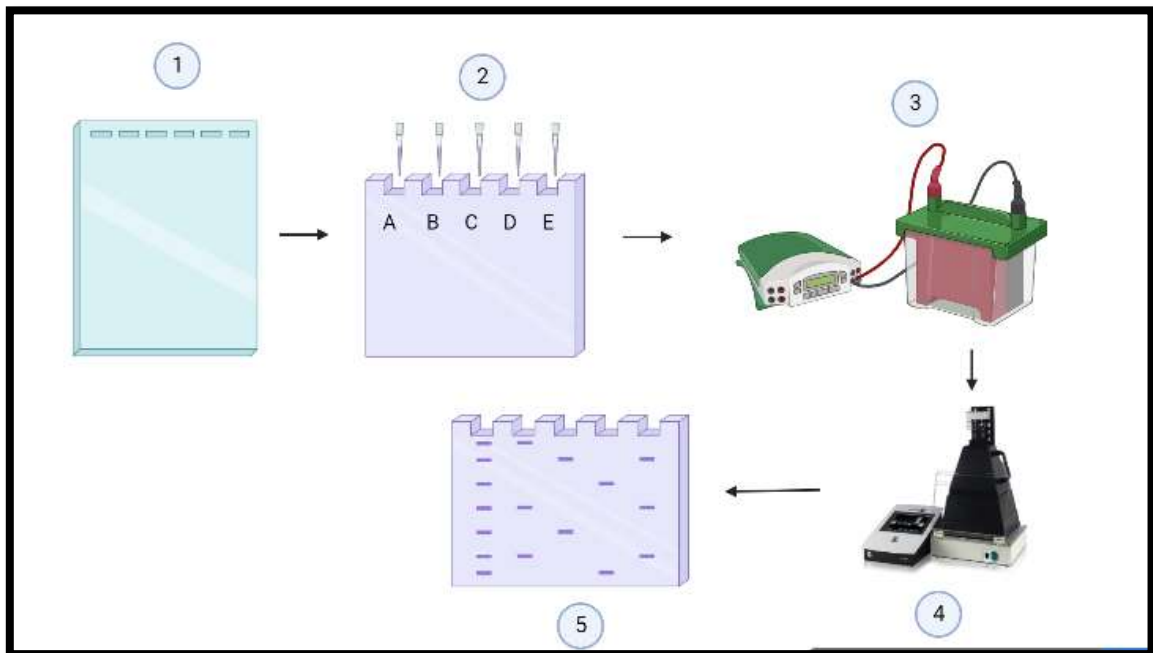
3= calentamos la solución por 2 min; pasado el tiempo se agrega 7.5 uL SYBR SAFE

4=Vertimos la solución en la bandeja con los peines seleccionados y dejamos solidificar por aprox 25 min

5=Gel de agarosa solidificado

Fuente: Elaboración propia

Anexo 19. Electroforesis



1= en gel solidificado dentro de la bandeja se coloca en la cámara de electroforesis, se cubre casi completamente con TAE 1X en reuso

2= se realiza la siembra: A: marcador de peso molecular; B,C,D,E,... : 2.5 uL ADN loading + 10uL de muestra

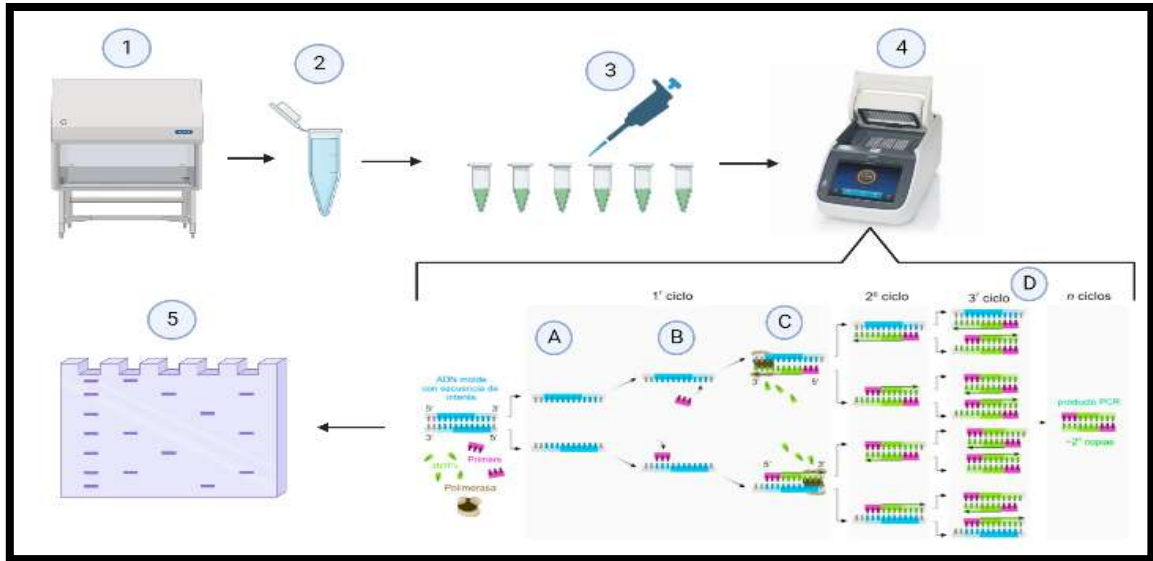
3=se conecta a una fuente de poder a 94v x 44min

4= se procede a la lectura en un fotodocumentador

5= Visualización de amplificación

Fuente: Elaboración propia

Anexo 20. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)



1=En una cabina de bioseguridad se prepara el mix de PCR

2=el mix de PCR se reparte según el volumen final en microtubos de 0.2 mL

3= En un ambiente desinfectado y ya fuera de la cabina se agrega el ADN a cada reacción

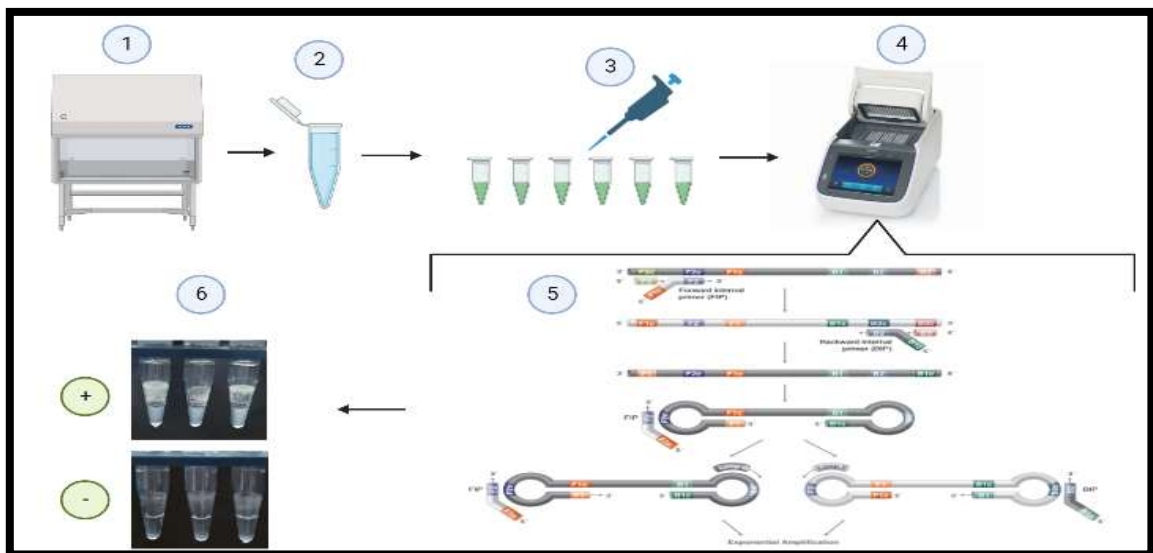
4= se lleva a ciclaje de temperatura; donde sucede lo siguiente: A= Desnaturalización; B= Alineamiento;

C= Extensión; D= Replicas

5=Electroforesis para ver amplificación

Fuente: Elaboración propia

Anexo 21. Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP)



1=En una cabina de bioseguridad se procede a preparar el mix LAMP

2=Preparado el mix se colocado en microtubos de 0.2 mL

3= En un área limpia y fuera de la cabina se añade el ADN

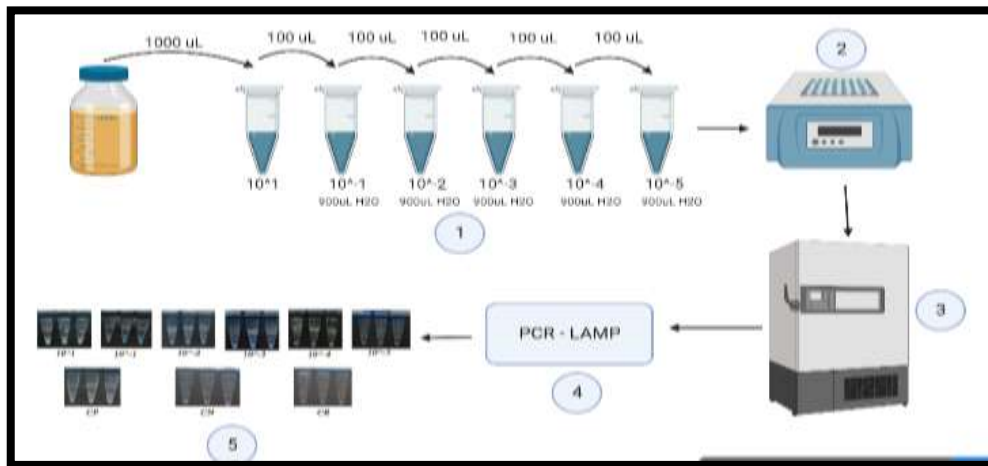
4= Se lleva al termociclador a una temperatura constante

5= Dentro del termociclador sucede lo siguiente: Reconocimiento de cebadores, Amplificación y ciclización

6= Visualización de resultados

Fuente: Elaboración propia

Anexo 22. Número Mas Probable Molecular (NMP - LAMP)



1=Se realiza las diluciones seriadas con agua destilada; 10⁰ es solución madre

2= Se lleva a hervor a 94°Cx10min

3= Pasado el tiempo de lisis, se conserva el ADN a -4 °C

4=Procede a ejecutar la PCR-LAMP

5=Visualización de resultados

Fuente: Elaboración propia

Anexo 23. Protocolo de PCR con cebadores LacZ



PCR CONVENCIONAL	
BACTERÍA: COLIFORME TOTALES (<i>Escherichia coli</i>)	FECHA: 10/05/2022
FRAGMENTO: 254 pares de bases	
Kit: INVITROGEN	

PRIMERS:

F: ColLacZF3 - ACC ATC GTC TGC TCA TCC A

→ **TM:** 61°C

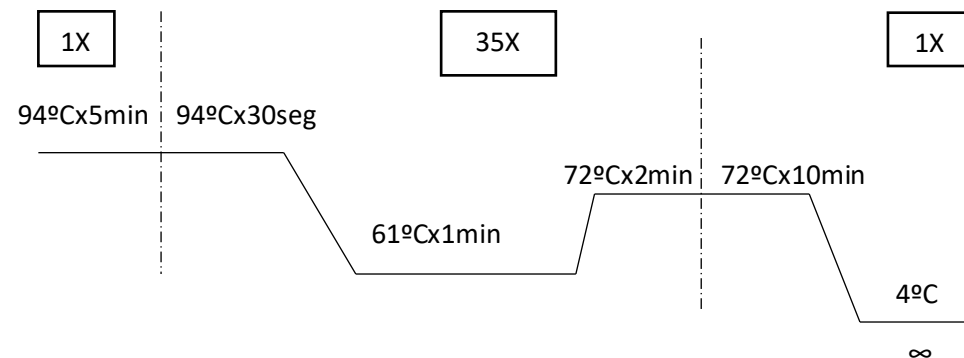
R: ColLacZB3 - TTA AAC TGC ACA CCG CCG

→ **TM:** 62°C

PROTOCOLO:

REACTIVO	C1	V1	CF
BUFFER	10X	2uL	1X
Mgcl2	50mM	0.8uL	2mM
dNTPs	25mM	0.16uL	0.2mM
PRIMER F3	10uM	1uL	0.5uM
PRIMER B3	10uM	1uL	0.5uM
H2O BM	-	12.84uL	-
TAQ POLIMERASA	50 U/ul	0.2uL	0.125 U/ul
TEMPLADO		2uL	
VF= 20uL			

CICLAJE:



TERMOCICLADOR UTILIZADO: APPLIED

Biosystems™ SimpliAmp™

Anexo 24. Protocolo de PCR con cebadores Ecuid



PCR CONVENCIONAL	
BACTERIA: <i>Escherichis coli</i>	FECHA: 10/05/2022
FRAGMENTO: 254 pares de base	
Kit: INVITROGEN	

PRIMERS:

F: EcuidF3 - CKG TAG AAA CCC CAA CCC G

→ TM: 61°C

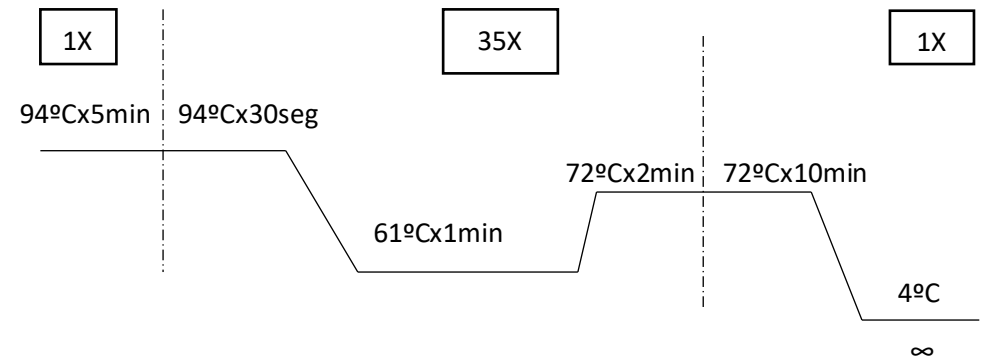
R: EcuidB3 - AWA CGC AGC ACG ATA CGC

→ TM: 62°C

PROTOCOLO:

REACTIVO	C1	V1	CF
BUFFER	10X	2uL	1X
Mgcl2	50mM	0.8uL	2mM
dNTPs	25mM	0.16uL	0.2mM
PRIMER F3	10uM	1uL	0.5uM
PRIMER B3	10uM	1uL	0.5uM
H2O BM	-	12.84uL	-
TAQ POLIMERASA	50 U/ul	0.2uL	0.125 U/ul
TEMPLADO		2uL	
VF= 20uL			

CICLAJE:



TERMOCICLADOR UTILIZADO: APPLIED

Biosystems™ SimpliAmp™

Anexo 25. Protocolo PCR con cebadores Ef23S



PCR CONVENCIONAL	
BACTERIA: <i>Enterococcus faecalis</i>	FECHA: 11/05/2022
FRAGMENTO: 112 pares de bases (pb)	
Kit: INVITROGEN	

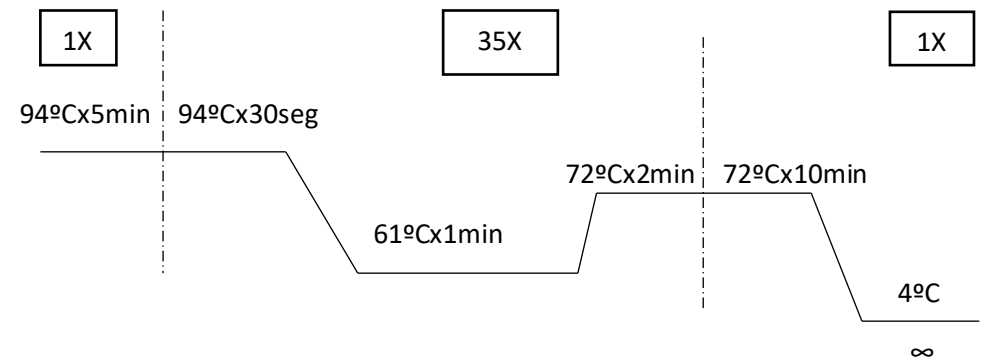
PRIMERS:

F: Ef23SF3 - GAA AAG CAC CCC GGA AGG → **TM: 60°C**
 R: Ef23SB3 - ACC TGG ACA TGG GTA GAT CA → **TM: 61°C**

PROTOCOLO:

REACTIVO	C1	V1	CF
BUFFER	10X	2uL	1X
Mgcl2	50mM	0.8uL	2mM
dNTPs	25mM	0.16uL	0.2mM
PRIMER F3	10uM	1uL	0.5uM
PRIMER B3	10uM	1uL	0.5uM
H2O BM	-	12.84uL	-
TAQ POLIMERASA	50 U/ul	0.2uL	0.125 U/ul
TEMPLADO		2uL	
VF= 20uL			

CICLAJE:



TERMOCICLADOR UTILIZADO: APPLIED

Biosystems™ SimpliAmp™

Anexo 26. Protocolo PCR - LAMP con cebadores LacZ



PCR - LAMP	
BACTERIA: COLIFORMES TOTALES (<i>Escherichia coli</i>)	FECHA: 12/05/2022
BUFFER: NEW ENGLAND BIOLABS	

PRIMERS: INVITROGEN

PRIMER	SECUENCIA (5'TO 3')
ColLacZF3	ACC ATC GTC TGC TCA TCC A
ColLacZB3	TTA AAC TGC ACA CCG CCG
ColLacZFIP	CAA GCC GTT GCT GAT TCG CGT TTT TGA CCT GAC CAT GCA GAG G
ColLacZBIP	CCG TTC AGC AGC AGC AGA CCT TTT ACG CTG ATT GAA GCA GAA GC

PROTOCOLO:

REACTIVO	C1	V1	C2
BUFFER NB	10X	2.5 uL	1x
MgsSO4	100mM	2uL	8mM
DNTPs	25mM	1.4uL	1.4mM
FIB	10uM	4uL	1.6mM
BIP	10uM	4uL	1.6mM
F3	10uM	0.5uL	0.2 mM
B3	10uM	0.5uL	0.2 mM
BST 3.0	8 U/uL	1uL	8 U/uL
H20 BM	-	4.1uL	-
TEMPLADO	-	5uL	-
VF = 25uL			

TEMPERATURA:

56 °C X 60 min

COVER:

100°C

TERMOCICLADOR UTILIZADO: APPLIED

Biosystems™ SimpliAmp™

Anexo 27. Protocolo PCR - LAMP con cebadores Ecuid



PCR - LAMP	
BACTERIA: <i>Escherichia coli</i>	FECHA: 12/05/2022
BUFFER: NAMRU	

PRIMERS: INVITROGEN

PRIMER	SECUENCIA (5'TO 3')
EcuidFIP	TAA CGC GCT TTC CCA CCA ACG GCC TGT GGG CAT TCA GTC
EcuidBIP	TAA CGA TCA GTT CGC CGA TGC ACT GCC CAA CCT TTC GGT AT
EcuidF3	CKG TAG AAA CCC CAA CCC G
EcuidB3	AWA CGC AGC ACG ATA CGC
EcuidLoopF	TCC ACA GTT TTC GCG ATC CA
EcuidLoopB	ACG TCT GGT ATC AGC GCG AAG T

TEMPERATURA:

63 °C X 30 min

COVER:

100°C

PROTOCOLO:

REACTIVO	C1	V1	C2
4X	-	5uL	1x
FIB	25 uM	1.92uL	2.4 uM
BIP	25uM	1.92uL	2.4uM
F3	25uM	0.16uL	0.2uM
B3	25uM	0.16uL	0.2uM
LF	25uM	0.64uL	0.8uM
LB	25uM	0.64uL	0.8uM
H2O BM	-	4.56uL	-
BST 3.0	8 U/uL	0.8uL	0.32U/uL
TEMPLADO	-	5uL	-
VF = 20uL			

TERMOCICLADOR UTILIZADO: APPLIED

Biosystems™ SimpliAmp™

Anexo 28. Protocolo PCR - LAMP con cebadores Ef23S



PCR - LAMP	
BACTERIA: <i>Enterococcus faecalis</i>	FECHA: 12/05/2022
BUFFER: NAMRU	

PRIMERS: INVITROGEN

PRIMER	SECUENCIA (5'TO 3')
Ef23SFIP	GCA ATC GTA ACT CGC CGG TTC AAA CCG TGT GCC TAC AAC AA
Ef23sBIP	TCG AAG AGA CGG AGC CGC AGT GGT TTC GGG TCT ACG ACT
Ecf23SF3	GAA AAG CAC CCC GGA AGG
Ef23SB3	ACC TGG ACA TGG GTA GAT CA
Ef23SLoopF	CCA TCA CTC ATT AAC GAG CTT TGA C
Ef23SLoopB	CGA GTC TGA ATA GGG CGA ATG AGT A

PROTOCOLO:

REACTIVO	C1	V1	C2
4X	-	5uL	1x
FIB	25 uM	1.92uL	2.4 uM
BIP	25uM	1.92uL	2.4uM
F3	25uM	0.16uL	0.2uM
B3	25uM	0.16uL	0.2uM
LF	25uM	0.64uL	0.8uM
LB	25uM	0.64uL	0.8uM
H20 BM	-	4.56uL	-
BST 3.0	8 U/uL	0.8uL	0.32U/uL
TEMPLADO	-	5uL	-
VF = 20uL			

TEMPERATURA:

63 °C X 60 min

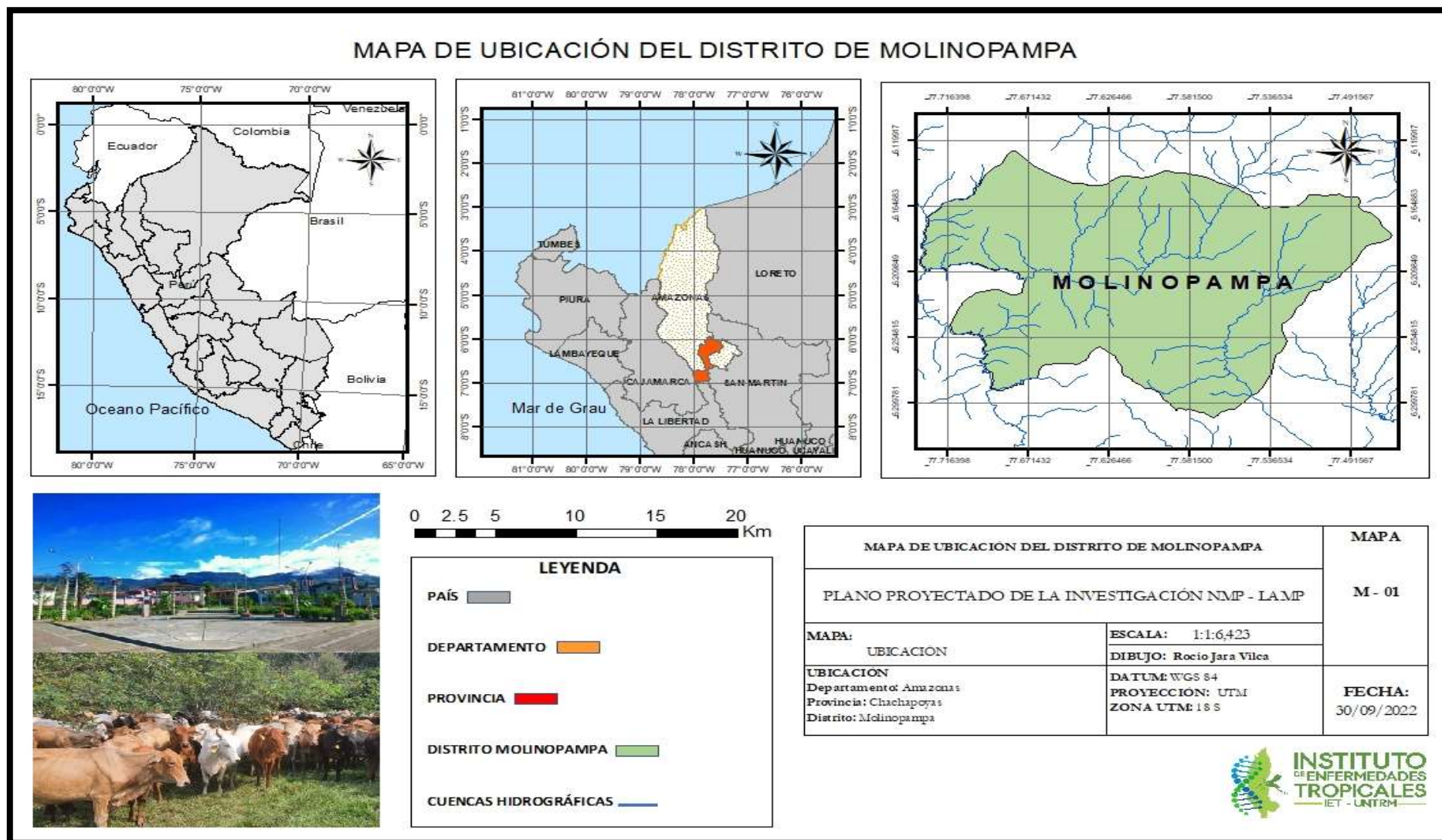
COVER:

100°C

TERMOCICLADOR UTILIZADO: APPLIED

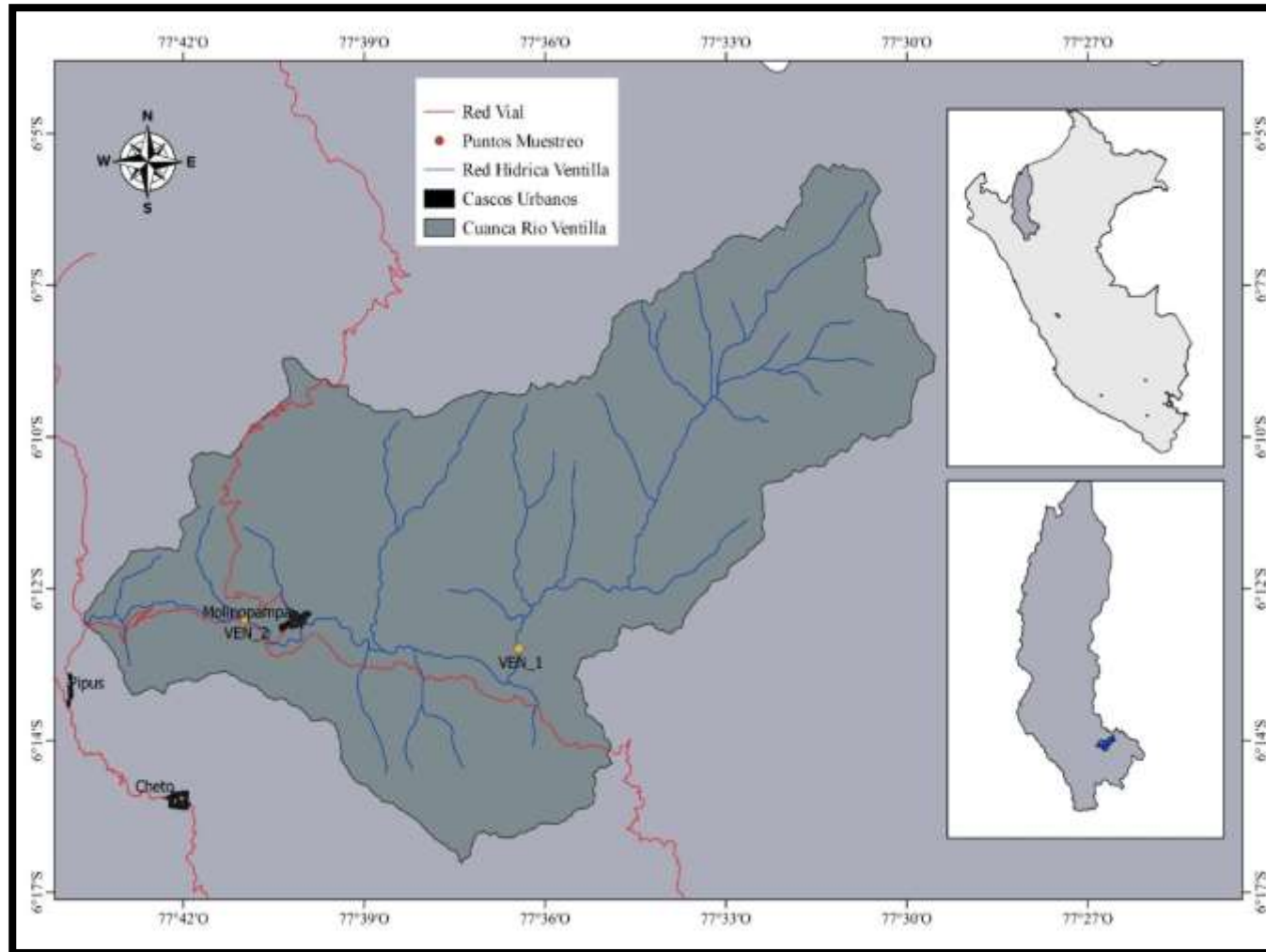
Biosystems™ SimpliAmp™

Anexo 29. Mapa de Ubicación del distrito de Molinopampa



Fuente: Elaboración propia

Anexo 30. Puntos de muestreo del río Ventilla



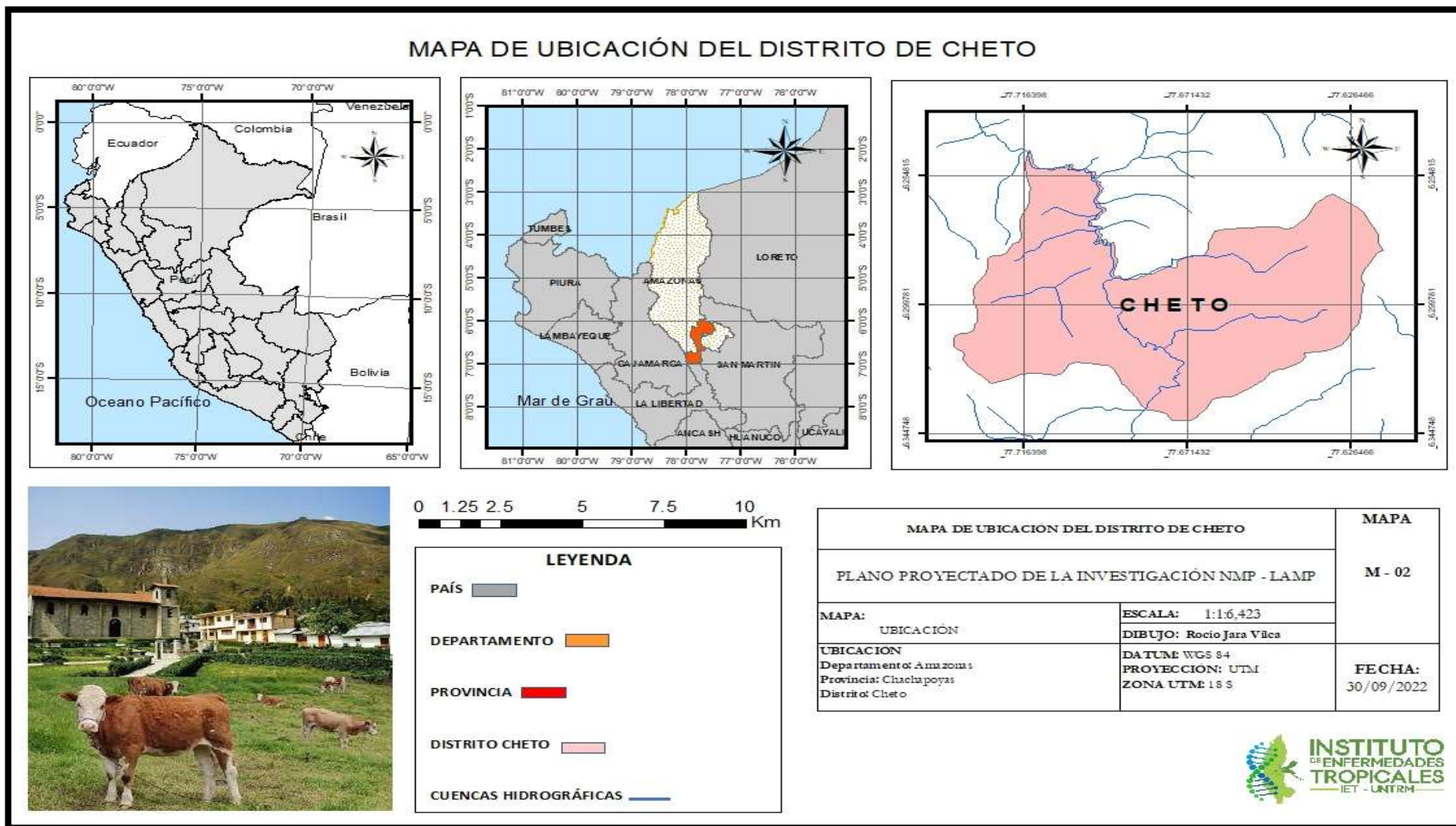
Punto 01 Ventilla – Sector Pampa Moreno



Punto 02 Ventilla – Sector Salida de Molinopampa

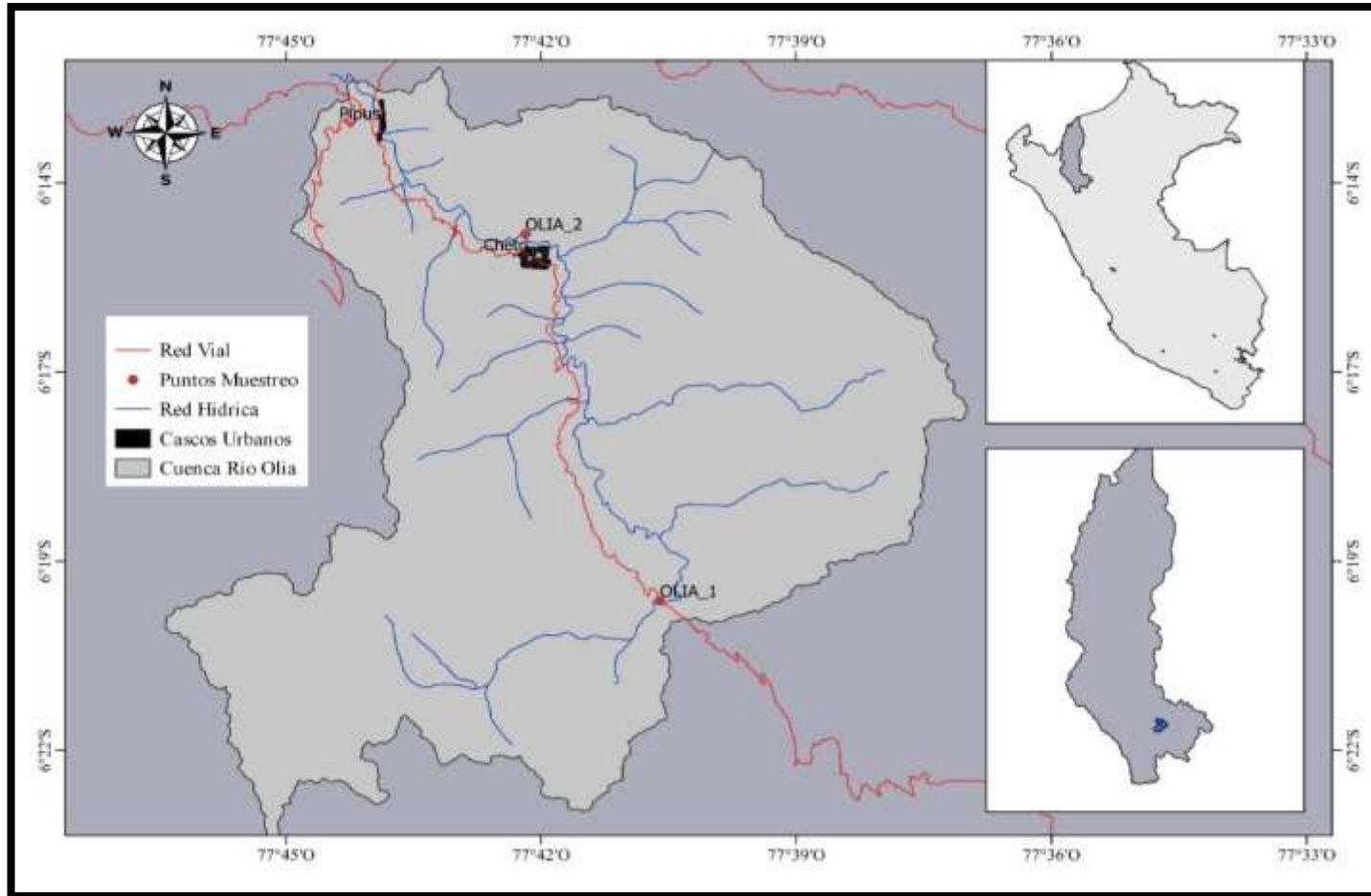
Fuente: Elaboración Propia

Anexo 31. Mapa de ubicación del distrito de Cheto



Fuente: Elaboración propia

Anexo 32. Puntos de muestreo del río Olía



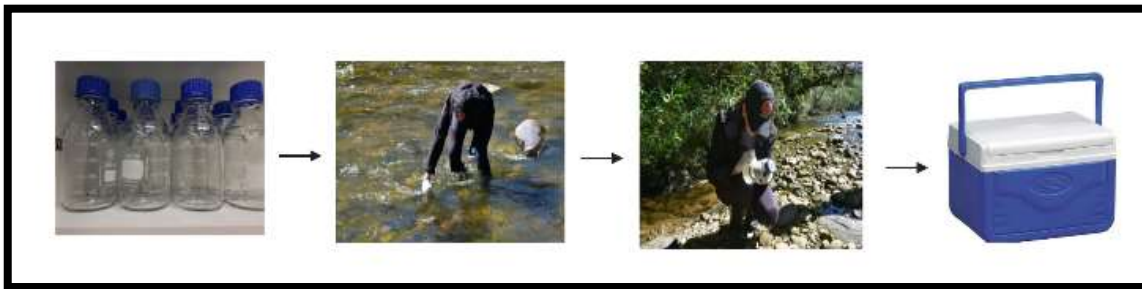
Punto 01 Olía – Sector Parte Alta de Cheto



Punto 02 Olía – Sector Salida de Cheto

Fuente: Elaboración propia

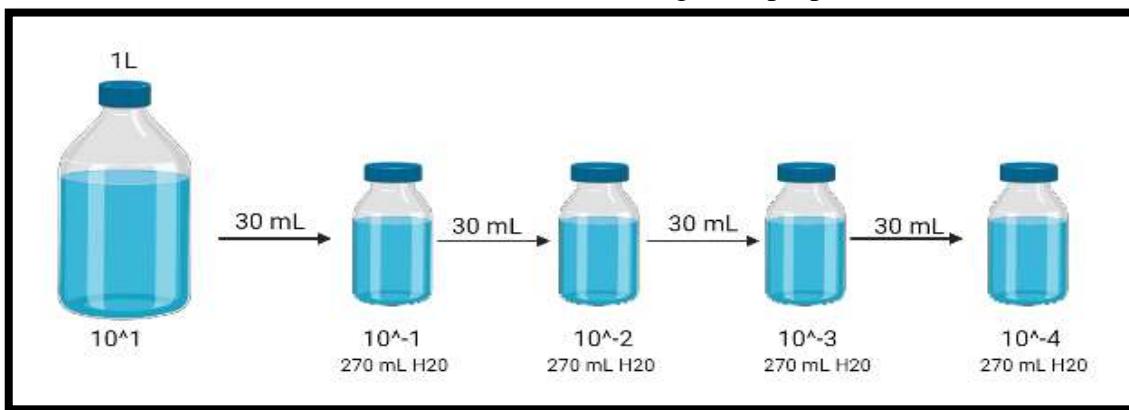
Anexo 33. Colecta de puntos de muestreo



De los frascos estériles, limpios y secos; se procede la colecta en el centro del río a contra corriente; luego se rotula la muestra y se coloca en un cooler

Fuente: Elaboración propia

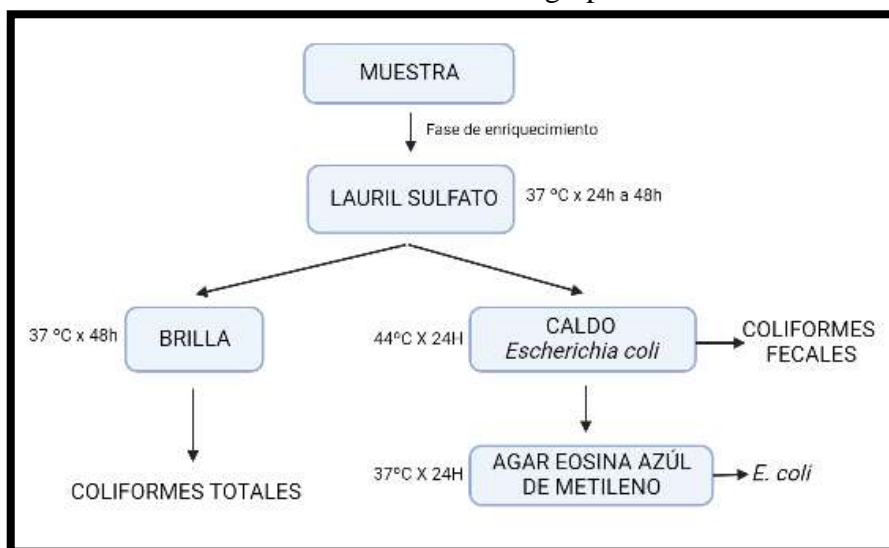
Anexo 34. Dilución de muestras de agua en proporción 1/9



De la muestra madre colectada se diluye en agua destilada

Fuente: Elaboración propia

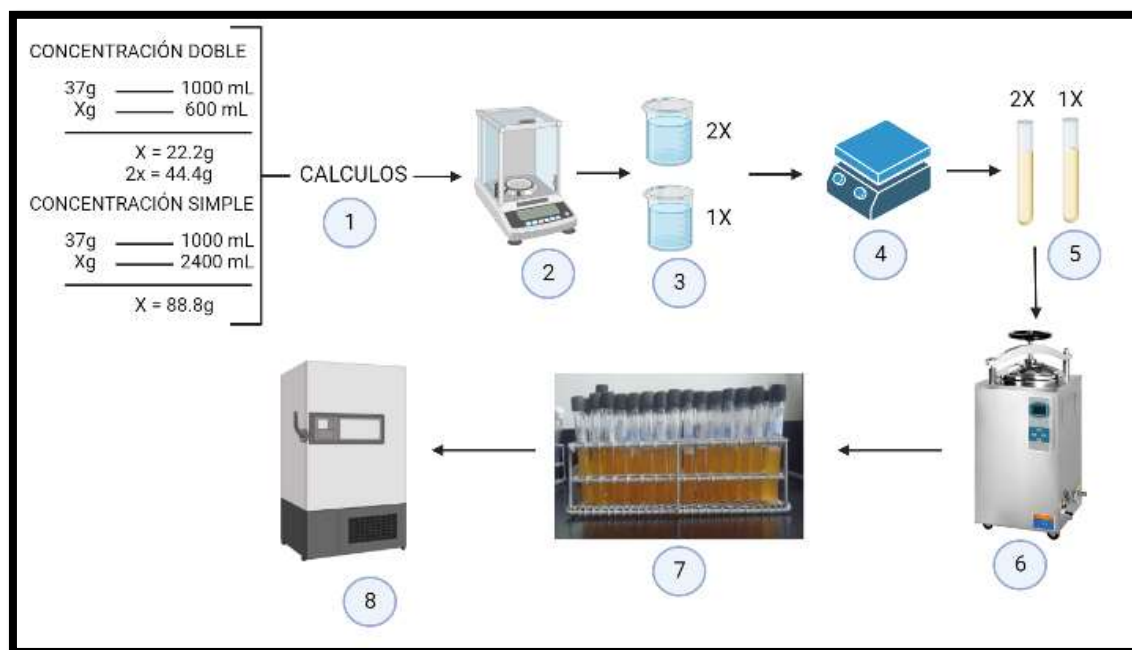
Anexo 35. NMP convencional grupo Coliformes



Proceso para detectar *E. coli*

Fuente: Laboratorio de Aguas y Suelos – UNTRM

Anexo 36. preparación de L.S



1= Se realizan los cálculos en concentraciones simples (1x) y dobles (2x)

2= se pesa el L.S.

3= se diluye en dos vasos precipitados de acuerdo a las concentraciones

4= se homogeniza la solución en un agitador magnético con calefacción

5=se vierte la solución en tubos de ensayo limpios y secos, se coloca a cada tubo una campana Durhan

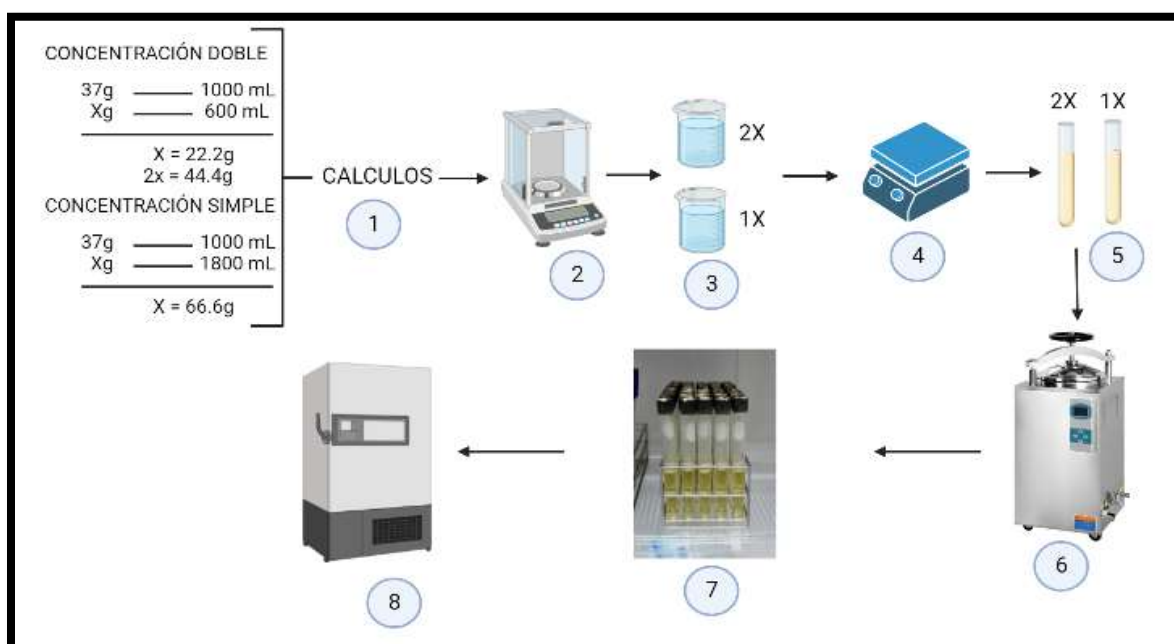
6= se autoclava el material

7=luego se deja enfriar

8=se conserva a 4°C

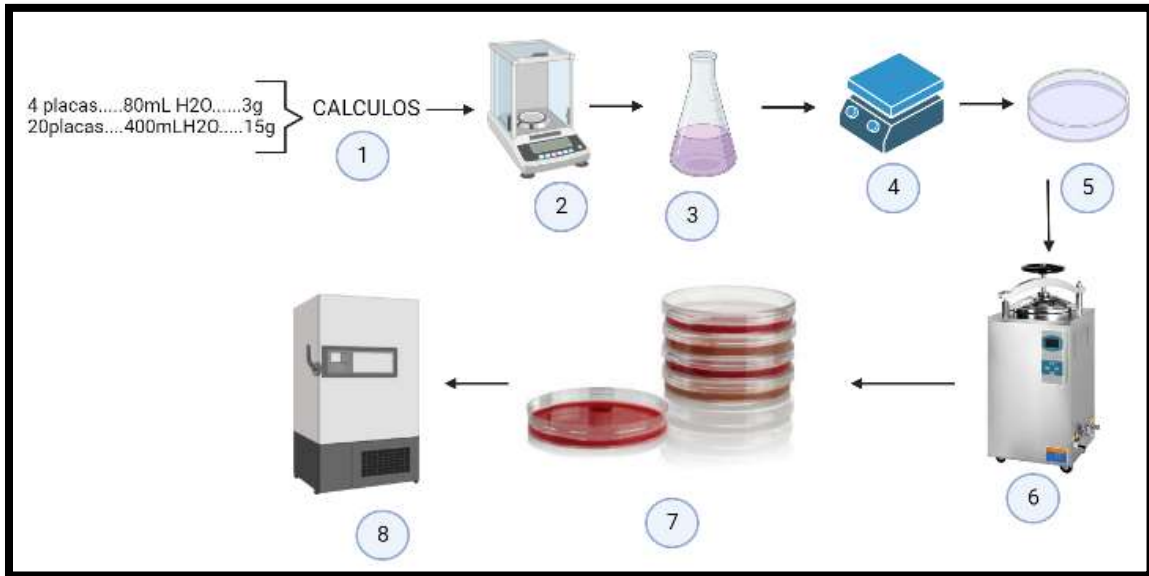
Fuente: Elaboración propia

Anexo 37.Preparación de caldo E.C.



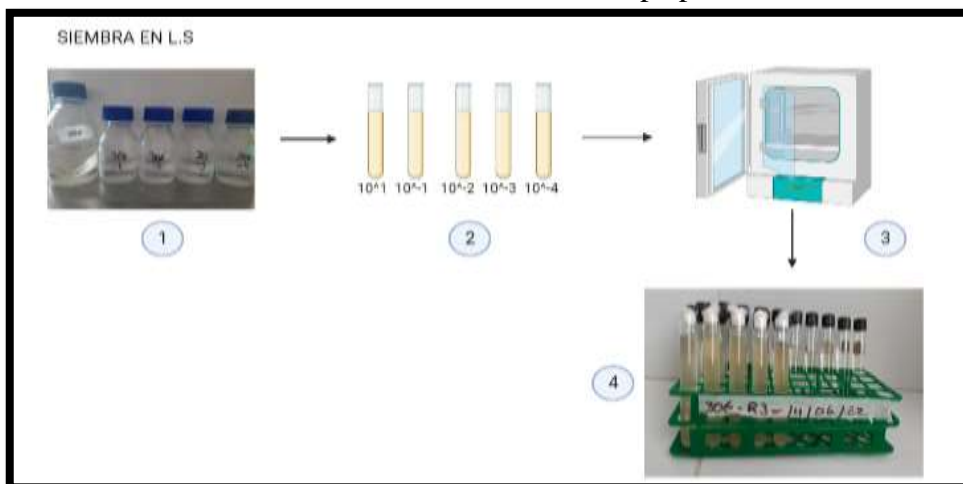
- 1= Se realizan los cálculos en concentraciones simples (1x) y dobles (2x)
 - 2= se pesa el E.C.
 - 3= se diluye en dos vasos precipitados de acuerdo a las concentraciones
 - 4= se homogeniza la solución en un agitador magnético con calefacción
 - 5=se vierte la solución en tubos de ensayo limpios y secos, se coloca a cada tubo una campana Durhan
 - 6= se autoclava el material
 - 7=luego se deja enfriar
 - 8=se conserva a 4°C
- Fuente:** Elaboración propia

Anexo 38.Preparación de Agar E.M.B.



- 1= Se realizan los cálculos para 20 placas
 - 2=Se pesa el agar
 - 3= Se diluye en agua destilada
 - 4=Se homogeniza en placa calentadora
 - 5=Se vierte en placas limpias 20mL
 - 6=Se autoclava el material
 - 7 y 8 =se deja solidificar se conserva a 4°C
- Fuente:** Elaboración propia

Anexo 39.NMP convencional - Etapa presuntiva



1= Diluciones de puntos de muestreo

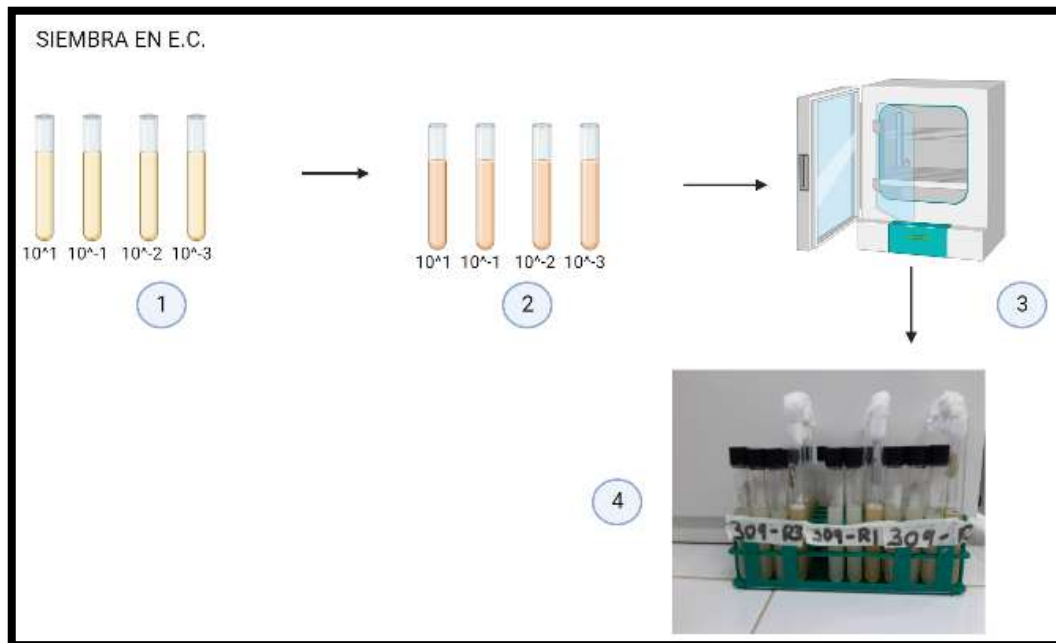
2=se inocula 1 mL de la muestra madre en el tubo con concentración 2x y 1 mL de las diluciones en tubos con 1x de concentración

3=Se incuba a 37°C por 48h

4=Lectura de resultados

Fuente: Elaboración propia

Anexo 40.NMP convencional - Etapa Confirmativa – E.C



1= Tubos positivos de L.S.

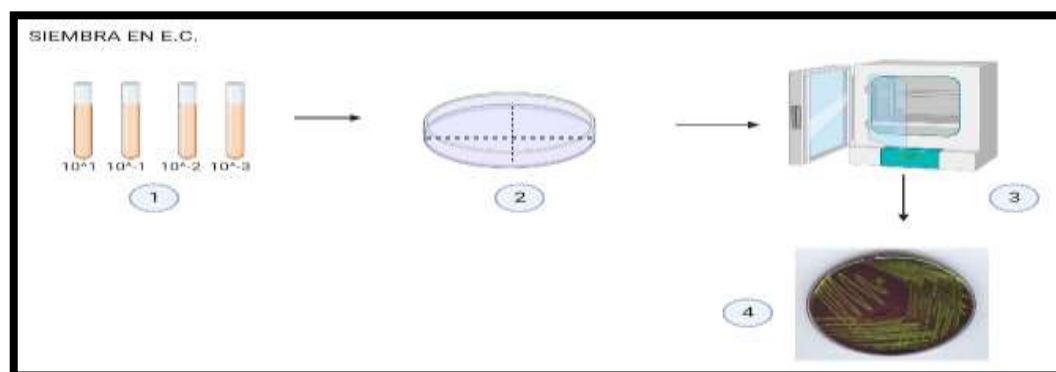
2=inoculación de 100 uL de los tubos

3=Se incuba a 44°C x 24h

4=Lectura de Resultados

Fuente: Elaboración propia

Anexo 41.NMP convencional - Etapa Confirmativa – EMB



1=Tubos positivos de E.C

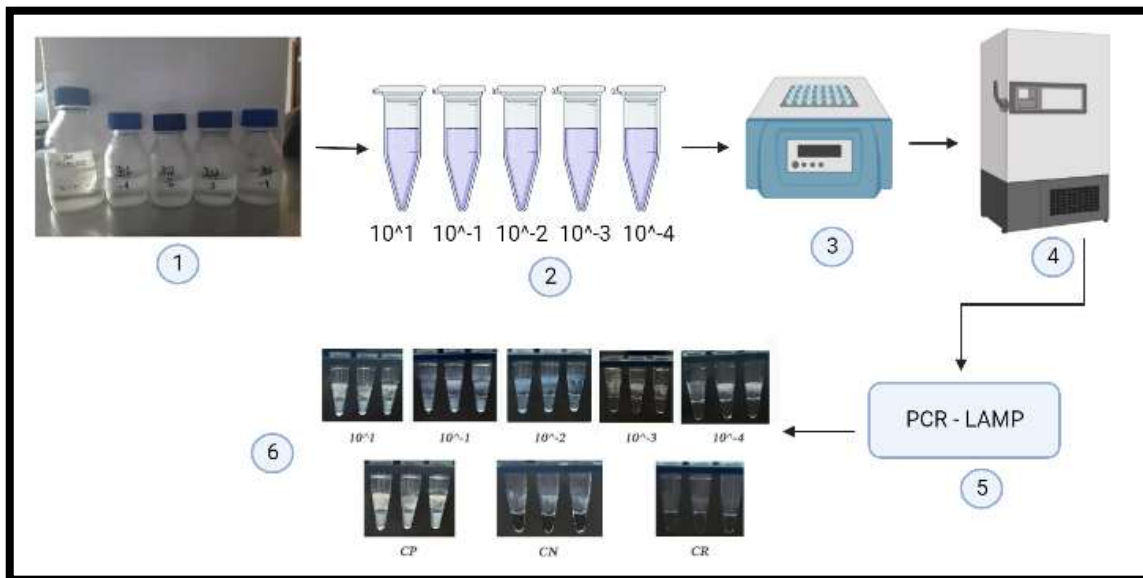
2=Se divide en regiones las placas y se siembra con una aza bacteriológica por estrias

3=Se incuba a 37°C x 24h

4=Se realiza las lecturas

Fuente: Elaboración propia

Anexo 42.PCR - LAMP con muestras de agua



1=Diluciones de muestreo de campo

2=se extrae de las diluciones 1 mL de la solución madre y las diluciones

3=Se lleva a hervor para la extracción de ADN a 94°C x 10 min

4=Se conserva a 4°C

5=Se realiza la PCR - LAMP

6=Visualización de resultados

Fuente: Elaboración propia

Anexo 43. Protocolo PCR - LAMP para muestras de agua - LacZ



PCR - LAMP	
BACTERIA: COLIFORMES TOTALES (<i>Escherichia coli</i>)	FECHA: 12/05/2022
BUFFER: NEW ENGLAND BIOLABS	

PRIMERS: INVITROGEN

PRIMER	SECUENCIA (5'TO 3')
ColLacZF3	ACC ATC GTC TGC TCA TCC A
ColLacZB3	TTA AAC TGC ACA CCG CCG
ColLacZFIP	CAA GCC GTT GCT GAT TCG CGT TTT TGA CCT GAC CAT GCA GAG G
ColLacZBIP	CCG TTC AGC AGC AGC AGA CCT TTT ACG CTG ATT GAA GCA GAA GC

PROTOCOLO:

REACTIVO	C1	V1	C2
BUFFER NB	10X	2.5 uL	1x
MgsSO4	100mM	2uL	8mM
DNTPs	25mM	1.4uL	1.4mM
FIB	10uM	4uL	1.6mM
BIP	10uM	4uL	1.6mM
F3	10uM	0.5uL	0.2 mM
B3	10uM	0.5uL	0.2 mM
BST 3.0	8 U/uL	1uL	8 U/uL
H2O BM	-	0.1uL	-
TEMPLADO	-	10uL	-
VF = 25uL			

TEMPERATURA:

56 °C X 60 min

COVER:

100°C

TERMOCICLADOR UTILIZADO: APPLIED

Biosystems™ SimpliAmp™

Anexo 44. Protocolo PCR - LAMP para muestras de agua - Ecuid



PCR - LAMP	
BACTERIA: <i>Escherichia coli</i>	FECHA: 12/05/2022
BUFFER: NAMRU	

PRIMERS: INVITROGEN

PRIMER	SECUENCIA (5'TO 3')
EcuidFIP	TAA CGC GCT TTC CCA CCA ACG GCC TGT GGG CAT TCA GTC
EcuidBIP	TAA CGA TCA GTT CGC CGA TGC ACT GCC CAA CCT TTC GGT AT
EcuidF3	CKG TAG AAA CCC CAA CCC G
EcuidB3	AWA CGC AGC ACG ATA CGC
EcuidLoopF	TCC ACA GTT TTC GCG ATC CA
EcuidLoopB	ACG TCT GGT ATC AGC GCG AAG T

PROTOCOLO:

REACTIVO	C1	V1	C2
4X	-	5uL	1x
FIB	25 uM	1.92uL	2.4 uM
BIP	25uM	1.92uL	2.4uM
F3	25uM	0.16uL	0.2uM
B3	25uM	0.16uL	0.2uM
LF	25uM	0.64uL	0.8uM
LB	25uM	0.64uL	0.8uM
H2O BM	-	0.44uL	-
BST 3.0	8 U/uL	0.8uL	0.32U/uL
TEMPLADO	-	10uL	-
VF = 20uL			

TEMPERATURA:

63 °C X 30 min

COVER:

100°C

TERMOCICLADOR UTILIZADO: APPLIED

Biosystems™ SimpliAmp™

Anexo 45. Protocolo PCR - LAMP para muestras de agua - Ef23S



PCR - LAMP	
BACTERIA: <i>Enterococcus faecalis</i>	FECHA: 12/05/2022
BUFFER: NAMRU	

PRIMERS: INVITROGEN

PRIMER	SECUENCIA (5'TO 3')
Ef23SFIP	GCA ATC GTA ACT CGC CGG TTC AAA CCG TGT GCC TAC AAC AA
Ef23sBIP	TCG AAG AGA CGG AGC CGC AGT GGT TTC GGG TCT ACG ACT
Ecf23SF3	GAA AAG CAC CCC GGA AGG
Ef23SB3	ACC TGG ACA TGG GTA GAT CA
Ef23SLoopF	CCA TCA CTC ATT AAC GAG CTT TGA C
Ef23SLoopB	CGA GTC TGA ATA GGG CGA ATG AGT A

PROTOCOLO:

REACTIVO	C1	V1	C2
4X	-	5uL	1x
FIB	25 uM	1.92uL	2.4 uM
BIP	25uM	1.92uL	2.4uM
F3	25uM	0.16uL	0.2uM
B3	25uM	0.16uL	0.2uM
LF	25uM	0.64uL	0.8uM
LB	25uM	0.64uL	0.8uM
H2O BM	-	0.44uL	-
BST 3.0	8 U/uL	0.8uL	0.32U/uL
TEMPLADO	-	10uL	-
VF = 20uL			

TEMPERATURA:

63 °C X 60 min

COVER:

100°C

TERMOCICLADOR UTILIZADO: APPLIED

Biosystems™ SimpliAmp™

Anexo 46. Manual Analítico Bacteriológico en su versión hoja de excel

CONCENTRATION

MPN =	2303.234	
LogMPN =	3.362	
95% CONFIDENCE LIMITS		
	LOW	HIGH
MPN =	569.416	9342.393
LogMPN =	2.755	3.970

Original Thomas's Approx = 854.24

Likelihood at MPN = 0.338632

Haldane's Approximation to the Standard Error of Log(MPN): 0.3099

Likelihood of most likely outcome = 4.15E-09

Improbability ratio = 8.16E+07

Note: if Likelihood at MPN = #NUM!, then check inocula, numbers of tubes, and positive tubes for errors.

BEGIN AS FOLLOWS:

To compute an MPN and the 95% confidence limits on the Log of the MPN: Enter the inoculum/tube in column A, for each dilution, replacing the example values from row 3 down, going no farther than row 20. Then enter numbers of tubes per dilution in col. B, and numbers of positive tubes in C. Then type the number that then appears in column J, row 3, into column G, row 2. Hit Enter key. Then hold down Ctrl key and type "m". Now the MPN, etc. will be correct.

For assistance, contact Dr. Blodgett at Division of Mathematics in FDA/CFSAN, 301-438-1836, or email robert.blodgett@cfscn.fda.gov.

Note: always leave blanks in columns A, B, and C except where B is greater than zero. Don't leave inocula amounts in Col. A and put zero in col. B to denote an unused dilution. You'll cause errors, because the "MIN" function ignores blanks instead of treating them as zeroes. Only allow entries in A, B, and C for actual dilutions used in this test.

Anexo 47.Preparación de Caldo HB



Anexo 48. Suspensión bacteriana



Anexo 49. Estándares de MacFarland



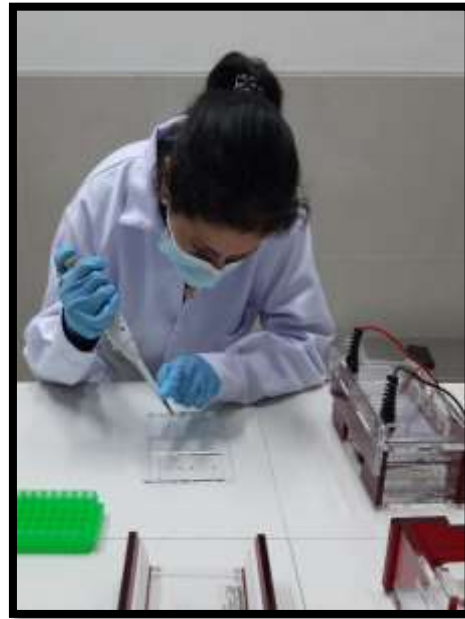
Anexo 50.Extracción de ADN



Anexo 51.PCR – LAMP



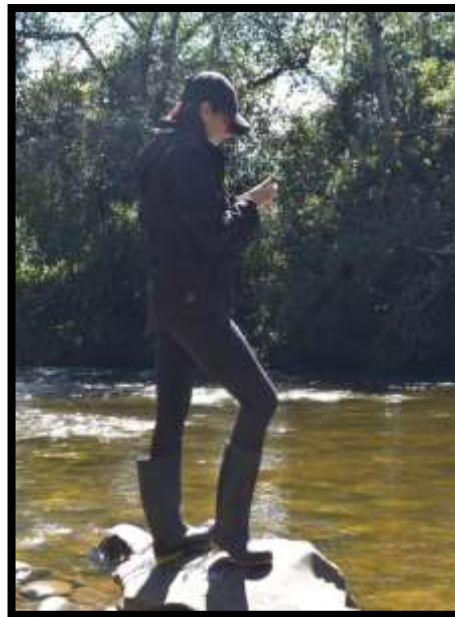
Anexo 52 Electroforesis



Anexo 53.NMP – LAMP



Anexo 54. Georreferenciación



Anexo 55. Muestreo en Campo



Anexo 56. Diluciones de puntos de Muestreo



Anexo 57. NMP - L.S.



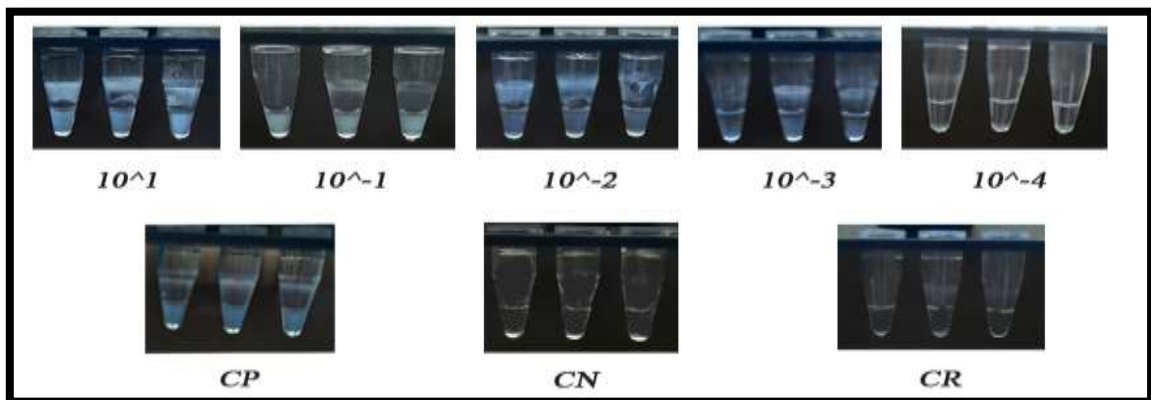
Anexo 58 NMP - E.C.



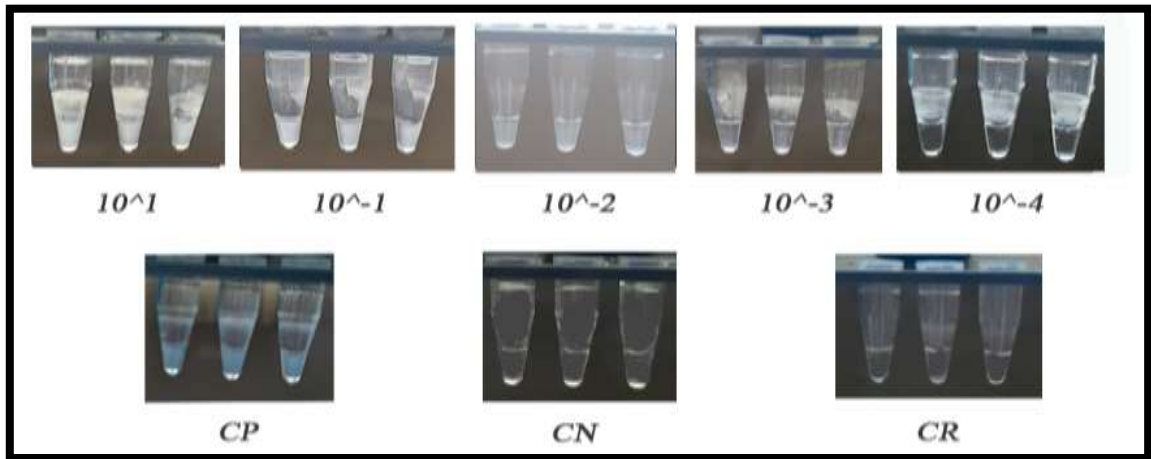
Anexo 59.NMP -EMB



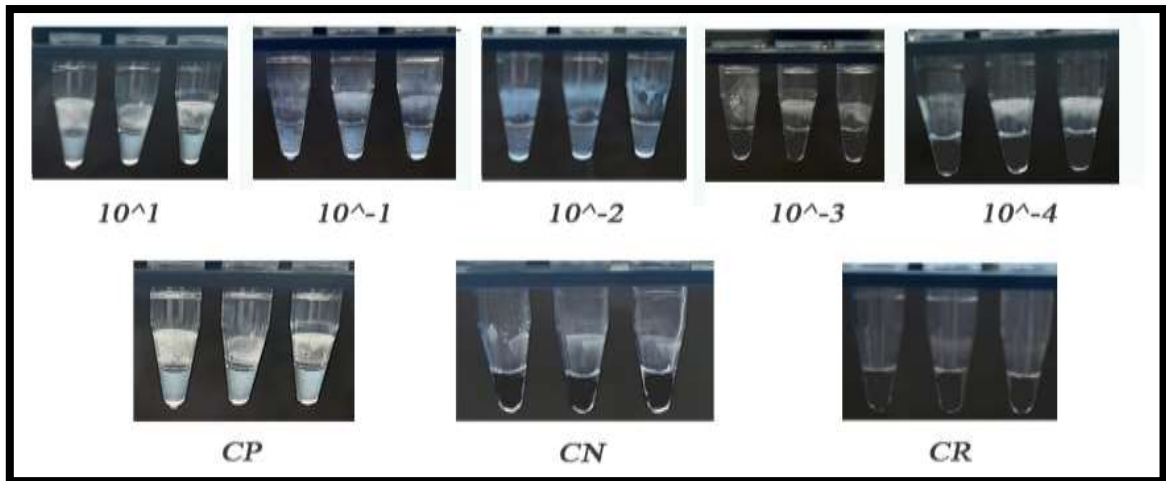
Anexo 60.NMP - LAMP para *E. coli* - Punto 01 Río Ventilla



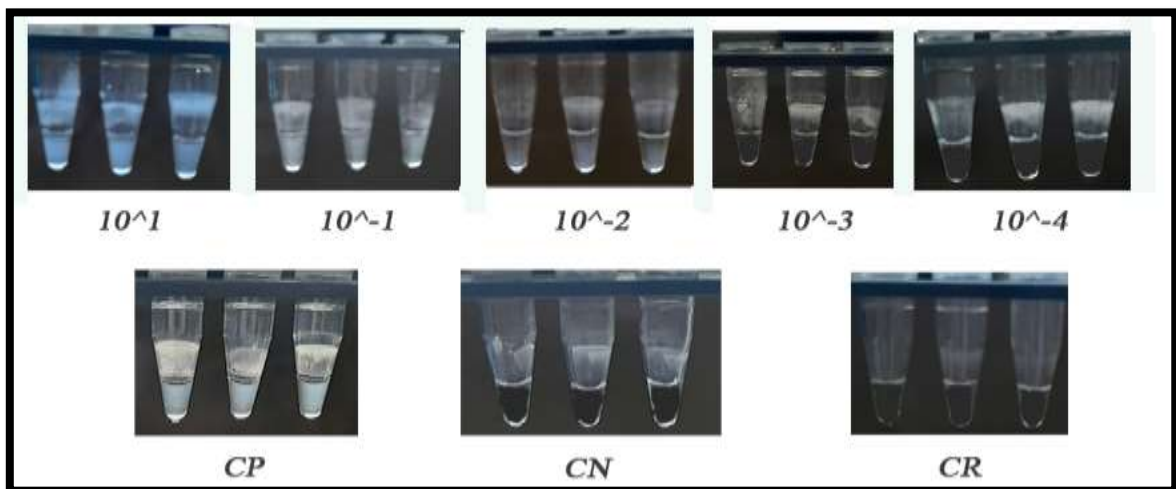
Anexo 61.NMP – LAMP para *E. coli* - Punto 02 - Río Ventilla



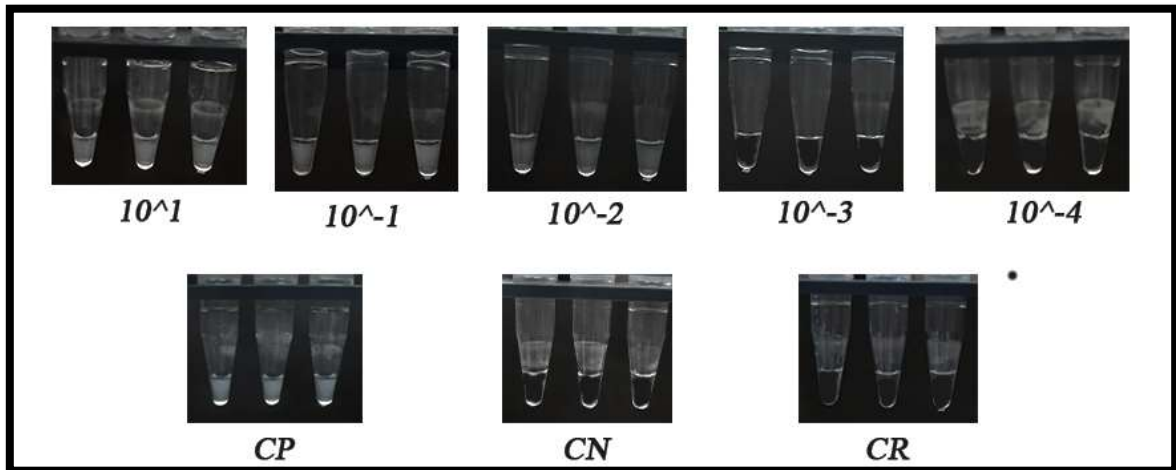
Anexo 62.NMP - LAMP para *E. coli* - Punto 01 - Río Olía



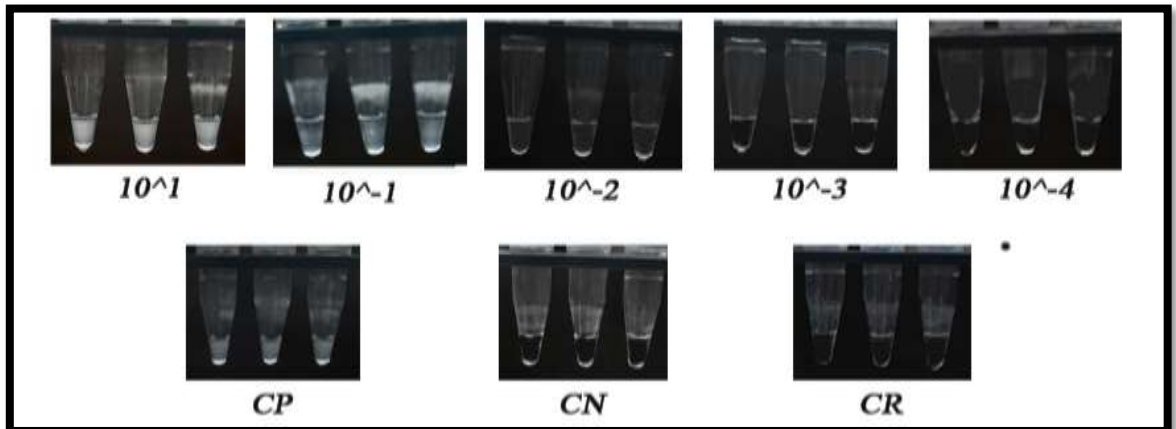
Anexo 63.NMP – LAMP para *E. coli* - Punto 02 - Río Olía



Anexo 64.NMP - LAMP para *E. faecalis* - Río Ventilla



Anexo 65.NMP - LAMP para *E. faecalis* - Río Olía



VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, F. (2017). *Most Probable Number - Loop Mediated Isothermal Amplification (MPN-LAMP) for Quantifying Waterborne Pathogens in Less Than 25 Minutes*.
- Amidoun, S. (2017). *Escherichia coli Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*.
- ANA. (2015). *Calidad de agua en cuencas hidrográficas a nivel nacional*.
- ANA. (2016). *Protocolo nacional para el monitoreo de las calidades de los recursos hídricos superficiales*.
- Aquino, P. (2017). *Calidad del agua en el Perú*.
- Baird, R., Eaton, A., & Rice, E. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23. <https://doi.org/10.2105/SMWW.2882.216>
- Cabezas, C. (2018). Infectious diseases related to water in Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(2), 309–316. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.352.3761>
- Carrión, M. (2020). ¿Cuánta agua hay en el planeta? *El Ágora*.
- Corroto, F., Gamarra, O., & Barboza, E. (2018). Multivariate assessment of water quality in the Utcubamba Basin (Peru). *Tecnología y Ciencias Del Agua*, 9(5), 33–51. <https://doi.org/10.24850/j-tyca-2018-05-02>
- Fu, J., Chiang, E. L. C., Medriano, C. A. D., Li, L., & Bae, S. (2021). Rapid quantification of fecal indicator bacteria in water using the most probable number - loop-mediated isothermal amplification (MPN-LAMP) approach on a polymethyl methacrylate (PMMA) microchip. *Water Research*, 199. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117172>
- Fusco, A., Batista, K., Oliveira, C., & Brito, E. (2010). Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de Escherichia coli diarreogênicas. *Revista Pan-Americana de Saúde*, 1(2). <https://doi.org/10.5123/s2176-62232010000200009>
- Gamarra, O., Barrena, M., Barboza, E., Rascón, J., & Corroto, F. (2018). Fuentes de contaminación estacionales en la cuenca del río Utcubamba, región Amazonas, Perú. *Arnaldoa*, 25(1), 179–194. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.251.25111>
- Girones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Rodríguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Corrêa, A., Hundesa, A., Carratala, A., & Bofill-Mas, S. (2010). Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. In *Water Research* (Vol. 44, Issue 15, pp. 4325–4339). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.030>
- Lee, S., Khoo, V. S. L., Medriano, C. A. D., Lee, T., Park, S. Y., & Bae, S. (2019). Rapid and in-situ detection of fecal indicator bacteria in water using simple DNA extraction and portable loop-mediated isothermal amplification (LAMP)PCR methods. *Water Research*, 160, 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.049>
- Mendes, D., & Domingues, L. (2015). On the track for an efficient detection of Escherichia coli in water: A review on PCR-based methods. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 113, pp. 400–411). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.015>

- MINSA. (2011). *Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano*.
- Molina, F., López-Acedo, E., Tabla, R., Roa, I., Gómez, A., & Rebollo, J. E. (2015). Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR. *BMC Biotechnology*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0168-2>
- Moyano, S., & Marín, G. (2014). Técnica de filtración ISO 9308 aplicada al monitoreo de agua de red. *RADI*, *450*(5900), 53–58.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 28, Issue 12).
- Nurliyana, M. R., Sahdan, M. Z., Wibowo, K. M., Muslihati, A., Saim, H., Ahmad, S. A., Sari, Y., & Mansor, Z. (2018). The Detection Method of *Escherichia coli* in Water Resources: A Review. *Journal of Physics: Conference Series*, *995*(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/995/1/012065>
- OMS. (2017). *Guidelines for drinking water quality*.
- ONU. (2017). *Agua para todos - Agua para la vida*.
- ONU. (2018). *AGUA, SANEAMIENTO E HIGIENE EN LAS ESCUELAS Informe de línea de base mundial 2018*. <https://washdata.org>
- ONU. (2019a). *NO DEJAR A NADIE ATRÁS*. www.unwater.org.
- ONU. (2019b, June 14). *Agua*.
- Prat, N., Rieradevall, M., & Fortuño, P. (2012). *Metodología F.E.M.*
- Price, R., & Wildeboer, D. (2016). *E. coli como indicador de contaminación y riesgo para la salud en aguas ambientales _ IntechOpen*.
- Ríos, S., Agudelo, R., & Gutiérrez, L. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, *35*(2), 236–247. <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08>
- Tongphrom, C., Preeprem, S., Nishibushi, M., Vuddhakul, V., & Mittraparp-Arthorn, P. (2018). Rapid and sensitive enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in water and foods by most-probable-number loop-mediated isothermal amplification (MPN-LAMP) method. *ScienceAsia*, *44*(5), 365–370. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2018.44.365>
- Vliet, M. T. H., Jones, E. R., Flörke, M., Franssen, W. H. P., Hanasaki, N., Wada, Y., & Yearsley, J. R. (2021). Global water scarcity including surface water quality and expansions of clean water technologies. *Environmental Research Letters*, *16*(2). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/abbfc3>
- Zandaryaa, S., & Sagasta, J. (2018). *Organic matter, pathogens and emerging pollutants*.

