



Obras Sanitarias del Estado

MÉTODO DE ENSAYO

DETERMINACIÓN DE
COLIFORMES TOTALES Y *Escherichia coli*
POR ENZIMA – SUSTRATO
(COLILERT® 18- COLILERT®)
PRESENCIA/AUSENCIA

ME.GL.BB.01
Versión Vigente
N° 04
Página 1 de 7

Sistema Integrado de Gestión
de Laboratorios (SIGLA)

1. OBJETIVO / ALCANCE

Determinación simultánea de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de agua tratada y del sistema de distribución mediante el ensayo de enzima-sustrato, empleando la Tecnología de Sustrato Definido (en inglés, DST) y el reactivo COLILERT®-18 o COLILERT® de la firma IDEXX Laboratories Inc.

El presente documento es un procedimiento operativo de ensayo de los Laboratorios del Sistema SIGLA de OSE.

2. REFERENCIAS

- 2.1 Inserto de las cajas de reactivos COLILERT®-18 o COLILERT® con instrucciones de uso del fabricante.
- 2.2 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th Ed. Método 9223B.
- 2.3 Norma EN-ISO9308-2:2014. Calidad del agua. Recuento de *Escherichia coli* y bacterias coliformes. Parte 2: Método del número más probable. Punto 8.2.
- 2.4 Procedimientos técnicos e instructivos de trabajo de cada laboratorio que estén relacionados a las actividades involucradas en la presente metodología.
- 2.5 Procedimientos de gestión de la información y de control de la calidad de los ensayos de cada laboratorio.
- 2.6 Procedimientos de gestión de la Seguridad de cada laboratorio.
- 2.7 Informe de validación N°8 del Área Bacteriología, Laboratorio Central (PG.AC.02). Anexo 3 (FG.AC.02.02) Robustez - Tiempo de Incubación ME.BB.01

3. DEFINICIONES

Aplican las definiciones establecidas en el Documento general DG.CC.01 – Glosario de términos y definiciones.

SIGLA: Sistema integrado de Gestión de Laboratorios

Analista: laboratorista, funcionario del laboratorio o personal tercerizado entrenado, que realiza un análisis o ensayo específico.

Elaborado por:
Leticia Quagliotto

Revisado por:
Rodolfo Graña

Aprobado por:
Rita Caristo

4. RESPONSABILIDADES

La responsabilidad de la ejecución del presente método es de un analista. La responsabilidad de la elaboración y aprobación del informe de resultados es de un técnico. La emisión del informe es responsabilidad del analista técnico o jefe de cada laboratorio, o quien sea designado para ello.

5. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El presente ensayo utiliza sustratos hidrolizables para la detección simultánea de enzimas de bacterias del grupo coliformes totales y *Escherichia coli*.

En esta metodología, el grupo “coliformes totales” es definido como todas las bacterias que poseen la enzima β -D-galactosidasa, la cual hidroliza el sustrato cromogénico liberando el cromógeno. Asimismo, *Escherichia coli* se define como aquella bacteria que posee respuesta positiva como coliforme y, además, posee la enzima β -glucuronidasa, la cual hidroliza el sustrato fluorogénico liberando el fluorógeno.

Los reactivos comerciales COLILERT®-18 y COLILERT® de la firma IDEXX Laboratories Inc., utilizan la Tecnología de Sustrato Definido (DST®) para realizar la detección simultánea de bacterias del grupo coliformes totales y *E. coli*.

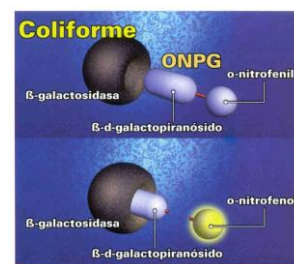
Dichos reactivos contienen dos nutrientes indicadores:

- un sustrato cromogénico: el *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG)
- un sustrato fluorogénico: el 4-metil-umbeliferil- β -D-glucurónido (MUG)

El ONPG es metabolizado por la enzima β -galactosidasa, específica de coliformes totales y el MUG por la enzima β -glucuronidasa, específica de la bacteria *E. coli*.

A medida que los coliformes utilizan la β -galactosidasa para metabolizar el ONPG se produce un cambio de color (de incoloro a amarillo) por el desprendimiento del cromógeno *o*-nitrofenol, al ser incubados a $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ durante (18 - 22) h con COLILERT®-18 o durante (24 – 28) h con COLILERT®.

El tiempo de incubación óptimo para nuestro procedimiento para



Sistema Integrado de Gestión
de Laboratorios (SIGLA)

COLILERT®-18 ha sido evaluado como óptimo entre 20 h y no más de 22 h de incubación.

La aparición de color amarillo indica resultado positivo para coliformes totales, sin necesidad de confirmación.

La β -glucuronidasa es utilizada por *E. coli* para metabolizar el MUG, produciendo fluorescencia por el desprendimiento del fluorógeno 4-metil-umbeliferona, al incubarse a $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$. El producto fluorescente liberado es detectado por exposición a luz ultravioleta (UV) de longitud de onda larga (365 nm). La aparición de fluorescencia indica resultado positivo para *Escherichia coli*, sin necesidad de confirmación.



La matriz formulada específicamente suprime el crecimiento de otros microorganismos no coliformes, tales como especies de *Aeromonas* y *Pseudomonas*, cuando están presentes en cantidades de hasta 10^6 UFC/100mL. y 2×10^6 ufc de heterótrofos/100 mL.

6. CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD

En la realización de la presente metodología se debe utilizar: túnica, gafas de seguridad, zapatos de seguridad para laboratorio o equivalentes, cabello recogido, guantes (bajo luz UV), y aplicar los lineamientos especificados en los procedimientos de seguridad de cada laboratorio, así como los indicados en el inserto de los reactivos. Es necesario lavar bien las manos luego de finalizar la tarea.

Los materiales se deben descartar según los procedimientos correspondientes de cada laboratorio.

7. INTERFERENCIAS

- Una cantidad de cloro libre residual en exceso presente en la muestra puede producir un destello azul al momento de colocar el reactivo. Si esto sucede se debe discontinuar el análisis.



- Si el color aparente de la muestra es mayor al del comparador al momento de la siembra, se deberá tener presente a la hora de analizar el resultado. Se recomienda tomar una foto a tiempo cero de incubación, para luego contrastarlo con el resultado obtenido a la hora de la lectura.

8. CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras deben ser procesadas en un máximo de 30 horas a partir de su extracción. Una vez llegadas al Laboratorio, si no se analizan en forma inmediata, las muestras deben conservarse refrigeradas a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

Es muy importante tener en cuenta que no se procesan muestras que hayan sido congeladas previamente, ya que la formación de hielo puede causar la muerte de la mayoría de las células ($> 99\%$).

9. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

9.1 Materiales

- Recipientes adecuados para muestreo bacteriológico de vidrio o plástico transparente e incoloro, de boca ancha, estériles, impermeables, de cierre hermético, no fluorescentes bajo luz UV (365-366nm), conteniendo tiosulfato de sodio en cantidad suficiente como para neutralizar 5 ppm de cloro libre residual, con marca de enrase en 100 mL y capacidad mínima para 120 mL.
- Etiquetas identificatorias conteniendo todos los datos de muestreo requeridos en la especificación correspondiente.
- Formulario de registro técnico - Cadena de custodia.
- Bandas elásticas.
- Pipetas de vidrio graduadas o punteros para pipetas automáticas, de volumen nominal 10 mL, estériles.
- Comparador de color/fluorescencia para P/A, marca IDEXX, vigente.

9.2 Reactivos



- Reactivo COLILERT®-18 o COLILERT® vigente, pre-dispensado en paquetes mono-dosis para 100 mL de muestra.

9.3 Equipos

- Macropipeta automática o pipeteador manual o motorizado.
- Baño de agua a $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ para pre-incubación de muestras cuando se usa COLILERT®-18.
- Cronómetro
- Estufa de incubación de cultivos regulable a $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$.
- Cámara oscura con lámpara de luz ultravioleta (UV) de longitud de onda 365-366nm, preferentemente de 6 - 8 W de potencia.

10. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

- 10.1 Agitar la muestra por inversión un mínimo de 10 veces para su homogeneización completa.
- 10.2 Previamente a la realización del ensayo de coliformes se deben realizar los otros análisis bacteriológicos requeridos para la muestra. Por ejemplo, el recuento de heterótrofos y/o la presencia/ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*, en ese orden.
- 10.3 Posteriormente, y cuando corresponda, extraer el líquido remanente utilizando una pipeta o puntero estéril, hasta enrasar en la marca de 100 mL.
- 10.4 Agregar cuidadosamente, en forma aséptica, el contenido de un sachet de reactivo debidamente preservado, o previamente desinfectado con etanol 70%.
- 10.5 Cerrar el envase de muestra y segregar unos minutos sin agitar, para la hidratación del reactivo.
- 10.6 Una vez procesadas las muestras de la tanda, agitar (sin invertir) los envases para la disolución del reactivo. Si se utiliza reactivo COLILERT® para el ensayo pasar al punto 10.8 del presente documento.
- 10.7 En caso de estar utilizando reactivo **COLILERT®-18** para el análisis se debe **termostatizar** las muestras en baño de agua a $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. Una vez transcurrido el período de termostatización retirar las muestras del baño y secarlas.



10.8 Ingresar las muestras a la estufa e incubar a $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$. En caso de uso de **COLILERT®-18** la lectura de todos los resultados (positivos y negativos) se realiza a partir de 20 h y no más de 22 h de incubación. En caso de uso de **COLILERT®** la lectura de todos los resultados se realiza a partir de 24 h y no más de 28 h de incubación.

10.9 Luego del período establecido, se procede a la lectura de resultados, tal como lo establece el fabricante del reactivo (ver inserto). En caso que el resultado de la muestra genere dudas, se debe contrastar con el comparador correspondiente.

- Resultados de **coliformes totales**: un color amarillo de igual o mayor intensidad que el comparador se informa como PRESENCIA de coliformes totales en 100 mL. En caso contrario, se registra como AUSENCIA en 100 mL.
- Resultados de ***Escherichia coli***: una fluorescencia de igual o mayor intensidad que el comparador **en una muestra con PRESENCIA de coliformes** totales (AMARILLA), se informa como PRESENCIA de *E. coli* en 100 mL. En caso contrario, se registra como AUSENCIA en 100 mL.

11. INFORME DE RESULTADOS / REGISTROS

El informe de resultados se realiza según lo establecido en el Procedimiento de Gestión de la Información de cada Laboratorio.

Datos que deben registrarse en el proceso del análisis:

- Número (u otra identificación inequívoca) de cada muestra
- Fecha y hora del análisis
- Lote del reactivo empleado
- Lote de pipetas o punteros utilizados
- Analista que lleva a cabo la siembra del ensayo
- Identificación de la estufa en la cual se lleva a cabo la incubación
- Fecha y hora de ingreso y de salida de la estufa de incubación
- Analista que lleva a cabo la lectura de resultados del ensayo
- Resultados obtenidos en la lectura
- Cualquier observación que se realice en cualquier etapa del proceso



Obras Sanitarias del Estado

MÉTODO DE ENSAYO

DETERMINACIÓN DE
COLIFORMES TOTALES Y *Escherichia coli*
POR ENZIMA – SUSTRATO
(COLILERT® 18 - COLILERT®)
PRESENCIA/AUSENCIA

ME.GL.BB.01
Versión Vigente
N° 04
Página 7 de 7

Sistema Integrado de Gestión
de Laboratorios (SIGLA)

12. CONTROL DE CALIDAD / ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

12.1 Control de calidad de implementos y reactivos

Los materiales estériles utilizados en el presente método de ensayo que sean preparados en el laboratorio se deben controlar y aprobar según los procedimientos correspondientes.

Los reactivos comerciales COLILERT-18® y COLILERT® se controlan mediante una serie de ensayos y son aceptados como conformes por el Laboratorio Central, según los criterios establecidos en las especificaciones para cada producto (ver inserto correspondiente).

12.2 Control diario

Cada día de siembra se debe analizar un BLANCO en paralelo con una tanda de muestras. Para ello, se coloca 100 mL de agua destilada estéril en un recipiente de iguales características que los utilizados para la extracción de muestras bacteriológicas y se adiciona el contenido de un sachet del reactivo que corresponda. Esta muestra debe ser sometida al mismo tratamiento y condiciones de siembra e incubación que las muestras problema. Todos los datos requeridos del análisis de este BLANCO deben registrarse como uno más de los del día.

12.3 Control de lámpara UV

Al momento de realizar la lectura de resultado de *E. coli* bajo lámpara UV, se debe corroborar que la misma esté funcionando correctamente y detectando el mínimo de fluorescencia posible. Para ello, se utiliza el comparador de color/fluorescencia correspondiente que debe estar vigente.

13. NATURALEZA DE LA REVISIÓN

Se reintrodujo la posibilidad del uso alternativo del reactivo Colilert®.

Se realizó una revisión general del documento.

14. ANEXOS

No aplica