



Obras Sanitarias del Estado

## MÉTODO DE ENSAYO

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

ME.GL.BB.01

Versión Vigente

N° 01

Página 1 de 8

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 la red de distribución mediante el ensayo de enzima-sustrato, empleando la Tecnología de Sustrato Definido (en inglés, DST) y el reactivo COLILERT®-18 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 UNE-EN ISO 9308-2: 2012, Recuento de *Escherichia coli* y bacterias coliformes Parte 2: Método de número más probable.
- 2.2 Inserto de las cajas de Colilert-18, 06-02027-22
- 2.3 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22<sup>th</sup> Ed.- Método 9223B.
- 2.4 Documento general DG.CC.xx.01 – Glosario de términos y definiciones.
- 2.5 Procedimiento Técnico PT.BB.02 - Lavado, Acondicionamiento y Descarte de Material.
- 2.6 ITM.BB.13.03 Lavado y esterilización de material para bacteriología en Laboratorio UUM.
- 2.7 Procedimiento Técnico PT.BB.03- Actividades Generales del Área Bacteriología.
- 2.8 Procedimiento Técnico PT.LM.07 – Extracción de muestras de grifo para control operacional.
- 2.9 Procedimientos de gestión de la información de cada laboratorio. PG.IF.XX, Procedimiento PG.GL.AE.03 Control de Calidad de los ensayos.
- 2.10 Procedimientos de gestión de la Seguridad de cada laboratorio. PG.SE.XX, siendo XX= 03 para laboratorio de Aguas Corrientes y 02 para Laboratorio Central “Dr. Francisco Alciaturi”.

Elaborado por:  
Subgrupo 2 del proyecto  
SIGLA

Revisado por:  
Rodolfo Graña

Aprobado por:  
Rita Caristo

### 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:** funcionario del laboratorio que realiza un análisis o ensayo específico.

**Sistema de red de distribución:**

### 4. RESPONSABILIDADES

La responsabilidad de la ejecución del presente método es de los analistas. La responsabilidad de la elaboración del informe se menciona en el punto 11 del presente documento.

### 5. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

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

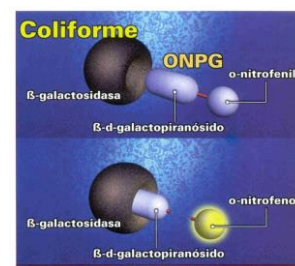
En esta metodología, el grupo “coliformes totales” se define como todas las bacterias que poseen la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, la cual hidroliza el sustrato cromogénico, liberando el cromógeno. Asimismo, *Escherichia coli* se define como aquella bacteria que posee respuesta positiva como coliforme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

El reactivo comercial COLILERT®-18 de la firma IDEXX Laboratories Inc., utiliza la Tecnología de Sustrato Definido (DST®) para realizar la detección simultánea de bacterias del grupo coliformes totales y *E. coli*.

El reactivo COLILERT®-18 consta de dos nutrientes indicadores:

- un sustrato cromogénico: el o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG)
- un sustrato fluorogénico: el 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucurónido (MUG)

El ONPG es metabolizado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa, específica de coliformes totales y el MUG por la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, específica de la bacteria





*E. coli*. A medida que los coliformes utilizan la  $\beta$ -galactosidasa para metabolizar el ONPG del COLILERT®-18 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. La aparición de color amarillo indica resultado positivo para coliformes totales, sin necesidad de confirmación.

La  $\beta$ -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 hasta aprox.  $10^6$  UFC/100mL.

## 6. CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD

Utilizar túnica, gafas de seguridad, zapatos de seguridad para laboratorio o equivalentes, cabello recogido, guantes por si es necesario manipular muestras bajo luz UV y demás lineamientos generales del procedimiento PG.SE.XX – “Gestión de la seguridad en el Laboratorio”, correspondiendo las XX a los números de código de documento según el Laboratorio al que aplique.

Los materiales se descartan según Procedimiento Técnico “Lavado, Acondicionamiento y Descarte de Material”, correspondiendo el código de documento según el Laboratorio al que aplique.

Se debe lavar bien las manos luego de trabajar con el reactivo.

## 7. INTERFERENCIAS

Valores de cloro libre residual en exceso en las muestras podrían hacer que aparezca un destello azul al colocarle el reactivo. <sup>(2.2)</sup>



Sistema Integrado de Gestión  
de Laboratorios (SIGLA)

Si la muestra contiene más de  $2 \times 10^6$  ufc de heterótrofos/100 mL el crecimiento de las bacterias coliformes podría verse inhibido. <sup>(2.1)</sup>

Si la muestra contiene más de  $2 \times 10^6$  ufc de *Pseudomonas sp*/100 mL el crecimiento de las mismas podrían no verse suprimido por el inhibidor incluido en la fórmula del reactivo colilert y por lo tanto multiplicarse y fluorescer, pudiendo inducir a tener falsos positivos para *E.coli*, si además la muestra resultara con presencia de coliformes totales. <sup>(2.1)</sup>

Color de la muestra: si el color aparente de la muestra ya es mayor al del comparador al momento de la siembra, tenerlo en cuenta a la hora de analizar el resultado. Se podría llegar a tomar una foto al tiempo cero de incubación para luego contrastarlo al color obtenido a la hora de la lectura.

## 8. CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras deberán ser procesadas en un máximo de 30 horas a partir de su extracción. Una vez llegadas al Laboratorio, si no se procesan en forma inmediata, las muestras deberán conservarse refrigeradas a  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ . <sup>(2.4)</sup>

Es muy importante tener en cuenta que no se pueden procesar 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

- Frascos o bolsas transparentes, estériles, impermeables, no fluorescentes bajo luz UV (365-366nm), con capacidad mínima para 120 mL, con Tiosulfato de Sodio para neutralizar 5ppm de cloro libre residual y con marca a los 100mL o contar con un frasco o bolsa comparador de



volumen a 100mL, el cual debe ser igual al utilizado para colectar la muestra.

- Comparador de color/fluorescencia para P/A, marca IDEXX, vigente.
- Pipetas de vidrio o punteros de 10 mL estériles.

## 9.2 Reactivos

- Reactivo COLILERT®-18 vigentes, pre-dispensado en snaps de uso único para 100 mL de muestra.

## 9.3 Equipos

- 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 6W.<sup>(2.4)</sup>
- Baño de agua a  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  para termostatización <sup>(2.1)</sup>.
- Macropipeta o pipeteador manual o motorizado.
- Cronómetro

# 10. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

## 10.1 Homogeneizar la muestra.

Previamente a la realización del ensayo de coliformes utilizando el reactivo Colilert® 18 se deberá realizar los ensayos que correspondan, por ejemplo, el recuento de heterótrofos y la presencia/ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

## 10.2 En caso que la muestra haya sido extraída en bolsa o frasco con marca de enrase a 100mL, extraer el líquido sobrante utilizando pipeta o tip estéril, hasta enrasar. En caso que la bolsa o frasco no posea marca enrasar el volumen de muestra a 100 mL mediante comparación visual con una bolsa o frasco igual al de la muestra conteniendo 100 mL de agua (comparador de volumen) y descartar el sobrante.



- 10.3 Agregar cuidadosamente, en forma aséptica, el contenido de un snap de reactivo COLILERT®-18 debidamente preservado o previamente desinfectado con etanol 70%, en los 100 mL de muestra.
- 10.4 Tapar el frasco o plegar la bolsa (según corresponda).
- 10.5 Termostatar la muestra en baño de agua a  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  durante 20 minutos.
- 10.6 Una vez cumplido el tiempo de termostatación, retirar la muestra del baño, secarlas e ingresarla a la estufa de incubación a  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ .
- 10.7 Incubar durante 18-22 horas a  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ .
- 10.8 Luego del período de incubación, se procede a la lectura de resultados. En caso de que el color de la muestra sea de color amarillo tenue y genere dudas si se corresponde a presencia o ausencia de coliformes totales, realizar la lectura de los resultados contra el comparador correspondiente. Coloración amarilla igual o más intensa que en el comparador se informa como PRESENCIA de coliformes totales en 100mL. En caso contrario, se registra como AUSENCIA en 100mL.
- 10.9 Las muestras con presencia de **Coliformes Totales** serán colocadas en cámara oscura bajo luz UV, a la distancia de unos 13 cm de la lámpara <sup>(2.2)</sup>, para determinar si se observa fluorescencia. Cualquier detección de fluorescencia se informará PRESENCIA de **E.coli** en 100 mL de la muestra. <sup>(2.1)</sup>

## 11. INFORME DE RESULTADOS / REGISTROS

Datos que deben registrarse en el proceso del análisis:

- Número de muestra u otra identificación inequívoca de la muestra
- Fecha y hora de incubación
- Analista que lleva a cabo la siembra



Obras Sanitarias del Estado

## MÉTODO DE ENSAYO

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

ME.GL.BB.01  
Versión Vigente  
N° 01  
Página 7 de 8

Sistema Integrado de Gestión  
de Laboratorios (SIGLA)

- Lote de reactivo colilert empleado y fecha de vencimiento.
- Tips o pipetas utilizados (lote y/o número de esterilización correspondientes)
- Lote de agua estéril utilizada para el control de esterilidad
- Identificación de la estufa en la cual se lleva a cabo la incubación
- Fecha y hora de lectura
- Resultado de la lectura
- Analista que realiza la lectura

2.11 Realizar el informe según lo establecido en los Procedimientos de Gestión de la Información de cada laboratorio. PG.IF.XX,

## 12. CONTROL DE CALIDAD / ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

### 12.1 Control de calidad de implementos y reactivos a utilizar

Las bolsas y/o frascos utilizados para la colecta de muestras bacteriológicas, así como el reactivo colilert deben ser previamente controlados por una serie de ensayos y aceptados como conforme según criterios descritos en las especificaciones para el producto en cuestión.

### 12.2 Control diario

Al menos una vez al día se debe sembrar un Blanco de siembra. Se coloca 100mL de agua estéril en un frasco o bolsa con iguales características que los utilizados para la extracción de muestras bacteriológicas y se le adiciona el reactivo contenido en un snap de Colilert® 18. El frasco/bolsa se debe someter al mismo tratamiento y a las mismas condiciones de siembra e incubación que las muestras. Los resultados de este control se registran en la planilla de trabajo correspondiente a la tanda de muestras del día.

### 12.3 Control lámpara UV

Al momento de realizar lecturas bajo lámpara UV, corroborar que la misma está funcionando correctamente y está detectando el mínimo de fluorescencia posible.



Obras Sanitarias del Estado

## MÉTODO DE ENSAYO

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

ME.GL.BB.01  
Versión Vigente  
N° 01  
Página 8 de 8

Sistema Integrado de Gestión  
de Laboratorios (SIGLA)

Para ello, utilizamos el comparador de color/fluorescencia también colilert, vigente.

### 13. NATURALEZA DE LA REVISIÓN

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

Se ajustó la temperatura de incubación a lo que indica la norma UNE-EN-ISO 9308-2.

Se agregó el paso de Pre-incubación como se sugiere en la misma norma.

Se redactó el procedimiento para la siembra del control de lote de reactivo, punto 12.1.

Se definió cuáles cepas utilizar para la siembra de los controles, Tabla 1.

Se agregó el control negativo diario del método, punto 12.2

Se agregó el control de la lámpara UV, punto 12.3

### 14. ANEXOS

No aplica

La impresión del presente documento genera una copia no sujeta a actualización