



1. OBJETIVO / ALCANCE

Determinación de *Pseudomonas aeruginosa* mediante el método de Presencia /Ausencia en muestras de agua tratada y de la red del sistema de distribución.

El presente documento es un procedimiento operativo de ensayo de los laboratorios del Sistema SIGLA de Ose.

2. REFERENCIAS

- 2.1 Standard Methods 22nd Edition 2012. Método 9213 F.
- 2.2 Norma UNIT-ISO9001:2000 – Sistemas de Gestión de la Calidad – Requisitos (equivalente a la norma ISO 9001:2000).
- 2.3 Norma UNIT-ISO-IEC 17025:2005 – Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración (equivalente a la norma ISO/IEC 17025:2005).
- 2.4 Norma UNIT-942:2008 Agua potable- Análisis microbiológico- Detección de *Pseudomonas Aeruginosa*- Método de enriquecimiento en medio líquido.
- 2.5 ISO16266 Water quality-Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*- Method by membrane filtration.
- 2.6 Manual de Calidad del Sistema Integrado de Gestión de Laboratorios (SIGLA)
- 2.7 Procedimiento de gestión PG.CC.02 – Control de documentos y formularios de registro.
- 2.8 Procedimiento de gestión PG.CC.03 – Control de registros.
- 2.9 Procedimiento de Gestión- Gestión de la Información PG.IF.01.
- 2.10 Documento general DG.CC.01 – Glosario de términos y definiciones.
- 2.11 Documento general DG.CC.02 – Estructura y jerarquía de la documentación.



2.12 Procedimiento Técnico PT.BB.01- Preparación de medios de cultivo y agua para uso en ensayos y controles.

2.13 Procedimiento Técnico PT.BB.02 - Lavado, Acondicionamiento y Descarte de material.

2.14 Procedimiento Técnico PT.LM.07 – Extracción de muestras de grifo para control operacional.

2.15 Procedimientos de gestión de la información de cada laboratorio. PG.IF.XX,

2.16 Procedimientos de gestión de Aseguramiento de la calidad de cada laboratorio. PG.AE.XX,

2.17 Procedimientos de gestión de la Seguridad de cada laboratorio. PG.SE.XX,

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.

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

5.1 Análisis presuntivo:

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo bacilo gram negativo, oxidasa y catalasa positivo, capaz de crecer y producir pigmentos fluorescentes, solubles en agua



en un medio que contiene asparagina o cetrimide y producir un pigmento azul verdoso (piocianina) característico de la especie, al igual que el aroma frutal.

Es capaz de crecer a 42°C y producir amonio a partir de acetamida, lo que la diferencia de otras *Pseudomonas* productoras de pigmentos fluorescentes.

El método consiste en sembrar e incubar la muestra a 36 °C ± 1 °C durante 48 hs en Caldo Asparagina doble concentración. Este es un medio de enriquecimiento que favorece la producción de los pigmentos fluorescentes característicos de ***Pseudomonas***.

5.2 Análisis confirmatorio:

Para la confirmación del resultado Presencia de ***Pseudomonas sp.*** se puede proceder de varias formas diferentes. Pero en todas ellas involucra la siembra desde el caldo Asparagina con fluorescencia a caldo acetamida, el cuál es muy selectivo, y sólo ***P. aeruginosa*** es capaz de producir amonio a partir de ella, alcalinizando el medio y ocasionando un viraje del naranja al rojo-fucsia. Sin embargo, algunas de las veces el viraje no es muy claro y es por eso que frente a cualquier duda y siguiendo las recomendaciones de la norma UNIT 942:2008, se debe realizar alguna otra prueba bioquímica para confirmar el resultado.

- a) Los tubos positivos deben ser confirmados, sembrando 0.1 mL de caldo asparagina con fluorescencia positiva en caldo acetamida o realizando una siembra en agar inclinado acetamida con un ansa de 10 micro Litros. En ambos casos, los tubos son incubados a 36 °C ± 1°C durante 48 horas. En paralelo, sembrar por estrías en una placa con agar cetrimide e incubarla a 42°C.
- b) Los tubos positivos deben ser confirmados, sembrando 0.1 mL de caldo asparagina con fluorescencia positiva en caldo acetamida o realizando una siembra en agar inclinado acetamida con un ansa de 10 micro Litros, el cual es incubado a



36 °C ± 1°C durante 48 horas. En ambos casos, los tubos son incubados a 36 °C ± 1°C durante 48 horas.

En caso de que el viraje de color del indicador sea dudoso es posible verificar el resultado con crecimiento en TSB a 42°C. Para ello se inocula un tubo con aproximadamente 4mL de caldo TSB con 10micro litros del caldo acetamida dudoso, con ansa calibrada, o biomasa si se partiera del medio agar acetamida. Se incuba a 42°C durante 48 horas.

Llevar a cabo la confirmación según la opción “a”, disminuye el tiempo de confirmación y de emisión de resultados. Sin embargo, se puede optar por la opción “b” según la logística de cada laboratorio (equipamiento, reactivos, etc).

6. CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD

Utilizar túnica, lentes o gafas de seguridad, zapatos de seguridad para laboratorio o equivalentes, cabello recogido y guantes de látex si es necesario para manipular la muestra bajo radiación UV.

Los materiales se descartan según procedimiento técnico PT.BB.02

7. INTERFERENCIAS

Tubos mal lavados podrían presentar interferencias de fluorescencia.

8. CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras deberán ser procesadas rápidamente después de la recolección para minimizar los cambios en la población bacteriana. El máximo período de tiempo



recomendado entre la extracción de la muestra y el análisis es de 48 horas, manteniéndose las mismas refrigeradas a 5 ± 3 °C.

9. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Material

Pipetas de 10 mL o Macropipeta con tips de 10mL

Pipetas de 1mL o Micropipetas con tips de 1mL

Pipeteador automático

Ansas calibradas 10 µl

Gradilla para tubos

Medios de Cultivo

Caldo Asparagina doble concentración

Caldo acetamida

TSB o Agar Cetrimide

Agua destilada estéril para control

Equipos

Estufa de incubación bacteriológica $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$

Baño de incubación o estufa de incubación a $42.0 \pm 0.5\text{ °C}$

Caja de paredes negras con Lámpara UV de 365-366 nm, preferentemente de 6W.

10. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

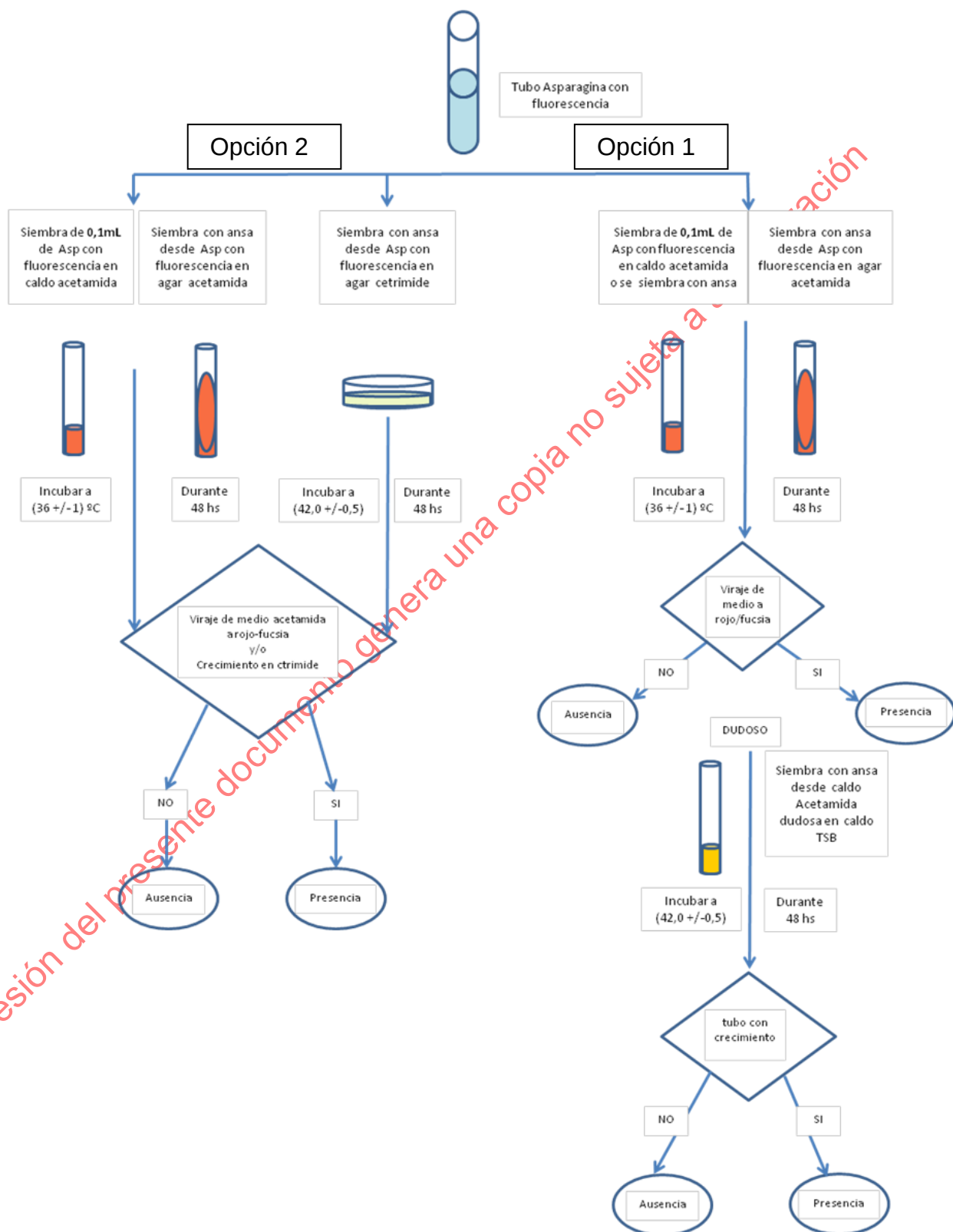
10.1 Siembra, incubación y lectura de *Pseudomonas sp.*

10.1.1 Rotule los tubos de asparagina doble concentración con el número de muestra.

10.1.2 Agite la muestra para homogeneizarla invirtiendo el envase al menos 10 veces.
Abrir asépticamente.



- 10.1.3 Tome 10 mL de muestra con una pipeta estéril o con un tip estéril y siémbrelos en el tubo correspondiente de asparagina doble concentración en forma aséptica.
- 10.1.4 Descarte la pipeta o tip. Cierre la bolsa o frasco que contiene la muestra
- 10.1.5 Repita los pasos del 1 al 4 para cada muestra.
- 10.1.6 Incube la/las muestras a 36 ± 1 °C durante $48 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.
- 10.1.7 Transcurrido el tiempo de incubación, retire de la estufa los tubos correspondientes.
- 10.1.8 Observe todos los tubos tomando como presuntivo positivo la presencia de fluorescencia azul-verdosa cuando se expone el tubo a la luz UV a 365 nm.
- 10.1.9 Registre en la planilla de trabajo el resultado presuntivo como presencia (**P**) de *Pseudomonas* o ausencia (**A**), según corresponda. En caso de que sea ausencia también se debe registrar una A en el casillero correspondiente a *Pseudomonas aeruginosa* de la planilla de trabajo.
- 10.1.10 Descarte los tubos negativos según PT.BB.02
- 10.1.11 Los tubos presuntivos positivos para *Pseudomonas aeruginosa* se colocan en una gradilla para su posterior confirmación.





10.2 Confirmación de *Pseudomonas aeruginosa*

10.2.1 Rotule los tubos de acetamida con la misma identificación que los tubos presuntivos.

10.2.2 Agite el tubo presuntivo para homogeneizar el cultivo

10.2.3 Tome 0.1 mL con pipeta o tips estéril de los tubos con fluorescencia, y colóquelo en forma aséptica, en medio acetamida.

10.2.4 Descarte los tubos de asparagina doble concentración según PT.BB.02

10.2.5 Incube la acetamida a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ de $48 \pm 3\text{ h}$,

10.2.6 Se considera positivo para *Pseudomonas aeruginosa* el viraje de la acetamida de anaranjado a púrpura/fucsia. Luego de las 24 hs si el viraje ya existe se puede informar un resultado positivo.

10.3 Reacciones complementarias

10.3.1 OPCION 1

10.3.1.1 En caso de que el viraje de color del indicador sea dudoso es posible verificar el resultado con crecimiento en TSB a 42°C . Realice el repique del tubo de Acetamida con ansa (10 μL) estéril a un tubo de caldo TSB. Incube a $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, de 16 a 48 horas. Si luego de las 48 horas de incubación no existe crecimiento se informa ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Si el caldo TSB presenta crecimiento se informa presencia. En caso de realizar el repique en TSB regístrelo en la planilla de trabajo.

10.3.1.2 Confirmada la presencia o ausencia se reporta como Presencia o Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el volumen



sembrado (10 mL). Registre el resultado en la planilla de trabajo FTP.BB.03.05 como A (ausencia) o P (presencia)

- 10.3.1.3 Descartar los tubos de acetamida según PT.BB.02.
- 10.3.1.4 Rotule los tubos de acetamida y las placas con cetrimide con la misma identificación que los tubos presuntivos.
- 10.3.1.5 Agite el tubo presuntivo para homogeneizar el cultivo.
- 10.3.1.6 Tome 0.1 mL con pipeta o tips estéril de los tubos con fluorescencia, y colóquelo en forma aséptica, en medio acetamida.
- 10.3.1.7 Tome un inóculo desde el tubo Asparagina con un ansa y estríe una placa con medio cetrimide.
- 10.3.1.8 Descarte los tubos de asparagina doble concentración según PT.BB.02

10.3.2 OPCION 2

- 10.3.2.1 Incube la acetamida a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 48 ± 3 hs y la placa de cetrimide a $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 hs. Se considera positivo para ***Pseudomonas aeruginosa*** el viraje de la acetamida de anaranjado a púrpura/fucsia. Luego de las 24 hs si el viraje ya existe se puede informar un resultado positivo.
- 10.3.2.2 En caso de que el viraje de color del indicador sea dudoso es posible verificar el resultado con crecimiento en cetrimide a 42°C , el cual ya fue incubado en paralelo. Si luego de las 48 horas de incubación no existe crecimiento se informa ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***. Si la placa cetrimide presenta crecimiento (sin importar forma o pigmentación de colonia), se informa presencia.



- 10.3.2.3 Confirmada la presencia o ausencia se reporta como Presencia o Ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa*** en el volumen sembrado (10 mL).
- 10.3.2.4 Registre el resultado en la planilla de trabajo como A (ausencia) o P (presencia)
- 10.3.2.5 Descartar los tubos de acetamida y placa cetrinide según PT.BB.02.

11. INFORME DE RESULTADOS / REGISTROS

Datos que deben registrarse en el proceso del análisis en la planilla de trabajo:

- Número de muestra u otra identificación inequívoca de la muestra
- Fecha/s y hora/s de siembra incubación,
- Analista que lleva a cabo la siembra
- Lote de medios de cultivo 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/s y hora/s de lecturas
- Resultado de la lectura
- Analista que realiza la lectura

Los registros se deben realizar en todo el proceso, tanto para la siembra presuntiva como las de confirmación.

El resultado se informa como presencia o ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa*** en 10 mL.

Realizar el informe según lo establecido en los Procedimientos de Gestión de la Información de cada laboratorio. PG.IF.XX, siendo XX= 04 para Laboratorios regionales, 03 para Laboratorio de Aguas Corrientes y ¿? para Laboratorio Central "Dr. Francisco Alciaturi".

12. CONTROL DE CALIDAD / ASEGURAMIENTO DE CALIDAD



Cada lote de medio se controla según el PT.BB.01.

Chequear los tubos bajo lámpara UV antes de ser utilizados para la siembra y segregar los que presenten fluorescencia o aspecto no habitual.

Al menos una vez al día, cuando se siembran las muestras se realiza un blanco control. El resultado se registra en la planilla de trabajo correspondiente.

13. NATURALEZA DE LA REVISIÓN

No aplica por ser primera versión.

14. ANEXOS **No aplica**

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