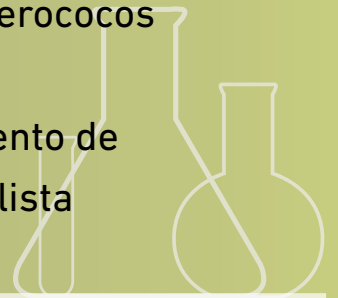


5070UY

Control de calidad analítico para verificar enterococos determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista

Pruebas bioquímicas



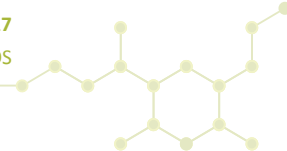
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza en el control de calidad analítico para verificar enterococos determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista. También se aplica para evaluar el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos, debiéndose realizar separadamente para cada tipo de matriz ambiental.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Determinación de enterococos en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales” (5058UY)
- 2.6. Procedimiento de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC 07)
- 2.7. Procedimiento Limpieza de materiales (PR 16)
- 2.8. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE13, INE 86 e INE97)
- 2.9. Instructivos de uso balanza plato abierto (INE 16)
- 2.10. Instructivos de uso cámara de flujo laminar (INE 17)
- 2.11. Instructivo de uso destilador Barnstead (INE 36)
- 2.12. Instructivo de uso desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.13. Instructivo de uso analizador de iones Thermo Scientific Orion VersaStar (INE 98)
- 2.14. Instructivos de uso agitador vórtex (INE 44)
- 2.15. Ruta de análisis (RMB 09)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Se definen como enterococos todos los cocos Gram positivos, entre 0,5 a 1,0 μm de diámetro, catalasa negativa, creciendo en medio Bilis Esculina Agar y BHIB con 6,5 % NaCl a 35 °C, y creciendo en Brain Heart Infusión Agar a 10 °C, y en el medio Brain Heart Infusión Broth a 45 °C.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Los aislamientos y las verificaciones deben ser realizados de preferencia en cámara de flujo laminar utilizando guantes descartables y túnica a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. No aplica.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Incubadora a 35 °C \pm 0,5 °C.
- 7.2. Incubadora a 45 °C \pm 0,5 °C.
- 7.3. Incubadora a 10 °C \pm 0,5 °C.
- 7.4. Mecheros.
- 7.5. Porta y cubre objetos
- 7.6. Ansa de inoculación
- 7.7. Termómetros calibrados para controlar las incubadoras.
- 7.8. Material de vidrio estéril para preparación de los medios de cultivo.

- 7.9. Balanzas de resolución 0,01 g
- 7.10. Placas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro, estériles.
- 7.11. Autoclave
- 7.12. Tubos de ensayo de vidrio estériles con tapa de algodón o de rosca.
- 7.13. Gradilla para tubo de ensayos.
- 7.14. Heladera a 2-8 °C.
- 7.15. Cámara de flujo laminar.
- 7.16. Bomba dosificadora (de preferencia)
- 7.17. Microondas (de preferencia)
- 7.18. Pipetas automáticas de 1000 µL y de rango variable (1-10 mL), con sus respectivos punteros estériles.
- 7.19. Destilador de agua (Barnstead o similar).
- 7.20. Desionizador de agua (Milli-Q o similar).
- 7.21. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)

8. REACTIVOS

- 8.1 Medio de cultivo Brain Heart Infusion Agar (BHIA)
- 8.2 Medio de cultivo Brain Heart Infusion Broth (BHIB)
- 8.3 Medio de cultivo Bilis Esculina Agar (BEA)
- 8.4 Etanol
- 8.5 Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.6 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3 %.
- 8.7 Tinción de Gram: lugol, alcohol cetona, fucsina de Zichl.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material de vidrio que se emplee en los aislamientos y los procedimientos de verificaciones debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y ser estéril.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

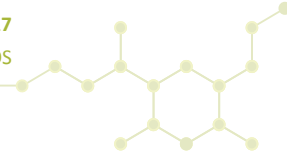
Operaciones previas

Preparación del medio BHIA (agar BHI)

- 11.1. Preparar el medio BHIA como lo indica el envase.
- 11.2. Disolver en microondas, y una vez disuelto autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- 11.3. Una vez estéril, termostatarlo a 45 °C aproximadamente y repartirlo en placas de Petri grandes. Rotular.
- 11.4. Conservar en heladera por un máximo de 14 días.

Preparación del medio BHIB (caldo BHI)

- 11.5. Preparar el medio BHIB como lo indica el envase.
- 11.6. Disolver en microondas, y repartir aproximadamente 3-4 mL en tubos de ensayo de vidrio. Rotular los mismos.
- 11.7. Tapar los tubos con tapa de algodón, colocar en gradilla autoclavable, tapar con papel aluminio y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos
- 11.8. Conservar en heladera por un máximo de 14 días.



Preparación del medio BHIB con 6,5 % de NaCl

11.9. Agregar 60 g NaCl a la formulación de BHIB preparada en el punto anterior.

Preparación del medio Bilis Esculina Agar (BEA)

11.10. Preparar el medio BEA como lo indica el envase.

11.11. Disolver en microondas, y una vez disuelto autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

11.12. Una vez estéril, termostatarlo a 45 °C aproximadamente y repartirlo en placas de Petri grandes. Rotular.

11.13. Conservar en heladera por un máximo de 14 días.

Procedimiento de verificación

11.14. Repicar colonias típicas crecidas en el filtro de nitrocelulosa a placas de Petri con Brain Heart Infusion Agar (BHIA) para obtener colonias aisladas, e incubar a 35 °C ± 0,5 °C por 24 a 48 horas.

11.15. Transferir una ansada de una colonia aislada en Brain Heart Infusion Agar a tubos con Brain Heart Infusion Broth (BHIB) e incubar a 35 °C ± 0,5 °C por 24 horas.

11.16. De la misma colonia preparar un frotis para coloración de Gram y en otro porta objetos esparcir parte de la colonia que se está analizando para realizarle la prueba de catalasa. Dicha prueba consiste en colocar una o dos gotas de peróxido de hidrógeno al 3 % sobre el preparado y observar el desarrollo de burbujas debido al desprendimiento de oxígeno. Si se observan burbujas se lee como catalasa positivo, e indica que la colonia no pertenece al género enterococos. Si la prueba es catalasa negativa, realizar la tinción de Gram. Los enterococos son gram positivos.

11.17. Posteriormente transferir una ansada del tubo con Brain Heart Infusion Broth a cada uno de los siguientes medios:

- una placa con Bilis Esculina Agar e incubar a 35 °C ± 0,5 °C por 48 horas.
- un tubo con BHIB e incubar a 45 °C ± 0,5 °C por 48 horas.
- un tubo con BHIB con 6,5 % NaCl e incubar a 35 °C ± 0,5 °C por 48 horas.
- una placa con agar BHI e incubar a 10 °C ± 0,5 °C por 48 horas.

11.18. Se consideran como colonias verificadas de pertenecer al género enterococos aquellas que son gram positivas, catalasa negativa, y con crecimiento en Bilis Esculina Agar y BHIB con 6,5 % NaCl a 35 °C, así como crecimiento en agar BHI a 10 °C, y en caldo BHI a 45 °C.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Sobre el total de colonias no típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos negativos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.

12.2. Sobre el total de colonias típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos positivos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. No aplica.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 9230 C Membrane filter techniques pp. 9-112 a 9-115.