

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

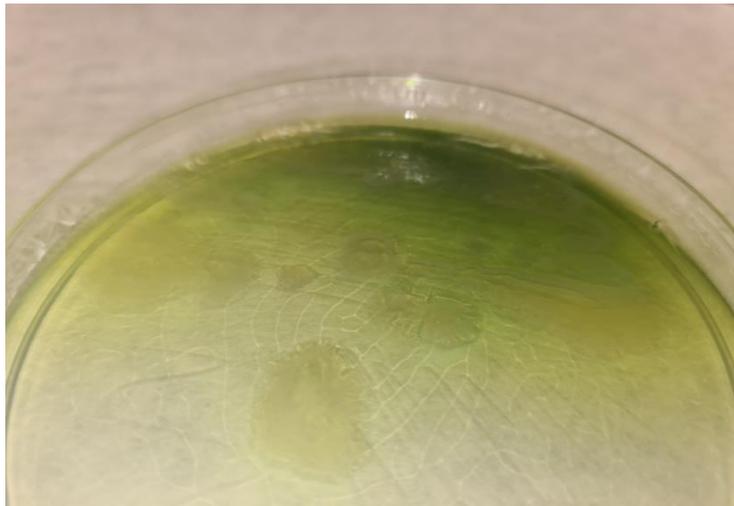
MCC P/A	COSMETIKIT®	DRY PLATES®	MUGPLUS
CRIOTECA®	CHROMOSALM	DESINFECTEST®	CCCNT
PLAQUIS®	KITPRO-PLUS	CROMOKIT®	MBS
M-IDENT®	SEILAGUA®	SALMOQUICK	AIREANO
NEOGRAM	ENVIROCOUNT		

MONOGRAFÍA *Pseudomonas aeruginosa*

1-El microorganismo y su interrelación con el ser humano

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, oxidasa positiva (no fermentador) y móvil (con un flagelo o penacho polar), capaz de generar pigmentos como la fluoresceína (verde-amarillento y fluorescente), mejor detectada con el medio King B, piocianina (verde-azulado) y pirrubina (pardo), mejor detectadas con el medio King A. Generan también fluorescencia y pigmentos en el Agar Cetrimida, confiriéndole tras su crecimiento un olor característico a jabón o a licor.

Los Pseudomonadales (incluido también Acinetobacter) se consideran los microorganismos que, a causa de la acumulación atmosférica de los compuestos que generan, provocaron las primeras condensaciones del vapor de agua en lluvia, lo que permitió el paso de la vida del mar primigenio a tierra. Su hábitat incluye el suelo, los vegetales, las aguas naturales y también tiene especial



Pseudomonas aeruginosa, aspecto típico en Agar Cetrimida

preferencia por las duchas, las piscinas y las aguas purificadas de la industria farmacocósmica (junto a *Burkholderia cepacia*, ver monografía 8), formando biofilms resistentes a antibióticos y desinfectantes. Lo que normalmente detectamos en el agua son sus formas planctónicas, que escapan del biofilm para colonizar nuevas zonas. También es frecuente, sin provocar enfermedad, en zonas húmedas del ser humano: axilas, ingles, boca..., siendo capaz de colonizar hasta los filtros de la cabina de flujo laminar a través de los aerosoles generados por el simple hecho de hablar o toser. Es capaz de alimentarse de los compuestos más diversos (explosivos, petróleo, desinfectantes...), por lo que a veces en vez de desinfectar, en realidad estamos infectando la zona de trabajo. Se trata de un patógeno humano del grupo 2 de riesgo biológico, aunque también ataca animales y vegetales. En el hombre lo mismo ataca heridas, que el tracto respiratorio, las vías urinarias, los ojos... y puede provocar otitis, dermatitis y hasta sepsis (respuesta extrema del cuerpo a una infección, que puede dañar los propios tejidos y provocar la muerte).

2-Los tipos de productos donde la legislación exige su búsqueda o recuento, así como otros tipos de productos donde a nuestro criterio, sería recomendable analizarlos

-La legislación UE (Directiva Europea 2015/1787 de 6/X) y por ende la española (Real Decreto 1799/2010, modificado por RD 902/2018 de 20/7) exigen la búsqueda de *P.aeruginosa* en **aguas envasadas** (incluida agua de mar envasada). El Real Decreto 742/2013 11/11 y algunas Comunidades Autónomas exigen también su búsqueda en **piscinas** (ausencia en 100 mL, en otras recuento 0 en 100 mL, que al parecer no debe ser lo mismo que la ausencia). Curiosamente no se habla de buscar *P.aeruginosa* en aguas de consumo humano, cuando ya se han informado varios casos, incluso de retrocontaminación de la red desde los grifos privados o públicos.

-*P.aeruginosa* debe buscarse (según legislación española y europea, actualizada en 2021) en los siguientes **ingredientes alimentarios**: concentrado refinado de péptidos de camarones, extracto de cresta de gallo, *Clostridium butyricum*. Tradicionalmente se ha buscado en refrigerados, congelados y neveras como algo más genérico: "bacterias psicrófilas".

-En **medicamentos no estériles**, la farmacopea exige la búsqueda activa de *P.aeruginosa*. También las GMPs exigen su búsqueda activa en las aguas de uso farmacéutico.

-En **cosméticos**, emulando la farmacopea, surgió la Norma ISO 22717 que habla de los mismos medios. Para seguir GMPs, aunque sean menos explícitas que en medicamentos, se debe buscar *P.aeruginosa* en aguas de uso cosmético, donde es bastante frecuente cuando se busca por primera vez.

3-Los métodos oficiales para su detección/recuento

-En aguas la legislación exige el seguimiento de la Norma ISO 16266, que habla del Agar Cetrimida CN (un Cetrimida especial con menos cetrimida que el farmacopea y con Ácido Nalidíxico), por Filtración de Membrana. Las colonias sospechosas (verde-azuladas o amarillas, fluorescentes; o pardo-rojizas) se confirman con la oxidasa (+), Acetamida-Nessler (+) y King B (Fluoresceína, agar F).



Fluorescencia en la placa izda de Agar King B

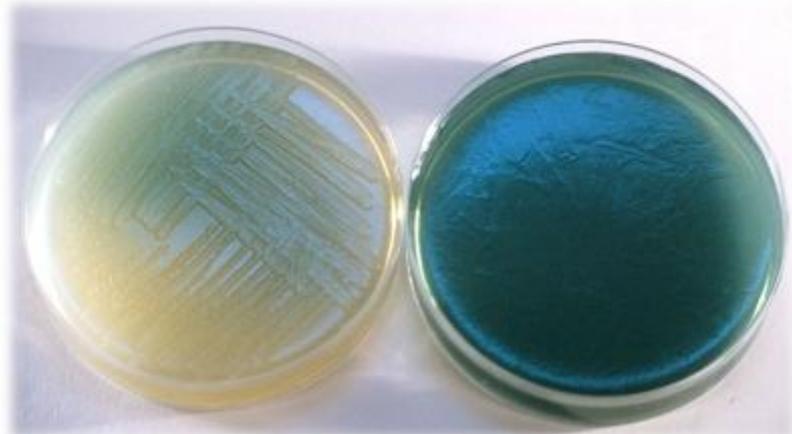


Derecha, Acetamida-Nessler +, *P.aeruginosa*

-En alimentos se emplea el Agar Cetrimida clásico (pharmacopea).

-En medicamentos se sigue pharmacopea con enriquecimiento en TSB (Medio A) y aislamiento en Cetrimida Agar (medio N), confirmando con la prueba de la citocromo-oxidasa +.

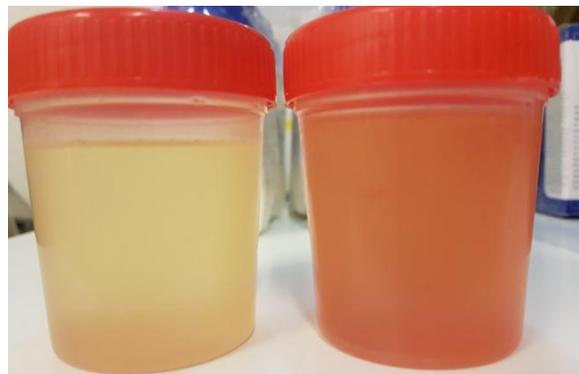
-En cosméticos no existe legislación específica, pero se sigue la Norma ISO 22717 que también habla del Agar Cetrimida (fórmula farmacopea) y de la confirmación de colonias sospechosas con Oxidasa y con King A (Píocianina, agar P) en vez del King B.



Píocianina en 48 h (izda) y 7 días (dcha) de Agar King A

4-Los métodos alternativos que mejoran la rapidez de los resultados y la robustez del análisis

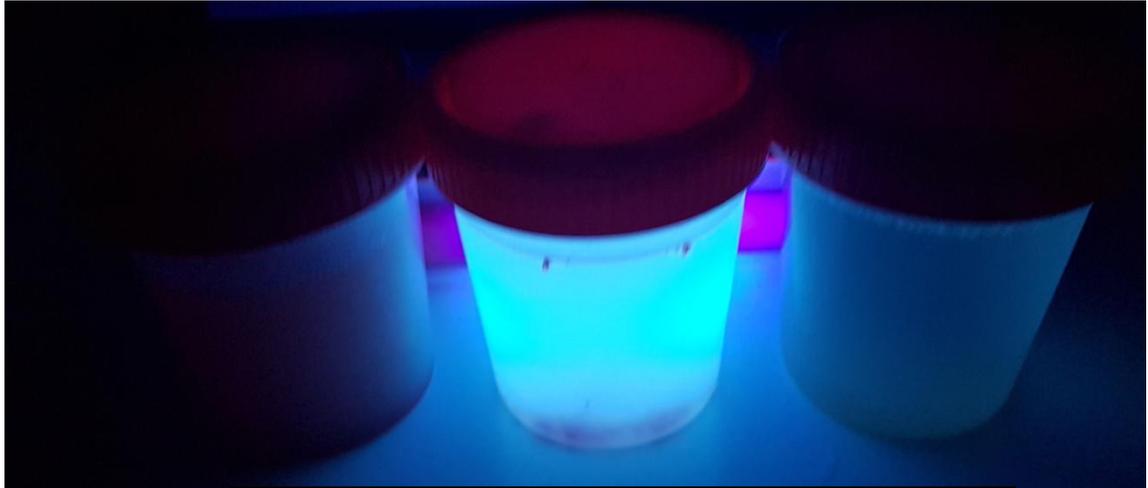
El problema de buscar *Pseudomonas aeruginosa* en aguas, por Filtración de membrana, es que se destruyen numerosas células durante la filtración y se obtiene nada menos que un 33% de muestras con resultado falsamente negativo (datos de 18 años de intercomparación Seilagua). Microkit creó hace ya casi 3 décadas el **Pseudocult P/A**, un caldo cromogénico selectivo que, añadido a 100-250 ml de muestra de agua, genera color rosado-rojo en 24-72h y fluorescencia



Pseudocult P/A, izquierda: negativo, derecha: positivo.
Abajo: varios tonos según carga y vitalidad de la cepa

en presencia de *Pseudomonas aeruginosa*. La validación que demostró el 33% de falsos negativos por filtración fue precisamente frente al Pseudocult, que detecta el 100% de positivos.

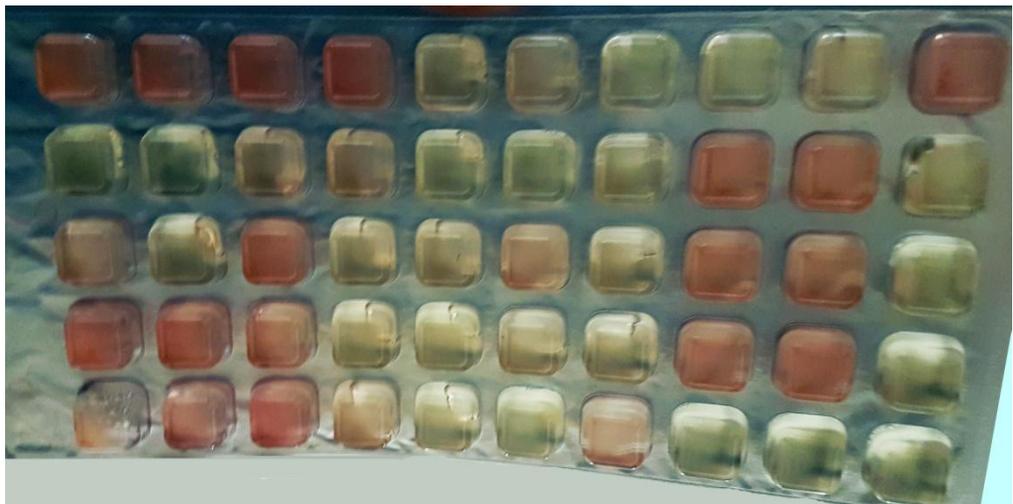




Fluorescencia de Pseudocult en presencia de *P.aeruginosa* (bote del centro)

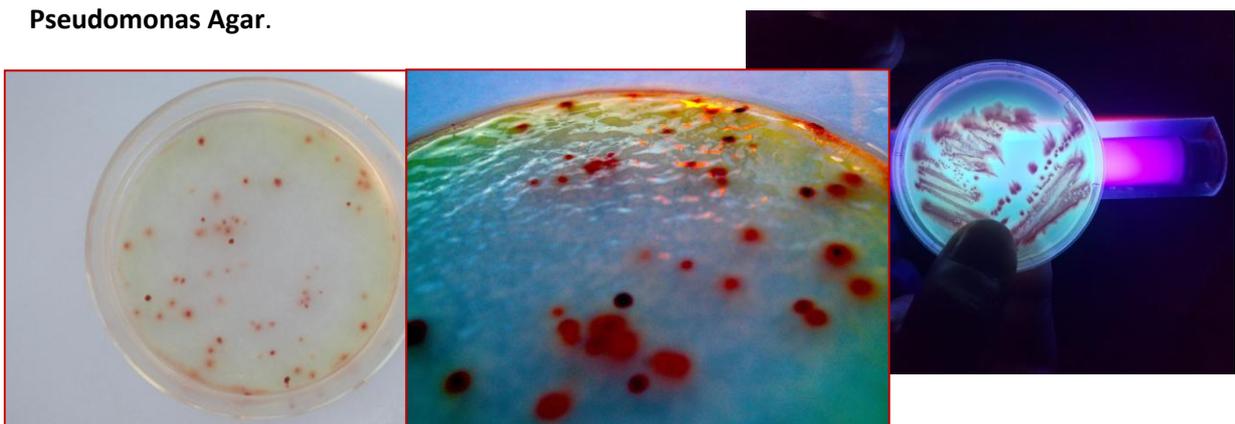
Lógicamente todo presunto positivo en Pseudocult se debe confirmar estriando en Agar cetrimida y siguiendo las confirmaciones antes mencionadas. Mientras que los presuntos negativos son confirmativamente negativos.

Dada la ortodoxia que obliga a “contar ceros” en algunas legislaciones (0 ufc/250 ml en vez de decir ausencia/250 mL), se puede usar el



medio Pseudocult con tubos o con cubetas NMP.

Otro problema del método clásico es que el Agar Cetrimida suele tardar 48 h en permitir ver las colonias de *P.aeruginosa*. MICROKIT resolvió este problema en 2013 durante el diseño de las **Dryplates-PS**, mediante la adición al Agar Cetrimida, del mismo cromógeno del Pseudocult, lo que permite visualizar las colonias desde las primeras 18 h de incubación. Después diseñó este mismo medio en formato deshidratado, con el nombre **Cromokit Rapid Pseudomonas Agar**.



La **confirmación** de *P.aeruginosa* en Agar Cetrimida es muy sencilla: basta con hacerles a las colonias la prueba de la **oxidasa**, que debe ser positiva, ya que son aerobios estrictos. Las tiras de MICROKIT están estabilizadas y no se ponen azules con el oxígeno del aire.

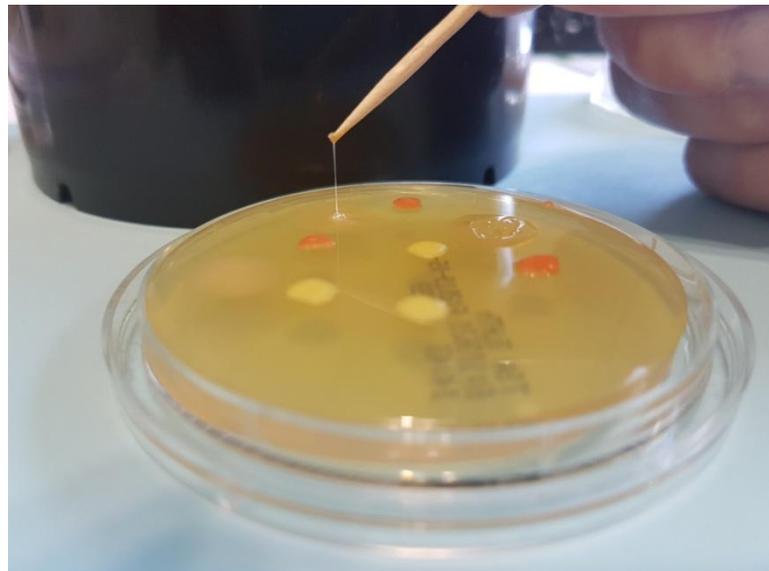
Otra prueba más definitiva es la **Acetamida-Nessler**, positiva para *P.aeruginosa* (ver foto en la página 2 de esta monografía).

Ambas pruebas y la del King B se pueden conseguir juntas en el kit **M-Ident-P.aeruginosa**.



La colonias oxidasa positivas provocan viraje de la tira a azul oscuro

A veces en Agar Cetrimida pueden crecer curiosamente algunos Gram positivos (ej: *Bacillus spp*), generando confusión; el primer paso para descartar falsos positivos en Agar Cetrimida debe ser la inmediata prueba del **Neogram** directa en las colonias, descartando las que no filamentos.



Neogram: colonia de Gram -: filamento en unos segundos
Si fuese Gram +, la colonia no filamentaría

5-Cómo vemos el futuro en la detección de este grupo

La búsqueda de *Pseudomonas aeruginosa* en aguas de consumo humano, en duchas y en aguas de uso cosmético debería ser obligada por Ley. La mayoría de problemas microbiológicos que encontramos en numerosas fábricas de cosméticos son aguas infestadas de *P.aeruginosa* (y/o de *Burkholderia cepacia*) porque nadie las controla.