

Especificación

Medio de cultivo sólido, para el aislamiento e identificación presuntiva de *Clostridium perfringens* según las normas ISO y otras normativas.

Presentación

| | Encajado | Caducidad | Almacenamiento |
|-----------------------------------|---|-----------|----------------|
| 10 Frascos | | | |
| Botella 125 ml con: 100 ± 3 ml | 1 caja con 10 botellas de 125 ml. Tapón plástico con rosca. | 12 meses | 8-25 °C |

Composición

| | |
|-------------------------------------|--|
| Composición (g/l): | Añadir 1 vial de Ref. 928610NL Suplemento Selectivo de D- Cicloserina (40 mg). |
| Digerido enzimático de caseína..... | 15,00 |
| Peptona de soja..... | 5,00 |
| Extracto de levadura..... | 5,00 |
| Disulfito sódico..... | 1,00 |
| Citrato ferrico amónico..... | 1,00 |
| Agar..... | 18,00 |

Descripción/Técnica

Descripción:

El Medio de Triptosa-Sulfito-Cicloserina es una modificación del medio clásico del TSN de Marshall, Steenberg y McClung en el que se han sustituido los antibióticos tradicionales, polimixina y neomicina, por la cicloserina. Este último antibiótico se ha manifestado más selectivo para *Clostridium perfringens* que los anteriores y además parece disminuir la tendencia a producir el ennegrecimiento difuso que se presenta en este género. Por otra parte, *Clostridium perfringens* es más resistente a la cicloserina que a la sulfadiacina, polimixina y neomicina, lo que permite una dosificación más eficaz. El medio incorpora meta-bisulfito sódico y citrato férrico-amónico para poner de manifiesto la capacidad reductora de sulfitos y de esta forma se puede verificar en un solo ensayo las tres características diferenciales de esta especie anaeróbica: sulfito-reducción, crecimiento a 44-46°C y resistencia a la cicloserina.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la cicloserina no resiste temperaturas superiores a los 100°C y por otra parte su estabilidad en solución es muy limitada, aún cuando sea en medios alcalinos, por lo cual se recomienda que se preparen las placas justas que se vayan a utilizar y no se almacenen con el antibiótico incorporado.

Técnica:

Fundir los frascos de medio de cultivo en microondas o al baño maría a 100°C; enfriar a 50°C y añadir Cicloserina a una concentración de 400 mg/L, antes de dosificar el medio en el recipiente final (tubos o placas).

No recalentar ni refundir una vez añadido el antibiótico.

Proceder a siembra de la muestra o diluciones por cualquier método convencional, y según normativa, si es necesario proceder a realizar una segunda capa para asegurar condiciones anaeróbicas.

Tras incubar a 44±1°C durante 21 ± 3 h, proceder al recuento de todas las colonias negras que aparezcan.

Las tres características diferenciales de *C.perfringens* (Reducción de Sulfito, Crecimiento a 44°C y Resistencia a Cicloserina) permiten la identificación presuntivas de las colonias aparecidas como tal especie.

Nota: Los medios sólidos pueden fundirse de diferentes maneras: autoclave, baño y si el cliente lo ve conveniente también el microondas. Siempre que se escoja la opción del microondas es necesario tomar ciertas medidas de seguridad para evitar la rotura del frasco o tubo, tales como aflojar el tapón y poner la botella o tubo en un baño maría dentro del microondas. Las temperaturas y tiempos de fusión dependerán de la forma del envase, del volumen de medio y de la fuente calorífica. Deben evitarse tanto los sobrecalentamientos como los calentamientos prolongados.

Control de Calidad

Control Físico/Químico

Color : Amarillo verdoso pH: 7,6 ± 0,2 a 25°C

Control de Fertilidad

Previa adición de Cicloserina; Control calidad según normativa EN ISO 11133:2014/ Adm 1 : 2018.

Fusión - Preparación Placas - Sembrar en espiral rango práctico 100 ± 20 UFC. Min. 50 UFC (Productividad)

Metodología analítica acorde con ISO 11133:2014/A1:2018; A2:2020.

Anaerobiosis . Incubación a 44 ± 1 °C durante 21 ± 3h.

Control microbiológico según normativa ISO 11133:2014/ A1:2018.

Microorganismo

Clostridium perfringens ATCC® 10543, WDCM 00174

Clostridium perfringens ATCC® 13124, WDCM 00007

Bacillus subtilis ATCC® 6633, WDCM 00003

Desarrollo

Bueno ≥ 50%. Colonias negras.

Bueno ≥ 50%. Colonias negras.

Inhibido

Una doble capa con agar TSC favorece la observación del ennegrecimiento de las cepas SH2(+).

Control de Esterilidad

Incubación 48 h a 30-35°C y 48 h a 20-25 °C: SIN CRECIMIENTO

Verificación a 7 días tras incubación en las mismas condiciones.

Bibliografía

- ATLAS, R.M., LC. PARKS (1993) Handbook of Microbiological Media. CRC Press, Inc. London.
- DIN Standard 10165. Referenz Verfahren für Bestimmung von *Clostridium perfringens*. Fleisch und Fleischerzeugnissen.
- DOWNES, F.P. & K. ITO (2001) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association. Washington.
- DIRECTIVA 2015/1787/UE de la Comisión por la que se modifica la Directiva 98/ 83/CE relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano (DO L260 de 7.10.2015 pg 6 y ss)
- FDA (Food and Drug Administrations) (1998) Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. Revision A. AOAC International Inc. Gaithersburg, MD.
- ISO 7937 (2004) Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for Enumeration of *C. perfringens*. Colony-count technique.
- ISO Norma 6461-2 (1986) Water Quality.- Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (Clostridia).- Part 2: Method by Membrane Filtration.
- ISO 11133:2014/ Adm 1:2018. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- ISO 14189 (2013) Water quality. Enumeration of *Clostridium perfringens* — Method using membrane filtration
- SMITH, L.D. (1981) Clostridial Anaerobic Infections, in Diagnostic Procedures for Bacterial Mycotic and Parasitic Infections. 6th ed. APHA. Washington.
- UNE-EN ISO 11133 (2014). Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua.-Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.