



Especificación

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

Fórmula * en g/L

Peptona de caseína.....	15,0
Peptona de soja.....	5,0
Extracto de levadura.....	5,0
m-Bisulfito sódico.....	1,0
Citrato férrico amónico.....	1,0
Agar.....	18,0

pH final a 25 °C, 7,6 ±0,2

*Fórmula ajustada y/o suplementada según necesidades para cumplir los criterios de recuperación

Reconstitución

Suspender 45 g del polvo en 1 L de agua destilada y dejar embeber unos minutos. Llevar a ebullición y distribuir volúmenes de 500 ml en recipientes adecuados. Esterilizar al autoclave durante 15 minutos a 121°C. Enfriar a 45-50° C y añadir 1 vial de Suplemento Selectivo de D-Cicloserina (Ref. DSHB3021) a 500 ml. Mezclar bien y distribuir en placas. Si se desea con yema, añadir al mismo tiempo que el antibiótico, yema de huevo estéril (Ref. FLWR3035) a razón de 80 ml/l.

Descripción

El Medio de Triptosa-Sulfito-Cicloserina es una modificación del medio clásico del TSN de Marshall, Steenbergen 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 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. De cualquier forma, si se desea, se puede preparar una solución activa de cicloserina en tampón fosfatos a pH 8,0 (Fosfato dipotásico 16,73 g/L y Fosfato monopotásico 0,52 g/L) y, mantenida en refrigeración podrá usarse durante unos 5 días. Si se almacena congelada a (-20±5) ° C podrá alargar la caducidad hasta 4 semanas e incluso 12 meses si se almacena a (-70±10) ° C.

Este producto liofilizado tiene una caducidad muy superior, indicada en la etiqueta del fabricante.

Suplemento necesario

Suplemento Selectivo de D-Cicloserina (Ref. DSHB3021)

Composición por vial:

Cantidad necesaria para 250 mL de medio completo.

D-Cicloserina 200,00 mg

Agua destilada (Disolvente)

Técnica

El procedimiento normalizado recomienda el inóculo superficial de la muestra o de sus diluciones y una vez absorbido por el medio verter una segunda capa de cobertura de anaerobiosis. Bien el propio medio de TSC, bien agar bacteriológico. Tras una incubación de 24 ± 3 h horas a 44-46 °C se procede a la enumeración de las colonias negras que aparezcan en la placa.

Proceder de acuerdo a normativas o métodos normalizados.

Control de calidad

Temperatura de incubación: 44 °C ± 1.0

Tiempo de incubación : 21 ± 3 h

Inóculo: Rango práctico 100 ± 20 UFC ; Min. 50 UFC (Productividad) / 10⁴-10⁶ CFU (Selectividad) según UNE-EN ISO 11133:2014/Amd 1:2018

Microorganismo

Clostridium perfringens ATCC® 10543

Clostridium perfringens ATCC® 13124

Bacillus subtilis ATCC® 6633

Clostridium perfringens ATCC® 13124

Crecimiento

Productividad > 0.50

Productividad > 0.50

Inhibido

Observaciones

Colonias negras (Anaerobiosis)

Colonias negras (Anaerobiosis)

-



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.

Almacenamiento

Solo para uso de laboratorio. Mantener bien cerrado, al resguardo de la luz, en lugar fresco y seco (entre 4°C y 30 °C).