Referencia: FLWR3077 **A.B.E. - Ficha Técnica**

Producto: **TRYPTOSE SULFITE CYCLOSERINE (TSC) AGAR BASE - 100 ml**

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 ºC

Composición

Composición (g/l):
Digerido enzimático de caseina..... 15,00
Peptona de soja.....5,00
Extracto de levadura.....5,00
Disulfito sódico..... 1,00
Citrato ferrico amónico..... 1,00
Agar..... 18,00

Añadir 1 vial de Ref. 928610NL Suplemento Selectivo de D- Cicloserina (40 mg) Ref DSHB3198.

Descripción/Técnica

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 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 100ºC; enfriar a 50ºC 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±1ºC 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 44ºC 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 25ºC

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 ºC durante 21 ± 3h.

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

Microorganismo	**Desarrollo**
Clostridium perfringens ATCC® 10543, WDCM 00174	Bueno ≥ 50%. Colonias negras.
Clostridium perfringens ATCC® 13124, WDCM 00007	Bueno ≥ 50%. Colonias negras.
Bacillus subtilis ATCC® 6633, WDCM 00003	Inhibido

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

Control de Esterilidad

Incubación 48 h a 30-35ºC y 48 h a 20-25 ºC: SIN CRECIMIENTO
Verificación a 7 días tras incubación en las mismas condiciones.

Bibliografia

· ATLAS, R.M., LC. PARKS (1993) Handbook of Microbiological Media. CRC Press, Inc. London.

· DIN Standard 10165. Referenz Verfahren fur 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 Adminstrations) (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.