

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

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

### TSC AGAR (BASE) TRIPTONA-SULFITO-CICLOSERINA Y MUP

Detección y recuento de *Clostridium perfringens* (UNE EN 13401:2000, UNE-EN 26461-2:1995, ISO/CD 6461-2:2002, EN ISO 14189)

#### COMPOSICIÓN

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Triptosa                  | 15.00 g |
| Peptona papaínica de soja | 5.0 g   |
| Extracto de levadura      | 5.0 g   |
| Citrato férrico amoniacal | 1.0 g   |
| Metabisulfito sódico      | 1.0 g   |
| Agar-agar                 | 18.0 g  |
| (Fórmula por litro)       |         |
| pH final: 7.6 ± 0.2       |         |



*Clostridium perfringens* en TSC. Abajo, en TSC con MUP

#### PREPARACIÓN

Disolver 45 g de medio en 1 l de agua bidestilada. Calentar, agitando, hasta ebullición, para su total homogeneización. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos o mejor a 116 °C, 15 minutos. El color final del medio es crema. Enfriar a 50 °C y añadir asepticamente 400 mg de D- Cicloserina estéril (4 viales de 100 mg de SMS252). Verter de inmediato en placas y no recalentar. Utilizar de inmediato a su preparación para evitar la letal oxigenación.

NOTA 1: Para mejorar el desarrollo de colonias negras de Clostridios, añada 1 vial del suplemento estéril VMT136 a cada 100-1000 ml de medio estéril, hervido para desoxigenarlo y una vez enfriado a 45-50 °C.

NOTA 2: Para seguir la última Norma ISO 14189 de aguas, mejorada sin reactivos cancerígenos, puede añadir también a cada 500 ml de medio enfriado a 50°C, 65-125 mg (depende de la vista del observador) de MUP (Metil-Umbeliferil Fosfato, Ref: MICROKIT SMT009), que reacciona con las colonias de *Cl.perfringens* emitiendo fluorescencia (amarilla o azul) bajo luz UVA de 366 nm (linterna MICROKIT VMT050). **Uso del MUP:** Disolver 100 mg en 20 mL de agua estéril tibia hasta su total homogeneización. Esterilizar por filtración con jeringa y filtro de carcasa de 0,22 µm, de modo que deben añadirse a cada placa 0,4 ml de esta solución filtrada. Dosis final en TSC: 100 mg de MUP/Litro de TSC (una placa tiene 15-20 ml de TSC, de modo que sobre cada placa hay que añadir 2 mg de MUP y repartirlo con asa digiralsky). Dejar embeber el MUP en la placa. Sembrar después la membrana filtrada, mejor boca abajo. Ideal añadir encima una segunda capa de TSC (Ofrecemos tubos preparados para esto, TPL137). Si sobra solución para otro día, mantenerla en nevera en vial cerrado y si sobra para la semana siguiente, congelar. Las placas así preparadas deben usarse dentro de la misma semana, ya que el reactivo una vez hidratado pierde su efectividad en 7 días.

PARA USO EXCLUSIVO EN LABORATORIO. MANTENGA EL BOTE BIEN CERRADO EN LUGAR SECO, FRESCO Y OSCURO. AGITE EL BOTE ANTES DE USAR. DESHIDRATADO CODIGO: DMT175, placas preparadas PPLM29, tubos preparados TPL137. Modificación del TSN más selectiva y con menor difusión del ennegrecimiento.

#### CONTROL DE CALIDAD DEL MEDIO

Realizado en nuestro laboratorio; es prudente repetirlo en su laboratorio siempre que varíen las condiciones (más de 3 meses sin usar, tras desinfectar laboratorio, tras conservar a alta Tª, cuando adquiere aspectos extraños aunque no haya llegado la fecha de caducidad teórica de la etiqueta,...)

DESHIDRATADO: Polvo grueso, Amarillo PREPARADO: Estéril, Beige

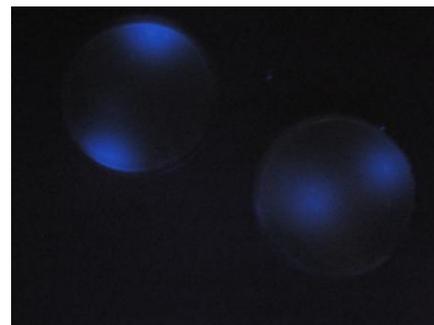
EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO ISO/TS 11133-2 20-48 h a 37-44 °C en anaerobiosis, aplicando el método ISO 7937 ó ISO/CD 6461-2: 2002 o el indicado en el Manual MICROKIT actualizado:

*Clostridium perfringens* WDCM00007 y WDCM 00080, Colonias negras, pardas o grises. PR > 0,7 respecto al número de ufc certificadas e inoculadas en otro lote validado de TSC. Con respecto a Schaedler, recuento 75-112%, pero de forma selectiva y diferencial; esta variabilidad de la productividad depende de la composición y carga de la flora acompañante inoculada. Si se añadió MUP, colonias que emiten fluorescencia azul bajo luz UVA de 366 nm.

*E.coli* WDCM00013, Inhibición completa: Ni una sola colonia. O a lo sumo inhibido con colonias blancas.

*Bacillus subtilis* WDCM00003, Inhibido.

*Staphylococcus aureus* WDCM00033, Inhibido, a lo sumo colonias blancas.



**PRESENTACIÓN:** MEDIO DESHIDRATADO (BASE) y SUPLEMENTO. También hay **tubos preparados, PLACAS MF 90mm con o sin MUP y frascotes 200 ml parafinados** para recuento en 100 ml de muestra). **En versión líquida, viales MF y viales pinchables. Y suplemento MUP en polvo (vial 1 g ó tubote 10 g).**

#### **MODO DE EMPLEO E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

En **ALIMENTOS**, sembrar en superficie 0'1 ml de muestra y su serie de diluciones decimales, añadiendo una segunda capa de medio. O bien sembrar en profundidad 1 ml incluso en tubo o 100 ml en frascote parafinado, fundidos en agua hirviendo y atemperados a 45-47°C justo antes de solidificar. Incubar 18-20 horas a 44-46 °C aproximadamente, en anaerobiosis (no hace falta en tubos ni frascos) y contar como *Clostridium perfringens* toda colonia negra. La Temperatura selectiva de 46°C a menudo es excesiva e inhibe también el crecimiento de algunas cepas diana. Las colonias blancas o grises son presuntivas si la anaerobiosis no es correcta; incluso las colonias negras pueden virar a incoloras después de sacarlas de la atmósfera de anaerobiosis. Resulta más recomendable sembrar 1 ml sobre un tubo (TPL137) hervido y enfriado a 75°C (para detectar y enumerar esporas) o a 45°C (para detectar y enumerar formas vegetativas), cerrar, voltear sin agitar para mezclar sin oxigenar, incubar vertical (ahorrando las jarras y los generadores de anaerobiosis) y contar directamente en el tubo las colonias negras, que crecen en anaerobiosis en toda su altura (por debajo de los 3-5 mm oxigenados de la superficie).

*La siembra en tubo ahorra la incubación en anaerobiosis y permite contar perfectamente las colonias*



En **AGUAS:** Una vez invalidado por numerosos laboratorios el medio oficial 2003-2015 “m-CP Agar”, la mejor elección es el Clostricult P/A si no se requiere recuento o si se ha de recontar “0 en 100 ml”, ya que en microbiología 0 ufc es equivalente a ausencia. Para recuento de esporas en aguas, según UNE-EN 26461-2, calentar la muestra de 100 ml de agua 15 minutos entre 70-80 °C. Lo lógico es hacer un duplicado para formas vegetativas, sin ese shock térmico. Puede haber 10-100 veces más esporas que vegetativas en una misma muestra. Filtrar 100 ml de agua a través de una membrana de 0,22 µm (ref: VAC022), evitando al máximo la oxigenación del agua y minimizando el tiempo entre el filtrado y la siembra. La industria farmacéutica revitaliza las células de anaerobios filtrando por la misma membrana, cuando se está acabando de filtrar el agua, 100 ml de Tioglicolato alternativo (ref: DMT208) estéril. Así consiguen mejores recuperaciones en estos microorganismos tan difíciles de hacer crecer tras una filtración. De igual forma, si añade a sus 100-250 ml de muestra el contenido de un tubo de caldo Tioglicolato alternativo polvo estéril (MICROKIT DPA047), volteando para su homogeneización antes de filtrar, obtendrá resultados mucho más acordes a la realidad, ya que este medio revitaliza los anaerobios. Una vez filtrada la muestra (y el caldo revitalizante, en su caso) no dejar que la membrana se seque ni un instante en el aparato de filtración, y menos si éste sigue conectado. Añadir la membrana boca abajo en la placa Petri (vacía, o bien con una capa de 15-18 ml de TSC o idealmente con una capa de 15-18 ml de TSC-MUP) y verter sobre ella 15-18 ml de TSC Agar (sin MUP) enfriado a 50 °C (y si se desea, preparado a doble concentración), sin que se formen burbujas. Siguiendo todas estas instrucciones se consiguen las mejores recuperaciones en microorganismos que, como Clostridium, no están preparados para soportar la oxigenación que proporciona el contacto con el aire. Para siembra directa (sin filtración) de aguas cloradas, añadir 0,6 g de Tiosulfato sódico para inactivar el cloro. Incubar 16-24 h y 40-48 horas a 36-38 °C aproximadamente o, más selectivamente, a 43-45°C aproximadamente (es un medio más rápido que el SPS), en anaerobiosis sobre todo si no se ha dejado la membrana en profundidad). Si se añadió MUP en la capa inferior, contar sólo las colonias que emitan fluorescencia (azul o amarilla) bajo luz UVA de 366 nm. Las colonias blancas o grises son presuntivas si la anaerobiosis no es correcta; incluso las colonias negras pueden virar a incoloras después de sacarlas de la atmósfera de anaerobiosis. De ahí la importancia del MUP para evitar falsos negativos de colonias que no están negras.

Ver también el kit PPL905A, KIT TSC-ANA - Plaqui TSC con bolsa de anaerobiosis incluida

**NOTA IMPORTANTE:** La placa pequeña, sea sea Deltalab (no hermética), Pall (hermética) o Falcon (hermética), reduce drásticamente el recuento de *C.perfringens* WDCM 00007. Todas ellas y también las cassettes MICROKIT (semiherméticas), reducen drásticamente el recuento de *C.perfringens* WDCM 00174. No es un tema de hermeticidad que impida la entrada de la atmósfera de anaerobiosis, ya que Deltalab y Microkit no son herméticas y la primera no funciona con ninguna de las dos cepas y la segunda no funciona con una de ellas. Por todo ello, para este microorganismo, es necesario usar placa de 90 mm, además de añadir una segunda capa de medio o de TSC (ideal Tubos TPL137) o de agar-agar. Otra cosa importante es secar muy bien la placa antes de usar, para que no se cree una hermeticidad entre la tapa y la placa, que dificulte la entrada de la atmósfera de anaerobiosis (o añadir un clup entre placa y tapa. Aunque los mejores resultados se obtienen analizando los 100 ml de muestra de agua sin pasarla por la oxigenante/estresante filtración: siembra en masa de 100 ml de agua en Quanti-P/A-TSC MICROKIT.

**En anaerobios estrictos es fundamental minimizar el tiempo de exposición al aire durante el análisis, ya que el oxígeno destruye las células y reduce la carga real hasta 3 log en solo unos minutos. Actúe con la misma prisa que actuaría si estuviera Ud. en una atmósfera de anaerobiosis. *C.perfringens* debe incubarse a 44°C, ya que muchos facultativos dan falso positivo a 37°C**

El usuario final es el único responsable de eliminar los microorganismos de acuerdo con la legislación medioambiental vigente. Autoclavar antes de desechar a la basura.

Fabricado en la UE por MICROKIT desde 1989, bajo ISO 9001, ISO 11133 y GMPs, revisado en Mayo-2024