

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

MCC P/A
CRIOTECA®
PLAQUIS®
M-IDENT®
NEOGRAM

COSMETIKIT®
CHROMOSALM
KITPRO-PLUS
SEILAGUA®
ENVIROCOUNT

DRY PLATES®
DESINFECTEST®
CROMOKIT®
SALMOQUICK

MUGPLUS
CCCNT
MBS
AIREANO

MONOGRAFÍA *Clostridium perfringens* y Clostridios Sulfito-Reductores

1-El microorganismo y su interrelación con el ser humano

Clostridium perfringens es un anaerobio estricto, bacilo Gram positivo, inmóvil, que forma esporas. Al no tolerar el oxígeno, desde la primera gran extinción masiva en la Tierra, provocada por las cianobacterias al convertir la atmósfera reductora en oxidante (hasta el actual 21% de oxígeno), todos los anaerobios estrictos se restringieron a vivir en zonas anóxicas, como los fondos de los lagos o el intestino de los animales. Sin embargo, al formar esporas resistentes al oxígeno, a *C.perfringens* se le encuentra también en el suelo, en el agua, en los alimentos (sobre todo en carnes rojas y aves)... incluso en las manos



Estromatolitos de cianobacterias, los primeros grandes generadores de oxígeno en la Tierra primigenia, que provocaron la primera gran extinción masiva de especies en la época procariota: casi todos los anaerobios estrictos. Los Clostridium son supervivientes de dicha extinción.



del ser humano, a la espera de poder germinar en cuanto estén en zona anóxica. Por eso se considera un microorganismo de hábitat ubicuo. Es un patógeno capaz de provocar la gangrena gaseosa, así como toxiinfecciones alimentarias en seres humanos y en el ganado, en el que provoca devastaciones. Es muy frecuente en el intestino de los perros, pero también puede comportarse como saprófito en el intestino humano (como siempre, cuando migra a otros tejidos que no son su hábitat natural, por ejemplo mediante heridas, o cuando migra del alimento al intestino, es cuando se suele comportar como patógeno). También es bien conocido como indicador, en las aguas de consumo, de infiltración de aguas naturales (y por tanto de posible presencia de Enterovirus, ej: bacteriófagos; y protozoos, ej: *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Entamoeba*...) o residuales (y por tanto de posible presencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella*, *Vibrio*...), más que por su mero valor como patógeno.

Clostridios sulfito-reductores son un grupo de especies del género *Clostridium* que tienen en común la capacidad de reducir el sulfito a los malolientes sulfuros cuando está presente el Citrato de Hierro. Salvo *C.perfringens*, suelen ser móviles. Junto con otros anaerobios sulfato-reductores (como ejemplo tipo, *Desulfovibrio*), forman el amplio grupo de los sulforeductores. Provocan ennegrecimiento de los productos y de los medios de cultivo que contienen hierro (ej. Citrato de Fe), formando un precipitado oscuro de sulfuro de hierro. Sirven para ellos las mismas consideraciones indicadas para *C.perfringens*, aunque con menores dificultades en su detección/recuento. *C.perfringens* es el clostridio sulfito-reductor más común, pero no el único. Clostridios sulfito-reductores es un parámetro más buscado en alimentos y cosméticos que el parámetro *C.perfringens*, y hasta 2004 era el buscado en aguas envasadas; desde entonces lo es *C.perfringens*, quedando así abierta la controversia de por qué gastar tanto tiempo y dinero en identificar según métodos ISO cancerígenos, exactamente la especie *C.perfringens* (fosfatasa ácida, lactosa, gelatina, nitratos, movilidad, doble halo de hemólisis...), cuando las esporas de todos los clostridios sulfito-reductores tienen el mismo valor como indicadores de infiltración de aguas no potables en la red de aguas potables y envasadas.

Anaerobios sulfito-reductores son los anaerobios (sean o no del género *Clostridium*) capaces de reducir el sulfito a los malolientes sulfuros cuando están en presencia de Citrato Férrico. Es un parámetro casi sinónimo de Clostridios sulfito-reductores, ya que casi todos pertenecen al género *Clostridium*. Sin embargo, se mantienen con este nombre en algunas legislaciones.

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

-Alimentos, la legislación habla de buscar *Clostridium perfringens* en carnes (máximo 10-100 ufc/g según el tipo de carne), especias (máximo 1000 ufc/g) y gelatinas (ausencia/g). De buscar Clostridios sulfito-reductores en conservas de pH > 4,6, máximo 100 ufc/g en jamón cocido y similares, su ausencia/g en semiconservas, máximo 1 ufc/g en cuajo, máximo 100 ufc/h en horchata, máximo 1000 ufc/g en pastelería-bollería-confitería y repostería (sobre todo si tiene ingredientes cárnicos). Y búsqueda de anaerobios sulfito-reductores en frutas-verduras-hortalizas congeladas (máximo 10 ufc/g) y en gelatinas (mismo límite).

-Medicamentos estériles, en el test de idoneidad del método de esterilidad, farmacopea exige la correcta detección de *C.sporogenes*.

-Cosméticos no hay mención específica, pero la inocuidad del cosmético derivada del Reglamento UE 1223:2009 implica la ausencia de patógenos. Y de la Ley General de Sanidad 14/1986, de 25 de abril, estableció la obligación de las Administraciones públicas sanitarias de orientar sus actuaciones prioritariamente a la promoción de la salud y la prevención de las enfermedades. En la monografía del Ministerio de Sanidad sobre microbiología cosmética (el famoso librito verde) se habla de buscar recuentos de Clostridios sulfito-reductores en 1 g de muestra. Lógicamente las materias primas derivadas del suelo (arcillas, barros, caolín...) y de plantas serán más susceptibles de contener este parámetro indicador.

-Aguas de consumo, la UE exige la ausencia (0 ufc/100 mL) de *Clostridium perfringens* incluidas sus esporas en 100 mL de agua de red y en 50 ml de agua envasada, desde la Directiva

98/83/CE, de 3 de noviembre de 1998, transcrita en España a Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero (actualizado en la Directiva 2015/1787 de la Comisión, de 6 de octubre de 2015 y transcrito en España al Real Decreto 902/2018, de 20 de julio). El método descrito ha cambiado entre estas dos leyes, de la filtración de membrana (MF) con Agar m-CP hasta 2015, a la MF con Agar TSC (según ISO 14189) desde 2018.

-En aguas envasadas se distingue si son aguas minerales (se debe demostrar ausencia de Anaerobios "Clostridios" Sulfito-Reductores esporulados en 50 mL) o preparadas para consumo humano procedentes de superficies (ausencia de *C.perfringens* en 100 mL).

3-Los métodos oficiales para su detección/recuento

En alimentos, se sigue la **ISO 13401** para *C.perfringens* (TSC Agar y confirmación por Lactosa, Gelatina, Nitratos y Movilidad), y la AOAC para Clostridios sulfito-reductores (SPS Agar).

En cosméticos no hay método oficial obligado, pero los laboratorios que buscan Clostridios sulfito-reductores, usan SPS Agar.

En aguas para *C.perfringens* se seguía la Directiva 98/83/C y consecuente RD 140/2003 con m-CP agar y la ISO 6461, y ahora la **ISO 14189** con TSC Agar y confirmación por fosfatasa ácida. Y para Sulfito-Reductores el SPS Agar.

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

Las principales complicaciones de buscar estos microorganismos anaerobios estrictos, es que lo hacemos en la atmósfera actual de la Tierra, con un 21% de oxígeno, que para ellos es letal, y parece que las legislaciones y normativas no hayan tenido en cuenta la magnitud de esta afirmación. Como intento de solventarlo, exigen el empleo de atmósferas generadoras de anaerobiosis durante la incubación, pero hemos podido constatar que muchísimas veces estas atmósferas, conforme se generan, se fugan a través de las juntas de la jarra o de la bolsa; y todas las veces tardan algunas horas en generarse, con lo cual gran parte de las células vegetativas no resisten tanto tiempo de oxígeno y no se detectan. Si añadimos, en aguas, el uso del método destructivo (oxigenante) de la Filtración de Membrana, no son de extrañar los espeluznantes resultados obtenidos, con más del 50% de muestras falsamente negativas. Y, en las que sí se encuentran como positivas, una reducción de más del 50% de ufc's respecto al valor inóculo. Existen 3 métodos que han demostrado en intercomparación, obtener resultados mucho más fiables, por los motivos expuestos:

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



4-a) Para muestras de 1 g (alimentos y cosméticos), el **tubo preparado** de 20 ml con 18 ml de medio TSC Agar (para *C.perfringens*) o de SPS Agar (para clostridios sulfito-reductores) obtiene mucho mejores resultados que la placa preparada y ahorra la atmósfera de anaerobiosis, ya que por debajo del primer centímetro de agar bajo el tapón, el oxígeno no penetra (sobre todo si el fabricante, como hace Microkit, tiene la precaución de usar el agar en proporción más elevada de la habitual típica de los medios para aerobios). Hay que dejar una cámara de aire de aprox 1 ml para que los gases generados por el metabolismo de los clostridios durante su incubación (que debe ser con el tubo vertical y el tapón arriba) no exploten el tubo, si es de vidrio fino, o no rezumen medio si se cerró mal el tapón. Los ortodoxos de las Normas ISO dicen que así se imposibilita confirmar colonias, pero son dos medios de cultivo cuya proporción de falsos positivos es ridícula, totalmente despreciable, por lo que su argumento nos parece de perogrullo, cuando el método, al alcance de todo el mundo y más económico que la placa + la atmósfera, está ahorrando un 50% de falsos negativos y obteniendo recuentos hasta un 50% superiores a los de la placa de TSC o de SPS. El tubo preparado lleno de TSC o de SPS no es idea exclusiva de Microkit, como puede leerse en bibliografía sobre el convergente “tubo de Fung”.

4-b) Para muestras de 50/100ml de agua. Dado que en microbiología 0 ufc/100 mL es exactamente lo mismo que ausencia en 100 mL, o la locución cada vez más habitual “no detectado” en 100 mL (¡¡¡aunque los ortodoxos de las Normas ISO no dejarán nunca de sorprendernos, pidiéndonos que lo demostremos!!!), el método Presencia /Ausencia cobra aquí su más importante fuerza con respecto al método de Filtración de Membrana MF. Con **Clostricult P/A** (añadiendo 3 g del polvo estéril a 100 mL de la muestra de agua) en un bote cerrado durante la incubación, nos ahorramos tanto la filtración de membrana y su paupérrimo nivel de detección en estos parámetros anaeróbicos, como la atmósfera de anaerobiosis. Si el agua está muy agitada-oxigenada, el ennegrecimiento de la muestra no es completo y se reduce al fondo del frasco, ya que el oxígeno impide su desarrollo en el resto del volumen de agua, de la misma manera que en la naturaleza las formas vegetativas están sólo en el fondo de los lagos; eso nos demuestra lo dependiente que es el método oficial con placa, de una atmósfera de anaerobiosis artificial que no se fugue y se demuestre que no se ha fugado. Para colmo, la reacción de ennegrecimiento de las colonias del TSC y del SPS es reversible y en cuando se vuelven a oxigenar las placas al sacarlas de la jarra/bolsas de anaerobiosis para contar: muchas colonias se vuelven grises e incluso blancas, dando lugar a más falsos negativos. La validación externa de este método Microkit con respecto a la MF con placa de mCP, de TSC y de TSC+MUP y los devastadores



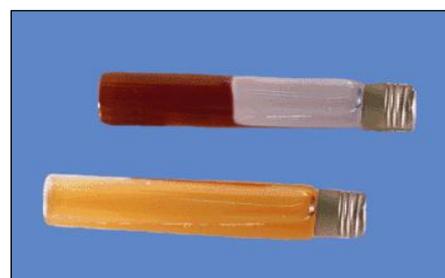
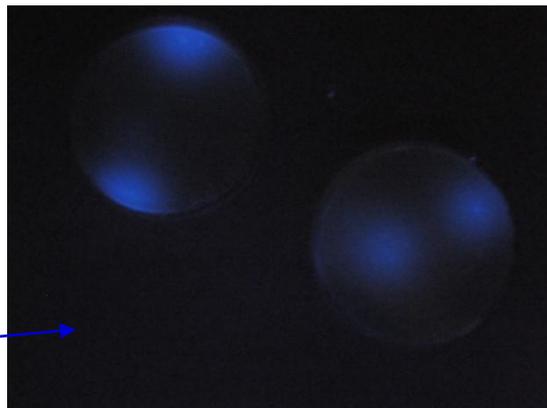
resultados a favor del método P/A Clostricult, están disponibles para quienes nos la soliciten.

4-c) Para muestras de 50/100ml de agua y seguirles la corriente a los poderosos ortodoxos que legislan y siguen diciendo que 0 ufc/100 mL no equivale a ausencia en 100 mL, Microkit, siguiendo la filosofía DryPlates con Hidragar pero para 100 ml de muestras en vez de 1 ml, ha patentado el método “**Quanti-P/A**” en bolsa hermética para recuento de colonias de clostridios (un kit para *C.perfringens* y otro para Clostridios sulfito-reductores) en 50/100 mL de agua, también útil para 1 g de muestra



(previamente disuelta en 100 mL de FTM o incluso de otro caldo diluyente). Los resultados son espectaculares con respecto a la MF con placa de TSC, incluso mejores que para P/A Clostricult y, cómo no, los ortodoxos dicen que el método no permite identificar las colonias con la fosfatasa ácida cancerígena (lo cual es tan falso como innecesario y hasta insultante en RRLL para el analista, como ya vimos en el apartado 4-a de los tubos).

Confirmación de colonias sospechosas. Los métodos más usados son diferentes galerías de identificación, cuya base de datos, meramente clínica, provoca numerosos errores, máxime cuando en realidad debemos ir en busca de una cepa concreta, y no de ponerle nombre y apellidos a todas las cepas que encontremos (esa es precisamente la diferencia entre confirmación e identificación). Los seguidores a rajatabla de la ISO de aguas usan los reactivos cancerígenos de la fosfatasa ácida, otros se acogen a la anterior prueba desde m-CP y otros intentan validar el MUP (colonias fluorescentes), cuyo principal inconveniente es su inestabilidad una vez añadido a la placa de TSC. Los pioneros que prefieren seguir su propio criterio, emplean las pruebas que dice la ISO de alimentos: incluso muchos laboratorios de aguas vuelven de la patética fosfatasa ácida, a la prueba Lactosa-Gelatina-Nitratos-Movilidad que sigue confirmando categóricamente a *C.perfringens*.



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

Si empresas como Microkit no fuesen PIMEs y los métodos alternativos (que hemos descrito en el capítulo 4, como nuestra aportación en diseño en los últimos 30 años a este capítulo de los anaerobios); no requiriesen de cientos de miles de € para ser “aprobados oficialmente”, ya habría una Norma ISO que exigiría el uso de “Quanti-P/A-TSC” para recuento de *Clostridium perfringens* en 100 mL de agua y mencionaría la patente de Microkit y nuestra dirección, para que ningún competidor intentase copiarnos el método, como sucede en otros parámetros. Nadie apoya el I+D de las Pymes españolas, por lo que seguirá habiendo un gravísimo problema de detección en un parámetro tan importante como indicador para el que ningún otro parámetro sirve, y para el que ya existen estas alternativas de resultados magníficos.