

CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS
Análisis microbiológico. Recuento de Clostridium
perfringens

COGUANOR
NGO 34 125 h26

1. OBJETO

La presente norma tiene por objeto establecer el método para el recuento de Clostridium perfringens en la carne y productos cárnicos.

2. NORMAS COGUANOR A CONSULTAR

Para la aplicación de la presente norma guatemalteca no es necesaria la consulta específica de ninguna otra.

3. TERMINOLOGIA

3.1 Clostridium perfringens. Son las bacterias que forman colonias de color negro en el medio selectivo cuando el análisis se realiza de acuerdo con el método descrito en la presente norma.

3.2 Recuento de Clostridium perfringens. Es la determinación del número de bacterias de Clostridium perfringens viables y confirmadas, por gramo de carne o sus productos, cuando el análisis se realiza de acuerdo con el método descrito en la presente norma.

4. PRINCIPIO DEL METODO

Se pica la carne o sus productos, se macera con un diluyente estéril en un mezclador mecánico y se preparan diluciones decimales del macerado. Se pone una cantidad apropiada de cada dilución en cajas de Petri, se mezcla con un medio selectivo (técnica del mezclado en placa) y se incuban las placas entre 35 y 37°C, durante 20 a 24 h.

A partir del número de colonias de color negro que aparecen sobre las placas, se calcula el número de bacterias de Clostridium perfringens presuntivo por gramo de carne o sus productos. Se someten las colonias a un procedimiento de confirmación y se calcula el número de bacterias de Clostridium perfringens confirmado por gramo de producto.

5. MEDIOS DE CULTIVO, DILUYENTES Y REACTIVOS

5.1 Materiales básicos. Para obtener resultados uniformes, se recomienda emplear bien sea los componentes deshidratados de los medios de cultivo de calidad uniforme y productos químicos de calidad analítica reconocida, o bien, los medios completos deshidratados. El agua debe ser destilada o de pureza equivalente.

Nota. Para ajustar el pH de las soluciones y medios indicados en la presente norma, pueden emplearse soluciones aproximadamente 6N de ácido clorhídrico o de hidróxido de sodio, según corresponda.

Continúa

5.2 Agar sulfito-cicloserina (SC).5.2.1 Medio Basal.

Triptosa	15 g
Soytona	5 g
Extracto de levadura	5 g
Citrato férrico amónico	1 g
Metabisulfito de sodio anhidro (Na ₂ S ₂ O ₅)	1 g
Agar	20 g
Agua	1 000 cm ³

Se disuelven en el agua hirviendo con agitación, los componentes del medio base excepto el agar, se ajusta el pH a $7,6 \pm 0,1$ a 25°C, se agrega el agar y se calienta para disolverlo; se transfiere el medio base a tubos o matraces de no más de 500 cm³ de capacidad, se esteriliza en autoclave durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ y se almacena en refrigeradora entre 4 y 5°C. Se deben descartar los medios que tengan más de 2 semanas de preparados.

5.2.2 Solución de D-cicloserina.

D-cicloserina (se debe usar sólo el polvo blanco cristalino)	4 g
Agua	100 cm ³

Se disuelve la D-cicloserina en el agua y se esteriliza la solución por filtración bacteriológica.

5.2.3 Medio completo. Inmediatamente antes de preparar las placas (véase el numeral 8.3.1), se agrega 1 cm³ de la solución de D-cicloserina esterilizada (véase el numeral 5.2.2) a cada 100 cm³ de medio basal (véase el numeral 5.2.1) esterilizado, fundido y enfriado entre 45 y 50°C.

5.3 Medio de movilidad-nitrato, suplementado.

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Nitrato de potasio (KNO ₃)	1,0 g
Galactosa	5,0 g
Glicerol	5,0 g
Agar	3,0 g
Agua	1 000 cm ³

Se disuelven en el agua hirviendo los componentes del medio y se ajusta el pH a $7,3 \pm 0,1$ a 25°C. Se transfieren cantidades de 13 cm³ del medio a tubos con tapa roscada y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Si no se usa el mismo día, se debe almacenar en refrigeradora entre 4 y 5°C; antes de usar se afloja ligeramente la tapa, se elimina el oxígeno del medio almacenado calentándolo, en un baño de agua a ebullición, durante 10 min, se aprieta la tapa y luego se lo enfría rápidamente, sin agitación, hasta la temperatura de incubación. Se deben descartar los tubos que no se hayan utilizado después de 4 semanas.

5.4 Medio tioglicolato fluído.

Tripticasa ó casitona	15,0 g
L - cistina	0,5 g
Dextrosa	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Tioglicolato de sodio	0,5 g
Resazurina en solución al 0,1%	1,0 cm ³
Agar	0,75 g
Agua	1 000 cm ³

Continúa

Se disuelven en el agua hirviendo los componentes del medio, se enfría entre 50 y 60°C y se ajusta el pH de manera que después de la esterilización sea $7,1 \pm 0,1$ a 25°C. Se distribuye en tubos con tapa roscada, que contienen 0,1 g de carbonato de calcio, en porciones de 10 cm³ en cada uno, se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 min y se enfrían rápidamente. Inmediatamente antes de usar se afloja ligeramente la tapa de los tubos, se calientan éstos en una corriente de vapor durante 10 min para eliminar el oxígeno disuelto, se aprieta la tapa y luego se enfrían rápidamente bajo agua del chorro.

5.5 Medio lactosa - gelatina.

Triptosa	15 g
Extracto de levadura	10 g
Lactosa	10 g
Fosfato ácido disódico (Na ₂ HPO ₄)	5 g
Rojo fenol (δ 5 cm ³ de solución al 1%)	0,05 g
Gelatina	120 g
Agua	1 000 cm ³

Se disuelven en el agua los ingredientes del medio, excepto la gelatina, se ajusta el pH a $7,5 \pm 0,1$, se agrega la gelatina y se calienta para disolverla; se distribuye en tubos de ensayo con tapa roscada en porciones de 13 cm³ en cada uno y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Inmediatamente antes de usar se afloja ligeramente la tapa de los tubos, se calientan éstos en baño de agua hirviendo durante 10 min, se aprieta la tapa y luego se enfrían rápidamente hasta la temperatura de incubación. Los tubos pueden ser guardados a 4°C. Se deben descartar los medios que tengan más de 4 semanas de preparados.

5.6 Solución diluyente de peptona con sal.

Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1 000 cm ³

Se disuelve la peptona deshidratada y el cloruro de sodio en el agua hirviendo y se ajusta el pH a $7,0 \pm 0,1$ a 25°C. Una parte se distribuye en frascos para la maceración en cantidades de 100 a 300 cm³ y el resto en tubos o matraces pequeños de manera que después de la esterilización cada uno contenga 9,0 cm³; se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

5.7 Reactivo para detectar la producción de nitrito.

5.7.1 Solución de ácido 5 amino - 2 naftileno sulfónico (5-2 ANSA). Se disuelve 0,25 g de 5-2 ANSA en 100 cm³ de solución al 15% (v/v) de ácido acético glacial y se filtra la solución a través de papel de filtro de doble lavado ácido, muy bajo en ceniza y de filtración cuantitativa rápida (1).

5.7.2 Solución de ácido sulfanílico. Se disuelve 1,0 g de ácido sulfanílico en 125 cm³ de solución 5 N de ácido acético glacial. Si es necesario se filtra la solución a través de papel filtro con las características indicadas anteriormente.

5.8 Zinc, en polvo.

6. APARATOS

6.1 Aparatos generales.

6.1.1 Balanza de laboratorio, con una sensibilidad de 0,1 g

(1) El papel filtro Whatman No. 41 es apropiado.

6.1.2 Máquina de moler o picar carne, tamaño de laboratorio, esterilizable, equipada con placa cribada con orificios de diámetro no mayor de 4 mm.

6.1.3 Mezclador mecánico, que opere a no menos de 838 rad/s (8 000 revoluciones por minuto) y a no más de 4 700 rad/s (45 000 revoluciones por minuto), con vasos mezcladores de metal o de vidrio con su tapa, de una capacidad apropiada, y que sean resistentes a las condiciones de esterilización.

6.1.4 Aparatos para esterilización, en seco (estufas) o en húmedo (autoclave). Los aparatos y material que entren en contacto con los medios de cultivo, el macerado y sus diluciones o la muestra, excepto los aparatos que se adquieren ya esterilizados (en especial material plástico), se los debe esterilizar como se indica en el numeral 6.4).

6.1.5 Incubadora, regulada a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.1.6 Incubadora, con una mezcla gaseosa de 5% de dióxido de carbono, 10% de hidrógeno y 85% de nitrógeno con una bomba de vacío o trompa de agua. Alternativamente, puede emplearse un recipiente cilíndrico anaerobio provisto de sobre generador de hidrógeno y dióxido de carbono para establecer condiciones anaerobias dentro del recipiente cilíndrico; para eliminar el agua que se forma, en el fondo de dicho recipiente se coloca CaSO_4 anhidro u otro desecante efectivo.

6.1.7 Gabinete de secado o incubadora, calentado por convección, regulado a $50 \pm 1^\circ\text{C}$, o un gabinete de flujo de aire laminar, para secar la superficie de las placas de agar.

6.2 Material de vidrio de laboratorio. El material de vidrio debe ser resistente a esterilizaciones repetidas (vidrio al borosilicato).

6.2.1 Tubos y frascos de cultivo, con tapa roscada.

6.2.2 Pipetas graduadas, con tapón de algodón, calibradas para uso bacteriológico, con una capacidad nominal de 1,0 y 10 cm^3 , subdivididas en 0,1 y 1,0 cm^3 respectivamente, y con abertura de descarga de 2 a 3 mm de diámetro.

6.2.3 Cajas de Petri, de vidrio, con las siguientes dimensiones:

- a) Diámetro interno de la caja, 90 ± 2 mm;
- b) Altura externa de la caja, no menor de 18 mm;
- c) El borde de la caja debe estar en un plano paralelo a la base;
- d) El fondo de la caja debe ser plano y paralelo a la base;
- e) Diámetro externo de la tapa, no más de 102 mm.

Nota. Se pueden usar también cajas de Petri de plástico desechables, preesterilizadas, aún cuando tengan pequeñas diferencias en sus dimensiones.

6.3 Medidor de pH, para ajustar el pH de los medios y reactivos con una exactitud de $\pm 0,1$ unidades de pH a 25°C .

6.4 Esterilización del material de vidrio, u otros materiales. El material de vidrio se esteriliza por uno de los siguientes métodos:

- a) esterilización húmeda a no menos de 121°C durante no menos de 20 min;
- b) esterilización seca a no menos de 170°C durante no menos de 1 h.

Continúa

6.5 Aparato para esterilización por filtración bacteriológica.

7. MUESTREO

Se parte de una muestra representativa de por lo menos 200 g tomada en forma aséptica y envasada en un envase estéril. Esta muestra puede ser almacenada en el laboratorio a una temperatura de 0 a 4°C, pero durante un tiempo no mayor de 24 h.

8. PROCEDIMIENTO

8.1 Pretratamiento de la muestra. En forma aséptica se muele y mezcla la muestra dos veces en la máquina de moler carne previamente esterilizada. Se comienza el análisis de la muestra, previamente molida, lo antes posible; si es necesario puede almacenarse la muestra a una temperatura entre 0 y 5°C, pero durante un tiempo no mayor de 1 h.

8.2 Maceración y dilución.

8.2.1 En un vaso mezclador estéril se pesan con una aproximación de 0,1 g, alrededor de 25 g de carne o producto cárnico molidos (véase el numeral 8.1), y luego se agrega 9 veces la cantidad, en masa, de la solución diluyente (véase el numeral 5.6). Se opera el mezclador justamente el tiempo necesario para alcanzar un número total de 1 600 a 2 100 rad/s (15 000 a 20 000 revoluciones por minuto); aún con el mezclador más lento, este tiempo no excederá de 2,5 min. Esta preparación corresponde a la dilución 10^{-1} .

8.2.2 Inmediatamente después de la maceración, se toman por duplicado porciones de 1 cm³ del macerado (véase el numeral 8.2.1) con una pipeta estéril y se agrega cada porción a un tubo o frasco de cultivo que contenga 9 cm³ de la solución diluyente estéril (véase el numeral 5.6), evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

8.2.3 Se mezclan los líquidos cuidadosamente agitando cada dilución 25 veces en arco de 30 cm durante 7 s. Se transfiere con una pipeta 1 cm³ de esta dilución (10^{-2}) a otro tubo de dilución que contenga 9 cm³ de la solución diluyente estéril, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

8.2.4 Se mezclan los líquidos como se indica en el numeral anterior y luego se repiten las operaciones tres veces más para alcanzar el número de diluciones requeridas, hasta 10^{-6} . No debe transcurrir un tiempo mayor de 15 min entre la dilución de la muestra y su inoculación en las placas.

8.3 Inoculación e incubación.

8.3.1 Con una pipeta esterilizada se transfiere por duplicado al centro de sendas cajas de Petri, 1 cm³ de cada dilución preparada (10^{-1} a 10^{-6}) luego se vierten dentro de cada caja 20 cm³ de agar SC (véase el numeral 5.2) fundido y previamente enfriado a aproximadamente 45°C, y se mezcla bien con el inóculo por rotación cuidadosa de la placa. Cuando el medio haya solidificado, se colocan las placas sin invertir, dentro de la incubadora o recipiente cilíndrico anaerobio (véase el numeral 6.1.6), haciendo el vacío y reemplazo de la mezcla gaseosa dos veces, y se incuban bajo condiciones anaerobias entre 35 y 37°C durante 20 a 24 h.

Nota. Una incubación más larga puede dar lugar a un ennegrecimiento excesivo en el fondo de las placas.

8.4 Recuento de las colonias presuntivas.

Continúa

8.4.1. Al final del período de incubación (véase el numeral 8.3.1) se seleccionan las placas que contengan estimativamente 20 a 200 colonias de color negro y se cuenta el número de colonias características en las placas, de acuerdo con los numerales 8.4.2, 8.4.3 y 8.4.4, las cuales presuntivamente son de Clostridium perfringens.

8.4.2 Si las dos placas correspondientes a una dilución dada contienen entre 20 y 200 colonias características, se cuentan esas colonias en cada placa y se registra la media aritmética de las dos placas. Si solamente una de las placas cumple con tal condición, se registra únicamente el conteo de dicha placa.

Se utilizan solo dos cifras significativas, procediendo del siguiente modo:

- a) Si el número es menor de 100, se redondea al múltiplo de 5 más cercano;
- b) si el número es mayor de 100 y termina en 5, se redondea al múltiplo de 20 más cercano;
- c) si el número es mayor de 100 y no termina en 5, se redondea al múltiplo de 10 más cercano.

8.4.3 Si hay placas que contienen entre 20 y 200 colonias características en dos diluciones consecutivas, se cuentan las colonias características en cada placa de dichas diluciones, se determina la media aritmética del recuento de las dos placas de cada una de las dos diluciones como se especifica en el numeral 8.4.2, y se registran los valores promedios obtenidos para cada dilución.

8.4.4 Si hay menos de 20 colonias características en las placas de todas las diluciones, se debe contar el número de colonias características en cada placa de la dilución más baja y se registra la media aritmética del recuento en las dos placas.

8.4.5 Si no hay colonias en las placas de todas las diluciones, tal situación se indica con la expresión "No se observan colonias".

8.5 Confirmación de las colonias presuntivas.

8.5.1 Selección de las colonias para confirmación. Se seleccionan al azar un total de 10 colonias de color negro de las placas contadas de acuerdo con los numerales 8.4.2, 8.4.3 u 8.4.4. Si hay menos de 10 colonias características en las placas duplicadas, se seleccionan todas las colonias características presentes.

8.5.2 Confirmación bioquímica.

8.5.2.1 Se inoculan picando hasta el fondo directamente en los medios de lactosa gelatina (véase el numeral 5.5) y de movilidad nitrato (véase el numeral 5.3), las colonias típicas y bien separadas, se tapan herméticamente los tubos y se incuban entre 35 y 37°C durante 24 h; esta incubación no requiere condiciones anaerobias.

Nota. Antes de usar los medios lactosa gelatina y movilidad nitrato, se debe eliminar el oxígeno que puedan contener, véase numerales 5.3 y 5.5.

8.5.2.2 Si las placas están cubiertas (crecimiento confluyente) o contienen numerosas colonias atípicas u ocurren ambas cosas, se inoculan 10 colonias en el medio tioglicolato fluido (véase el numeral 5.4); se incuban entre 35 y 37°C durante 18 a 24 h, se aíslan los cultivos en placas SC y se incuban anaeróbiamente entre 35 y 37°C durante 18 a 24 h. Si es necesario se repite el procedimiento hasta que se obtengan colonias típicas y bien aisladas y se procede a realizar los análisis de confirmación como se indicó anteriormente.

Continúa

8.5.2.3 Se examinan los tubos con medio movilidad-nitrato para determinar si hay crecimiento a lo largo de la línea de la picadura, lo cual se considera como desarrollo no móvil, y se procede en la forma siguiente:

- a) En cada uno de los tubos que presentan dicho desarrollo se determina la presencia de nitrito, adicionando aproximadamente $0,1 \text{ cm}^3$ de cada uno de los reactivos indicados en el numeral 5.7 ó $0,2 \text{ cm}^3$ de una mezcla (1+1) de dichos reactivos; la producción de un color rosado o rojo denota la presencia de nitrito.
- b) Si no aparece un color rosado o rojo dentro de los 15 min siguientes, se agrega una pequeña porción de zinc en polvo y se espera 10 min; si después de la adición del zinc aparece un color rojo, significa que no tuvo lugar una reducción bacteriana del nitrato y por lo tanto el análisis es negativo, pero si no da color rojo significa que el cultivo sí redujo el nitrato completamente a nitrógeno o a amonio y por lo tanto el análisis es positivo.
- c) Si el desarrollo está limitado a la parte inferior del tubo y se produce una leve o ninguna coloración, se extrae la parte superior del contenido del tubo con una pipeta y se repite la adición de los reactivos antes indicados.

8.5.2.4 Se examinan los tubos con lactosa gelatina para detectar la formación de gas y cambio de color del rojo al amarillo; la producción de gas y color amarillo indica fermentación de la lactosa con formación de ácido. Se enfrían los tubos durante 1 h a 5°C y se detecta si hay licuefacción de la gelatina; si el medio se solidifica, se reincuban los tubos a 35°C durante 24 h adicionales y luego se detecta la licuefacción de la gelatina como se indicó anteriormente.

8.5.3 Interpretación.

8.5.3.1 Los bacilos (bastones) no móviles, que producen colonias de color negro en el medio SC, reducen el nitrato a nitrito, producen ácido y gas con la lactosa, y licúan la gelatina en 48 h, se registran como Clostridium perfringens confirmados.

Nota. Ocasionalmente un cultivo que muestre ser no móvil y dé una traza o una reacción dudosa de nitrato, podría pensarse que es Clostridium perfringens; por ejemplo, el Clostridium sardiniensis es débilmente móvil y, a menos que el ensayo de movilidad se haya observado cuidadosamente, podría considerarse erróneamente "no móvil". Por otra parte, cultivos de Clostridium perfringens que muestren solamente trazas de nitritos podrían no ser tomados como tales ya que dichos cultivos producen una reacción inmediata e intensa.

8.5.3.2 En el caso de que una colonia seleccionada, al ser sometida a los análisis confirmatorios que anteceden, dé resultados dudosos, se procederá a realizar los análisis de reconfirmación que se indican en el Anexo de la presente norma.

9. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

9.1 Cálculo para placas que contienen 20 a 200 colonias.

9.1.1 Se calcula el número de bacterias de Clostridium perfringens por gramo de muestra para cada dilución, sobre la base del porcentaje de colonias contadas y registradas en los numerales 8.4.2 u 8.4.3 que resultaron confirmadas como Clostridium perfringens (véase el numeral 8.5.3.1).

Continúa

9.1.2 Ejemplos:

- a) Si la media de los recuentos de colonias en las placas sembradas con la dilución 10^{-2} de la muestra fue registrada como 75 de acuerdo con el numeral 8.4.2, y siete de las diez colonias analizadas (70%) fueron confirmadas como Clostridium perfringens, el número de bacterias positivas en la muestra se informa como "5 000 bacterias de Clostridium perfringens por gramo de producto". Dicho valor se obtiene en la forma siguiente: $75 \times 0,70 = 52,5$ el cual se redondea a 50; luego éste se multiplica por el valor recíproco de la dilución usada, o sea $50 \times 100 = 5\ 000$.
- b) Si de acuerdo con el numeral 8.4.3 las medias de los recuentos de dos diluciones consecutivas fueron registradas como 180 para la dilución 10^{-2} y 22 para la dilución 10^{-3} , y cinco de las diez colonias analizadas fueron confirmadas como Clostridium perfringens, se realizan los siguientes cálculos:
- $180 \times 0,50 = 90$; luego, $90 \times 100 = 9\ 000$
 - $22 \times 0,50 = 11$; luego, $11 \times 1\ 000 = 11\ 000$
 - Se promedian ambos resultados y se informa como "10 000 bacterias de Clostridium perfringens por gramo de producto".

Nota. Si la relación entre el valor más alto y el más bajo es mayor que 2, se informa solo el valor más bajo de los dos; es decir, si con la dilución 10^{-2} se llegara a un valor final de 14 000 y con la dilución 10^{-3} se llegara a un valor de 32 000, lo cual da una relación $32\ 000/14\ 000 = 2,28$, se descarta el valor de 32 000 y solamente se informa como "14 000 bacterias de Clostridium perfringens por gramo de producto".

9.2 Cálculo para placas que contienen menos de 20 colonias. Para las placas que contienen menos de 20 colonias por placa, se informa como menos de 20 por el valor recíproco de la dilución más baja usada.

9.2.1 Ejemplo.

- a) Si la media de los recuentos de colonias se registró como 12 de acuerdo con el numeral 8.4.4 (es decir menos de 20), la primera dilución fue 10^{-1} , y una o más de las diez colonias analizadas se confirmaron como Clostridium perfringens, el número de bacterias positivas en la muestra se informa como "Menos de 200 bacterias de Clostridium perfringens por gramo de producto". Dicho valor se obtiene en la forma siguiente: menos de 20 por el valor recíproco de la primera dilución o sea: menos de $20 \times 10 =$ menos de 200

9.3 Ausencia de colonias en las placas. Si no aparecen colonias en las placas de todas las siembras de las diversas diluciones, el número de Clostridium perfringens por gramo de producto se informa como menos de 1 por el valor recíproco de la dilución mas baja usada.

9.3.1 Ejemplo.

- a) Si no aparecieron colonias en las placas de todas las diluciones usadas y la menor dilución usada fue 10^{-1} , el número de bacterias se informa como "Menos de 10 bacterias de Clostridium perfringens por gramo de producto". Dicho valor se obtiene en la forma siguiente: menos de 1 por el valor recíproco de la primera dilución o sea: menos de $1 \times 10 =$ menos de 10.

Continúa

10. INFORME DEL ENSAYO O ANALISIS

En el informe del análisis se debe indicar el método empleado y el resultado obtenido. Debe mencionar también todas las condiciones de operación no especificadas en esta norma o señaladas como opcionales así como cualquier circunstancia que pueda haber influido en el resultado.

El informe debe incluir los detalles requeridos para una completa identificación de la muestra.

11. CORRESPONDENCIA

Para la redacción de la presente norma se tomaron en cuenta:

- a) "Microorganisms in Foods. Their significance and methods of enumeration; second edition, of the International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF), University of Toronto," 1978; y
- b) Anteproyecto de Norma de la Comisión Panamericana de Normas Técnicas COPANT 39:1-023 Carne y sus productos. Recuento de Clostridium perfringens. Método de referencia.

12. ANEXO

12.1 Análisis de reconfirmación.12.1.1 Reactivos o materiales.12.1.1.1 Agar triptosa-sulfito-cicloserina (agar TSC).a) Medio basal.

Triptosa	15 g
Soytona	5 g
Extracto de levadura	5 g
Citrato férrico amónico	1 g
Metabisulfito de sodio	1 g
Agar	20 g
Agua	900 cm ³

Se disuelven los ingredientes en el agua hirviendo con agitación, hasta obtener una solución completa; se ajusta el pH a $7,6 \pm 0,1$, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 10 min y se enfría entre 45 y 50°C .

b) Medio completo. A los 900 cm³ del medio basal se agregan 4 cm³ de una solución al 10% de D-cicloserina esterilizada por filtración bacteriológica y 100 cm³ de emulsión de yema de huevo.

Nota 1. Debe usarse solo el polvo blanco cristalino de la D-cicloserina.

Nota 2. La emulsión de yema de huevo puede obtenerse en el comercio, o bien prepararse con yema fresca obtenida de huevos que tengan su cáscara intacta y estén libres de antibióticos, procediéndose en la forma siguiente:

Se lavan con un cepillo las cáscaras de los huevos utilizando agua ligeramente más tibia que la temperatura de los huevos, se los sumerge en una solución acuosa al 1% de cloruro mercuríco, también un poco más tibia que los huevos, y se secan con una toalla estéril.

Continúa

Se quiebran los huevos en forma aséptica, se hacen rodar las yemas sobre la toalla estéril para remover las trazas de clara y luego se las coloca en una probeta estéril, graduada, provista de tapón.

Se agrega a la probeta igual volumen de una solución acuosa al 0,85% de cloruro de sodio, previamente esterilizada en un autoclave a 121°C durante 15 min, y se mezcla bien. La emulsión debe usarse inmediatamente. (El cloruro mercúrico residual debe descartarse con las precauciones necesarias para evitar la contaminación de los desagües y efluentes).

12.1.1.2 Antitoxina tipo A de Clostridium perfringens, o antitoxina de diagnóstico polivalente de Clostridium perfringens.

12.1.1.3 Agar de sangre de oveja.

a) Medio basal.

Extracto de carne	10 g
Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
Agua	1 000 cm ³

Se suspenden los ingredientes en el agua, se mezcla bien y se hierve con agitación frecuente hasta obtener una disolución completa; se enfría entre 50 y 60°C y se ajusta el pH de manera que después de la esterilización sea 7,2 ± 0,2. Se distribuye el medio en porciones de 100 cm³ y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

b) Medio completo. Se enfría a 45°C el medio basal esterilizado y a cada 100 cm³ se le agregan, 5 a 7 cm³ de sangre estéril desfibrinada de oveja; se mezcla completamente y se vierte en porciones de 15 a 20 cm³ en placas de Petri que contienen 10 cm³ del medio basal solidificado. Se seca la superficie de las placas antes de usarlas, colocándolas en un horno calentado por convección o incubadora, regulada a 50°C, durante 30 min, con las tapaderas removidas y las superficies de agar hacia abajo. Las placas deben almacenarse entre 5 y 8°C hasta que sean requeridas.

12.1.2 Aparatos.

12.1.2.1 Asa circular.

12.1.2.2 Incubadora, regulada entre 35 y 37°C.

12.1.3 Procedimiento.

12.1.3.1 Reacción de yema de huevo.

- Se traza una línea central bajo las placas preparadas de agar TSC (véase el numeral 12.1.1.1.) y con el asa circular se distribuye 0,05 cm³ de la antitoxina tipo A o bien de la antitoxina polivalente, de Clostridium perfringens, sobre una mitad de la placa y se deja secar.
- Comenzando desde el lado sin antisuero se rayan 3 cultivos, apropiadamente espaciados, a través de las dos mitades de la placa y luego se incuban entre 35 y 37°C durante 20 a 24h.
- Debido a la producción de α -toxina (lecitinasas C), las bacterias de Clostridium perfringens producen una zona opaca alrededor de las rayas; esta actividad es neutralizada en la mitad de la placa que contiene el antisuero.

Continúa

12.1.3.2 Reacción de hemólisis.

- a) Se rayan 3 cultivos, apropiadamente espaciados, sobre la superficie seca de placas de agar de sangre de oveja, y se incuban entre 35 y 37°C durante 20 a 24 h.
- b) Sobre el agar de sangre de oveja las cepas producen una de las siguientes reacciones:
- Una zona interior con hemólisis completa, debido a la teta toxina, y una zona exterior con hemólisis parcial debido a la alfa toxina; o
 - Una zona solamente con hemólisis parcial.

- ULTIMA LINEA -