

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

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

Quanti-P/A Clostricult

Recuento de *Clostridium perfringens* y/o de Clostridios sulfito-reductores en 1 g, 50 ml, 100 ml ó 250 ml de muestra

Quanti-P/A-Clostricult-TSC para detección y recuento fiables de *Clostridium perfringens* en 100 ml de muestra de aguas potables o en 1 gramo/ml de muestra de alimentos. Ref: QPA-CP (caja 20 u)

Quanti-P/A-Clostricult-SPS para detección y recuento fiables de Clostridios sulfito-reductores en 1 gramo/ml de muestra de alimentos/cosméticos o en 50 ml de muestra de aguas envasadas. Ref: QPA-CSR (caja 40 u)

Clostridium perfringens es un anaerobio estricto que por el método destructivo de filtración de membrana, aunque sea el método oficial, ve reducida su concentración a niveles inaceptables (baja al 10% e incluso al 1% respecto al valor inóculo, cuando debería recuperarse al menos un 50-95 % del valor inóculo) y además es incapaz de ofrecer una sensibilidad adecuada (el 49% de las aguas con este microorganismo, casi la mitad, dan falso negativo con dicho sistema, cuando deberían dar como máximo un 5% de falsos negativos; y no sólo con el medio de la Directiva 2003 de aguas de consumo, el Agar m-CP, también con el medio de la Nueva Directiva 2015 de aguas de consumo, el Agar TSC).

Por otra parte el sistema DryPlates para recuento de microorganismos, por inclusión en masa de 1 ml de muestra, sin necesidad de calentar/enfriar agares, no puede emplearse en anaerobios estrictos, porque la fina capa de medio los oxigena demasiado. Desde la invención de las DryPlates en 2014, MICROKIT ha estado intentando encontrar el método idóneo para hacer recuentos de *Clostridium perfringens* y de Clostridios sulfito-Reductores en 1 ml de muestra de alimento o cosmético, en 50 ml de aguas envasadas y en 100 ml de aguas de consumo humano. Y tras 3 años, en Junio de 2017 por fin lo ha conseguido! Damos la bienvenida al futuro a los pioneros, con criterio propio, que no se dejan cegar por la ortodoxia normativa! Sin duda pasarán años hasta que este nuevo método sea el oficial, pero de ninguna manera eso significa que no deba emplearlo desde ya y adelantarse al futuro normativo, que siempre es tan lento. La fiabilidad de resultados es lo más importante. Y actualmente, esta fiabilidad está gravemente comprometida en los recuentos de anaerobios.



8 ufc Quanti-P/A-CP incubando sólo 24h con 2 errores: sin haber extraído previamente el aire ni haber planchado

Empleando el mismo hidragar de las DryPlates diseñado y patentado por MICROKIT, mezclado con el medio de cultivo TSC (QPA-CP para *Clostridium perfringens*) o SPS (QPA-CSR para Clostridios sulfito-reductores) en bolsas transparentes, rígidas y herméticas, con tapón a rosca, se consigue una **recuperación muy cercana al 100%** del valor inóculo y una **sensibilidad también muy cercana al 100%** de las muestras realmente positivas. Hemos bautizado este **nuevo método** patentado por MICROKIT con el nombre Quanti P/A, porque utilizamos los mismos caldos P/A que diseñamos hace décadas, pero con el hidragar de las DryPlates para poder hacer recuentos.

Se añaden como ventajas a la **fiabilidad** mediante estos excelentes resultados, la **comodidad** del método (**ahorro de filtraciones de membrana**, que además son destructivas para las células subletales; **siembra en masa sin necesidad de calentar y enfriar agares**) y su extraordinaria **caducidad (3 años desde fabricación)**. Además, **se ahorra el empleo de jarras y de costosas atmósferas de anaerobiosis**, ya que se incuba hermético en ausencia de aire (semivacío).

El **Agar TSC** es el medio Normativo para análisis de *Clostridium perfringens*, tanto en muestras de alimentos (ISO 13401), como de aguas de consumo humano (ISO 14189).

El **Agar SPS** es el medio Normativo (AOAC) para análisis de Clostridios sulfito-Reductores, tanto en muestras de alimentos, como de aguas envasadas.

¡Enhorabuena por utilizar el mejor método para recuento de anaerobios en aguas (o en alimentos y cosméticos) sin necesidad de calentar/enfriar agares, sin oxigenar por filtración y sin necesidad de atmósferas de anaerobiosis, sustituto del Siglo XXI de los medios deshidratados, de los medios preparados hidratados en tubo, frasco o botella y del método destructivo de Filtración de Membrana!

VER FOTOGRAFÍAS EXPLICATIVAS EN FOLLETO ANEXO

148 ufc Quanti-P/A-CSR incubando en exceso (48 h): colonias ya englobándose unas a otras. Su aspecto no es el más ortodoxo, pero lo importante es que es el método que mejores resultados obtiene en recuento de anaerobios.



MODO DE EMPLEO (ver tutorial en <https://www.youtube.com/watch?v=A8WifR8mZ1k>):

1) para detección y recuento de *Clostridium perfringens* y sus esporas en 100 ml de muestra de aguas de consumo humano:

1. Tome un Quanti-P/A-CP, dele la vuelta para que el medio salga del fondo, doble el fondo de la bolsa para que no vuelva a depositarse allí, ponga la bolsa vertical con el fondo doblado, abra el tapón y añada por el orificio, con pulso para evitar derrames, 100 ml de la muestra de agua (tratada con Na TioSulfato si es clorada). Si lo que busca son esporas, caliente el agua de muestra a 75 °C antes de añadirla al kit. Lo ideal es analizar una muestra de 100 ml a temperatura ambiente para formas vegetativas y un duplicado de 100 ml de la misma muestra a 75°C para esporas. Los eventuales artefactos negros, púrpura o rosados no afectan los resultados: son de contorno irregular, no crecen al incubar, es más: desaparecen, a diferencia de las colonias. Apriete para que el agua llegue casi al borde del tapón y quede muy poco aire.
2. Cierre con fuerza el tapón. Amase el conjunto con las dos manos unas 10-30 veces (o bien con stomacher-masticator) para mezclar el medio con los 100 ml de muestra de agua. Si queda polvo o algún grumo de más de 1 cm, pellízquelo hasta que se disuelva o parta. No se preocupe por los pequeños grumos que queden, desaparecerán durante la incubación. Cuanto mejor amase mejores resultados obtendrá, al separar mejor las ufc. Aplane la bolsa contra la poyata y planche el medio hidratado con la muestra, en toda la superficie interna de la bolsa, para que la capa de medio sea lo más homogénea y fina posible, y así luego pueda contar mejor las colonias al trasluz. Puede ayudarse con una caja de frascos MICROKIT llena de frascos de 100 mL (peso ideal para el mejor planchado). El agua fría se disuelve peor.
3. Deposite la bolsa horizontal en la estufa de cultivos, verificando que el tapón sigue herméticamente cerrado. Puede apilar numerosas bolsas, alternando su posición (tapones al N en una capa, al S en otra, al E en otra, al W en otra...)
4. Incube 24-48 horas a 35-45°C (a 35°C puede haber falsos positivos de colonias negras de fermentadores facultativos: Staphylococcus, Salmonella, Proteus, Klebsiella, Citrobacter...). Si se prolonga la incubación, las colonias se agrandan, se solapan y en caso extremo todo el medio ennegrece, impidiendo así el recuento que, por este motivo, debe hacerse entre 24 y 48 h desde iniciada la incubación. Si a las 24 h no hay crecimientos, espere a leer a las 48h. Durante la incubación, en caso positivo extremo, la bolsa se podría hinchar del gas generado.
5. Extraiga la bolsa y cuente al trasluz todas las colonias o burbujas negras, que serán el número de ufc de *Clostridium perfringens* en 100 ml de muestra de agua. Cuente primero por una cara y repita el recuento por la otra, ya que el medio es traslúcido: Sume los recuentos de ambas caras evitando contar dos veces la misma colonia. En este sistema se cuentan perfectamente entre 0 y 200 colonias. Puede confirmar las colonias con el kit KMT008 (ISO 6461 y FDA) pinchando a través de la bolsa.

2) para detección y recuento de *Clostridium perfringens* y sus esporas en 1 g ó ml de muestra de alimentos o cosméticos (u otras matrices):

Siga exactamente los mismos pasos descritos en el apartado anterior, con las siguientes salvedades:

1. Mezcle su ml ó gramo de muestra con 100 ml de medio estéril FTM (puede emplear agua peptonada tamponada, Ringer, Solución marina al 0,9 %, agua..., aunque FTM es lo ideal para conseguir los más óptimos resultados en anaerobios).
2. Cuente todas las colonias o burbujas negras, que serán el número de ufc de *Clostridium perfringens* en 1 ml ó gramo de muestra de alimento, cosmético o la matriz que sea (aumenta x10 el límite inferior). En este sistema se cuentan perfectamente entre 1 y 100 colonias.

3) para detección y recuento de *Clostridium sulfito-reductores* en 50-100 ml de muestra de aguas envasadas:

Siga exactamente los mismos pasos descritos en el apartado 1), con las siguientes salvedades:

1. En este caso use la bolsa Quanti-P/A-CSR.
2. Añada 100 ml del agua de muestra (o 50 ml de su agua de muestra más 50 ml de agua estéril) y amase sobre la pila para prevenir posibles derrames. Siga los demás pasos indicados en el apartado 1)
3. Incube 24 horas a 35°C aprox.
4. Cuente todas las colonias o burbujas negras, que serán el número de ufc de *Clostridium sulfito-reductores* en 50-100 ml de agua envasada. En este sistema se cuentan perfectamente entre 1 y 100 colonias.

4) para detección y recuento de *Clostridium sulfito-reductores* en 1 g ó ml de muestra de alimentos o cosméticos (u otras matrices):

Siga exactamente los mismos pasos descritos en los apartados 1) y 3), con las siguientes salvedades:

1. Mezcle su ml o gramo de muestra con 100 ml de medio estéril FTM (puede emplear agua peptonada tamponada, Ringer, Solución marina al 0,9 %, agua..., aunque FTM es la mejor opción en anaerobios). Aumenta x10 el límite inferior de cuantificación, al emplear directamente 1 g de alimento diluido en 100 ml de caldo: leerá ufc/g, no las hasta ahora habituales ufc/0,1 g.

CONSERVACIÓN Y PRECAUCIONES DE USO

Almacenar a temperatura ambiente (ideal 15-25°C) **¡no en nevera!**, ya que en ésta la humedad es más fácil que prehidrate y estropee los medios. Es imprescindible **almacenar en lugar muy seco y oscuro**, ya que la humedad y la luz dañan irreversiblemente los medios de cultivo deshidratados. Si trabaja en zonas de alta humedad atmosférica, almacene las Quanti-P/A, bien cerradas en su bolsa, dentro de una caja hermética "tupper" con sacos antihumedad (ej: VRB747).

Con este sistema, y la destreza que da la experiencia, un analista puede controlar (de la muestra a la estufa incubadora) hasta 50 muestras por hora. También en este mismo método, el Quanti-P/A-Enterocult (QPA-ETC) para recuento de Enterococos fecales (colonias pardas-negras) en 100-250 ml de muestra de agua, conseguido mezclando nuestro clásico P/A Enterocult con Hidragar en este tipo de envase. Para cuantificar Coliformes-*E.coli* y *Pseudomonas aeruginosa* emplee nuestros caldos P/A (MCC Colicult y Pseudocult, respectivamente) en las cubetas NMP. Esto ahorrará los elevados porcentajes de falsos negativos que también implica el método de filtración de membrana en estos tres parámetros (21% en *E.coli*-Coliformes, 6% en Enterococos fecales y 33% en *P.aeruginosa*).

NOTA IMPORTANTE: 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. Validado en base a la Norma UNE-EN-ISO 16140. Exactitud del 87,5 % al 100 % de ufc, en función de lo correctos que sean el amasado-planchado de la muestra al mezclarla con el medio. Precisión de duplicados a 35-45°C, medida en CV: 24,2%. Exclusividad a 45°C: 100%. Inclusividad en muestras no calentadas a 75°C: 100% (no disponíamos de esporas para evaluar a 75°C). Límite inferior de cuantificación: 1-3 ufc/100 ml en muestras tanto frías como calientes (75°C).

Si desea seguir el Reglamento UE 2-2019 que entrará en vigor en 2021 mediante el cual los lobbies del laboratorio han conseguido barrer la innovación que aporta el milagro mediterráneo (la PIME), al exigirnos a los inventores de productos/métodos para industria alimentaria, el invariable pago de cientos de miles de € a AOAC, AFNOR o similar por cada referencia innovadora; nos puede pedir TSC Agar ISO 14189 (Ref: DMT175 en deshidratado, TPL137 en tubo, ECOP44J en Ecoplaclas...), o bien SPS Agar BAM (Ref: DMT116 en deshidratado, TPL089 en tubos, ECOPQ14J en Ecoplaquita MF...) ya que de este modo no es un método alternativo y por tanto ningún inspector ni auditor puede impedirle emplearlo. Aunque perderá el valor añadido del kit: su extraordinario poder de detección sin falsos negativos, su enorme exactitud y precisión, el ahorro de generadores de atmósfera de anaerobiosis.... La mejor solución sería realizar una proporción residual pero razonable de muestras con el medio ISO en formato clásico, para presentar sus informes a inspección de Sanidad, y así poder seguir usando internamente en paralelo este kit en esas y en las demás muestras, para la mejora, fiabilidad y rapidez de sus resultados de autocontrol. A fin de cuentas, este reglamento que corta de cuajo el I+D que no pro venga de multinacionales, no es nada nuevo: los kits de autocontrol nunca han servido para obtener resultados oficiales, pero ayudan a la industria a tomar las mejores decisiones para la rapidez y fiabilidad en la liberación de sus lotes. NADIE puede exigirle que deje de emplear kits diseñados en las 3 últimas décadas para facilitarle su trabajo, con los que obtiene mejores resultados y emplea menos tiempo en su autocontrol, tal y como explica la Norma ISO 17381 sobre la elección de kits de análisis. El reglamento UE 2-2019 es ilegal y quien lo exige, prevarica.

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

Diseñado, Patentado y Fabricado en la UE por MICROKIT bajo ISO 9001, ISO 11133 y GMPs, desde Junio de 2017, texto actualizado en Enero, 2022