

12398 CP *ChromoSelect* Agar (*Clostridium perfringens* *ChromoSelect* Agar; CPC Agar; *Clostridium perfringens* Chromogen Agar)

Un nuevo agar cromogénico para la cuantificación y diferenciación de *Clostridium sp.*, en particular *Clostridium perfringens*, en muestras acuosas. El medio es más fiable que agar m-CP y TSC y de fácil manejo.

Composición:

Ingredientes	Gramos/Litro
Tryptose (vegetable)	20.0
Yeast Extract	15.0
Soy peptone	5.0
Sucrose	3.0
L-Cysteine hydrochloride	1.0
Magnesium sulfate heptahydrate	0.1
Ammonium iron (III) citrate	0.2
Tris buffer	1.8
chromogenic mixture	1.73
Agar	15.0
Final pH 7.4 +/- 0.2 at 25°C	

Almacenamiento: medio preparado debajo de 8°C, proteger de la luz. Polvo deshidratado, en lugar seco y bote cerrado a 2-25°C.

Apariencia: Ligeramente amarillo a marrón, homogéneo, polvo suelto.

Gelificado: firme

Color y Claridad: Color amarillo a marrón claro a ligeramente turbio en forma de gel en la placa Petri.

Dirección:

Suspender 31.42 g en 400 ml de agua destilada y ajustar el volumen a 500 ml. Hervir para disolver completamente. Enfríe a 50-55°C y añada 1 vial de *Perfringens* T.S.C. Supplement (P9352) o 1 vial de M-CP selective Supplement I (Fluka 51962 para agua fuertemente contaminada). Dispense en una placa Petri (recomendamos una pequeña).

Procedimiento experimental:

Recomendamos la técnica de filtración por membrana. El tipo de membrana de filtración puede afectar a la eficacia del medio (tasa de recuperación y color de las colonias) [1]. Incubar: 24 ± 2 horas a 44°C bajo condiciones anaerobias. Después de la incubación, abrir la placa e incubar en condiciones aerobias por 1 h a 44°C. Si las colonias de *C. perfringens* están ya verdes, no necesita más tiempo de incubación.

Principio e interpretación:

CP *ChromoSelect* Agar es un nuevo medio cromogénico especialmente desarrollado para la detección y cuantificación de *Clostridium sp.*, en particular *Clostridium perfringens* en muestras acuosas.

Respecto al medio común, éste tiene la ventaja de no tener difusión en el agar y no requiere confirmación. Las colonias verdes son altamente específicas para *C. perfringens*. Usando mCP agar, las colonias de *C. perfringens* no pueden ser usadas para subcultivos por causa de que Amoniaco y mCP es también selectivo. Las colonias rojas, después de la adición de, amoniaco, desaparecen y no es posible más confirmaciones.

TSC agar detecta todos SRC y está basado en la reducción de sulfito a sulfuro por la acción de la enzima sulfito reductase. Esto es visible en la presencia de hierro como colonias negras rodeadas por un halo negro en medio sólido. Otra desventaja de TSC es, en algunos casos, excesivo ennegrecimiento del agar frustrando el conteo de las más bajas diluciones, incluso aunque bajos números de células fueran esperados. Si la contaminación fuera demasiado alta, TSC no produce consistentemente colonias negras. Cuando el medio llega a ser ácido, sulfuro de hierro no precipitará y desaparecerá a causa del oxígeno, el cual produce falsos negativos.

CP *ChromoSelect* Agar contiene una peptona vegetal que aporta las características nutricionales de la tryptosa. Junto con peptona de soja y extracto de levaduras actúan como una fuente de nitrógeno, carbono, aminoácidos y complejo vitamínico B. Sacarosa es un azúcar fermentable por *Clostridium perfringens* y L-Cysteine hydrochloride es un agente reductor y más bajo potencial de reducción del medio. Sulfato de magnesio heptahidrato es una fuente de iones magnesio requeridos en una

variedad de reacciones enzimáticas, mientras que el citrato de amonio y hierro (III) incrementa las reacciones de fermentación proveyendo iones y sustratos. El pH es estabilizado por tampón Tris, *Cl. perfringens* comienza a ser inhibida por pH 7,6. La mezcla cromogénica contiene sustratos de enzimas, inhibidores y diferentes promotores para proteger daño celular, para mejorar la tasa de recuperación y mejorar el crecimiento.

La adición de suplemento con D-Cycloserina y Polymyxin B hace el medio inhibidor para la flora acompañante non-clostridial y así permitir análisis de células vegetales and y esporas de Clostridium. Mayor selectividad es aportada por incubación bajo condiciones anaerobias a 44 °C.

Para mejor confirmación de *Clostridium perfringens* se sugiere realizar los siguientes test bioquímicos: Reducción de sulfito, reacción a gram, cepa de esporas, motilidad, reducción de nitratos, licuación de gelatina y fermentación de lactosa.

Características del cultivo después de 24 h de incubación anaeróbica a 44 °C seguida de 1-2 h aeróbica a 44 °C.

Organismos (ATCC)	Crecimiento	Apariencia de la colonia
<i>Clostridium perfringens</i> (13124)	+++	green
<i>Clostridium bifermentans</i> (638)	+++*	dark blue with violet halo
<i>Clostridium sporogenes</i> (8534)	-	-
<i>Clostridium sordelli</i> (9714)	++	dark green with halo (change to red with Kovac's Reagent)
<i>Enterococcus faecalis</i> (29212)	++	violet
<i>Escherichia coli</i> (25922)	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853)	-	colourless
<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> (6051)	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (DSM 554)	++	violet

* Key: growth at 40 °C but no growth at 44 °C

Referencias:

1. D.P. Sartory, M. Field, S.M. Curbishley, A.M. Pritchard, Evaluation of two media for the membrane filtration enumeration of *Clostridium perfringens* from water, Letters in Applied Microbiology, 27, 323-327 (1998)