



Placas Petrifilm^{MR}

Aspectos Técnicos Relevantes





Placas Petrifilm^{MR}



¿Qué son y para que se usan?

- Son medios de cultivo en formato listo para sembrar la muestra
- Constituidas de adhesivos, películas y nutrientes
- “Semejantes a las metodologías tradicionales para llevar a cabo pruebas microbiológicas Rápidas.



Análisis Microbiológicos en 3 pasos...



Inoculación



Incubación



Lectura



Placas Petrifilm



Algunas diferencias vs Método tradicional:

- El agente gelificante: en la mayoría de los casos Petrifilm utiliza goma guar en lugar de agar
- Método tradicional como SPC, PDA, Sabouraud, BP, VRB (excepto cromagar) no tiene indicadores
- La base de hule espuma está indicada en Placas como EC, EB y RCC por cuestiones de producción pues el medio se adiciona en líquido y es necesario el hule espuma para mantenerlo dentro de la placa
- Las Placas con hule espuma no contabilizan el crecimiento fuera de este pues se considera que el medio ya no es selectivo en esta zona



Acerca del TTC



- **Nombre:** Cloruro de trifenil tetrazolio
- La enzima deshidrogenasa en la membrana de las bacterias se asocia al TTC y los iones H se liberan **reduciendo al TTC a *formazan*** coloreando la colonia en rojo
- En las Placas Petrifilm el TTC esta inmerso en el adhesivo y **se libera con el tiempo** por lo que de oportunidad a que las bacterias crezcan y después interaccionen con el indicador, reduciendo así el potencial tóxico.



Muestras



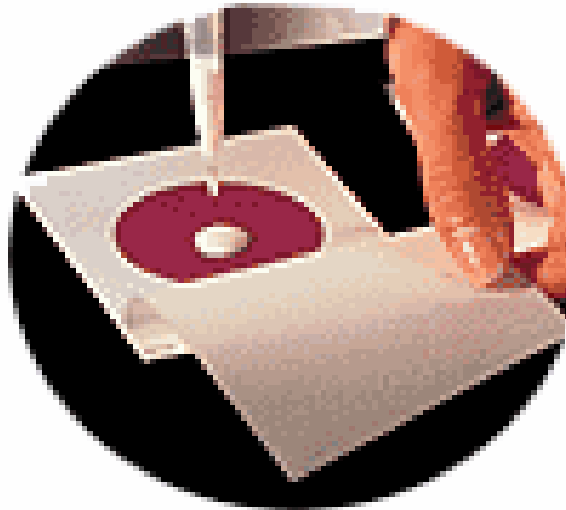
- Para sembrar una muestra debe tomarse en cuenta:
 - La carga microbiológica esperada
 - Dilución o siembra directa
- Si la muestra se siembra sin diluir considerar si tienen algún inhibidor como Acidos, Especies, Bajo Aw
- Para detalles acerca de diluciones refiérase a las guías 3M de preparación de diluciones y aplicación en lácteos y jugos en Placas Petrifilm



Volumen Inóculo



- 1.0 ML SIEMPRE (NO PUEDE INOCULARSE 0.1)





Actividad de Agua (Aw)



- La Actividad de agua condiciona el crecimiento de los microorganismos. Por lo que en Placas Petrifilm el desarrollo microbiano puede verse afectado en alimentos con:
- Alto contenido de azúcar
- Alto contenido de sólidos
- Productos deshidratados



Efecto del pH



- **pH óptimo:** 6.5 - 7.2
- **Razón:** El TTC reacciona de forma óptima a pH neutro
- Al sembrar en Placas Petrifilm se requiere ajustar el pH de la muestra entre 6.5 y 7.2
- Excepto la Placa para recuento de hongos y levaduras



Efecto del pH



- Microorganismos como **Lactococcus** y otros productores de ácido pueden interferir con la reacción de reducción
- Si las **bacterias producen rápidamente ácido** pueden evitar la reacción de reducción del TTC y por tanto no colorear las colonias
- Las muestras pueden requerir **dilución ó neutralización** con soluciones como: Buffer de fosfatos pH 7, NaOH 1N, Buffer de fosfatos pH > 7 (para alimentos ácidos)



Diluentes de Muestras



- Buffer de Fosfatos pH 7 (“Butterfields”)
- Agua Peptonada al 0.1%
- Agua Peptonada Regulada
- Solución Salina
- Solución Ringer
- Buffer Peptona Sal
- **NO** Buffer Citratos
- **NO** Buffer Tiosulfatos
- Además para la Placa RSA **NO** usar agua peptonada bufferada o bisulfitos.



Temperatura Incubación

Estándares varían por prueba y lugar

Verificar en la lista de aprobaciones.



A que temperatura incubas:

- a) Mesófilos*
- b) Coliformes fecales*
- c) Mohos*



Placa Petrifilm™ para Recuento Aeróbico



Placa Petrifilm™ para Recuento Aeróbico

**Cuantificar todas
las Colonias rojas**

Area = 20 cm²
Rango ideal de recuento: 25 a 250



Placa Petrifilm™ Recuento Aeróbico



- Aplicación para:
Bacterias ácido lácticas
Fundamento:
La adición de caldo MRS a las placas Petrifilm en combinación con una incubación anaerobia permite el crecimiento de lactobacilos y bacterias ác. Lácticas de alimentos procesados con alto contenido ácido y/o de azúcares.
- Ej. Pimientos, productos a base de tomate, cárnicos procesados.



Placa Petrifilm™ Recuento Aeróbico



- Nutrientes medio métodos estandar.
- Goma guar
- Incubación a 32-35°C por 48+/- 2 hrs.
- Indicador TTC tiñe colonias en rojo



¿Problemas con Licuefactores?



¿Qué son los licuefactores?

Son microorganismos que digieren el gel en las Placas Petrifilm.

Soluciones

- Realice una dilución mayor
- Verifique y lea las Placas desde las 24 o 36 horas . Confirme a las 48
- Incube en grupos de menos de 20 Placas encimadas
- disminuya la temperatura de incubación a 30 o 32°C
- Utilice el dispersor de Hongos y Levaduras
- Interpretación parcial y extrapolación



Placas Petrifilm para Recuento de Coliformes

- Los coliformes producen **colonias rojas asociadas a burbujas de gas**
- Las colonias rojas SIN gas son otros microorganismos gram negativos NO coliformes



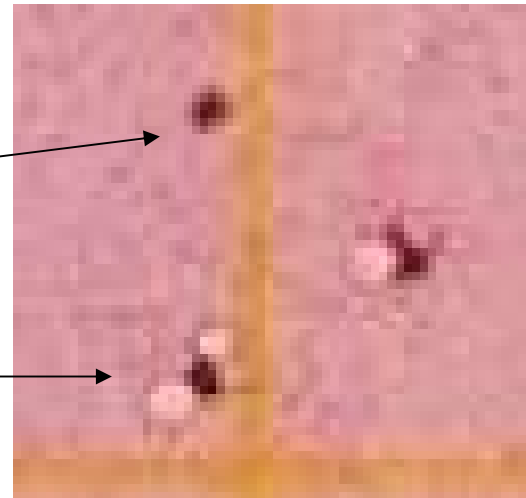
*Define bioquímicamente a
un coliforme*



Placa Petrifilm™ para Recuento de Coliformes

No coliformes
colonias rojas

Coliformes
Colonias rojas
con burbuja





Placa Petrifilm™ para Recuento de Coliformes



- Medio de bilis y rojo violeta
- Goma guar
- Almohadilla hule espuma
- Incubación 32-35°C 24+/- 2 hrs.
- Indicador TTC
- Producción de gas por fermentación



Placas Petrifilm para Recuento de E. coli y Coliformes

- Dos pruebas en una
- Los resultados de E. coli se confirman en 24 a 48 hr ahorrando así de 4 a 5 días.



Prueba para E. coli



- Esta prueba es necesaria en alimentos como:
 - Carnes crudas
 - Productos del mar
 - Lácteos como queso
 - Vegetales crudos y/o congelados
 - Alimentos listos para comer



Interpretación de E. coli

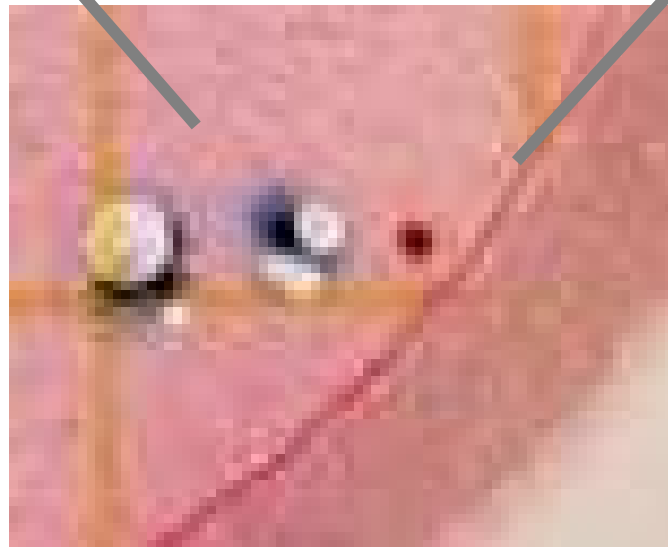


- Siempre que aparezcan colonias azules con burbuja de gas (Puede ser antes de las 24h de incubación) se considera confirmativo para E. coli.
- Aprobacion AOAC en 24 hs para productos: Carnicos (canales ó embutidos), Avícolas y Productos del Mar.
- Para los productos alimenticios no incluidos en los ya mencionados la validacion AOAC es de 48 h
 - Esto no significa que a las 24 hs no se pueda ya emitir un resultado si a ese tiempo ya existe evidencia de crecimiento azul con gas que asi lo permita. Si no es asi, el tiempo maximo de incubacion para emitir resultados es de 48 hs



Placa Petrifilm™ para Recuento de E. coli

E. coli:
colonia azul
con burbuja



No coliformes ni
E. coli:
colonias rojas



Placa Petrifilm™ para Recuento de *E. coli*



- **Cuente todas las colonias AZULES asociadas a gas como *E.coli***
- **Las colonias azules pueden estar o no asociadas a burbujas de gas según AFNOR**
- **Las colonias azules DEBEN estar asociadas a gas para ser *E. coli* según AOAC**
- ***E. coli* O157:H7 es glucuronidasa negativa, aparece como coliforme (roja con burbuja de gas)**



Placas Petrifilm™ para Recuento Rápido de Coliformes



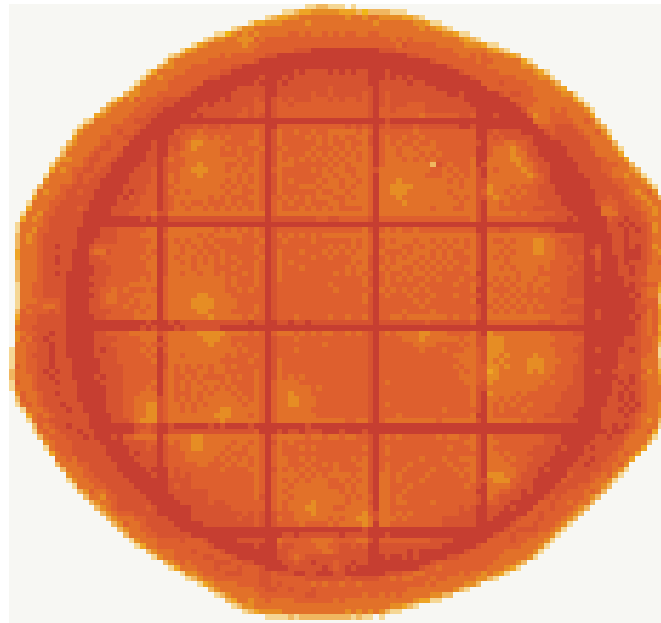
- Aplicación: Detección de niveles de **>1000 / placa entre 4 y 6 hrs.**
- Coliformes presuntivos de 6-14 hrs
- Coliformes confirmados de 8-24 hrs



Placa Petrifilm™ para Recuento Rápido de Coliformes Serie 2000



Halo amarillo =
coliformes presuntivos



Colonias rojas
con gas =
coliformes confirmados



Placas Petrifilm para Recuento Coliformes de Alta Sensibilidad

- Para muestras con **recuentos muy bajos** de coliformes
- Permiten reportar resultados en relación a **1 gramo** de muestra.



Placas Petrifilm Coliformes de Alta Sensibilidad



Dilución	Petrifilm	u.f.c. ó ml
1 : 1 0 0	placa de 1 m l	1 0 0
	placa de 5 m l	2 0
1 : 2 0	placa de 1 m l	2 0
	placa de 5 m l	4
1 : 1 0	placa de 1 m l	1 0
	placa de 5 m l	2
1 : 5	placa de 1 m l	5
	placa de 5 m l	1
1 : 2	placa de 1 m l	2
	placa de 5 m l	0 . 4
Sin dilución	placa de 1 m l	1
	placa de 5 m l	0 . 2



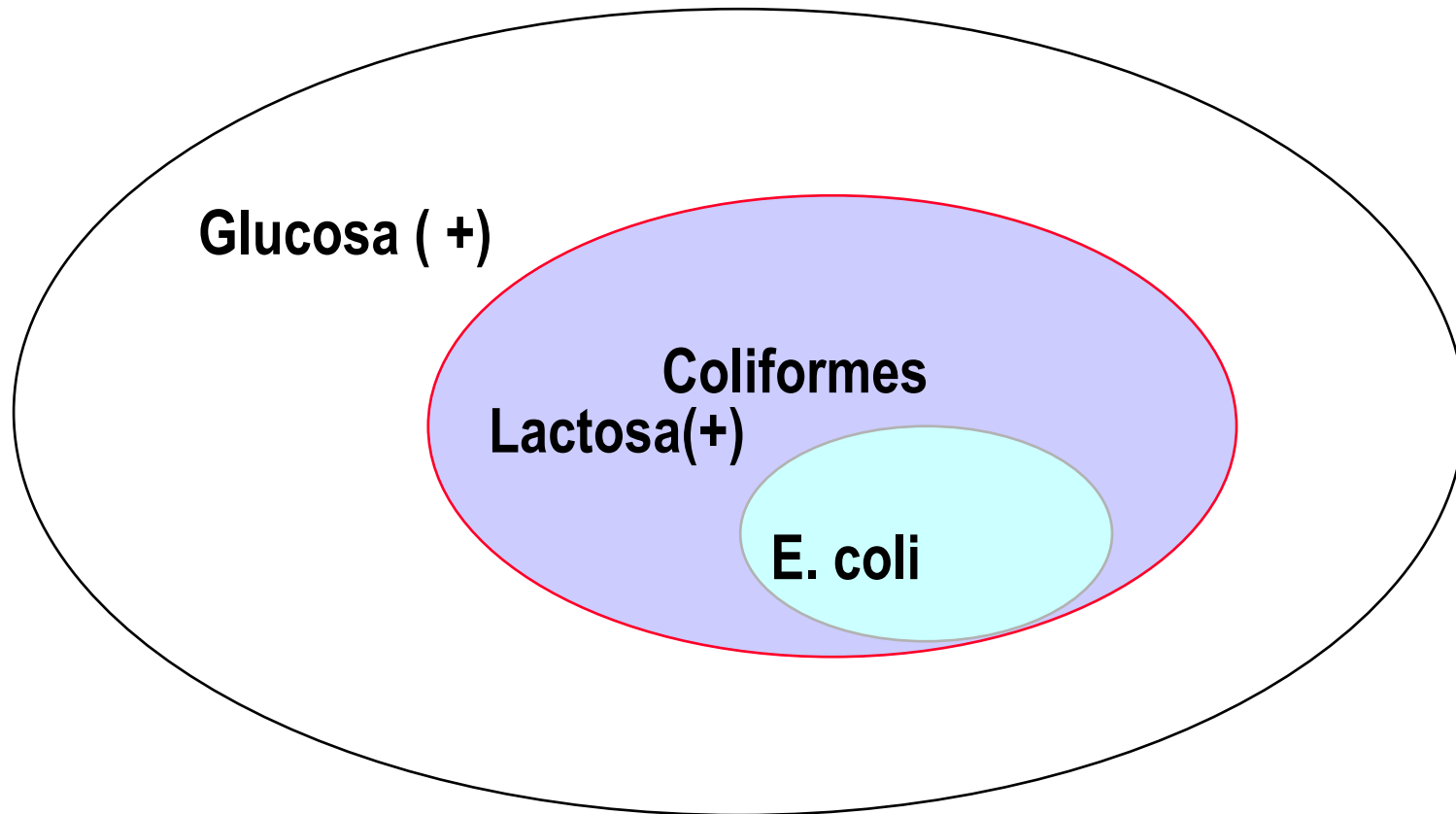
Placas Petrifilm para Recuento de Enterobacterias



- Para detectar contaminación después del procesamiento como pasteurización o sanitización.
- Incluyen todos los coliformes y los fermentadores de la glucosa *no coliformes* como: *Salmonella, Shigella y Yersinia*
- Algunas familias de Enterobacterias incluyen: *Citrobacter, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, *roteus Providencia* , entre otros



Familia: *Enterobacteriaceae*



Las Enterobacterias son bacilos gram negativos que fermentan la lactosa a ácido, y son oxidasa negativo
Generalmente también son, catalasa positivo o móviles



Placas Petrifilm^{MR} para Recuento de Enterobacterias



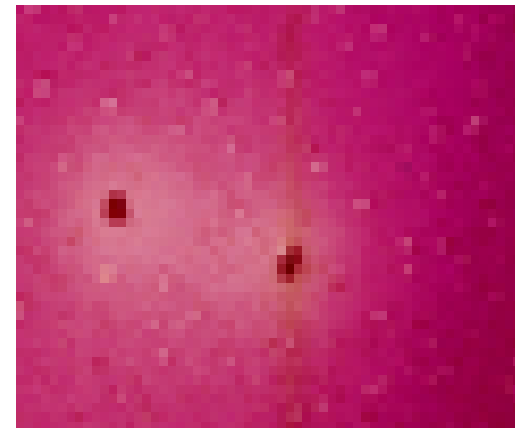
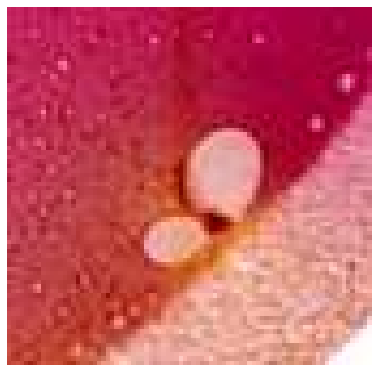
- Es una prueba presuntiva, detecta un grupo de bacterias. Para conocer la especie es necesario realizar pruebas bioquímicas
 - Se identifican como Enterobacterias:
 - Colonias con zona ácida (amarilla)
 - Colonias con zona ácida asociadas a gas
 - Colonias asociadas a gas
 - No son Enterobacterias colonias rojas sin zona ácida o sin gas.



Placas Petrifilm para Recuento de Enterobacterias



- Considere como ***Enterobacterias***
 - Colonias con zona amarilla y gas
 - Colonias con zona amarilla
 - Colonias con gas sin zona amarilla



El rango de recuento es de 15 a 150 colonias.

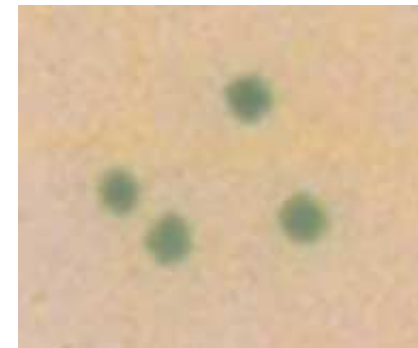


Placa Petrifilm™ para Recuento de Mohos y Levaduras



- **Levaduras:**

- Colonias Pequeñas
- Bordes definidos
- Color uniforme entre azul y verde (algunas rosadas)
- Colonias en 3a dimensión. (Sobresalen de la placa)
- Rango de conteo 15 a 150.





Placa Petrifilm™ para Recuento de Mohos y Levaduras



•Hongos:

- Colonias grandes planas
- Límites difusos
- Centro obscuro
- Varios colores
- Rango de conteo:
15 a 150.



Placas Petrifilm para Recuento de Hongos y Levaduras



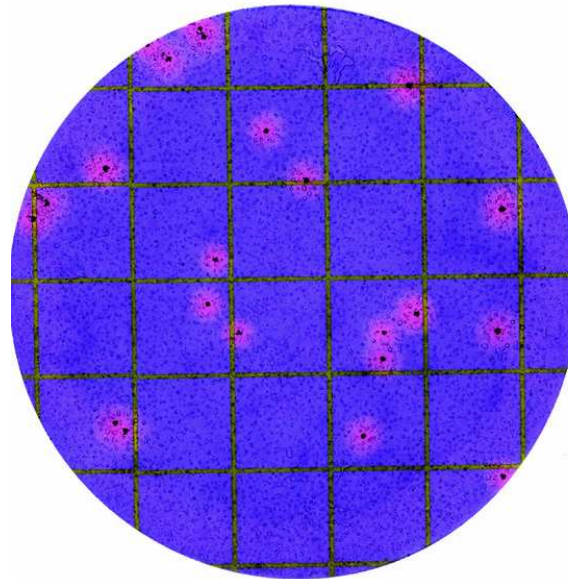
- Los antibióticos inhiben crecimiento bacteriano
- Temperatura de incubación 25°C
- El indicador **tiñe colonias de levaduras para facilitar su recuento**
- Algunas ocasiones los hongos cubren el crecimiento de levaduras. Para verificarlo, abra la placa y observe la presencia de levaduras además éstas presentan olor característico)
Refiérase a la guía de interpretación para más detalles al respecto



Placas Petrifilm para Recuento Rápido de *S. aureus*



- Cuente como *S. aureus* los halos rosados con o sin colonias.
- El rango óptimo para conteo es 15 - 100 halos.





Placas Petrifilm para Recuento Rápido de *S. aureus*



- Tome en cuenta que el metabolismo de ***S. aureus*** es generalmente ácido por lo que no siempre encontrará colonias dentro de los halos rosas (la actividad del TTC es inhibida a bajos pHs).
- Debido a que el agente gelificante de la Placa RSA es débil en cuanto a firmeza, esta placa no se recomienda para muestreos de superficies.



Placas Petrifilm para Recuento Rápido de *S. aureus*



- Prueba cuantitativa y confirmativa rápida: 26 horas
- Equivalente al agar Baird-Parker y método de coagulasa en tubo
- Confirmación y aislamiento en un solo procedimiento



Placas Petrifilm^{MR}: Manejo y Almacenamiento

- **Recepción:**
 - Las Placas Petrifilm deben refrigerarse en cuanto las entregue el proveedor.
- **Almacenamiento:**
 - En paquetes cerrados: Almacenar a temperatura de refrigeración o congelación.
 - En paquetes abiertos almacenar en un lugar fresco y seco (temperatura < 25°C y Humedad relativa < 50%).



Placas Petrifilm^{MR}: Manejo y Almacenamiento



Vida de Anaquel

En paquetes cerrados y almacenados: **18 meses** a partir de la fecha de fabricación. Excepto

Placas Petrifilm Serie 2000 tiene 12 meses de vida de anaquel a partir de la fecha de fabricación.

–En paquetes abiertos almacenados a temperatura ambiente (en un lugar fresco y seco) tienen un tiempo de vida de **30 días**

–La fecha de expiración y el número de lote están impresos en la parte posterior de cada paquete.



Placas Petrifilm™

Aprobaciones Internacionales



- **AOAC** (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS)
- **AFNOR** (ASOCIACION FRANCESA DE NORMALIZACION)
- **NCIMS** (U.S. GRADE A PASTEURIZED MILK ORDINANCE)
- **CANADA-HEALTH PROTECTION BRANCH HPB** (COMPENDIUM OF ANALYTICAL METHODS)
- **AUSTRALIA**, NEW SOUTH WALES DAIRY TEST MANUAL



Placas Petrifilm™



- Características
- Ventajas
- Beneficios



Placas Petrifilm™



Características

- Geles / nutrientes solubles en frío
- Presencia de indicadores Químicos, TTC
- Construcción de Película Laminada
- Calidad Estandarizada



Placas Petrifilm^{MR}



Geles / Nutrientes solubles en frío

Ventajas:

- No es necesario calentar ni fundir agares

Beneficios:

- Reduce tiempo en preparación de medios.
- No requiere uso de baño de agua.
- Reduce uso de autoclaves.
- Fácil de manejar.



Placas Petrifilm^{MR}



Geles / Nutrientes solubles en frío

Ventajas:

- No se somete la muestra a “shock de temperatura”

Beneficios:

- Reducción en la variación de resultados
- Cuentas bacterianas más solubles.



Placas Petrifilm^{MR}



Ventajas:

- Colonias coloreadas
- Indicador β -glucoronidasa
- Indicador de fosfatos

Beneficios:

- Fácil de leer colonias puntiformes.
- Diferenciación entre colonias/partículas.
- Identificación de ***E.coli***.
- Distinción de mohos/levaduras.



Placas Petrifilm^{MR}



Ventajas:

- Capacidad para ver producción de gas

Beneficios:

- Mayor predicción del valor de ***coliformes*** y ***E.coli***.



Placas Petrifilm^{MR}



Ventajas:

- Compactas
- Ampliables
- Materiales ligeros y seguros

Beneficios:

- Requieren menor espacio en incubación y almacenaje.
- Fácilmente transportables para muestreos en planta.
- Menor volumen de desperdicio.



Placas Petrifilm^{MR}



Ventajas:

- Garantía de funcionamiento estandarizado en mismo lote y entre lotes.

Beneficios:

- Reproducibilidad
- Solo error de analista.
- Adecuadas para programas certificación de proveedores y HACCP.