

TRYPTIC GLUCOSE EXTRACT AGAR

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la conta microbica su piastra nel latte, nei prodotti lattiero-caseari, nell'acqua e in altri campioni di importanza sanitaria.

2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA *

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

Tryptone	5,0 g
Estratto di carne	3,0 g
Glucosio	1,0 g
Agar	15,0 g

*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Nel 1935, Bower e Hucker idearono la composizione di un terreno (Tryptone Glucose Agar) per l'analisi batteriologica del latte e riportarono conteggi su piastra più elevati e dimensioni delle colonie più grandi.^{1,2} Il Tryptic Glucose Extract Agar (TGEA) fu originariamente suggerito dal pubblico americano Health Association nel 1948³ per la stima dei conteggi vitali totali nel latte e nei prodotti lattiero-caseari ed è stata successivamente adottata per l'analisi dell'acqua⁴. Il TGEA è rimasto per molti anni il terreno di coltura standard per la conta microbica su piastra. Attualmente è raccomandato nel Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods per eseguire la conta in piastra di bacilli mesofili aerobi che formano endospore⁵ e per la conta in piastra aerobi o eterotrofi nell'acqua in bottiglia⁶. Il triptone e l'estratto di manzo forniscono azoto, carbonio, minerali e amminoacidi per la crescita microbica. Il glucosio è una fonte di carbonio ed energia; l'agar è l'agente solidificante.

4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 24 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione con agitazione frequente per sciogliere completamente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione	beige chiaro, limpida
pH finale (20-25 °C)	7,0 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Tryptic Glucose Extract Agar	Terreno di coltura in polvere	4021442	500 g (20,8 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre di Petri sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Latte, latticini, acqua e altri campioni di importanza sanitaria. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Conteggio delle colonie con la tecnica della semina per inclusione.

- Utilizzando una pipetta sterile, dispensare 1 mL del campione di analisi liquido, o 1 mL di una sospensione iniziale nel caso di altri prodotti, in una capsula di Petri vuota e miscelare con Tryptic Glucose Extract Agar fuso pre-raffreddato a 44- 46°C.
- Preparare le altre piastre nelle stesse condizioni utilizzando diluizioni decimali del campione in esame o della sospensione iniziale.
- Incubare le piastre in condizioni aerobiche a 35 °C per 72 ore.

Conteggio delle colonie con la tecnica della semina in superficie.

- Asciugare le piastre preparate prima dell'uso.
- Utilizzando una pipetta sterile, trasferire 0,1 mL del campione in esame, se il prodotto è liquido, o della sospensione iniziale nel caso di altri prodotti, al centro di una piastra di Tryptic Glucose Extract Agar.
- Distribuire con cura l'inoculo in modo uniforme e il più rapidamente possibile sulla superficie della piastra di agar, senza toccare i lati della piastra con lo spargitore.
- Lasciare le piastre con i coperchi per circa 15 minuti a temperatura ambiente affinché l'inoculo venga assorbito dall'agar.
- Incubare le piastre in condizioni aerobiche a 35 °C per 72 ore.

Consultare la bibliografia per informazioni riguardanti i dettagli del trattamento e dell'inoculazione dei campioni di acqua in bottiglia⁴ e il conteggio in piastra dei bacilli mesofili aerobi produttori di endospore⁵.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, contare tutte le colonie ottenute nelle piastre contenenti meno di 300 colonie e calcolare il numero di microrganismi per grammo o per millilitro del campione in esame. Seguire le procedure raccomandate per il conteggio delle colonie e la refertazione dei risultati.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto vengono messi in vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utente finale può eseguire il proprio Controllo di Qualità in conformità alle normative locali applicabili, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.²

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> ATCC 8739	37°C/72H/A	buona crescita
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	37°C/72H/A	buona crescita
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	37°C/72H/A	buona crescita

A: incubazione aerobica; ATCC è un marchio di American Type Culture Collection.



12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Tryptic Glucose Extract Agar disidratato viene testato per la produttività confrontando i risultati con Tryptic Soy Agar.

La produttività è testata con metodo quantitativo con i seguenti ceppi *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538 e *B. subtilis* ATCC 6633. Le piastre sono inoculate mediante tecnica di semina in superficie con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 37°C per 24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i terreni e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr: UFC_{TGEA}/UFC_{TSA}). Se Pr è ≥ 0,7 i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche. Inoltre le caratteristiche di produttività sono testate mediante tecnica ecometrica semi-quantitativa con i seguenti ceppi: *S. pyogenes* ATCC 19615, e *E. faecalis* ATCC 19433, *L. acidophilus* ATCC 314. Dopo l'incubazione, viene valutata la quantità di crescita: i ceppi testati presentano buona crescita.

13 – LIMITI DEL METODO

- Un ritardo superiore a 10 minuti tra la dispensazione del campione nelle piastre Petri e l'aggiunta dell'agar può comportare conte sottostimate.⁷
- Una potenziale fonte di errore nel conteggio delle piastre può derivare dal mettere in pila le piastre di Petri: in una pila di 3 piastre, la piastra centrale e quella superiore impiegano troppo tempo a raffreddarsi, con conteggi inferiori.⁷
- L'aumento del tempo di mantenimento delle diluizioni nel diluente comporta un conteggio più elevato.⁷
- La conta aerobica su piastra non distingue tra diversi tipi di batteri. L'alterazione del tempo e della temperatura di incubazione e il tipo di atmosfera cambieranno i tipi di organismi che cresceranno e che quindi verranno contati.⁷

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico ed è per uso professionale; deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno disidratato deve essere maneggiato con adeguate protezioni. Prima dell'uso, consultare le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Applicare le Buone Pratiche di Fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura preparati.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura, i supplementi ed i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego dei prodotti, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi). L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

16 - REFERENCES

- Bowers CS and Hucker GY. 1935. The composition of media for the bacteriological analysis of milk. Tech Bull. N.Y. State Agr. Expt. Sta. No. 228. 1935.
- Bowers CS and Hucker GY. 1936. Further studies of the composition of media for the bacteriological analysis of milk. Am. J. of Public Health. 1936; 26:350-352
- APHA Standard Methods for the Examination of Dairy Products. American Public Health Association, New York, N.Y. 9th ed. 1948.
- APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, D.C. 15th ed. 1980
- Stevenson KE, Lembke F. Mesophilic Aerobic Endospore-Forming Bacilli. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015.
- Posnick L, Feng P. Bottled Water. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015
- Petran R, Grieme LE, Foong-Cunningham S. Culture Methods for Enumeration of Microorganisms. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	o REF	 LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	 Proteggere dall'umidità
 Limiti di temperatura		 Contenuto sufficiente per <n> test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	05/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

