

**ChromArt****TRYPTONE BILE X-GLUC (TBX) AGAR****Terreno selettivo e cromogeno in polvere e pronto all'uso in piastra, flacone e provetta**TBX Agar: *E. coli* (colonie blu)
ed *E. aerogenes* (colonie incolori)**1 - DESTINAZIONE D'USO**Terreno cromogeno per il conteggio di *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivo nei campioni della filiera alimentare.**2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA****(PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)***

Triptone (digerito enzimatico di caseina)	20,0 g
Sali biliari n. 3	1,5 g
5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D glucuronide (X-GLUC) ^b	0,075 g
Agar	14,0 g

Note

b: sale di cicloesilammonio

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Tryptone Bile X-GLUC (TBX) Agar è un terreno selettivo e cromogeno, indicato da ISO 16649-1¹, 16649-2² e 16649-3³ per il conteggio di *E. coli* β -glucuronidasi positivo nei prodotti destinati al consumo umano o per l'alimentazione animale con incubazione a 44°C e con metodo di semina per inclusione (parte 2 della norma) o con metodo delle membrane filtranti (parte 1 della norma) e con la tecnica del MPN-Most Probable Number (parte 3).

Il triptone fornisce azoto, carbonio ed oligoelementi per la crescita microbica; l'azione selettiva è dovuta alla presenza dei sali biliari, inibitori per i batteri Gram positivi; l'azione differenziale è esplicata dal substrato cromogeno X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronide), l'idrolisi del quale, attraverso l'enzima β -glucuronidasi, dà luogo alla formazione di un pigmento blu-verde.

E. coli, tra gli enterobatteri, è una delle poche specie β -glucuronidasi positiva, insieme a qualche ceppo di *Salmonella* e *Shigella*, e quindi coltiva sul terreno con colonie blu. Gli enterobatteri β -glucuronidasi negativi coltivano con colonie incolori.

4A- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 35,6 g in 1000 mL di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione fino a completa soluzione, quindi autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 44-47°C e distribuire in piastre Petri sterili.

4B- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN FLACONE

Sciogliere il contenuto del flacone per bollitura in bagnomaria termoregolato. Raffreddare a 44-47°C e distribuire in piastre Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Aspetto del terreno disidratato

Aspetto del terreno in piastra, in flacone e in provetta

pH finale del terreno completo (20-25°C)

polvere fine di colore beige

beige, limpido

7.2 \pm 0.2**6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Tryptone Bile X-GLUC (TBX) Agar CND: W0104010101	Terreno in polvere	4021561	100 g (2.8 L)
Tryptone Bile X-GLUC (TBX) Agar CND: W0104010101	Terreno in polvere	4021561	500 g (14 L)
TBX Agar CND: W0104010306	Flaconi pronti all'uso	5121562 5121563	6 x 100 mL 6 x 200 mL
TBX (Tryptone Bile X-GLUC Agar) CND: W0104010402	Piastre pronte all'uso	542156	2 x 10 piastre \varnothing 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane; confezionamento secondario: scatola di cartone
TBX (Tryptone Bile X-GLUC Agar) CND: W0104010402	Piastre pronte all'uso	492156	3 x 10 piastre \varnothing 55 mm confezionamento primario: 3 sacchetti di cellophane; confezionamento secondario: scatola di cartone
TBX (Tryptone Bile X-GLUC Agar) CND: W0104010206	Provette pronte all'uso	5521562S	20 provette di vetro da 15 mL, 18 x 145 mm, con fondo piatto e tappo a vite, in scatola di cartone



7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, membrane ad apparati per la filtrazione del campione, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

Alimenti, mangimi, campioni della filiera alimentare, campioni dall'ambiente e dalla fase di produzione primaria. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio e fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

SEMINA SU MEMBRANA¹

- Trasferire due membrane sterili sulla superficie di 2 piastre di Minerals Modified Glutamate Agar.
- Inoculare nel centro della membrana 1 mL di campione o 1 mL di sospensione madre.
- Strisciare l'inoculo su tutta la superficie della membrana evitando di andare oltre i bordi. Ripetere l'operazione, se necessario, con le diluizioni decimali.
- Lasciare le piastre a temperatura ambiente per 15 min. in modo che l'inoculo venga assorbito dal terreno di coltura
- Incubare le piastre per 4 ore \pm 1 ora a 37 \pm 1°C.
- Dopo questa operazione di vivificazione trasferire le membrane su piastre di TBX Agar.
- Incubare le piastre di TBX Agar a 44 \pm 1°C per 20-24 ore. Non superare mai la temperatura di 45°C.

SEMINA PER INCLUSIONE²

- Seminare in duplicato, in piastre da 90 mm, 1 mL della sospensione del campione e, se necessario, 1 mL delle sue diluizioni decimali
- Aggiungere circa 15 mL di terreno termostato a 44-47°C; questa operazione deve essere effettuata non oltre i 15 minuti dalla deposizione dell'inoculo nelle piastre.
- Mescolare bene l'inoculo con il terreno.
- Incubare a 44°C per 18-24 ore. In caso di sospetta presenza di colonie stressate, pre-incubare per 4 ore a 37°C prima dell'incubazione a 44°C. Non superare mai la temperatura di 45°C.

DETERMINAZIONE O CONTEGGIO CON METODO MPN³

Semina della sospensione del campione e se necessario, delle sue diluizioni decimali in provette di Minerals Modified Glutamate Broth (MMGM- REF 401737) a concentrazione semplice o doppia. Incubazione a 37 \pm 1°C per 24 \pm 2 ore. Trapianto dalle provette positive per la produzione di acidità su piastre di TBX Agar ed incubazione a 44 \pm 1°C per 18-24 ore.

SEMINA IN SUPERFICIE

Seminare 0,1 ml di sospensione del campione e, se necessario 0,1 mL delle sue diluizioni decimali e disperdere l'inoculo sulla superficie della piastra. Incubate a 37°C per 24 ore⁴ oppure a 30°C per 4 ore e quindi a 44°C per 18-24 ore⁵.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica delle colonie.

Contare come *E.coli* β -glucuronidasi positivo le colonie blu nelle piastre in cui vi siano non più di 150 colonie tipiche e non più di 300 colonie totali (tipiche e non tipiche).

Esprimere i risultati come UFC/g seguendo le indicazioni espresse dalle norme citate.^{1,2,3}

11 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

Controllo produttività:	<i>E. coli</i> ATCC 25922:	crescita, colonie blu
Controllo specificità:	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853:	crescita, colonie verde-beige
Controllo selettività:	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433:	inibito

(Incubazione a 44°C per 24 h)

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 - LIMITI DEL METODO

- Alcuni ceppi di *E. coli* come *E. coli* O157:H7 e O157:H possono crescere poco o per niente con incubazione a 44°C.
- Alcuni ceppi di *E.coli*, in particolare quelli appartenenti al sierotipo O157:H7, sono per lo più β -glucuronidasi negativi.⁶ Di conseguenza, alcuni ceppi di *E. coli*, compresi quelli patogeni, non verranno rilevati con questo metodo.
- L'attività della β -glucuronidasi può essere manifestata a 44°C anche da alcuni altri membri delle *Enterobacteriaceae*, in particolare *Shigella*⁷ e *Salmonella*⁸.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I prodotti qui descritti sono da impiegare per controlli microbiologici, sono per uso professionale e devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura in polvere e pronto all'uso 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 questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare i prodotti 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.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.





- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura, supplemento o agenti microbici.
- Le singole piastre e le singole provette del prodotto qui descritto sono monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Fare attenzione quando si aprono i flaconi e le provette con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Il terreno pronto in flacone e in provetta è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave a vapore.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno di base ed il supplemento non utilizzati ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti qui descritti 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 del prodotto, 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.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Terreno in polvere - Conservare a +2°C /+8°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. 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 o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

Piastre pronte all'uso - Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

Flaconi pronti all'uso - Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Dopo l'apertura della scatola, i flaconi possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare i flaconi se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, colore alterato). Il terreno in flacone può essere sciolto a 100°C per una sola volta.

Provette pronte all'uso - Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare le provette oltre la data di scadenza. Dopo l'apertura della scatola, le provette possono essere utilizzate fino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere utilizzate immediatamente. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare le provette se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, colore alterato).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. ISO 16649-1 (2018): Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* -- Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.
2. ISO 16649-2 (2001): Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase positive *Escherichia coli* -- Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.
3. ISO 16649-3 (2015): Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase positive *Escherichia coli* -- Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide.
4. Donovan TJ et al. Communicable Disease and Public Health. 1998; 1:188-196.
5. PHLS Standard Methods for Microbiological Examination of Food, Dairy and Water Samples. F20: Direct Enumeration of *Escherichia coli*.
6. Feng P, Lampel KA, Karch H, Whittam TS. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. J. Infect. Dis. 177: 1750-1753.
7. Kilian M. & Bulow P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol Microbiol Scand Sect B. 1976, 84: 245-251
8. Le Minor, Buisnière J, Novel G, Novel M. Relation entre le sérotype et l'activité β-glucuronidasique chez les *Salmonella*. Ann Microbiol (Paris) 1978; 129B (2) :155-165.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Non riutilizzare	Imballaggio riciclabile Lato superiore
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Fragile maneggiare con cura	Proteggere dalla luce diretta

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 10	Modifiche del contenuto dei capitoli "Procedura dell'analisi", "Limiti del metodo", "Precauzioni ed avvertenze", "Conservazione e validità", "Bibliografia" e del layout.	07/2021

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

