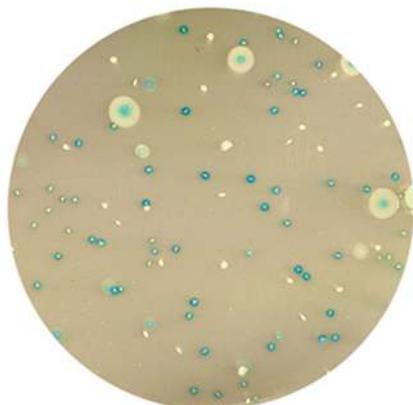


**ChromArt**

## TRYPTONE BILE X-GLUC (TBX) AGAR

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso in piastra, flacone e provetta


 TBX Agar: colonie di *E. coli* blu-verdi) e *E. aerogenes* (bianche)

### 1- DESTINAZIONE D'USO

 Per il conteggio di *Escherichia coli* positivi alla  $\beta$ -glucuronidasi in alimenti e mangimi.

### 2 - COMPOSIZIONE

**FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA\***
**TERRENO DISIDRATATO, PIASTRE PRONTE ALL'USO, PROVETTE E FLACONI**

Tryptone (digerito enzimatico di caseina)	20,0 g
Sali biliari No. 3	1,5 g
Agar	14,0 g
5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-GLUC) <sup>^</sup>	0.075 g

\* Le formule possono essere adattate e/o integrate per soddisfare i criteri di prestazione richiesti.

^ sale di cicloesilammonio

### 3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

 Il Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX) Agar si basa sulla formulazione del Tryptone Bile Agar originariamente ideato per il conteggio di *E. coli* in materiali alimentari.<sup>1,2</sup> Il TBX Agar è una modifica del Tryptone Bile Agar sviluppata sulla base di numerosi studi su substrati prima fluorogenici e poi cromogenici per la rilevazione dell'enzima  $\beta$ -glucuronidasi direttamente sui terreni di isolamento<sup>3-7</sup> e contiene il composto cromogenico 5-bromo-4-cloro-3-indossil- $\beta$ -D-glucuronide (X-GLUC).

 Il TBX Agar è preparato in conformità alla norma ISO 16649 e soddisfa i requisiti in essa contenuti.<sup>8-10</sup>

 Il conteggio di *E. coli*  $\beta$ -glucuronidasi-positivi negli alimenti può essere effettuato mediante 1) la tecnica della semina in piastra per inclusione in TBX Agar<sup>8</sup>, 2) la tecnica del conteggio su membrane incubate su Minerals Modified Glutamate Agar e successivamente trasferite su TBX Agar<sup>9</sup>, 3) la tecnica del numero più probabile (MPN) utilizzando Minerals Modified Glutamate Medium e la subcoltura su TBX Agar<sup>10</sup>. Le ultime due tecniche prevedono una fase di riattivazione cellulare e sono consigliate per l'esame di alimenti che possono contenere cellule con lesioni sub-letali.

 I fattori di crescita essenziali sono forniti dal triptone, che è una fonte di azoto, carbonio e minerali. I sali biliari n° 3 inibiscono lo sviluppo dei batteri Gram-positivi, in particolare bacilli e streptococchi fecali, favorendo al contempo la crescita di *E. coli*. Il terreno contiene X-GLUC per la rilevazione dell'enzima  $\beta$ -glucuronidasi: all'interno delle *Enterobacteriaceae*, *E. coli* e alcuni ceppi di *Salmonella* e *Shigella* sono in grado di scindere il legame tra il cromoforo 5-bromo-4-cloro-3-indolile e il  $\beta$ -D-glucuronide; il cromoforo rilasciato è colorato e si accumula all'interno delle cellule, causando la colorazione blu-verde delle colonie di *E. coli*.

### 4A- INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DI COLTURA (TERRENO DISIDRATATO)

Sospendere 35,6 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino a ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

### 4B- INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DI COLTURA (TERRENO PRONTO IN FLACONI)

 Ridisciogliere il contenuto della beuta in un'autoclave a 100  $\pm$  2°C o in un bagno d'acqua a temperatura controllata (100°C). In alternativa, il flacone può essere inserito in un recipiente contenente acqua, che viene posto su una piastra calda e portato a ebollizione. Allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento per consentire lo scambio di pressione. Raffreddare a 47-50°C e versare il terreno di coltura in piastre Petri sterili, in condizioni asettiche.

### 5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere

Fine granulometria omogenea, beige

Aspetto del terreno in soluzione e del flacone

limpido, beige

pH (20-25°C)

 7,2  $\pm$  0,2

### 6-MATERIALI FORNITI-CONFEZIONAMENTO

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Tryptone Bile X-GLUC (TBX) Agar	Terreno in polvere	4021562	500 g (14 L)
Tryptone Bile X-GLUC (TBX) Agar	Terreno pronto all'uso in piastra	542156	2 x 10 plates $\varnothing$ 90 mm
Tryptone Bile X-GLUC (TBX) Agar	Terreno pronto all'uso in piastra	492156	3 x 10 plates $\varnothing$ 55 mm
TBX Agar	Terreno pronto all'uso in provette	5521562S	20 x 15 mL
TBX Agar	Terreno pronto all'uso in flacone	5121562	6 x 100 mL
TBX Agar	Terreno pronto all'uso in flacone	5121563	6 x 200 mL

### MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

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



### 8-CAMPIONI

Prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali e campioni ambientali nel settore della produzione e della manipolazione degli alimenti. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.

### 9-PROCEDURA DELL'ANALISI

#### Conteggio di *E. coli* mediante tecnica per inclusione (ISO 16649-2)<sup>8</sup>

1. Trasferire 1 mL del campione in doppio in due piastre Petri sterili, se liquido, o 1 mL della sospensione iniziale ( $10^{-1}$ ), nel caso di altri prodotti. Ripetere la procedura con ulteriori diluizioni decimali, se necessario.
2. Entro 15 minuti, versare in ciascuna piastra Petri circa 15 mL di TBX Agar pre-raffreddato a 44-47°C.
3. Mescolare bene l'inoculo con il terreno di coltura. Capovolgere le piastre inoculate e incubare a 44°C per 18-24 ore. In caso si sospetti la presenza di colonie stressate, incubare per 4 ore a 37°C prima dell'incubazione a 44°. Non incubare a più di 45°C.

#### Conteggio di *E. coli* mediante tecnica di filtrazione su membrana (ISO 16649-1)<sup>9</sup>

1. Posizionare asetticamente una membrana sulla superficie asciutta di un numero adeguato di piastre di Minerals Modified Glutamate Agar (MMGM REF 401737 integrato con Agar) facendo attenzione a non intrappolare bolle d'aria sotto le membrane.
2. Trasferire al centro della membrana 1 mL del campione o 1 mL della sospensione iniziale e spargere l'inoculo sulla superficie della membrana. Se necessario, ripetere la procedura con ulteriori diluizioni decimali.
3. Utilizzando uno spargitore sterile, distribuire l'inoculo in modo uniforme su tutta la superficie della membrana, evitando qualsiasi fuoriuscita dalla membrana.
4. Lasciare le piastre a temperatura ambiente per 15 minuti in modo che il terreno di coltura assorba il campione liquido.
5. Incubare le piastre per 4 ore  $\pm$  0,25 ore a 37°C, con la superficie della membrana/agar rivolta verso l'alto.
6. Dopo questa fase di riattivazione cellulare trasferire le membrane su piastre di TBX Agar e incubare a 44°C per 18-24 ore. Non incubare a più di 45°C.

#### Conteggio di *E. coli* mediante tecnica MPN (ISO 16649-3)<sup>10</sup>

1. Inoculare 3 o 5 provette contenenti 10 mL di Minerals Modified Glutamate Medium (MMGM REF 401737) a doppia concentrazione con 10 mL del campione in esame, se liquido, o con 10 mL della sospensione iniziale nel caso di altri prodotti.
2. Inoculare 3 o 5 provette contenenti 10 mL di MMGM a concentrazione singola con aliquote da 1 mL del campione in esame, se liquido, o con aliquote da 1 mL della sospensione iniziale nel caso di altri prodotti.
3. Ripetere l'inoculo del terreno liquido a singola concentrazione per ciascuna delle ulteriori diluizioni decimali, utilizzando una nuova pipetta per ogni diluizione.
4. Incubare le provette a 37°C per 24  $\pm$  2 ore.
5. Da ciascuna delle provette incubate che mostrano un colore giallo, effettuare una subcultura con un'ansa su una piastra di TBX Agar per ottenere colonie isolate e incubare a 44°C per 24  $\pm$  2 ore.
6. Esprimere i risultati come Most Probable Number di *E. coli* in base alla presenza di colonie blu-verdi su piastre TBX.

### 10-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, esaminare le piastre di TBX Agar per verificare la presenza di colonie tipiche, blu o blu-verdi, che indicano la presenza di *E. coli* positivi alla  $\beta$ -glucuronidasi.

Calcolare il numero di *E. coli* positivi alla  $\beta$ -glucuronidasi contando le colonie tipiche in ogni piastra contenente meno di 150 UFC tipiche e meno di 300 UFC totali (tipiche e non).

Moltiplicare il numero di colonie per il fattore di diluizione ed esprimere il risultato come numero di *E. coli* per grammo di campione.

### 11-CONTROLLO QUALITÀ

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 facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo 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.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T° / t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	44°C / 18-24H / A	crescita, colonie blu-verdi
<i>C. freundii</i> ATCC 43864	44°C / 18-24H / A	crescita, colonie da bianche a beige-verdi
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	44°C / 18-24H / A	inibito

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrate di American Type Culture Collection

### 12 - VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI

Prima dell'immissione sul mercato, un campione rappresentativo di tutti i lotti del terreno in polvere e del terreno pronto all'uso TBX Agar disidratato e pronto all'uso viene sottoposto a test di produttività, specificità e selettività, confrontando i risultati con il Tryptic Soy Agar (TSA). La produttività viene valutata mediante un test quantitativo per inclusione con i ceppi target *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 8739 ed *E. coli* NCTC 13216. Le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubate a 44°C per 18 ore. Le colonie vengono contate su TBX Agar e su TSA e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr:  $UFC_{TBX}/UFC_{TSA}$ ). Se Pr è  $\geq 0,5$  e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici (colonie blu-verdi), i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche. La specificità è testata mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi non target: *C. freundii* ATCC 43864 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Dopo l'incubazione a 44°C per 24 ore, vengono valutate la quantità di crescita e le caratteristiche delle colonie: i ceppi non target mostrano una crescita con colonie di colore da bianco a verde-beige.

La selettività viene valutata con il metodo semiquantitativo modificato Miles-Misra, inoculando la superficie delle piastre con gocce di diluizioni decimali adeguate in soluzione fisiologica di una sospensione di *E. faecalis* ATCC 29212 da 0,5 McFarland. La crescita del ceppo non target è totalmente inibita dopo incubazione a 44°C per 24 ore.

### 13-LIMITI DEL METODO

- È stato riportato che circa il 40% delle specie di *Shigella*, vari bio-sierotipi di *Salmonella* (13% di *Salmonella* sottogenere I) possono essere positivi alla  $\beta$ -glucuronidasi; solo eccezionalmente questo test è positivo con ceppi di *Providencia*, *Enterobacter* e *Yersinia* (1-5%).<sup>11</sup>
- Circa il 3-4% degli *E. coli* è negativo alla  $\beta$ -glucuronidasi, in particolare i ceppi di *E. coli* O157<sup>12</sup>.





- Alcuni ceppi di *E. coli* possono crescere poco o per niente in terreni incubati a 44 °C. Di conseguenza, alcuni ceppi di *E. coli*, compresi quelli patogeni, non saranno rilevati dai metodi sopra riportati, tratti dalle norme ISO.<sup>10</sup>

#### 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
- I terreni disidratati devono essere maneggiati 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](http://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 produzione dei terreni.
- Prestare attenzione all'apertura dei tappi a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro. Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- Quando si utilizza una piastra riscaldante e/o un bagnomaria, far bollire a sufficienza per sciogliere tutto il terreno di coltura.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la liquefazione del terreno. Non mettere le beute calde in un bagno di ghiaccio o in acqua fredda per accelerare il raffreddamento, poiché ciò potrebbe causare crepe nel vetro.
- Il tempo necessario per la completa liquefazione del terreno in flacone può variare notevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento, dalla sua potenza, dalle dimensioni e dal volume della bottiglia.
- Una volta liquefatto, il terreno in flacone non può essere solidificato e disciolto una seconda volta.
- Le provette ed i flaconi pronti all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Ogni piastra, provetta e flacone di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti delle specifiche definite riportate sul Certificato di Controllo Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'ambiente 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](http://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

##### Piastre pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

##### Provette e Flaconi pronti all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni i prodotti sono validi fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. I flaconi/provette estratti dal confezionamento secondario possono essere utilizzati sino alla data di scadenza. Provette/ flaconi aperti devono essere usati immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare i flaconi e le provette con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).

##### Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +2°C / +8°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).

Secondo la norma ISO 16649-1, le piastre preparate in autonomia possono essere conservate a +2°C /+8°C al buio e protette dall'evaporazione per un massimo di quattro settimane.<sup>9</sup> Immediatamente prima dell'uso, asciugare accuratamente le piastre di agar.

#### 16-BIBLIOGRAFIA

- Baird RM, Corry JEL, Curtis GDW. Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology. Proceedings of the 4th International Symposium on Quality Assurance and Quality Control of Microbiological Culture Media, Manchester 4-5 September, 1986. Int J Food Microbiol 1987; 5:276-277.
- Anderson JM, Baird-Parker AC A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype I in food. J Appl Bacteriol 1975;39:111-7.
- Kilian M, Bulow P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol Microbiol. Scand. Sect. B. 1976; 84:245-251.
- Trepeta RW, Edberg SC. Methylumbelliferyl- D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1984; 19 :172.
- Ley AN, Bowers RJ, Wolfe S. Indoxyl-β-D-glucuronide, a novel chromogenic reagent for the specific detection and enumeration of *Escherichia coli* in environmental samples. Can J Microbiol 1988; 34: 690-693
- Restaino L., Frampton EW, Lyon RH. Use of the chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-GLUC) for enumerating *Escherichia coli* in 24 h from ground beef. J Food Prot 1990; 53:508-510.
- Ogden ID, Watt AJ. An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration of *Escherichia coli*. Lett Appl Microbiol 1991; 13:212-215.





8. 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.
9. 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 °C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.
10. ISO 16649-3:2016. 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.
11. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
12. Robison BJ.Evaluation of a fluorogenic assay for detection of Escherichia coli in foods. Appl Environ Microbiol 1984; 48:285-288

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

<b>REF</b> o REF Numero di catalogo	<b>LOT</b> Numero di lotto	 Fabbricante	 Utilizzare entro	 Proteggere dall'umidità	 Fragile, maneggiare con cura
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Lato superiore	 Proteggere dalla luce	 Monouso

**CRONOLOGIA DELLE REVISIONI**

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 11	Aggiornamento del contenuto e del layout	04/2023

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

