

TRYPTIC GLUCOSE YEAST AGAR (PLATE COUNT AGAR) (STANDARD METHODS AGAR) Terreno in polvere e pronto all'uso.

1 - DESTINAZIONE D'USO

Per la conta microbica totale in alimenti, latte, prodotti caseari, acqua e altri campioni di interesse sanitario.

2- COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)*

TERRENO IN POLVERE E PRONTO ALL'USO

Triptone	5.0 g
Estratto di lievito	2.5 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

Tryptic Glucose Yeast Agar, noto anche come Plate Count Agar o Standard Methods Agar, è raccomandato dalle autorità di regolamentazione¹⁻⁷ per il conteggio dei microrganismi aerobi, mesofili, termofili o psicotrofi in alimenti, latte, prodotti lattiero-caseari, acque, materie prime e altri campioni di interesse sanitario, nonché per la valutazione delle condizioni sanitarie dei campioni ambientali nell'ambito della produzione e della manipolazione di alimenti e mangimi. Questo test si basa sul presupposto che ogni cellula vitale, coppia di cellule o piccolo gruppo di cellule formerà una colonia visibile, chiamata unità formante colonia (UFC), quando viene mescolata al terreno di coltura.⁴ Il conteggio dei microrganismi richiede la diluizione dei campioni per ottenere una popolazione che possa essere contata con il metodo scelto. Sono state descritte e sono disponibili diverse tecniche per la conta dei microrganismi aerobi in piastra: tecnica per inclusione, semina in superficie, filtrazione su membrana, metodo a spirale, metodo dell'ansa calibrata, metodo a goccia.⁴ La scelta del metodo più appropriato deve tenere conto dei requisiti delle autorità di normazione, del tipo di campione da analizzare, dei microrganismi e del livello di contaminazione attesi.

La norma ISO 4833-1 specifica un metodo per inclusione per il conteggio dei microrganismi mesofili ed è applicabile ai prodotti che richiedono un conteggio affidabile quando è specificato un basso limite di rilevazione o ai prodotti che si prevede contengano colonie che possano sciamare.¹

La norma ISO 4833-2 specifica una tecnica di semina sulla superficie del terreno, applicabile a prodotti contenenti organismi sensibili al calore o batteri aerobi obbligati.²

La norma ISO 17410 descrive un metodo di semina sulla superficie del terreno per il conteggio di microrganismi psicotrofi con incubazione a 6,5 °C.³

Negli Stati Uniti, procedure dettagliate per la determinazione della conta microbica su piastra sono state sviluppate da APHA⁴⁻⁶, da AOAC⁷ e riassunte nel FDA-BAM.⁸

La formulazione del Tryptic Glucose Yeast Agar è conforme agli Standard ISO, al FDA-BAM e ad altre autorità di normazione.

Il triptone fornisce azoto, carbonio, minerali ed aminoacidi per la crescita microbica. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. Il glucosio è una fonte di carbonio ed energia.

4A- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 23,5 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente per dissolvere completamente la polvere e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene e distribuire in piastre di Petri sterili.

4B- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN FLACONI

Liquefare il contenuto del flacone in autoclave a 100 ± 2°C o in un bagnomaria a temperatura controllata (100°C). In alternativa, il flacone può essere inserito in un recipiente con acqua, posto su una piastra riscaldante e portato ad ebollizione. Allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento. Raffreddare a 47-50°C e versare il terreno di coltura in piastre di Petri sterili con le precauzioni dell'asepsi.

5 - CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Terreno disidratato	fine granulometria omogenea di colore beige
Aspetto della soluzione e del terreno preparato	beige chiaro, limpido
pH finale del terreno a 20-25 °C:	7,0 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Tryptic Glucose Yeast Agar (Plate Count Agar), (Standard Methods Agar)	Terreno in polvere	4021452	500 g (21.3L)
		4021454	5 Kg (213 L)
Plate Count Agar	Flaconi pronti all'uso	5121452	6 x 100 mL
		5121453	6 x 200 mL
Plate Count Agar	Piastre pronte all'uso	542145	2 x 10 piastre ø 90 mm
Plate Count Agar	Piastre pronte all'uso	492145	3 x 10 piastre ø 55 mm
Plate Count Agar	Provette pronte all'uso	552145B	20 x 15 mL

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, pipette e bacchette a L sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, matracci, piastre di Petri sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.





8 - CAMPIONI

Materiali di importanza sanitaria come prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali, campioni ambientali nel settore della produzione e della manipolazione degli alimenti. Consultare i riferimenti appropriati per la raccolta, la conservazione e la preparazione dei campioni.¹⁻⁷

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Conteggio delle colonie per inclusione¹

1. Utilizzando una pipetta sterile, dispensare 1 mL del campione liquido, o 1 mL di una sospensione iniziale nel caso di altri prodotti, in una piastra Petri vuota e mescolare il Tryptic Glucose Yeast Extract Agar fuso e pre-raffreddato a 44-46°C.
2. Preparare le altre piastre nelle stesse condizioni utilizzando diluizioni decimali del campione in esame o della sospensione iniziale.
3. Incubare le piastre in aerobiosi a 30 °C per 72 ore.

Conteggio delle colonie con la semina superficiale^{2,3}

1. Asciugare le piastre preparate prima dell'uso.
2. Con 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 Yeast Extract Agar.
3. Distribuire con cura l'inoculo con una bacchetta ad L in modo uniforme e il più rapidamente possibile sulla superficie del terreno, senza toccare le pareti della piastra.
4. Lasciare le piastre per circa 15 minuti a temperatura ambiente affinché l'inoculo venga assorbito dall'agar.
5. Incubare le piastre in aerobiosi a 30 °C per 72 ore per il conteggio dei microrganismi mesofili o a 6,5 °C per 10 giorni per il conteggio dei microrganismi psicrotrofi.

Consultare la bibliografia per i dettagli delle procedure.¹⁻⁷

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo incubazione, contare tutte le colonie coltivate, 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.¹⁻⁷

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 facoltà 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

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T°/ t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> ATCC 8739	30°C/72H-A	buona crescita
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	30°C/72H-A	buona crescita
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	30°C/72H-A	buona crescita

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

12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di Tryptic Glucose Yeast Agar disidratato e pronto all'uso vengono sottoposti a test di produttività confrontando i risultati con Tryptic Soy Agar.

La produttività viene valutata con metodo quantitativo con i seguenti ceppi: *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538 e *B. subtilis* ATCC 6633. Le piastre sono inoculate in superficie, con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 30°C per 72 ore. Le colonie sono contate su entrambi i terreni e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr: UFC_{PCA}/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 semiquantitativa con i seguenti ceppi: *S. pyogenes* ATCC 19615 ed *E. faecalis* ATCC 19433. Dopo incubazione, viene valutata l'entità della crescita: entrambi i ceppi testati presentano una buona crescita.

13- LIMITI DEL METODO

- Un ritardo di oltre 10 minuti tra la dispensazione del campione nelle piastre Petri e l'aggiunta di agar può dar luogo a conteggi inferiori.^{4,9}
- Una potenziale fonte di errore nel conteggio può derivare dall'impilamento delle piastre di Petri: in una pila di 3 piastre, la piastra centrale e quella superiore impiegano un tempo maggiore per raffreddarsi, determinando così conteggi inferiori.^{4,10}
- Aumentando il tempo di permanenza delle diluizioni microbiche nel diluente si ottengono conteggi più elevati.^{4,11}
- La conta in piastra non distingue tra diversi tipi di batteri. Variazioni del tempo e della temperatura di incubazione e del tipo di atmosfera selezionano la crescita e quindi il conteggio di tipi diversi di microrganismi.⁴

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per controlli microbiologici, è per uso professionale e 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 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 norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Prestare attenzione all'apertura dei flaconi e delle provette con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- 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 in flacone ed in provetta. Non mettere flaconi e provette 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 ed in provetta 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 ed in provetta non può essere solidificato e disciolto una seconda volta.
- I flaconi e le provette pronte all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Ogni piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura in polvere ed i ceppi microbici.
- Sterilizzare prima i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni 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

Terreno in polvere

Conservare a +10°C /+30°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).

L'utilizzatore è responsabile del processo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento). Secondo le norme ISO, il terreno preparato in laboratorio in flacone può essere conservato a +2 °C / +8 °C per un massimo di 3 mesi e le piastre possono essere conservate a +2 °C / +8 °C per un massimo di 4 settimane.^{1,3}

Piastre pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C /+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 ed alla temperatura indicata in etichetta. 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).

Terreno pronto all'uso in flacone ed in provetta

Dopo il ricevimento, conservare i flaconi e le provette nella loro confezione originale a +2/+8°C al riparo dalla luce diretta. Se correttamente conservati, i flaconi e le provette possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Non utilizzare i flaconi e le provette oltre questa data. I flaconi e le provette delle confezioni secondarie aperte possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. I flaconi e le provette aperte devono essere utilizzati immediatamente. Prima dell'uso controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare flaconi e le provette con segni di deterioramento (ad es. contaminazione microbica, torbidità anomala, precipitato, colore atipico).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique.
2. ISO 4833-2:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique.
3. ISO 17410:2019. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms
4. American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 5th ed. 2015. APHA, Washington, DC.
5. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water, 23rd ed. 2017. APHA, Washington, DC
6. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th ed. 2004. APHA, Washington, DC.
7. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 21st ed. 2019. AOAC, Arlington, VA.
8. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 3: Aerobic Plate Count. Rev 2001
9. Berry JM, McNeill DA, Witter LD. Effect of delay in pour plating on bacterial counts. J Dairy Sci 1969; 52:1456-1457
10. Koburger JA. Stack pouring of Petri plates: a potential source of error. J Food Prot. 1980; 43:561-562.
11. Huhtanen CN Brazis AR, Arledge WL et al. Effects of time of holding dilutions on counts of bacteria from raw milk. J Milk Food Technol. 1972; 35:126-130.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	Monouso	Fabbrikante	Lato superiore	Proteggere dall'umidità
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 5	Aggiornamento del contenuto e del Layout	01/2023

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

