

TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)

Catalog #	Description
3564035	TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide) , dehydrated, 500 g
3555309	TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide) , 100 ml x 6 bottles

For laboratory use only.

Intended Use

Selective chromogenic medium used for the direct enumeration (without colony confirmation) of glucuronidase positive *Escherichia coli* in products intended for human and animal consumption, primary production samples and environmental samples.

Principle

The principle of the medium relies on the detection of the β -D-glucuronidase activity of *E. coli*. The medium contains a complex chromogen linked to a sugar (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide [BCIG]) which is specific to β -D-glucuronidase. Absorbed by the target microorganism, the BCIG is hydrolyzed by this enzyme. The sugar is consumed by the bacteria and the chromogenic agent accumulates in this same cell, giving *E. coli* colonies a blue or blue-green color. With the combined action of high incubation temperature and the presence of bile salts, this medium is selective against Gram positive bacteria and interfering flora.

Theoretical Composition

Base Medium

Enzymatic casein digest	20 g
Bile salts #3	1.5 g
BCIG	0.075 g
Agar	12 g
Distilled water	1,000 ml
Final pH at 25°C = 7.2 $\pm$ 0.2	

Shelf Life and Storage

Store ready-to-use medium 2–8°C in a dark place. Store dehydrated medium at 15–25°C in carefully sealed bottles in a cool, dry place. Medium prepared by user from dehydrated product has a shelf life of 30 days when stored at 2–8°C in a dark place.

Required Materials Not Supplied

This list is not exhaustive.

Equipment

- All usual laboratory equipment
- Incubators or incubation room
- Scales
- Stirrer/homogenizer
- Vortexer
- Water-bath capable of maintaining $\pm$ 1°C
- Sterile forceps for handling membranes

Supplies

- Sterile Petri dishes ($\varnothing$ = 90 mm)
- Sterile disposable platinum loop or inoculating loops
- Sterile pipettes (1 ml, etc)
- Sterile membrane filters ($\varnothing$ = 85 mm, 0.45 μ m to 1.2 μ m)
- Sterile spreaders

Precautions

- Respect Good Laboratory Practice (EN ISO 7218). Appropriate protection, such as gloves and lab coats, should be worn when working with potentially infectious live bacteria
- Media that have come in contact with food, environmental or primary production samples should be considered contaminated and should be disposed of in accordance with local rules and regulations
- Some *E. coli* strains:
 - are β -D-glucuronidase negative (around 3–4 %) and do not produce a blue color (e.g. *E. coli* O157)
 - do not develop at the high temperature of 44°C (e.g. *E. coli* O157:H7)
- Some serovars of *Salmonella* and a few species of *Shigella* also possess the enzyme β -D-glucuronidase (<1.5%)
- If the presence of stressed *E. coli* is suspected when inoculating without a membrane, incubate 4 hr at $37 \pm 1^\circ\text{C}$, then 21 ± 3 hr at $44 \pm 1^\circ\text{C}$
- Incubation should not exceed 24 hr and 45°C
- For media which are ready-to-use or prepared in advance, avoid any prolonged overheating during autoclave sterilization. To maintain optimal quality, the medium must not undergo more than 1 cycle of heating and solidification after initial preparation
- The medium may present a frothy appearance after solidification in bottles. It nevertheless retains all its qualities when the appearance changes after melting and shaking
- As development of colonies at the bottom of the Petri dish may interfere with reading (due to staining of colonies), the time lapse between depositing the inoculum in Petri dishes and addition of the medium must not exceed 15 min
- Avoid trapping any air bubbles underneath the membrane when depositing it on the agar. If necessary, gently and carefully flatten the membrane using sterile forceps
- For SDS product safety information and certificate of analysis, visit bio-rad.com

Quality Control

Every product manufactured and marketed by Bio-Rad is subject to a quality assurance procedure at all stages, from reception of raw materials through to marketing of the finished products. Each batch of finished product undergoes quality control according to EN ISO 11133 and is marketed only if it satisfies the acceptability criteria. Documentation relative to the production and quality control of each batch is kept on file.

Protocol

Dehydrated Base Medium Preparation

- Shake the bottle before use
- Dissolve 33.6 g of powder in 1 L of sterile distilled water. Wait for 5 min, then mix until a homogeneous suspension is obtained
- Heat gently, swirling frequently, and bring to a boil until completely dissolved
- Dispense and sterilize at $121 \pm 3^\circ\text{C}$ for 15 min
- Cool to 44–47°C

Reconstitution ratio: 33.6 g/1 L (500 g of powder makes 14.8 L of medium base)

Sample Preparation and Enrichment

- Prepare and enrich sample according to the standard method applicable to the product concerned

Inoculation and Incubation

Membrane filtration (for products containing stressed bacteria; ISO 16649-1)

- Prepare Petri dishes with minerals modified glutamate medium (MMGA) and with TBX medium (approximately 15 ml/dish)
- Under aseptic conditions, place the membrane on the dry surface of the MMGA agar
- Transfer 1 ml of sample and/or 1 ml of its decimal dilutions to the center of the membrane
- Spread the inoculum uniformly over the entire surface of the membrane, avoiding distributing it beyond the membrane
- Leave the inoculated dishes in a horizontal position at room temperature for about 15 min, until the inoculum has been absorbed by the agar
- Invert the dishes and incubate at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 4 hr $\pm$ 15 min
- After resuscitation of injured bacteria, using sterile tweezers, transfer the membranes from MMGA medium to Petri dishes containing TBX medium
- Incubate at $44 \pm 1^\circ\text{C}$ for 20–24 hr

Pour plate inoculation (stressed or non-stressed bacteria; ISO 16649-2)

- Using sterile pipettes, transfer 1 ml of sample and/or 1 ml of its decimal dilutions to sterile Petri dishes
- Quickly pour about 15 ml of tempered (44–47°C) TBX medium to the Petri dish. Homogenize by swirling and leave to solidify on a cool, level surface
- Incubate at $44 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18–24 hr

Surface inoculation (detection and MNP method; ISO 16649-3)

- Transfer 1 ml of sample and/or its decimal dilutions to 10 ml of MMGA simple and/or double strength MMGA according to the standard protocol
- Incubate at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 hr
- Using a sterile loop, streak each positive tube onto TBX dishes
- Incubate at $44 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18–24 hr

Reading and Interpretation

- After incubation, count any characteristic glucuronidase positive *E. coli* colonies, which are blue or blue-green. Other colonies are white/beige
- For calculation and expression of results, refer to standards ISO 16649-1, -2 and -3 or ISO 7218

References

ISO 7218:2007/AMD1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations

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.

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.

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 C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.

Revision History

Release date	Document number	Change
July 2022	5096 Ver A	- Major change - New document design - Document number change — previous version: V4_12/08/11

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. All trademarks used herein are the property of their respective owner.

TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)

N° de référence Description

3564035 **TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)**, base déshydratée, 500 g
3555309 **TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)**, 100 ml x 6 flacons

Uniquement pour une utilisation en laboratoire.

Usage prévu

Milieu chromogène sélectif utilisé pour le dénombrement direct (sans confirmation des colonies) de *Escherichia coli* glucuronidase positive dans les produits destinés à la consommation humaine et animale, ainsi que dans les échantillons de production primaire et environnementaux.

Principe

Le principe du milieu repose sur la détection de l'activité β -D-glucuronidase de *E. coli*. Le milieu contient un chromogène complexe lié à un sucre (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide [BCIG]) qui est spécifique à la β -D-glucuronidase. Absorbé par le microorganisme ciblé, le BCIG est hydrolysé par cette enzyme. Le sucre est consommé par la bactérie et l'agent chromogène s'accumule dans cette même cellule, donnant aux colonies de *E. coli* une couleur bleue ou bleu-vert. Grâce à l'action conjuguée de la température d'incubation élevée et de la présence de sels biliaires, ce milieu est sélectif vis-à-vis des bactéries à Gram positif et de la flore interférente.

Formule théorique

Milieu de base

Digestat enzymatique de caséine	20 g
Sels biliaires n° 3	1,5 g
BCIG	0,075 g
Agar	12 g
Eau distillée	1 000 ml
pH final à 25 °C = 7,2 $\pm$ 0,2	

Durée de conservation et stockage

Milieu prêt à l'emploi : 2–8 °C à l'abri de la lumière. Conservation du milieu déshydraté à 15–25 °C en flacons soigneusement scellés, dans un endroit frais et sec. Le milieu préparé à partir de la base déshydratée présente une durée de conservation de 30 jours pour un stockage à 2–8 °C à l'abri de la lumière.

Matériel requis non fourni

Liste non exhaustive.

Matériel

- Tout le matériel de laboratoire habituel
- Incubateurs ou salle d'incubation
- Balances
- Agitateur-homogénéisateur
- Agitateur-mélangeur vortex
- Bain-marie capable de maintenir une température de ± 1 °C
- Pinces stériles pour la manipulation des membranes

Produits

- Boîtes de Petri stériles ($\varnothing$ = 90 mm)
- Anse de platine stérile jetable ou anses d'inoculation
- Pipettes stériles (1 ml, etc.)
- Membranes filtrantes stériles ($\varnothing$ = 85 mm, 0,45 μ m à 1,2 μ m)
- Étaleurs stériles

Précautions

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (EN ISO 7218). Porter un équipement de protection approprié, par exemple des gants et une blouse de laboratoire, pour travailler avec des bactéries vivantes potentiellement infectieuses.
- Les milieux qui sont entrés en contact avec des échantillons alimentaires, environnementaux ou de production primaire doivent être considérés comme contaminés et doivent être éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Certaines souches de *E. coli* :
 - Sont β -D-glucuronidase négative (autour de 3–4 %) et ne produisent pas de couleur bleue (par ex. *E. coli* O157)
 - Ne se développent pas à une température élevée de 44 °C (par ex. *E. coli* O157:H7)
- Certains sérovars de *Salmonella* et quelques espèces de *Shigella* possèdent également l'enzyme β -D-glucuronidase (< 1,5 %)
- Si la présence de bactéries *E. coli* est suspectée lors de l'inoculation sans membrane, incubé pendant 4 hr à 37 ± 1 °C, puis pendant 21 ± 3 hr à 44 ± 1 °C
- L'incubation ne doit pas excéder 24 hr et une température de 45 °C
- Pour les milieux prêts à l'emploi ou préparés à l'avance, éviter toute surchauffe prolongée durant la stérilisation à l'autoclave. Afin de maintenir une qualité optimale, le milieu ne doit pas subir plus d'un cycle de chauffage et de solidification après sa préparation initiale
- Le milieu peut avoir un aspect mousseux après solidification en flacons. Il conserve cependant toutes ses qualités lorsque son aspect change légèrement lorsqu'il est fondu et agité
- Le développement de colonies au fond de la boîte de Petri pouvant perturber la lecture (en raison de la coloration des colonies), le temps écoulé entre le dépôt de l'inoculum dans les boîtes de Petri et l'ajout du milieu ne doit pas excéder 15 min
- Éviter d'emprisonner des bulles d'air sous la membrane durant son placement sur la gélose. Si nécessaire, aplanir doucement et soigneusement la membrane au moyen des pinces stériles
- Pour obtenir les informations sur la sécurité du produit (fiche de données de sécurité, FDS) et le certificat d'analyse, visiter bio-rad.com

Contrôle qualité

Chaque produit fabriqué et commercialisé par Bio-Rad est soumis à une procédure d'assurance qualité à toutes les étapes, de la réception des matières premières jusqu'à la mise sur le marché du produit fini. Chaque lot de produits finis subit un contrôle qualité conforme à EN ISO 11133 et est mis sur le marché uniquement s'il satisfait aux critères d'acceptabilité. La documentation relative à la production et au contrôle qualité de chaque lot est archivée.

Protocole

Préparation du milieu de base déshydraté

- Bien agiter le flacon avant utilisation
- Dissoudre 33,6 g de poudre dans 1 L d'eau distillée stérile. Attendre 5 min et mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène
- Chauffer doucement en mélangeant fréquemment, puis amener à ébullition jusqu'à dissolution complète
- Distribuer et stériliser à 121 ± 3 °C pendant 15 min
- Refroidir à 44–47 °C

Taux de reconstitution : 33,6 g/L (500 g de poudre donnent 14,8 L de milieu de base)

Préparation de l'échantillon et enrichissement

- Préparer et enrichir l'échantillon conformément à la méthode normalisée applicable au produit concerné

Inoculation et incubation

Filtration sur membrane (pour les produits contenant des bactéries stressées : ISO 16649-1)

- Préparer les boîtes de Petri avec du milieu à base de glutamate modifié riche en minéraux (MMGA) et du milieu TBX (environ 15 ml/boîte)
- Dans des conditions d'asepsie, placer la membrane sur la surface sèche de la gélose MMGA
- Transférer 1 ml de l'échantillon et/ou de ses dilutions décimales au centre de la membrane
- Répartir l'inoculum uniformément sur toute la surface de la membrane, en évitant de déborder de la membrane
- Laisser les boîtes inoculées en position horizontale à température ambiante pendant environ 15 min, jusqu'à ce que l'inoculum ait été absorbé par la gélose
- Retourner les boîtes et incubé à 37 °C ± 1 °C pendant 4 hr ± 15 min
- Après revivification des bactéries stressées, transférer à l'aide de pinces stériles les membranes du milieu MMGA aux boîtes de Petri contenant le milieu TBX
- Incuber à 44 ± 1 °C pendant 20–24 hr

Inoculation en profondeur (bactéries stressées ou non ; ISO 16649-2)

- Utiliser des pipettes stériles pour transférer 1 ml d'échantillon et/ou de ses dilutions décimales dans les boîtes de Petri stériles
- Distribuer rapidement 15 ml environ de milieu TBX tempéré (44–47 °C) dans la boîte de Petri. Homogénéiser en mélangeant et laisser solidifier sur une surface plane et froide
- Incuber à 44 ± 1 °C pendant 18–24 hr

Inoculation de surface (détection et méthode NPP ; ISO 16649-3)

- Transférer 1 ml d'échantillon et/ou de ses dilutions décimales dans 10 ml de milieu MMGA à simple et/ou double concentration conformément au protocole normalisé
- Incuber à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 hr
- À l'aide d'une anse stérile, strier chaque tube positif sur les boîtes contenant du milieu TBX
- Incuber à 44 ± 1 °C pendant 18–24 hr

Lecture et interprétation

- Après incubation, compter les colonies de *E. coli* glucuronidase positive caractéristiques, qui sont de couleur bleue ou bleu-vert. Les autres colonies sont de couleur blanche/beige
- Pour les calculs et l'expression des résultats, consulter les normes ISO 16649-1, -2 et -3 ou ISO 7218

Références

ISO 7218:2007/AMD1:2013. Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations

ISO 16649-1:2018. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive — Partie 1 : Technique de comptage des colonies à 44 degrés C au moyen de membranes et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl bêta-D glucuronide.

ISO 16649-2:2001. Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive — Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44 degrés C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl bêta-D-glucuronate.

ISO 16649-3:2015. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive — Partie 3 : Recherche et technique du nombre le plus probable utilisant le bromo-5-chloro-4-indolyl-3 β-D-glucuronate.

Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Juillet 2022	5096 Ver A	- Modification importante - Nouvelle conception de document - Modification du numéro de document — version précédente : V4_12/08/11

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc. Toutes les marques déposées utilisées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.

TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)

Katalog-Nr. Beschreibung

3564035 **TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)**, dehydriert, 500 g

3555309 **TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)**, 6 Flaschen x 100 ml

Nur für die Verwendung im Labor.

Verwendungszweck

Selektives chromogenes Medium zur direkten Zählung (ohne Koloniebestätigung) von Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* in Produkten, die für den menschlichen und tierischen Verzehr bestimmt sind, in Proben aus der Primärproduktion und in Umweltproben.

Prinzip

Das Prinzip des Mediums beruht auf dem Nachweis der β -D-Glucuronidase-Aktivität von *E. coli*. Das Medium enthält ein komplexes Chromogen, das an einen Zucker (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Glucuronid [BCIG]) gebunden ist, für den die β -D-Glucuronidase spezifisch ist. Das vom Zielmikroorganismus absorbierte BCIG wird von diesem Enzym hydrolysiert. Der Zucker wird von den Bakterien verstoffwechselt und die chromogene Substanz reichert sich in der Zelle an, wodurch *E. coli* Kolonien eine blaue oder blaugrüne Farbe erhalten. Durch die kombinierte Wirkung einer hohen Inkubationstemperatur und des Vorhandenseins von Gallensalzen ist dieses Medium selektiv und hemmt das Wachstum grampositiver Bakterien und anderer Begleitflora.

Theoretische Zusammensetzung

Basismedium

Enzymatisch verdautes Casein	20 g
Gallensalze 3	1,5 g
BCIG	0,075 g
Agar	12 g
Destilliertes Wasser	1.000 ml
Finaler pH-Wert bei 25 °C = 7,2 $\pm$ 0,2	

Haltbarkeit und Lagerung

Das gebrauchsfertige Medium bei 2–8 °C vor Licht geschützt lagern. Das dehydrierte Medium kühl und trocken in sorgfältig verschlossenen Flaschen bei 15–25 °C lagern. Das aus dem dehydrierten Produkt hergestellte Medium ist 30 Tage haltbar, wenn es bei 2–8 °C vor Licht geschützt gelagert wird.

Zusätzlich benötigtes Material

Diese Liste ist nicht vollständig.

Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Inkubatoren oder Inkubationsraum
- Waagen
- Rührer/Homogenisator
- Vortex
- Wasserbad mit einer Temperaturgenauigkeit von ± 1 °C
- Sterile Pinzette zur Handhabung von Membranen

Zubehör

- Sterile Petrischalen ($\varnothing$ = 90 mm)
- Sterile Platinösen bzw. -impfösen zur Einmalverwendung
- Sterile Pipetten (1 ml usw.)
- Sterile Membranfilter ($\varnothing$ = 85 mm, 0,45 μ m bis 1,2 μ m)
- Sterile Drigalskispatel

Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis zu beachten (EN ISO 7218). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen lebenden Bakterien sollte angemessene Schutzkleidung wie Handschuhe und Laborkittel getragen werden.
- Medien, die mit Lebensmittel-, Umwelt- oder Primärproduktionsproben in Kontakt gekommen sind, sind als kontaminiert zu betrachten und den vor Ort geltenden Vorschriften und Bestimmungen entsprechend zu entsorgen.
- Manche *E. coli*-Stämme:
 - sind β -D-Glucuronidase negativ (ungefähr 3–4 %) und bilden keine blaue Farbe (z. B. *E. coli* O157)
 - wachsen nicht bei der erhöhten Temperatur von 44 °C (z. B. *E. coli* O157:H7)
- Einige Serovare von *Salmonella* und einige *Shigella*-Spezies weisen ebenfalls das Enzym β -D-Glucuronidase auf (< 1,5 %).
- Wenn bei der Inokulierung ohne Membran das Vorhandensein gestresster *E. coli* vermutet wird, 4 hr bei 37 ± 1 °C und anschließend 21 ± 3 hr bei 44 ± 1 °C inkubieren.
- Nicht länger als 24 hr und bei nicht mehr als 45 °C inkubieren.
- Bei gebrauchsfertigen oder zubereiteten Medien ist eine längere Überhitzung während der Sterilisation im Autoklaven zu vermeiden. Zur Erhaltung einer optimalen Qualität darf das Medium nach der Zubereitung nicht mehr als 1 Zyklus der Verflüssigung durch Erwärmen und anschließendem Erstarren ausgesetzt werden.
- Das Medium kann nach dem Erstarren in Flaschen schaumig erscheinen. Alle Eigenschaften werden jedoch beibehalten, wenn sich das Aussehen des Mediums nach dem Schmelzen und Schütteln verändert.
- Da die Entwicklung von Kolonien am Boden der Petrischale die Ablesung beeinträchtigen kann (aufgrund der Färbung der Kolonien), darf die Zeitspanne zwischen dem Einbringen des Inokulums in die Petrischale und der Zugabe des Mediums 15 min nicht überschreiten.
- Beim Auflegen der Membran auf den Agar darauf achten, dass sich darunter keine Luftblasen ansammeln. Die Membran falls notwendig, behutsam und vorsichtig mit der sterilen Pinzette glätten.
- Das Sicherheitsdatenblatt (SDS) und das Analysezertifikat für das Produkt sind auf **bio-rad.com** erhältlich.

Qualitätskontrolle

Jedes von der Firma Bio-Rad hergestellte und verkaufte Produkt unterliegt vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte einer umfassenden Qualitätssicherung. Jede Charge des fertigen Produkts wird einer Qualitätskontrolle gemäß EN ISO 11133 unterzogen und gelangt nur dann in den Vertrieb, wenn sie die Akzeptanzkriterien erfüllt. Die Unterlagen zur Produktion und Qualitätskontrolle jeder Charge werden archiviert.

Protokoll

Herstellung des Mediums ausgehend von der dehydrierten Basis

- Die Flasche vor der Verwendung schütteln.
- 33,6 g Pulver in 1 L sterilem destilliertem Wasser lösen. 5 min warten, dann mischen, bis eine homogene Suspension entstanden ist.
- Unter häufigem Schwenken vorsichtig erhitzen, dann bis zum vollständigen Auflösen kochen lassen.
- Verteilen und 15 min bei 121 ± 3 °C sterilisieren.
- Auf 44–47 °C abkühlen lassen.

Rekonstitutionsverhältnis: 33,6 g/1 L (500 g Pulver ergeben 14,8 L Mediumbasis)

Probenvorbereitung und Anreicherung

- Die Probe nach der für das jeweilige Produkt geltenden Standardmethode vorbereiten und anreichern.

Beimpfung und Inkubation

Membranfiltration (bei Produkten, die gestresste Bakterien enthalten; ISO 16649-1)

- Petrischalen mit mineralmodifiziertem Glutamatmedium (MMGA) und mit TBX Medium vorbereiten (ca. 15 ml/Petrischale)
- Die Membran unter aseptischen Bedingungen auf die trockene Oberfläche des MMGA Agars aufbringen
- 1 ml Probe und/oder 1 ml ihrer Dezimalverdünnung in die Mitte der Membran überführen
- Das Inokulum gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche der Membran, aber möglichst nicht darüber hinaus, verteilen
- Die beimpften Petrischalen ca. 15 min waagrecht bei Raumtemperatur stehen lassen, bis das Inokulum von dem Agar absorbiert ist
- Die Petrischalen umdrehen und 4 hr ± 15 min bei 37 ± 1 °C inkubieren
- Nach der Reaktivierung geschädigter Bakterien die Membranen mit einer sterilen Pinzette von dem MMGA-Medium in Petrischalen mit TBX-Medium überführen
- Bei 44 ± 1 °C für 20–24 hr inkubieren

Beimpfung nach dem Plattengussverfahren (gestresste oder nicht gestresste Bakterien; ISO 16649-2)

- Mit einer sterilen Pipette 1 ml Probe und/oder 1 ml ihrer Dezimalverdünnung in sterile Petrischalen überführen
- Rasch ca. 15 ml temperiertes (44–47 °C) TBX Medium in die Petrischale gießen. Durch Schwenken homogenisieren und auf einer kühlen, ebenen Fläche fest werden lassen
- Bei 44 ± 1 °C für 18–24 hr inkubieren

Oberflächenbeimpfung (Nachweis und MNP-Methode; ISO 16649-3)

- Unter Befolgung des Standardprotokolls 1 ml der Probe und/oder ihrer Dezimalverdünnung in 10 ml einfach- und/oder doppelkonzentriertes MMGA überführen
- Bei 37 ± 1 °C für 24 ± 2 hr inkubieren
- Den Inhalt jedes positiven Röhrchens mit einer sterilen Öse auf TBX Agarplatten ausstreichen
- Bei 44 ± 1 °C für 18–24 hr inkubieren

AbleSEN und Auswerten der Ergebnisse

- Nach der Inkubation alle charakteristischen Glucuronidase-positiven *E. coli*-Kolonien mit blauer oder blaugrüner Farbe zählen. Andere Kolonien sind weiß/beige
- Zur Berechnung und Angabe der Ergebnisse siehe die Normen ISO 16649-1, -2 und -3 oder ISO 7218

Literatur

ISO 7218:2007/AMD1:2013. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen

ISO 16649-1:2018. Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für die Zählung von beta-Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* — Teil 1: Koloniezählverfahren bei 44 °C mit Membranen und 5-Brom-4-Chlor-3-Indol-beta-D-Glucuronid.

ISO 16649-2:2001. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für die Zählung von beta-Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* — Teil 2: Koloniezählverfahren bei 44 °C mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indol-beta-D-Glucuronid.

ISO 16649-3:2015. Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für die Zählung von beta-Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* — Teil 3: Nachweis und Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl unter Verwendung von 5-Brom-4-Chlor-3-Indol-beta-D-Glucuronid.

Revisionshistorie

Versionsdatum	Dokumentnummer	Änderung
Juli 2022	5096 Ver A	- Bedeutende Änderung - Neues Dokumentdesign - Änderung der Dokumentnummer — vorhergehende Version: V4_12/08/11

BIO-RAD ist eine Marke von Bio-Rad Laboratories, Inc. Alle hierin verwendeten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.

TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)

Numero catalogo Descrizione

3564035 **TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)**, in forma disidratata, 500 g

3555309 **TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)**, 100 ml x 6 flaconi

Esclusivamente per uso in laboratorio.

Uso previsto

Terreno cromogenico selettivo utilizzato per la conta diretta (senza conferma della colonia) di *Escherichia coli* positiva alla glucuronidasi in prodotti destinati al consumo umano e animale, campioni di produzione primaria e campioni ambientali.

Principio

Il principio del terreno si basa sul rilevamento dell'attività della β -D-glucuronidasi dell'*E. coli*. Il terreno contiene un complesso cromogeno legato allo zucchero (5-bromo-4-cloro-3-indolile- β -glucuronide [BCIG]) specifico della β -D-glucuronidasi. Una volta assorbito dal microorganismo bersaglio, il BCIG viene idrolizzato da questo enzima. Lo zucchero è consumato dai batteri e l'agente cromogenico si accumula in questa stessa cellula, fornendo alle colonie di *E. coli* una colorazione blu o blu-verde. Con l'azione combinata della temperatura di incubazione elevata e della presenza di sali biliari, questo terreno è selettivo contro i batteri gram-positivi e la flora interferente.

Composizione teorica

Terreno di base

Digerito enzimatico di caseina	20 g
Sali biliari #3	1,5 g
BCIG	0,075 g
Terreno di coltura agar	12 g
Acqua distillata	1.000 ml
pH finale a 25 °C = 7,2 $\pm$ 0,2	

Durata e conservazione

Conservare il terreno pronto per l'uso a 2–8 °C in un luogo buio. Conservare il terreno disidratato a 15–25 °C in un flacone accuratamente sigillato in un luogo fresco e asciutto. Il terreno preparato dall'utilizzatore a partire dal prodotto in forma disidratata ha una durata di 30 giorni se conservato a 2–8 °C in un luogo buio.

Materiali richiesti non in dotazione

Il presente elenco non è esaustivo.

Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Incubatori o camera di incubazione
- Bilance
- Agitatore/omogeneizzatore
- Vortex
- Capace di mantenere $\pm$ 1 °C a bagnomaria
- Pinze sterili per manipolazione delle membrane

Materiali

- Piastre di Petri sterili ($\varnothing$ = 90 mm)
- Occhiello in platino monouso sterile oppure occhielli per inoculazione
- Pipette sterili (1 ml, ecc.)
- Filtri a membrana sterili ($\varnothing$ = 85 mm, da 0,45 μ m a 1,2 μ m)
- Spargitori sterili

Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 7218). Indossare protezioni adeguate, come guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi
- I terreni entrati in contatto con campioni di alimenti, ambientali o di produzione primaria devono essere considerati come contaminati e quindi smaltiti in conformità alle normative e direttive locali
- Alcuni ceppi di *E. coli*:
 - sono negativi alla β -D-glucuronidasi (intorno al 3–4%) e non producono una colorazione blu (ad es. *E. coli* O157)
 - non si sviluppano alla temperatura elevata di 44 °C (ad es. *E. coli* O157:H7)
- Alcuni sierotipi di *Salmonella* e alcune specie di *Shigella* presentano inoltre l'enzima β -D-glucuronidasi (<1,5%)
- Se si sospetta la presenza di *E. coli* sottoposta a stress durante l'inoculazione senza una membrana, incubare per 4 hr a 37 ± 1 °C, quindi per 21 ± 3 hr a 44 ± 1 °C
- L'incubazione non deve superare le 24 hr a 45 °C
- Per i terreni pronti all'uso o preparati in precedenza, evitare qualsiasi surriscaldamento prolungato durante la sterilizzazione in autoclave. Per mantenere una qualità ottimale, il terreno non deve essere sottoposto a più di 1 ciclo di riscaldamento e solidificazione dopo la preparazione iniziale
- Il terreno potrebbe apparire schiumoso dopo la solidificazione nei flaconi. Mantiene tuttavia tutte le sue qualità anche quando il suo aspetto cambia dopo lo scioglimento e l'agitazione
- Poiché lo sviluppo di colonie sul fondo della piastra di Petri potrebbe interferire con la lettura (macchiando le colonie), il periodo di tempo fra la deposizione dell'inoculo nelle piastre di Petri e l'aggiunta del terreno non deve superare i 15 min
- Evitare di intrappolare bolle d'aria sotto la membrana durante il suo posizionamento sul terreno di coltura agar. Se necessario, appiattire delicatamente e con cautela la membrana utilizzando pinze sterili
- Per informazioni sulla sicurezza del prodotto (schede dati di sicurezza) e il certificato di analisi, visitare **bio-rad.com**

Controllo qualità

Tutti i prodotti fabbricati e commercializzati dalla società Bio-Rad sono sottoposti a un sistema di assicurazione qualità dal momento del ricevimento delle materie prime fino alla commercializzazione dei prodotti finiti. Ciascun lotto di prodotto finito è soggetto a un controllo di qualità conformemente alla norma EN ISO 11133 e viene messo in commercio soltanto se risulta conforme ai criteri di accettazione. La documentazione relativa alla produzione e al controllo di qualità di ciascun lotto è conservata a cura del fabbricante.

Protocollo

Preparazione del terreno di base disidratato

- Agitare i flaconi prima dell'uso
- Sciogliere 33,6 g di polvere in 1 L di acqua distillata sterile. Attendere 5 min, quindi miscelare fino ad ottenere una sospensione omogenea
- Riscaldare lentamente, agitando frequentemente, quindi portare a ebollizione fino al completo scioglimento
- Dispensare e sterilizzare a 121 ± 3 °C per 15 min
- Raffreddare a 44–47 °C

Rapporto di ricostituzione: 33,6 g/1 L (500 g di polvere producono 14,8 L di terreno di base)

Arricchimento e preparazione del campione

- Preparare e arricchire il campione secondo il metodo standard applicabile al prodotto in questione

Inoculazione e incubazione

Filtrazione su membrana (per i prodotti che contengono batteri sottoposti a stress; ISO 16649-1)

- Preparare le piastre di Petri con il terreno di glutammato modificato da minerali (MMGA) e con il terreno TBX (all'incirca 15 ml/piastra)
- In condizioni asettiche, posizionare la membrana sulla superficie asciutta del terreno di coltura agar MMGA
- Trasferire 1 ml di campione e/o 1 ml di diluizioni decimali al centro della membrana
- Spargere l'inoculo in modo uniforme sull'intera superficie della membrana, evitando di distribuirlo al di fuori della membrana
- Lasciare le piastre inoculate in posizione orizzontale a temperatura ambiente per circa 15 min, finché l'inoculo non è stato assorbito dall'agar
- Capovolgere le piastre e incubarle a 37 ± 1 °C per 4 hr $\pm$ 15 min
- Dopo la rianimazione dei batteri feriti, utilizzando pinzette sterili, trasferire le membrane dal terreno MMGA alle piastre di Petri contenenti il terreno TBX
- Incubare a 44 ± 1 °C per 20–24 hr

Versare l'inoculazione della piastra (batteri sottoposti o non sottoposti a stress; ISO 16649-2)

- Utilizzando pipette sterili, trasferire 1 ml di campione e/o 1 ml delle sue diluizioni decimali su piastre di Petri sterili
- Versare rapidamente circa 15 ml di terreno TBX temperato (44–47 °C) sulla piastra di Petri. Omogeneizzare tramite agitazione e lasciare solidificare su una superficie piana e fredda
- Incubare a 44 ± 1 °C per 18–24 hr

Inoculazione su superficie (rilevamento e metodo MNP; ISO 16649-3)

- Trasferire 1 ml di campione e/o le sue diluizioni decimali su 10 ml di campione MMGA e/o MMGA a doppia forza secondo il protocollo standard
- Incubare a 37 ± 1 °C per 24 ± 2 hr
- Utilizzando un'ansa sterile, strisciare ogni provetta positiva sulle piastre di TBX
- Incubare a 44 ± 1 °C per 18–24 hr

Lettura e interpretazione

- Dopo l'incubazione, conteggiare qualsiasi colonia caratteristica di *E. coli* positiva alla glucuronidasi, di colore blu o blu-verde. Le altre colonie sono di colore bianco/beige
- Per il calcolo e l'espressione dei risultati, fare riferimento agli standard ISO 16649-1, -2 e -3 o ISO 7218

Riferimenti

ISO 6579-1:2017/AMD 1:2020. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration, and serotyping of *Salmonella* spp.

ISO 7218:2007/AMD1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 19250:2010. Water quality — Detection of *Salmonella* spp.

NF U47-100 July 2007. Animal health analysis methods – Isolation and identification of *Salmonella* or search for particular serovar's in the animal production sector.

NF U47-101 November 2007. Animal health analysis methods – Isolation and identification of any salmonella serotype or of specified salmonella serotypes among birds.

NF U47-102 January 2008. Animal health analysis methods – Isolation and identification of any salmonella serotype or of specified salmonella serotypes among mammals.

Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Luglio 2022	5096 Ver A	- Modifica importante - Nuova struttura del documento - Modifica al numero di documento — versione precedente: V4_12/08/11

BIO-RAD è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc. Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà del rispettivo proprietario.

TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)

Nº do catálogo Descrição

3564035 **TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)**, desidratado, 500 g
3555309 **TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)**, 100 ml x 6 frascos

Somente para uso em laboratório.

Uso previsto

Meio cromogênico seletivo usado para enumeração direta (sem confirmação de colônias) de *Escherichia coli* com glucuronidase positiva em alimentos para consumo humano e animal, amostras de produção primária e amostras ambientais.

Princípio

O princípio do meio se baseia na detecção de atividade de β -D-glucuronidase do *E. coli*. O meio contém um complexo cromogênico ligado a açúcar (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucuronídeo [BCIG]) que é específico de β -D-glucuronidase. Absorvido pelo microrganismo alvo, o BCIG é hidrolisado por esta enzima. O açúcar é consumido por bactérias e o agente cromogênico se acumula nesta mesma célula, dando às colônias de *E. coli* uma coloração azul ou azul-esverdeada. Com ação combinada de alta temperatura de incubação e a presença de sais biliares, este meio é seletivo contra bactérias Gram positivas e flora interferente.

Composição teórica

Meio de Base

Digerido de caseína enzimático	20 g
Sais biliares #3	1,5 g
BCIG	0,075 g
Ágar	12 g
Água destilada	1.000 ml
pH final em 25°C = 7,2 $\pm$ 0,2	

Prazo de validade e armazenamento

Armazene meios prontos para uso em 2–8°C em local escuro. Armazene o meio desidratado a 15–25°C em frascos cuidadosamente fechados em um local fresco e seco. Meio preparado pelo usuário a partir do produto desidratado tem uma vida útil de 30 dias quando armazenado a 2–8°C em local escuro.

Materiais necessários não fornecidos

Essa lista não é exaustiva.

Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Incubadoras ou sala de incubação
- Balanças
- Misturador/homogeneizador
- Agitador
- Banho de água capaz de manter $\pm$ 1°C
- Pinça estéril para manuseio de membranas

Suprimentos

- Placas de Petri estéreis ($\varnothing$ = 90 mm)
- Alça de platina descartável estéril ou alças de inoculação
- Pipetas estéreis (1 ml, etc.)
- Filtros de membrana estéreis ($\varnothing$ = 85 mm, 0,45 μ m a 1,2 μ m)
- Espalhadores estéreis

Precauções

- Respeite as Boas Práticas de Laboratório (EN ISO 7218). Proteção adequada, como luvas e jalecos, deve ser usada ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas
- O meio que entrou em contato com amostras de alimentos, ambiente ou produção primária deve ser considerado contaminado e descartado de acordo com as regras e regulamentos locais
- Algumas cepas de *E. coli*:
 - são β -D-glucuronidase negativa (em torno de 3–4%) e não produzem uma coloração azul (por ex., *E. coli* O157)
 - não se desenvolvem a alta temperatura de 44°C (por ex., *E. coli* O157:H7)
- Alguns sorovares de *Salmonella* e algumas espécies de *Shigella* também possuem a enzima β -D-glucuronidase (<1,5%)
- Se houver suspeita de presença de *E. coli* estressado ao inocular sem membrana, incube por 4 hr a 37 $\pm$ 1°C, e em seguida por 21 $\pm$ 3 hr a 44 $\pm$ 1°C
- A incubação não deve exceder 24h e 45°C
- Para meios que estão prontos para uso ou são preparados antecipadamente, evite qualquer superaquecimento prolongado durante a esterilização em autoclave. Para manter a qualidade ideal, o meio não deve passar por mais de um ciclo de aquecimento e solidificação após a preparação inicial
- O meio pode apresentar aspecto espumoso após a solidificação em frascos. No entanto, ele conserva todas as suas qualidades quando a aparência muda após derreter e agitar
- Como o desenvolvimento de colônias no fundo da placa de Petri pode interferir na leitura (devido à coloração das colônias), o lapso de tempo entre a deposição do inóculo nas placas de Petri e a adição do meio não deve exceder 15 min
- Evite prender bolhas de ar abaixo da membrana ao depositá-lo no ágar. Se necessário, alise delicadamente e com cuidado a membrana utilizando a pinça estéril
- Para informações de segurança do produto SDS e certificado de análise, visite bio-rad.com

Controle de Qualidade

Todos os produtos fabricados e comercializados pela Bio-Rad estão sujeitos aos procedimentos de garantia de qualidade em todas as etapas, desde o recebimento da matéria-prima até a comercialização do produto final. Cada lote de produto acabado passa por um controle de qualidade de acordo com a EN ISO 11133 e é comercializado apenas quando satisfaz os critérios de aceitabilidade. A documentação relativa à produção e ao controle de qualidade de cada lote é mantida arquivada.

Protocolo

Base desidratada Preparação do meio

- Agite a garrafa antes de usar
- Dissolva 33,6 g de pó 1 L de água destilada estéril. Aguarde 5 min e misture até obter uma suspensão homogênea
- Aqueça delicadamente, girando com frequência e deixe ferver até dissolver completamente
- Dispense e esterilize a 121 $\pm$ 3°C por 15 min
- Refrigere a 44–47°C

Taxa de reconstituição: 33,6 g/1 L (500 g de pó faz 14,8 L de base de meio)

Preparação de amostra e enriquecimento

- Prepare e enriqueça a amostra de acordo com o método padrão aplicável ao respectivo produto

Inoculação e Incubação

Filtragem da membrana (para produtos contendo bactéria estressada; ISO 16649-1)

- Prepare as placas de Petri com meio glutamato modificado com minerais (MMGA) e meio TBX (aproximadamente 15 ml/placa)
- Sob condições assépticas, coloque a membrana na superfície seca do ágar MMGA
- Transfira 1 ml da amostra e/ou 1 ml de suas diluições decimais no centro da membrana
- Espalhe o inóculo uniformemente sobre toda a superfície da membrana, evitando distribuir além da membrana
- Deixe as placas inoculadas na posição horizontal a temperatura ambiente por aproximadamente 15 min, até que o inóculo seja absorvido pelo ágar
- Inverta as placas e incube a 37 $\pm$ 1°C por 4 hr $\pm$ 15 min
- Após a ressuscitação da bactéria ferida, usando pinças estéreis, transfira as membranas do meio MMGA para as placas de Petri contendo meio TBX
- Incube a 44 $\pm$ 1°C por 20–24 hr

Derramamento da inoculação na placa (bactéria estressada ou não estressada; ISO 16649-2)

- Usando pipetas estéreis, transfira 1 ml de amostra e/ou 1 ml de suas diluições decimais nas placas de Petri estéreis
- Derrame rapidamente aproximadamente 15 ml de meio TBX temperado (44–47°C) na placa de Petri. Homogeneíze girando e deixe solidificar em uma superfície nivelada e fria
- Incube a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18–24 hr

Inoculação da superfície (detecção e método NMP; ISO 16649-3)

- Transfira 1 ml de amostra e/ou suas diluições decimais para 10 ml de MMGA de concentração simples e/ou dupla de acordo com o protocolo padrão
- Incube a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 hr
- Usando uma alça estéril, estrie cada tubo positivo nas placas TBX
- Incube a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18–24 hr

Leitura e Interpretação

- Após a incubação, conte as colônias de *E. coli* com características de glucuronidase positiva, que possuem coloração azul ou azul-esverdeada. As outras colônias são brancas/beges
- Para cálculo e expressão dos resultados, consulte as normas ISO 16649-1, -2 e -3 ou ISO 7218

Referências

ISO 7218:2007/AMD1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations

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.

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.

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 C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.

Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Julho de 2022	5096 Ver A	- Alteração importante - Novo design de documento - Alteração do número do documento — versão anterior: V4_12/08/11

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc. Todas as marcas comerciais usadas neste documento são de propriedade de seus respectivos proprietários.

TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide)

Referencia # Descripción

3564035	TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide) , deshidratado, 500 g
3555309	TBX Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide) , 100 ml x 6 frascos

Sólo para uso en laboratorio.

Uso previsto

Medio cromogénico selectivo utilizado para el recuento directo (sin confirmación de las colonias) de *Escherichia coli* positiva a la glucuronidasa en productos destinados al consumo humano y animal, muestras de producción primaria y muestras ambientales.

Principio

El principio del medio se basa en la detección de la actividad β -D-glucuronidasa en *E. coli*. El medio contiene un cromógeno complejo unido a un azúcar (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucurónido [BCIG]) que es específico de la β -D-glucuronidasa. Absorbido por el microorganismo meta, el BCIG es hidrolizado por esta enzima. El azúcar es consumido por la bacteria y el agente cromógeno se acumula en esta misma célula, confiriendo a las colonias de *E. coli* un color azul o azul-verde. Con la acción combinada de la alta temperatura de incubación y la presencia de sales biliares, este medio es selectivo contra las bacterias Gram positivas y la flora interferente.

Composición teórica

Medio base

Peptona de Caseína (digestión enzimática)	20 g
Sales biliares #3	1,5 g
BCIG	0,075 g
Agar	12 g
Agua destilada	1.000 ml
pH final a 25 °C = 7,2 $\pm$ 0,2	

Vida útil y almacenamiento

Almacenar el medio listo para usar a 2–8 °C en un lugar oscuro. Almacenar el medio deshidratado a 15–25 °C en frascos bien cerrados en un lugar fresco y seco. El medio preparado por el usuario a partir del producto deshidratado tiene una vida útil de 30 días cuando se almacena a 2–8 °C en un lugar oscuro.

Materiales necesarios, pero no suministrados

Esta lista no es exhaustiva.

Equipos

- Todo el equipo habitual del laboratorio
- Incubadoras o sala de incubación
- Balanzas
- Agitador/homogeneizador
- Vórtex
- Baño de agua capaz de mantener $\pm$ 1 °C
- Pinzas estériles para manipular las membranas

Consumibles

- Placas de Petri estériles ($\varnothing$ = 90 mm)
- Asas de inoculación o asa de platino desechable estéril
- Pipetas estériles (1 ml, etc.)
- Filtros de membrana estériles ($\varnothing$ = 85 mm, 0,45 μ m a 1,2 μ m)
- Esparcidores estériles

Precauciones

- Deben respetarse las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 7218). Usar protección adecuada, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaja con bacterias vivas potencialmente infecciosas
- Los medios que hayan estado en contacto con muestras alimentarias, ambientales o de producción primaria deben considerarse contaminados y eliminarse de conformidad con las normas y reglamentos locales
- Algunas cepas de *E. coli*:
 - son negativas a la β -D-glucuronidasa (alrededor del 3-4%) y no producen una coloración azul (por ejemplo, *E. coli* O157)
 - no se desarrollan a la alta temperatura de 44 °C (por ejemplo, *E. coli* O157:H7)
- Algunos serovares de *Salmonella* y unas pocas especies de *Shigella* también poseen la enzima β -D-glucuronidasa (<1,5%)
- Si se sospecha la presencia de *E. coli* estresada al inocular sin membrana, incubar 4 hr a 37 ± 1 °C, y luego 21 ± 3 hr a 44 ± 1 °C
- La incubación no debe superar las 24 hr y los 45 °C
- Para los medios listos para usar o preparados con antelación, evitar cualquier sobrecalentamiento prolongado durante la esterilización en autoclave. Para mantener una calidad óptima, el medio no debe someterse a más de 1 ciclo de calentamiento y solidificación después de la preparación inicial
- El medio puede presentar un aspecto espumoso después de la solidificación en los frascos. Sin embargo, conserva todas sus cualidades cuando el aspecto cambia después de la disolución y la agitación
- Como el desarrollo de las colonias en el fondo de la placa de Petri puede interferir con la lectura (debido a la tinción de las colonias), el lapso de tiempo entre el depósito del inóculo en las placas de Petri y la adición del medio no debe superar los 15 min
- Evitar que queden burbujas de aire debajo de la membrana al depositarla en el agar. Si es necesario, aplanar la membrana con cuidado utilizando unas pinzas estériles
- Visite bio-rad.com para obtener información de seguridad del producto (SDS) y certificados de análisis

Control de calidad

Todos los productos fabricados y comercializados por Bio-Rad están sujetos a un protocolo de garantía de calidad en todas las etapas, desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización de los productos terminados. Cada lote de producto terminado se somete a un control de calidad según la norma EN ISO 11133 y sólo se comercializa si cumple los criterios de aceptabilidad. La documentación relativa a la producción y al control de calidad de cada lote se mantiene archivada.

Protocolo

Preparación del medio base deshidratado

- Agitar siempre el frasco antes de usar
- Disolver 33,6 g de polvo en 1 L de agua destilada estéril. Esperar 5 min y a continuación mezclar hasta obtener una suspensión homogénea
- Calentar suavemente, agitando frecuentemente, y llevar a ebullición hasta que se disuelva por completo
- Dispensar y esterilizar a 121 ± 3 °C durante 15 min
- Enfriar a 44–47 °C

Proporción de reconstitución: 33,6 g/1 L (con 500 g de polvo se obtienen 14,8 L de medio base)

Preparación de la muestra y enriquecimiento

- Preparar y enriquecer la muestra según el método estándar aplicable al producto en cuestión

Inoculación e incubación

Filtración por membrana (para productos que contienen bacterias estresadas; ISO 16649-1)

- Preparar placas de Petri con medio de glutamato modificado con minerales (MMGA) y con medio TBX (aproximadamente 15 ml/placa)
- En condiciones asépticas, colocar la membrana sobre la superficie seca del agar MMGA
- Transferir 1 ml de muestra y/o 1 ml de sus diluciones decimales al centro de la membrana
- Distribuir el inóculo uniformemente por toda la superficie de la membrana, evitando distribuirlo más allá de la misma
- Dejar las placas inoculadas en posición horizontal a temperatura ambiente durante unos 15 min, hasta que el inóculo haya sido absorbido por el agar
- Invertir las placas e incubar a 37 ± 1 °C durante 4 h $\pm$ 15 min
- Tras la reanimación de las bacterias lesionadas, con unas pinzas estériles, transferir las membranas del medio MMGA a placas de Petri que contengan medio TBX
- Incubar a 44 ± 1 °C durante 20–24 hr

Inoculación en placa (bacterias estresadas o no estresadas; ISO 16649-2)

- Utilizando pipetas estériles, transferir 1 ml de muestra y/o 1 ml de sus diluciones decimales a placas de Petri estériles
- Verter rápidamente unos 15 ml de medio TBX templado (44–47 °C) en la placa de Petri. Homogeneizar agitando y dejar que se solidifique en una superficie fría y plana
- Incubar a 44 ± 1 °C durante 18–24 hr

Inoculación en superficie (método de detección y MNP; ISO 16649-3)

- Transferir 1 ml de muestra y/o sus diluciones decimales a 10 ml de MMGA simple y/o MMGA de doble fuerza según el protocolo estándar
- Incubar a 37 ± 1 °C durante 24 ± 2 hr
- Usando un asa estéril, sembrar cada tubo positivo en placas TBX
- Incubar a 44 ± 1 °C durante 18–24 hr

Lectura e interpretación

- Después de la incubación, contabilizar las colonias de E. coli positivas a la glucuronidasa, que son azules o azul-verde. Las demás colonias son de color blanco/beige
- Para el cálculo y la expresión de los resultados, consultar las normas ISO 16649-1, -2 y -3 o ISO 7218

Referencias

ISO 7218:2007/AMD1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations

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.

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.

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 C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.

Historial de revisiones

Fecha de publicación	Número de documento	Cambio
Julio 2022	5096 Ver A	- Cambio significativo - Nuevo diseño del documento - Cambio en el número de documento — versión anterior: V4_12/08/11

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc. Todas las marcas comerciales aquí indicadas son propiedad de sus respectivos propietarios.