TBX Agar

Chromogenic medium for detection and enumeration of *E. coli*, according to ISO 16649 (all parts).

DESCRIPTION

TBX Agar is a chromogenic selective medium used for the isolation and identification of *Escherichia coli* in foods, according to ISO 16649-1, -2 and -3.

TYPICAL FORMULA	(g/l)
Enzymatic Digest of Casein	20.0
Bile Salts No. 3	1.5
X-Glucuronide	0.075
Agar	15.0

Final pH 7.2 ± 0.2 at 25°C

METHOD PRINCIPLE

Enzymatic digest of casein provides amino acids, nitrogen, carbon, vitamins and minerals for organisms growth. Bile salts act as selective agent inhibiting most Gram-positive bacteria.

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (BCIG) is the chromogenic substrate cleaved by the enzyme β-glucuronidase of *E. coli*. Agar is the solidifying agent.

PREPARATION

Dehydrated medium: Suspend 36.6 g of the powder in 1 liter of distilled or deionized water. Mix well. Heat to boil shaking frequently until completely dissolved. Sterilize in autoclave at 121°C for 15 minutes.

Medium in bottles: Melt the content of the bottle in a water bath at 100°C (loosing the cap partially removed) until completely dissolved. Then screw the cap and check the homogeneity of the dissolved medium, if it is the case turning the bottle upside down. Cool at 45-50°C, mix well avoiding foam formation and aseptically distribute into Petri dishes.

TEST PROCEDURE

ISO 16649-1 recommends the following procedure:

1. Place a filter membrane onto two plates of Mineral-Modified Glutamate Agar (MMGA) and spread 1 ml of the test sample over the whole membrane surface. Repeat the procedure with the further decimal dilutions, if necessary. Leave inoculated plates at room temperature for 15 min and incubate at 37°C for 4 ± 1 hours.
2. After the resuscitation period transfer the membranes to TBX Agar plates and incubate at 44°C for 18-24 h.

Alternatively, direct inoculation methods, either pour plate method or surface plate technique, can be used. For the recovery of sub-lethally injured *E. coli*, incubate plates at 37°C or 30°C for 4 hours. Continue incubation at 44°C for additional 18-20 hours.

INTERPRETING RESULTS

After incubation observe the color of the colonies and interpret the results as indicated in the ID table. Count typical CFU in all plates containing 15-300 colonies in total (typical and non-typical).

ID Table.

Microorganism	Typical colony color
β-glucuronidase-positive *Escherichia coli*	Blue to blue-green
β-glucuronidase-negative bacteria (if not inhibited)	White to green-beige

APPEARANCE

Dehydrated medium: free-flowing, homogeneous, light beige.
Prepared medium: slightly opalescent, colorless to light beige.

STORAGE

The powder is very hygroscopic, store the powder at 10-30°C, in a dry environment, in its original container tightly closed. Store bottles and prepared plates at 2-8°C away from light. Do not use the product beyond its expiry date on the label or if product shows any evidence of contamination or any sign of deterioration.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

SHELF LIFE

Dehydrated medium: 2 years.
Medium in bottles: 1 year.
Ready-to-use plates: 4 months.

QUALITY CONTROL

Plates are inoculated with the microbial strains indicated in the QC table.
Inoculum: 50-100 CFU (productivity); 10^4-10^6 CFU (selectivity); 10^3-10^4 CFU (specificity).
Incubation conditions: aerobically at 44 ± 1°C for 20-24 hours.

QC Table.

Microorganism		Specification
Escherichia coli	WDCM 00013	Good growth, blue green colonies
Escherichia coli	WDCM 00202	Good growth, blue green colonies
Enterococcus faecalis	WDCM 00009	Inhibition
Citrobacter freundii	WDCM 00006	White to green-beige colonies
Pseudomonas aeruginosa	WDCM 00025	White to green-beige colonies

WARNING AND PRECAUTIONS

The product does not contain hazardous substances in concentrations exceeding the limits set by current legislation and therefore is not classified as dangerous. It is nevertheless recommended to consult the safety data sheet for its correct use. The product is intended for professional use only and must be used by properly trained operators.

DISPOSAL OF WASTE

Disposal of waste must be carried out according to national and local regulations in force.

BIBLIOGRAPHY

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 16649-3:2015. 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-ß-D-glucuronide
3. 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.
4. Ogden I.D., and A.J. Watt (1991) An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration of *E. coli*. Letters in App. Microbiol. 13:212-215.
5. Delisle G.L., and A. Ley (1989) Rapid detection of *E. coli* in urine samples by a new chromogenic β-Dglucuronidase assay. J. Clin. Microbiol. 27:778-779.

PRESENTATION		Contents	Ref.
TBX Agar	90 mm ready-to-use plates	20 plates	10522
TBX Agar	90 mm ready-to-use plates	100 plates	10522*
TBX Agar	60 mm ready-to-use plates	20 plates	163652
TBX Agar	Bottles	6 x 100 ml bottles	481170
TBX Agar	Bottles	25 x 200 ml bottles	451170
TBX Agar	Dehydrated medium	500 g of powder	610224
TBX Agar	Dehydrated medium	100 g of powder	620224

TABLE OF SYMBOLS

LOT Batch code	Keep away from sunlight	Manufacturer	Use by	Fragile, handle with care
REF Catalogue number	Temperature limitation	Contains sufficient for <n> tests	Caution, consult Instruction For Use	Do not reuse

LIOFILCHEM® s.r.l.
Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (Te) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330 www.liofilchem.net liofilchem@liofilchem.net

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Istruzioni per l'uso
ITALIANO

TBX Agar

Terreno cromogenico per la ricerca ed il conteggio di *E. coli*, in accordo a ISO 16649.

DESCRIZIONE

TBX Agar è un terreno cromogenico selettivo utilizzato per l'isolamento e l'identificazione di *Escherichia coli* negli alimenti, secondo ISO 16649-1, -2, e -3.

FORMULA TIPICA	(g/l)
Digerito Enzimatico di Caseina	20.0
Sali di Bile No.3	1.5
X-Glucuronide	0.075
Agar	15.0

pH Finale 7.2 ± 0.2 a 25°C

PRINCIPIO DEL METODO

Il digerito enzimatico di caseina fornisce aminoacidi, azoto, carbonio, vitamine e minerali per la crescita dei microrganismi. I sali di bile agiscono come agente selettivo inibendo la maggior parte dei batteri Gram positivi. L'acido 5-bromo-5-cloro-3-indolil-β-D-glucuronico (BCIG) è il substrato cromogenico scisso dall'enzima β-glucuronidasi di *E. coli*. L'agar è l'agente solidificante.

PREPARAZIONE

Terreno disidratato	Sospendere 36.6 g di polvere in 1 litro di acqua distillata o deionizzata sterile. Mescolare bene. Riscaldare agitando di frequente e bollire fino a completa dissoluzione. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.
Terreno in flaconi	Sciogliere il contenuto di un flacone in bagnomaria a 100°C (con i tappi leggermente svitati) fino a completa dissoluzione del terreno. Verificare, una volta fuso, la buona omogeneità del terreno capovolgendo il flacone dopo averne avvitato il tappo. Raffreddare a 45-50°C, mescolare bene senza formazione di bolle. Versare in piastre Petri in condizioni di asepsi.

PROCEDURA DEL TEST

ISO 16649-1 raccomanda la seguente procedura:

1. Posizionare una membrana filtrante su due piastre di Mineral-Modified Glutamate Agar (MMGA) e diffondere 1 ml di campione sull'intera superficie della membrana. Ripetere la procedura con diluizioni decimali del campione, se necessario. Lasciare le piastre inoculate a temperatura ambiente per 15 min ed incubare a 37°C per 4 ±1 ore.
2. Trasferire le membrane su piastre di TBX Agar ed incubare a 44°C per 18-24 ore.

In alternativa possono essere utilizzati metodi diretti di inoculo, sia il metodo per inclusione che la tecnica per spatolamento. Per facilitare il recupero di cellule di *E. coli* lese gravemente, incubare le piastre a 37°C o 30°C per 4 ore. Continuare l'incubazione per ulteriori 18-20 ore.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione osservare il colore delle colonie ed interpretare i risultati come indicato nella tabella ID. Contare le UFC tipiche in tutte le piastre contenenti 15-300 colonie in totale (tipiche e non tipiche)

Tabella ID.

Microrganismo	Colore delle colonie tipiche
Escherichia coli β-glucuronidasi positivo	Da blu a blu-verde
Batteri β-glucuronidasi negativi (se non inibiti)	Da bianco a verde-beige

ASPETTO

Terreno disidratato: omogeneo, fine granulometria, beige chiaro.
Terreno preparato: da incolore a beige chiaro, leggermente opalescente.

CONSERVAZIONE

La polvere è fortemente igroscopica, conservare a 10-30°C, in ambiente asciutto, nel suo contenitore originale chiuso ermeticamente. Conservare i flaconi e le piastre pronte a 2-8°C al riparo dalla luce. Non usare il prodotto dopo la sua data di scadenza indicata sull'etichetta o se il prodotto mostra segni di contaminazione o deterioramento.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

DURATA

Terreno disidratato: 2 anni.
Terreno in flaconi: 1 anno.
Piastre pronte all'uso: 4 mesi.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Le piastre vengono inoculate con i ceppi microbici indicati nella tabella CQ.
Inoculo per produttività: 50-100 UFC.
Inoculo per selettività: 10^4-10^6 UFC.
Condizioni di incubazione: ambiente aerobico a 44 ± 1°C per 18-24 ore.

Tabella CQ.

Microrganismo		Crescita	Specifiche
Escherichia coli	WDCM 00013	Buona	Colonie da blu a blu-verdi
Escherichia coli	WDCM 00202	Buona	Colonie da blu a blu-verdi
Enterococcus faecalis	WDCM 00009	Inibita	---
Citrobacter freundii	WDCM 00006	Buona	Colonie da bianche a verde-beige
Pseudomonas aeruginosa	WDCM 00025	Buona	Colonie da bianche a verde-beige

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Il prodotto non contiene sostanza nocive in concentrazioni superiori ai limiti fissati dall'attuale legislazione e perciò non è classificato come pericoloso. Ciononostante si raccomanda di consultare la scheda di sicurezza per il suo corretto uso. Il prodotto è da intendersi esclusivamente per uso in ambito professionale e deve essere utilizzato esclusivamente da operatori adeguatamente addestrati.

SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

Lo smaltimento dei rifiuti deve essere effettuato in conformità alle normative nazionali e locali in vigore.

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 16649-3:2015. 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-ß-D-glucuronide
3. 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.
4. Ogden I.D., and A.J. Watt (1991) An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration of *E. coli*. Letters in App. Microbiol. 13:212-215.
5. Delisle G.L., and A. Ley (1989) Rapid detection of *E. coli* in urine samples by a new chromogenic β-Dglucuronidase assay. J. Clin. Microbiol. 27:778-779.

PRESENTAZIONE		Contenuto	Ref.
TBX Agar	Piastre da 90 mm pronte all'uso	20 piastre	10522
TBX Agar	Piastre da 90 mm pronte all'uso	100 piastre	10522*
TBX Agar	Piastre da 60 mm pronte all'uso	20 piastre	163652
TBX Agar	Flaconi	6 flaconi da 100 ml	481170
TBX Agar	Flaconi	25 flaconi da 200 ml	451170
TBX Agar	Terreno disidratato	500 g di polvere	610224
TBX Agar	Terreno disidratato	100 g di polvere	620224

TABELLA DEI SIMBOLI

LOT Codice del lotto	Tenere al riparo dalla luce	Fabbricante	Utilizzare entro	Fragile, maneggiare con cura
REF Numero di catalogo	Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Attenzione, Consultare le istruzioni per l'uso	Non riutilizzare

LIOFILCHEM® s.r.l.
Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (Te) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330 www.liofilchem.net liofilchem@liofilchem.net

DOMINIQUE DUTSCHER SAS