

BACILLUS CEREUS AGAR BASE (MYP)
BACILLUS CEREUS ANTIMICROBIC SUPPLEMENT
BACILLUS CEREUS SELECTIVE AGAR (MYP)

Terreno di base in polvere, supplemento selettivo,
piastre e flaconi pronti per l'isolamento di *Bacillus cereus* (ISO 7932 e ISO 21871)



Terreno MYP: colonie rosate con alone di *Bacillus cereus*

FORMULE TIPICHE**BACILLUS CEREUS AGAR BASE – MYP (g/L)**

Estratto di carne	1,00
Peptone	10,00
D-mannitolo	10,00
Sodio cloruro	10,00
Rosso fenolo	0,025
Agar	12,00

BACILLUS CEREUS ANTIMICROBIC SUPPLEMENT (x fiala)

Polimixina B solfato	50.000 U.I.
----------------------	-------------

BACILLUS CEREUS SELECTIVE AGAR MYP (piastre pronte), g/L

Estratto di carne	1,00
Peptone di carne	10,00
D-mannitolo	10,00
Sodio cloruro	10,00
Rosso fenolo	0,025
Agar	12,00
Polimixina B solfato	100.000 U.I.
Egg Yolk Emulsion	100 mL

PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 21,5 g in 450 mL di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a 50 °C. Ricostituire, con le precauzioni dell'asepsi, il contenuto di una fiala di Bacillus Cereus Antimicrobic Supplement (cat. n° 4240001) con 5 mL di acqua distillata sterile, aggiungendolo al terreno di base e mescolare. Aggiungere 50 mL di Egg Yolk Emulsion (cat. n° 42111601), mescolare e distribuire in piastre Petri sterili in ragione di 15-20 mL per piastra.

pH finale 7.2 ± 0.2

PREPARAZIONE DEL TERRENO PRONTO IN FLACONE

In un bagnomaria termoregolato a 100°C introdurre i flaconi e riscaldare fino ad ebollizione ed a scioglimento completo. Raffreddare a 45-50°C e, con le cautele dell'asepsi, aggiungere 1 mL del supplemento Bacillus Cereus Selective Supplement (REF 4240001), ricostituito con 5 mL di acqua distillata sterile e 10 mL di Egg Yolk Emulsion (REF 42111601). Mescolare bene e distribuire.
pH finale 7.2 ± 0.2

DESCRIZIONE

Bacillus cereus è responsabile di tossinfezioni alimentari, provocate da due tossine, una stabile al calore ed emetica, l'altra termolabile e causa di diarrea. L'infezione è provocata dall'ingestione di carne, riso e vegetali contaminati da *B. cereus* e rimasti a temperatura ambiente dopo la cottura. La dose minima infettante è di 100 cellule/g di alimento. La diagnosi deve essere supportata dall'isolamento di *B. cereus* dagli alimenti e dalle feci e da colture quantitative.

Il terreno qui descritto corrisponde, nella formulazione, al Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP), il mannitolo è presente come carboidrato fermentabile, il rosso fenolo come indicatore di pH, la polimixina B, contenuta nel supplemento liofilo, come agente selettivo.

IMPIEGO

Per l'isolamento ed il conteggio di *B. cereus*, negli alimenti ISO 7932 indica la seguente procedura:

- Preparare il campione secondo le indicazioni della norma ISO 6887 o delle norme specifiche applicabili.
- Sulla superficie di due piastre di terreno, distribuire in duplicato, 0.1 mL del campione, se liquido, o 0,1 della sospensione madre, per i prodotti non liquidi. Nel caso si desideri una sensibilità analitica superiore distribuire, in duplicato, 1 mL del campione, se liquido, o 1 della sospensione madre, per i prodotti non liquidi su piastre di diametro 150 mm o suddividere l'inoculo su 3 piastre da 90mm.
- Incubare a 30°C in aerobiosi per 18-24 ore. Se le colonie non sono chiaramente visibili, incubare per ulteriori 24 ore. La crescita di eventuali contaminanti è maggiormente limitata con un'incubazione di 24 ore.
- Contare le colonie tipiche di *B. cereus*, nelle piastre contenenti da 15 a 150 colonie, considerando come tali le crescite che abbiano le seguenti caratteristiche:

colonie sfrangiate di circa 5 mm di diametro, rosa con un distinto alone opaco di precipitazione del rosso d'uovo dello stesso colore delle colonie (mannitolo neg., lecitinasi pos.). Data la scarsa produzione di lecitinasi da parte di alcuni ceppi di *B.cereus*, anche le colonie prive di alone, ma con le altre caratteristiche tipiche, dovrebbero essere sottoposte a test di conferma.

Selezionare 5 colonie da ciascuna piastra per il test di conferma :

- Emolisi su piastre di Blood Agar n°2 con sangue di montone, con incubazione a 30°C per 24 h ± 2 (*B.cereus* sviluppa colonie emolitiche).

Altri test di conferma (non indicati dalla norma ISO):

- o osservazione microscopica (cellule con estremi squadrati, ed angoli tondi, spore in posizione centrale o paracentrale)
- o test di fermentazione del glucosio (+)
- o Reazione di Voges Proskauer (+)
- o Riduzione dei nitrati (+)

Le seguenti prove consentono di differenziare *B.cereus* da altri bacilli correlati tassonomicamente:

- o Emolisi su agar sangue (*B.cereus*: +)
- o Aspetto colonie su agar sangue (*B.cereus* :verdastre)
- o Mobilità (*B.cereus*: +)
- o Presenza di cristalli parasporali (*B.cereus*: -)

CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE (24-48 h /30 °C)

Controllo della produttività, con supplemento selettivo: *B.cereus* ATCC 11778: buona crescita, colonie rosa con alone opaco

Controllo della selettività, con supplemento selettivo: *E.coli* ATCC 25922: inibito

Controllo della specificità: *B. subtilis* ATCC 6633: crescita con colonie senza alone

CONSERVAZIONE

Terreno in polvere: conservare a 10-30°C al riparo della luce, in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento della polvere ecc.).

Conservare il terreno di base preparato in laboratorio, senza aggiunti di supplementi, per un massimo di 1 mese a 2-8°C

Conservare le piastre, complete di supplemento, preparate in laboratorio per un massimo di 4 giorni a 2-8°C

Supplemento selettivo: conservare fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, a 2 - 8°C.

Piastre pronte e flaconi : conservare a 2-8°C nella confezione originale. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento.

PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI

Terreno in polvere: il preparato qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente né contiene sostanze pericolose in concentrazioni >1%. Come per tutti i terreni in polvere anche la manipolazione di questo terreno deve essere effettuata con una adeguata protezione delle vie respiratorie

Supplemento selettivo: il preparato qui descritto non è classificabile come pericoloso ai sensi della legislazione vigente ma contiene polimixina B ad una concentrazioni >1% e come tale richiede la scheda di sicurezza, che deve essere consultata prima dell'uso.

Piastre pronte e flaconi: il preparato qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente né contiene sostanze pericolose in concentrazioni ≥1%.

I prodotti qui descritti devono essere usati in laboratorio, da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
Sterilizzare le piastre dopo il loro uso e prima dell'eliminazione come rifiuto.

BIBLIOGRAFIA

- ISO7932 :2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* -- Colony-count technique at 30 degrees C
- ISO 21871:2005 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the determination of low numbers of presumptive *Bacillus cereus* -- Most probable number technique and detection method
- Rapporto ISTISAN 96/35. ISSN 1123-3117. Metodi di analisi per il controllo microbiologico degli alimenti. Raccolta a cura di D.De Medici, L.Feniccia, L.Orefice e A.Stacchini.

CONFEZIONI

Terreno in polvere

4011112	Bacillus Cereus Agar Base (MYP),	500 g (11.6 L)
Supplemento selettivo		
4240001	Bacillus Cereus Antimicrobial Supplement,	10 fiale liofile, ciascuna per 500 mL
Arricchimento		
42111601	Egg Yolk Emulsion	50 mL

Il terreno è disponibile anche pronto per l'uso in piastra ed in flacone

541112M	Bacillus Cereus Selective Agar-MYP	20 piastre
5111112	Bacillus Cereus Agar Base – MYP	6 x 90 mL