

BACILLUS CEREUS AGAR BASE (PEMBA) BACILLUS CEREUS ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

Terreno di base in polvere e in flacone, supplemento selettivo, terreno in piastre pronto all'uso per l'isolamento di *Bacillus cereus*



Terreno PEMBA: colonie turchese con alone di *Bacillus cereus*

FORMULE TIPICHE

BACILLUS CEREUS AGAR BASE – PEMBA (g/L)

Mannitolo	10.00 g
Peptone	1.00
Sodio piruvato	10.00
Sodio cloruro	2.00
Magnesio solfato	0.10
Potassio fosfato monobasico	0.25
Sodio fosfato bibasico	2.50
Blu bromotimolo	0.12
Agar	15.00

BACILLUS CEREUS ANTIMICROBIC SUPPLEMENT (x fiala)

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

BACILLUS CEREUS SELECTIVE AGAR PEMBA (piastre pronte) (g/L)

Mannitolo	10.00 g
Peptone	1.00
Sodio piruvato	10.00
Sodio cloruro	2.00
Magnesio solfato	0.10
Potassio fosfato monobasico	0.25
Sodio fosfato bibasico	2.50
Blu bromotimolo	0.12
Agar	15.00
Polimixina B solfato	100.000 U.I.
Egg Yolk Emulsion	50 mL

PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 20,5 g in 470 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 (REF 4240001) con 5 mL di acqua distillata sterile, addizionarlo al terreno di base e mescolare. Aggiungere 25 mL di Egg Yolk Emulsion (REF 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 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 5 mL di Egg Yolk Emulsion (REF 42111601). Mescolare bene e distribuire.

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 proposto (PEMBA: Polymyxin pyruvate egg yolk mannitol bromothymol blue agar) corrisponde alla formulazione di Holbrook e Anderson ed al terreno indicato dalla norma ISO 21872 per la determinazione, con metodo MPN, di *B. cereus* presente negli alimenti con cariche basse. Il mannitolo è presente come carboidrato fermentabile, il blu di bromotimolo come indicatore di pH, il sodio piruvato come stimolante della precipitazione del rosso d'uovo, la polimixina B come agente selettivo.

IMPIEGO

Per la determinazione, con metodo MPN, di *B. cereus* presente negli alimenti con cariche basse ISO 21871 indica la procedura qui riassunta:

- Arricchimento selettivo in Tryptic Soy Broth + polimixina, a concentrazione singola e doppia con incubazione a 30°C per 48 h \pm 4 h .
- Trapianto dai due brodi di arricchimento su piastra di terreno PEMBA o di terreno MYP (REF 4011112).
- Incubazione delle piastre di terreno PEMBA a 37°C per 24 + 24 ore
- Incubazione delle piastre di terreno MYP a 30°C per 24 + 24 ore

Test di conferma: sulle colonie coltivate su PEMBA (colonie sfrangiate di circa 5 mm di diametro, blu turchese con un distinto alone opaco di precipitazione del rosso d'uovo, dello stesso colore delle colonie) eseguire il test dell'emolisi o l'osservazione microscopica; sulle colonie coltivate su MYP eseguire il test dell'emolisi.

Per l'isolamento ed il conteggio di *B. cereus*, negli alimenti, operare come segue:

* Sulla superficie di due piastre di terreno, distribuire in duplicato, 0.1 mL del campione, se liquido, o della sospensione madre, per i prodotti non liquidi e delle diluizioni successive fino alla 10⁻⁶ (diluente: Maximum Recovery Diluent -cat. n° 401691).

* 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 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, blu turchese con un distinto alone opaco di precipitazione del rosso d'uovo, dello stesso colore delle colonie.

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 almeno 5 colonie tipiche da ciascuna piastra per i seguenti test di conferma:

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

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

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

CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE (24-48 h / 37 °)

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

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.).

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

Piastre pronte: 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 contiene polimixina B ad una concentrazioni >1%: Consultare la Scheda di Sicurezza prima dell'uso.

Piastre pronte 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

- Holbrook, R. and Anderson, J.M. (1980), Can. J. Microbiol. 26, 753-759.
- ISO 21871:2006 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.Fenicia, L.Orefice e A.Stacchini.

CONFEZIONI

Terreno in polvere

4011122 **BACILLUS CEREUS AGAR BASE (PEMBA),** **500 g (12.2 L)**

Supplemento selettivo

4240001 **BACILLUS CEREUS ANTIMICROBIC SUPPLEMENT,** **10 fiale liofile, ciascuna per 500 mL**

Arricchimento

42111601 **Egg Yolk Emulsion** **50 mL**

Terreno in piastra pronto all'uso

541112 **Bacillus Cereus Selective Agar (PEMBA)** **20 piastre ø 90 mm**

Terreno in flacone

5111122 **Bacillus Cereus Selective Agar (PEMBA),** **6 x 95 mL, flaconi**