



## **BACILLUS CEREUS AGAR BASE (MYP) BACILLUS CEREUS SELECTIVE AGAR (MYP)**

**Terreno di coltura in polvere, piastre e flaconi pronti all'uso**



MYP: colonie tipiche di *Bacillus cereus*

### **1 – DESTINAZIONE D'USO**

Per la rilevazione e il conteggio del gruppo *B. cereus* negli alimenti e in altri campioni.

### **2 – COMPOSIZIONE**

#### **BACILLUS CEREUS AGAR BASE (MYP)**

##### **FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA\***

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

#### **BACILLUS CEREUS SELECTIVE AGAR (MYP) – PIASTRE PRONTE ALL'USO**

Bacillus Cereus Agar Base	43 g
Egg yolk emulsion 20%	100 mL
Polimixina B solfato	100.000 U.I.
Acqua purificata	900 mL

\* Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

### **3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO**

*Bacillus cereus* costituisce un gruppo di bacilli Gram-positivi sporigeni, anaerobi facoltativi ubiquitari che si trovano comunemente nel suolo. Il Gruppo *Bacillus cereus* comprende: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudo-mycoides* e *B. anthracis*. *Bacillus cereus* è un patogeno di origine alimentare che può produrre due tossine, una termostabile ed emetica e l'altra termolabile che causa la diarrea.<sup>1</sup> L'infezione è causata dall'ingestione di alimenti come carne, riso e verdure che sono contaminati da *B. cereus* e che sono stati lasciati a temperatura ambiente dopo la cottura.

Per il conteggio delle cellule vegetative e delle spore di *Bacillus cereus* negli alimenti, nel 1967<sup>2</sup> Mossel ha sviluppato un agar mannitolo-tuorlo d'uovo-rosso fenolo (MYP) sfruttando l'incapacità di *B. cereus* di catabolizzare il mannitolo e la capacità della maggior parte dei ceppi di produrre fosfolipasi C. L'agar MYP è raccomandato da ISO 7932,<sup>3</sup> ISO 21871<sup>4</sup>, FDA-BAM<sup>5</sup> e APHA per la rilevazione e la conta di *B. cereus* negli alimenti.

Nel terreno Bacillus Cereus Selective Agar MYP, l'estratto di manzo e il peptone forniscono carbonio, azoto, vitamine e minerali per la crescita microbica. Questo terreno si basa sulla componente inibitoria selettiva della polimixina B e su due sistemi indicatori: mannitolo con rosso fenolo e tuorlo d'uovo.

La crescita di molti organismi indesiderati è soppressa dalla polimixina B, mentre gli organismi bersaglio non fermentano il mannitolo ma catabolizzano il tuorlo d'uovo e di conseguenza producono tipiche colonie bacilliformi con zone rosso porpora e aloni di precipitato.<sup>6</sup> Gli organismi non bersaglio che fermentano il mannitolo producono cataboliti acidi, formando colonie gialle.

### **4A – PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE**

Sospendere 21,5 g di Bacillus Cereus Agar Base MYP in 450 mL di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione agitando frequentemente, sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti e raffreddare a 44-47 °C.

ISO 7932, ISO 21871: Ricostituire in condizioni asettiche il contenuto di un flacone di Bacillus Cereus Antimicrobial Supplement (codice 4240001) con 5 mL di acqua distillata sterile, aggiungere al terreno di base e mescolare. Aggiungere 50 mL di Egg Yolk Emulsion 20%, (REF 42111205), mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

FDA-BAM: Distribuire 225 mL di Bacillus Cereus Agar Base MYP bollito in flaconi da 500 mL. Autoclavare per 15 min a 121 °C e raffreddare a 44-47 °C. A 225 mL di base aggiungere 2,25 mL di Bacillus Cereus Antimicrobial Supplement (REF 4240001) e 12,5 mL di Egg Yolk Emulsion 50% (REF 42111601). Mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

### **4B – PREPARAZIONE DEL TERRENO PRONTO IN FLACONE**

Sciogliere il contenuto del flacone in un'autoclave impostata a 100 ± 2°C o in bagnomaria a temperatura controllata (100°C). In alternativa, il flacone può essere inserito in un barattolo contenente acqua, posizionato su una piastra calda e portato a ebollizione. Allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento per consentire lo scambio di pressione. Raffreddare a 44-47°C. Ricostituire in condizioni asettiche il contenuto di una fiala di Bacillus Cereus Antimicrobial Supplement (RIF 4240001) con 5 mL di acqua purificata sterile, aggiungerne 1 mL al terreno di coltura e mescolare.

ISO 7932, ISO 21871: aggiungere 10 mL di Egg Yolk Emulsion 20% (RIF 42111205), mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

FDA-BAM: aggiungere 5 mL di Egg Yolk Emulsion 50% (RIF 42111601), mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili

### **5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO**

Aspetto della polvere	fine granulometria, omogenea, rosso-arancio
Aspetto del terreno in soluzione e in flacone	leggermente opalescente, rosso
Aspetto del terreno in piastra	opaco, rosa
pH (20-25 °C)	7,2 ± 0,2



**6 – MATERIALI FORNITI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Bacillus Cereus Agar Base (MYP)	Terreno di coltura in polvere	4011112	500 g (11.6 L)
Bacillus Cereus Agar Base (MYP)	Flacone pronto all'uso	5111112	6 x 90 mL
Bacillus Cereus Selective Agar (MYP)	Piastra pronta all'uso	541112M	2 x 10 plates ø 90 mm

**7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI**

Autoclave, bagnomaria, anse, pipette, tamponi sterili, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, flaconi, piastre Petri sterili, Egg Yolk Emulsion (codice 42111205 e 42111601), Bacillus Cereus Antimicrobial Supplement (codice 4240001), reagenti e terreni di coltura accessori.

**8 – CAMPIONI**

Prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali e campioni ambientali nel settore della produzione e manipolazione degli alimenti. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.<sup>3-6</sup>

**9 – PROCEDURA D'ANALISI**

Per l'isolamento e il conteggio dei ceppi del gruppo *B. cereus* negli alimenti in accordo con ISO 7932 si raccomanda il seguente metodo:

- Preparare il campione secondo la norma internazionale adeguata al prodotto in questione.
- Distribuire 0,1 mL di campione, se il prodotto è liquido, o della sospensione iniziale se solido, sulla superficie di due piastre di agar (90 mm). Ripetere la procedura utilizzando ulteriori diluizioni decimali.
- Se si prevede una carica bassa di *B. cereus*, distribuire 1 mL di campione se il prodotto è liquido o 1 mL della sospensione iniziale se solido, su ciascuna delle due piastre di agar (140 mm) o sulla superficie di tre piastre da 90 mm.
- Incubare a 30°C in condizioni aerobiche per 18-24 ore. Se le colonie non sono visibili, incubare le piastre per altre 24 ore prima del conteggio.

**10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DELL'ANALISI**

Contare le colonie del gruppo *B. cereus* su piastre con meno di 150 colonie, che abbiano le seguenti caratteristiche: grandi, rosa (indice che non c'è stata fermentazione del mannitolo) e generalmente circondate da un alone di precipitato (indice di produzione di lecitinasi). Se le piastre hanno un elevato contenuto di flora di fondo che fermenta il mannitolo, la caratteristica colorazione delle colonie e del fondo può essere ridotta o non più visibile. Inoltre, alcuni presunti ceppi di *Bacillus cereus* hanno solo una leggera reazione con il tuorlo d'uovo nessuna. In tali casi e in tutti gli altri casi dubbi, anche queste colonie devono essere sottoposte alla conferma.

Le colonie tipiche e atipiche su MYP Agar devono essere confermate mediante test di emolisi su agar sangue.

Selezionare cinque colonie presuntive da ciascuna piastra e strisciarle sulla superficie dell'agar sangue in modo da consentire una buona interpretazione della reazione di emolisi. Incubare a 30 °C per 24 h ± 2 h e interpretare la reazione di emolisi.

Risultati che confermano ceppi del gruppo *Bacillus cereus*:

- Formazione di colonie rosa circondate da precipitato su agar MYP.
- Reazione di emolisi positiva.

Test opzionali destinati a indagini complementari (epidemiologiche) su ceppi isolati del gruppo *Bacillus cereus*<sup>3</sup>: 1) rilevamento di varianti del gene *cytK-1* o *cttK2* del gene che codifica per la citotossina K; 2) Rilevazione di ceppi del gruppo *Bacillus cereus* in grado di produrre cereulide; 3) Test di motilità per lo screening di *B. anthracis*; 4) Esame microscopico del cristallo parasporale di *Bacillus thuringiensis*. Altri test di conferma/differenziazione:<sup>5</sup> 1) Osservazione microscopica (grandi bacilli Gram-positivi in catene da corte a lunghe; le spore sono ellissoidali, da centrali a sub-terminali, e non rigonfiano lo sporangio); 2) Fermentazione del glucosio (+); 3) Reazione di Voges Proskauer (+); 4) Riduzione dei nitrati (+); 5) Test di mobilità (+); 6) Decomposizione della tirosina (+); 7) Resistenza al lisozima (+).

**11 – CONTROLLO QUALITÀ**

Tutti i lotti fabbricati sono messi in commercio dopo che è stato eseguito il Controllo Qualità per verificarne la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utente finale può eseguire il proprio Controllo Qualità in accordo con le normative locali applicabili, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo qualità:

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	18-24h /30°C/A	buona crescita, colonie rosa con alone opaco
<i>E. coli</i> ATCC 11775	18-24h /30°C/A	inibito
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	18-24h /30°C/A	buona crescita, colonie gialle senza alone opaco

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

**12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI**

Prima dell'immissione sul mercato, un campione rappresentativo di tutti i lotti del terreno in polvere Bacillus Cereus Agar Base (MYP), supplementato con Bacillus Cereus Antimicrobial Supplement e dei terreni pronti all'uso (Test Batch:TB) viene sottoposto alla valutazione della produttività, specificità e selettività, confrontando i risultati con Tryptic Soy Agar.

La produttività è testata con il metodo semi-quantitativo ecometrico con il ceppo target *B. cereus* ATCC 11778: le piastre sono inoculate con diluizioni decimali di una sospensione batterica in soluzione fisiologica e incubate a 30°C per 18-24 ore. Le colonie sono contate su entrambi i terreni e si calcola il rapporto di produttività (Pr: CFU<sub>TB</sub>/CFU<sub>TSA</sub>). Se Pr è ≥ 0,5 e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici (colonie rosa con alone opaco) i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

Inoltre le caratteristiche di produttività sono valutate mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi target: *B. cereus* ATCC 14579 e *B. thuringiensis* ATCC 10792. Dopo l'incubazione, si valutano la quantità della crescita e le caratteristiche delle colonie: i ceppi target mostrano una buona crescita, con colonie rosa e alone opaco.

La specificità è valutata mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con *B. subtilis* ATCC 6633. Dopo l'incubazione si valutano la quantità di crescita e le caratteristiche della colonia: *B. subtilis* mostra una buona crescita con colonie gialle senza alone opaco.

La selettività è valutata con il metodo della goccia superficiale Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione 0,5 McFarland di *E. coli* ATCC 25922, la cui crescita risulta completamente inibita.





### 13 - LIMITAZIONI DEL METODO

- Sembra che le spore di molti, se non della maggior parte, dei ceppi di *B. cereus* germinino prontamente sulla superficie dei terreni di coltura utilizzati per il conteggio. Nella maggior parte dei casi non sembra essere necessario un trattamento con shock termico per provocare la germinazione. A volte è preferibile applicare una procedura di shock termico, ad esempio per la conta delle spore o per inibire la crescita delle cellule batteriche vegetative. In questi casi si raccomanda un trattamento per 15 min a 70 °C.<sup>3</sup>
- I test di conferma possono, in alcuni casi, essere inadeguati per distinguere *B. cereus* da organismi culturalmente simili, che si potrebbero occasionalmente riscontrare negli alimenti. Questi microrganismi includono 1) *B. thuringiensis*, patogeno degli insetti, che produce cristalli di tossine proteiche; 2) *B. mycoides*, che produce tipicamente colonie rizoidi su terreno agarizzato; e 3) *B. anthracis*, che presenta una marcata patogenicità animale ed è immobile. Con l'eccezione di *B. thuringiensis*, che è attualmente utilizzato per il controllo degli insetti su colture alimentari e foraggere, questi organismi si incontrano raramente nell'esame di routine degli alimenti. I test descritti in precedenza sono generalmente adeguati a distinguere i ceppi tipici di *B. cereus* da altri membri del gruppo *B. cereus*. Tuttavia, i risultati con ceppi atipici di *B. cereus* sono piuttosto variabili e potrebbero essere necessari ulteriori test per identificare gli isolati.<sup>5</sup>
- Anche se le colonie microbiche sulle piastre sono differenziate in base alle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa su isolati, da coltura pura, per una completa identificazione.

### 14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura i supplementi e i terreni pronti all'uso sono destinati al controllo microbiologico e sono per uso professionale; devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura ed i supplementi devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati ed i supplementi contenenti antibiotici 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](http://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.
- Prestare attenzione all'apertura dei flaconi con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro. Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- 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. Non mettere le beute calde 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 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 non può essere solidificato e disciolto una seconda volta.
- I flaconi pronti all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione a membrana.
- 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.
- L'area del laboratorio deve essere controllata per evitare contaminazioni con il terreno in polvere, i supplementi o i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi 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 la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://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 del prodotto, 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

#### Piastra pronta all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

#### Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C / +30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. 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, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

#### Flacone pronto all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni i flaconi sono validi fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. I flaconi estratti dal confezionamento secondario possono essere utilizzati sino alla data di scadenza. I flaconi aperti devono essere usati immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e





l'integrità del tappo a vite. Eliminare i flaconi con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro validità, in funzione della tipologia (piastre/flaconi) e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). In accordo a ISO 7932, le piastre possono essere conservate prima dell'essiccazione a una temperatura compresa tra 1 °C e 5 °C per un massimo di 4 giorni.<sup>3</sup>

### 16- BIOGRAFIA

1. Turenne C, Alexander DC Bacillus and other Aerobic Endospore-Forming Bacteria. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
2. Mossel DAA, Koopman MJ, Jongerius E. Enumeration of Bacillus cereus in foods. Appl Microbiol 1967;15(3):650-3.
3. ISO 7932:2004/AMD 1:2020 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus — Colony-count technique at 30 degrees C — Amendment 1: Inclusion of optional tests
4. 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
5. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 14: Bacillus cereus. Content current as of: 06/29/2021
6. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food, 5th Ed., American Public Health Association, Washington D.C., 2015
7. Baird RM, Corry JEL, Curtis GDW. Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology. Proceedings of the 4th International Symposium on Quality Assurance and Quality Control of Microbiological Culture Media, Manchester 4-5 September, 1986. Int J Food Microbiol 1987; 233-234.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 <b>REF</b> or <b>REF</b> Numero di catalogo	 <b>LOT</b> Numero di lotto	 <b>Fabbricante</b>	 <b>Utilizzare entro</b>	 <b>Proteggere dall'umidità</b>	 <b>Fragile, maneggiare con cura</b>
 <b>Limiti di temperatura</b>	 <b>Contenuto sufficiente per &lt;n&gt; saggi</b>	 <b>Consultare le Istruzioni per l'Uso</b>	 <b>Lato superiore</b>	 <b>Proteggere dalla luce</b>	 <b>Monouso</b>

### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 7	Aggiornamento del contenuto e del layout	09/2022
Revisione 8	Modifica dei capitoli 2, 5, 6, 7, 12, 14, 15	12/2022
Revisione 9	Modifica dei capitoli 4A e 4B e altre modifiche minori	12/2024

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

