



BACILLUS CEREUS AGAR BASE (PEMBA) BACILLUS CEREUS SELECTIVE AGAR (PEMBA)

Terreno di coltura in polvere e terreno pronto all'uso in piastre



PEMBA: colonie tipiche di *Bacillus cereus*

1 - DESTINAZIONE D'USO

Per la ricerca e la conta del gruppo *B. cereus* in alimenti e altri campioni.

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

BACILLUS CEREUS AGAR BASE (PEMBA)

D-mannitolo	10,00 g
Peptone	1,00 g
Sodio piruvato	10,00 g
Cloruro di Sodio	2,00 g
Magnesio solfato	0,10 g
Potassio diidrogeno fosfato	0,25 g
Disodio idrogeno fosfato	2,50 g
Blu di Bromotimolo	0,12 g
Agar	15,00 g

BACILLUS CEREUS SELECTIVE AGAR (PEMBA) – PIASTRE PRONTE ALL'USO

Bacillus Cereus Agar Base (PEMBA)	41 g
Egg yolk emulsion 20%	50 mL
Polimixina B solfato	100.000 UI
Acqua	950 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 anaerobici 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.¹ L'infezione è causata dall'ingestione di alimenti come carne, riso e verdure che sono contaminati da *B. cereus* e sono stati lasciati a temperatura ambiente dopo la cottura.

L'uso e le prestazioni di un terreno diagnostico e selettivo migliorato, il PEMBA (agar blu di polimixina piruvato tuorlo d'uovo mannitolo bromotimolo), per la rilevazione del *Bacillus cereus* negli alimenti, è stato descritto da Hoolbrook e Anderson nel 1980.²

PEMBA è raccomandato dalla ISO 21871³ per il rilevamento e l'enumerazione di un basso numero di presunti *B. cereus* negli alimenti.

Nel Bacillus Cereus Agar (PEMBA), il peptone fornisce carbonio, azoto, vitamine e minerali per la crescita microbica. Questo terreno si basa sulla componente inibitoria selettiva della polimixina B, su due sistemi indicatori: mannitolo e blu di bromotimolo e sul tuorlo d'uovo.

La selettività si ottiene con la polimixina B e una concentrazione critica di nutrienti. *B. cereus* non utilizza il mannitolo ma metabolizza il tuorlo d'uovo dando origine alle tipiche colonie bacilliformi da turchese a blu pavone con alone.⁴ Gli organismi non bersaglio che fermentano il mannitolo producono acidi e formano colonie gialle.

4 – PREPARAZIONE

Sospendere 20,5 g in 470 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. Ricostituire in condizioni asettiche il contenuto di una fiala di Bacillus Cereus Antimicrobic Supplement (Ref. 4240001) con 5 mL di acqua distillata sterile, aggiungere al terreno di base e mescolare. Aggiungere 25 mL di Egg Yolk Emulsion 20%, (REF 42111205), mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Bacillus Cereus Selective Agar (PEMBA)

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, grigia
Aspetto del terreno in soluzione	blu-verde, leggermente opalescente
Aspetto del terreno in piastra	blu-verde, opaco
pH (20-25°C)	7,2 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Bacillus Cereus Agar Base (PEMBA)	Terreno di coltura in polvere	4011122	500 g (12.2 L)
Bacillus Cereus Selective Agar (PEMBA)	Piastre pronte all'uso	541112	2 x 10 piastre ø 90 mm

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e tamponi sterili, incubatrice e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute Erlenmeyer, piastre Petri sterili, Egg Yolk Emulsion (codice 42111205), Bacillus Cereus Antimicrobic Supplement (codice 4240001) terreni di coltura ausiliari e reagenti per l'identificazione completa delle colonie.

8 – CAMPIONI

Prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali e campioni ambientali nel settore della produzione e manipolazione degli alimenti. Consultare i riferimenti appropriati per la raccolta, la conservazione e la conservazione dei campioni.³

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

ISO 21871,3 raccomanda la procedura qui riassunta.





1. Inoculare le piastre di agar PEMBA dopo l'arricchimento selettivo in brodo triptone soia polimixina (TSPB). Le provette TSPB possono essere preparate da Tryptic Soy Broth (codice 402155) con aggiunta di Bacillus Cereus Antimicrobial Supplement (codice 4240001).
2. Per conteggio, inoculare tre provette di TSPB a doppia concentrazione con 10 mL della diluizione primaria e inoculare il TSPB a concentrazione singola con 1 mL di diluizioni decimali della diluizione primaria (sospensione iniziale). Per il rilevamento, inoculare 1 mL della sospensione iniziale in 9 mL di TSPB a concentrazione singola.
3. Incubare le provette TSPB inoculate a 30°C per 48 h ± 4 h.
4. Mescolare bene le provette TSPB e strisciare un'ansa da ciascuna delle provette sulla superficie del PEMBA.
5. Incubare le piastre inoculate con il coperchio rivolto verso il basso a 37 °C per 18-24 ore.
6. Se non è possibile valutare chiaramente le colonie, continuare a incubare le piastre per un massimo di altre 24 ore.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Al termine dell'incubazione, esaminare le piastre per la presenza di colonie tipiche o atipiche.³

Su PEMBA, le colonie tipiche del presunto *Bacillus cereus* hanno una dimensione compresa tra 2 mm e 5 mm, hanno un bordo irregolare frastagliato e superficie simile a vetro smerigliato, sono di colore da turchese a blu pavone, a volte con un centro bianco grigiastro su uno sfondo blu e hanno un alone di precipitazione (reazione al tuorlo d'uovo) largo fino a 5 mm.

Se le piastre hanno un elevato contenuto di flora contaminante che fermenta il mannitolo, la caratteristica colorazione delle colonie può essere ridotta o non più visibile. Inoltre, alcuni ceppi di *Bacillus cereus* hanno solo una leggera o addirittura nessuna reazione al tuorlo d'uovo. In tali casi e in tutti gli altri casi dubbi, anche queste colonie devono essere sottoposte alla conferma.

Le colonie tipiche e atipiche su PEMBA devono essere confermate mediante test di emolisi su agar sangue di montone ed esame microscopico.

- Strisciare le colonie selezionate da PEMBA sulla superficie dell'agar sangue in modo da consentire lo sviluppo di colonie ben separate. Incubare a 30 gradi centigradi per 24 ore e leggere la reazione di emolisi. Ogni colonia circondata da una zona limpida è considerata positiva all'emolisi.
- Colonie tipiche e atipiche su PEMBA possono essere confermate mediante esame microscopico effettuando una prima colorazione con una soluzione di verde malachite per colorare le spore e una soluzione di Sudan Black B per colorare i granuli di grasso intracellulare e una seconda colorazione con una soluzione di safranina.
- Esaminare il vetrino al microscopio utilizzando olio per immersione. Di norma, le cellule a forma di mattone di *Bacillus cereus* sono disposte in catene e sono lunghe da 4 µm a 5 µm, larghe da 1 µm a 1,5 µm e contengono quantità abbastanza grandi di grasso intracellulare, colorato in nero. Le spore, colorate in verde, possono essere centrali o subterminali, ma non distendono mai gli sporangi, colorati in rosso.
Di seguito, altri test di conferma/differenziazione:⁵ 1) Osservazione microscopica (grandi bacilli Gram-positivi in catene da corte a lunghe; le spore sono ellissoidali, da centrali a subterminali, e non rigonfiano lo sporangio); 2) Fermentazione del glucosio (+); 3) Reazione Voges Proskauer (+); 4) Riduzione dei nitrati (+); 5) Test di mobilità (+); 6) Decomposizione della tirosina (+); 7) Resistenza al lisozima (+).

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

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

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

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima della messa in vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di Bacillus Cereus Agar Base disidratato, Bacillus Cereus Antimicrobial Supplement e piastre pronte per l'uso vengono testati per produttività, specificità e selettività confrontando i risultati con Tryptic Soy Agar.

La produttività viene testata con metodo quantitativo con il ceppo bersaglio *B.cereus* ATCC 11778: le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 30°C per 18-24 ore. Le colonie vengono enumerate su entrambi i mezzi e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr). Se Pr è ≥ 0,5 e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici (blu turchese con alone opaco) i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

Inoltre le caratteristiche di produttività sono testate mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi target: *B.cereus* ATCC 11778 e *B. thuringiensis* ATCC 10792. Dopo l'incubazione, si valutano la quantità di crescita e le caratteristiche della colonia: i ceppi target mostrano una buona crescita, con turchese-blu con 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 crescita di *E.coli* è totalmente inibita.

13– LIMITI DEL METODO

- Solo per il conteggio delle presunte spore di *Bacillus cereus*, la diluizione primaria può essere riscaldata a 80 °C per 10 minuti a bagnomaria.³
- I test di conferma possono in alcuni casi essere inadeguati per distinguere *B. cereus* da organismi culturalmente simili che potrebbero occasionalmente trovarsi negli alimenti. Questi organismi includono 1) *B. thuringiensis*, che produce cristalli di tossine proteiche; 2) *B. mycoloides*, 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 sopra descritti 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 identificarne gli isolati.⁵
- 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 le piastre pronte 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 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.
- Ciascuna piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti delle specifiche definite riportate sul Certificato di Controllo Qualità.
- Trattare tutti i campioni di laboratorio come potenzialmente 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 principio attivo 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.
- 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

Terreno disidratato

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. 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 (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

Piastre pronte all'uso

Conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

Secondo la norma ISO 21871, le piastre possono essere conservate prima dell'essiccazione a una temperatura compresa tra 1 °C e 5 °C per un massimo di 4 giorni.³

16 - BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Holbrook R, Anderson JM. An improved selective and diagnostic medium for the isolation of Bacillus cereus in foods. Can J Microbiol 1980; 26: 753-759.
- 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
- 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.
- US Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 14: Bacillus cereus. Content current as of: 06/29/2021

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	 Monouso	 Fabbricante	 Lato superiore	 Proteggere dall'umidità
 limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le istruzioni per l'uso	 Utilizzare entro	 Fragile maneggiare con cura	 Proteggere dalla luce diretta	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 7	Aggiornamento del contenuto e del Layout	07/2022
Revisione 8	Modifica dei capitoli 2, 5, 6, 7, 14,15	12/2022
Revisione 9	Modifica del capitolo 4 e altre modifiche minori	12/2024

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