
RAPID' *B.cereus* Agar

User Guide

Chromogenic media for the detection and the enumeration of *Bacillus cereus* group (vegetative cells and spores) in human food products, animal feed and environmental samples at 30°C in 24 hr without confirmation

Catalog #12007304, Prepared plates, 90 mm x 20 dishes

Catalog #12007305, Dehydrated, 500 g

Catalog #12007306, Supplement 1, liquid, 10 vials

Catalog #12007307, Supplement 2, freeze-dried, 10 vials



BIO-RAD

Table of Contents

Section 1	Introduction	1
Section 2	RAPID' <i>B.cereus</i> Principle	1
Section 3	Theoretical Formula	1
Section 4	Shelf Life and Storage	1
Section 5	Materials Required but Not Supplied	2
	Equipment.....	2
	Supplies	2
Section 6	Precautions, Limitations of Use, and Quality Control	2
Section 7	Protocol.....	3
	Preparation of Dehydrated Medium.....	3
	Sample Preparation	3
	Inoculation and Plate Reading.....	4
Section 8	Confirmation of Positive Results.....	4
Section 9	Confirmation of Other Methods	4
Section 10	Test Performance and Validation	4
Section 11	References.....	5
Section 12	Revision History	5

Section 1 Introduction

The *Bacillus cereus* group of organisms is widely distributed in the environment and eliminating it can present a challenge in food production, particularly with ready-to-eat and ready-to-reheat products. Different bacteriological characteristics, including biochemical characteristics, are shared by several species within the *Bacillus* genus, making differentiation of these organisms difficult. These spore-forming organisms have traditionally been controlled by the application of heat. However, the increasing demand for food with a fresh-like quality (texture, color, and aroma) and the desire to produce foods with functional ingredients have increased interest in the development of low-heat operations to either inactivate spores or to prevent their germination and growth.

Section 2 RAPID'*B.cereus* Principle

RAPID'*B.cereus* Agar is based on a chromogenic reaction and phospholipase activity. Typical *B. cereus* colonies develop a characteristic red color generally surrounded with an opaque halo. Some rare *B. cereus* do not express the phospholipase activity and aren't able to produce the opaque halo. The medium's selective mixture prevents the growth of the interfering flora and enables the analysis of a broad range of foods. The sensitivity of the medium has been specially optimized to allow growth of all pathogenic *Bacillus cereus* strains, even those that are difficult to culture, like *B. cytotoxicus*. The interpretation of RAPID'*B.cereus* Agar plates is further facilitated by the high level of contrast between the color of the colonies and the agar.

Section 3 Theoretical Formula

Peptones	13 g
Phospholipids	5 g
Selective agents	1.1 g
Chromogenic mix	0.01 g
Salt	10.5 g
Agar	15 g
Distilled water	qsp 1,000 ml

Final pH at 25°C = 7.0 ± 0.2

Section 4 Shelf Life and Storage

- Dehydrated agar: 15–25°C in a carefully sealed package in a dry and dark place
- Supplements: 2–8°C in a dark place

Section 5 Materials Required but Not Supplied

- Preprepared agar plates: 2–8°C in a dark place
- Plate prepared from the dehydrated agar: 1 month at 2–8°C in a carefully sealed package in a dry and dark place

Section 5 Materials Required but Not Supplied

Equipment

- All usual laboratory equipment
- Hot plate
- Scale, sensitivity of 0.1 g
- Stirrer/homogenizer
- Thermostatically controlled incubator or incubation room, precise to $\pm 1^\circ\text{C}$
- Water bath

Supplies

- Diluent for enumeration: Buffered Peptone Water (BPW) (e.g. catalog #3554179, 225 ml x 6 bottles; 3564684, dehydrated, 500 g; 3555790, 5 L x 2 bags; 3555795, 3 L x 4 bags); tryptone salt (e.g. catalog #3555754, 9 ml x 25 tubes; 3555756, 90 ml x 6 bottles; catalog #3564544, dehydrated, 500 g; catalog #3555796, 3 L x 4 bags)
- Inoculating loops
- Sterile petri dishes
- Sterile pipets
- Sterile weigh bags

Section 6 Precautions, Limitations of Use, and Quality Control

Precautions

- Respect Good Laboratory Practice (EN ISO 7218). Appropriate protection, such as gloves and lab coats, should be worn when working with potentially infectious live bacteria such as *Bacillus*
- Media that have come in contact with food samples should be considered contaminated and should be disposed of in accordance with local rules and regulations
- The time lapse between the end of preparation of the stock solution (or 10^{-1} dilution in the case of a solid product) and when the dilutions come into contact with the culture medium must not exceed 45 min

Section 7 Protocol

- Plates should be pre-dried before use to ensure that they are free of excess moisture (EN ISO 7218). For example, plates can be dried by placing them with the agar surface facing upwards in a laminar-flow safety cabinet (at room temperature) for 20 to 30 minutes.

Limitations of Use

- A small percentage of *Bacillus cereus* strains do not express phospholipase activity (red colonies without opaque halo), especially when the pour plate protocol is used. These red colonies should be considered typical

Quality Control

- Every product manufactured and marketed by Bio-Rad is subject to a quality assurance procedure at all stages, from reception of raw materials through to marketing of the finished products. Each batch of finished product undergoes quality control according to EN ISO 11133 and is marketed only if it satisfies the acceptability criteria. Documentation relative to the production and quality control of each batch is kept on file
- For SDS product safety information and certificate of analysis, visit www.bio-rad.com

Section 7 Protocol

Preparation of Dehydrated Medium

1. Always shake bottle before use.
2. Dissolve 36.3 g of powder in 950 ml of distilled water, wait 5 min, then mix until a homogenous suspension is obtained.
3. Heat gently, agitating frequently, then bring to a boil.
4. Dispense 475 ml into two bottles.
5. Sterilize by autoclaving at 121°C for 15 min.
6. Cool the medium to 44–47°C.
7. Aseptically add 1 vial of Supplement 1.
8. Aseptically add 1 vial of Supplement 2 that has been reconstituted in 6 ml sterile water.
9. Mix well and pour into petri dishes or keep in bottles to use a pour plate inoculation method.
10. Complete medium prepared with supplements can be maintained at 44–47°C up to 8 hr before use.
11. One 500 g bottle of powder makes 13.8 L of medium.

Sample Preparation

Prepare sample according to the standard applicable to the product concerned.

Inoculation and Plate Reading

1. **Pour plate method:** Transfer 1 ml of sample and/or its decimal dilutions into an empty petri dish. Pour the melted medium, cooled to 44–47 °C, onto the sample and homogenize by swirling. Let solidify on a cool surface.
2. **Surface inoculation method:** Spread 0.1 ml of sample and/or its decimal dilutions on a petri dish. If it is necessary to estimate small numbers, spread 1 ml of sample over three 90 mm dishes (~0.33 ml/dish) or over one 140 mm dish.
3. For both methods, incubate plates facing down at 30 ± 1°C for 24 ± 3 hr.
4. *B. cereus* produces red colonies surrounded with an opaque halo or without halo in some rare cases. The aspect of strains belonging to the *B. cereus* group may be variable (rhizoidal aspect, rough colonies, variable diameter, etc.).
5. Refer to EN ISO 7218 standard for inoculation, colony counting, calculation and expression of results.
6. After the incubation step, plates can be stored at 2–8°C for 72 hr for surface inoculation.


Section 8 Confirmation of Positive Results

Not applicable.

Section 9 Confirmation of Other Methods

Not applicable.

Section 10 Test Performance and Validations

Certification	Scope	Validation Protocol	Reference Protocol	Certificate Reference
NF VALIDATION	All food products, animal feed, environmental samples	EN ISO 16140-2	ISO 7932	 BRD: 07/26–03/19 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Certified by AFNOR Certification http://nf-validation.afnor.org/en

Section 11 References

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 °C.

Section 12 Revision History

Release date	Document number	Change
August 2020	10000127897 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Major change - New document design - Document number change – previous version RAPID'B.cereus_V2_28 November 2018
October 2021	10000127897 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Addition of animal feed and environmental samples to intended use and validation scope - Inoculation protocol clarification

Visit www.bio-rad.com/rapidmedia for more information on our complete range of RAPID chromogenic media

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

*Life Science
Group*

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23
Belgium 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500
Czech Republic 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23
Japan 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670
The Netherlands 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23
Poland 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23 **Russian Federation** 00 800 00 24 67 23
Singapore 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0121



10000127897 Ver B US/EG

RAPID'*B.cereus* Agar

Guide d'utilisation

Milieu chromogène pour la détection et le dénombrement du groupe *Bacillus cereus* (cellules et spores végétatives) dans les produits d'alimentation humaine, animal et échantillons de l'environnement à 30 °C en 24 hr et sans confirmation

N° de référence 12007304, boîte préparée, 90 mm x 20 boîtes
N° de référence 12007305, base déshydratée, 500 g
N° de référence 12007306, Supplément 1, liquide, 10 flacons
N° de référence 12007307, Supplément 2, lyophilisé, 10 flacons



BIO-RAD

Sommaire

Section 1	Introduction	1
Section 2	RAPID' <i>B.cereus</i> - Principe	1
Section 3	Formule théorique	1
Section 4	Durée de conservation et stockage	1
Section 5	Matériel requis non fourni	2
	Matériel.....	2
	Produits	2
Section 6	Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité	2
Section 7	Protocole	3
	Préparation du milieu de culture déshydraté	3
	Préparation des échantillons	3
	Inoculation et lecture	4
Section 8	Confirmation des résultats positifs	4
Section 9	Confirmation d'autres méthodes	4
Section 10	Performance du test et validations	4
Section 11	Références	5
Section 12	Historique des révisions	5

Section 1 Introduction

Bacillus cereus est un groupe de micro-organismes largement présents dans l'environnement. Leur élimination peut présenter un défi dans le domaine de la production alimentaire, notamment en ce qui concerne les aliments prêts-à-consommer et prêts-à-réchauffer. Différentes caractéristiques bactériologiques, y compris différentes caractéristiques biochimiques, sont partagées par plusieurs espèces du genre *Bacillus*, ce qui rend la distinction difficile. Ces micro-organismes sporulants sont traditionnellement maîtrisés par l'application de chaleur. Toutefois, la demande croissante en produits avec une qualité de type « frais » (texture, couleur et arôme) et le souhait de produire des aliments à ingrédients fonctionnels font porter de l'intérêt aux procédés à faible chaleur, soit pour désactiver les spores, soit pour empêcher leur germination et leur développement.

Section 2 RAPID'*B.cereus* - Principe

La gélose RAPID'*B.cereus* est basée sur une réaction chromogène et sur l'activité de phospholipase. Les colonies de *B.cereus* typiques acquièrent une couleur rouge caractéristique, entourée d'un halo opaque. Certaines souches rares de *B. cereus* n'expriment pas d'activité de phospholipase et ne produisent pas de halo opaque. Le mélange sélectif du milieu empêche la croissance de la flore interférente et permet d'analyser une large gamme d'aliments. La sensibilité du milieu a été optimisée spécifiquement pour permettre la croissance de toutes les souches de *Bacillus cereus* pathogènes, y compris les souches difficiles à cultiver, comme *B.cytotoxicus*. En outre, l'interprétation des milieux de culture gélosés RAPID'*B.cereus* est facilitée par le niveau élevé de contraste (couleur des colonies/gélose).

Section 3 Formule théorique

Peptones	13 g
Phospholipides	5 g
Agents sélectifs	1,1 g
Mélange chromogène	0,01 g
Sel	10,5 g
Gélose	15 g
Eau distillée	q.s.p. 1 000 ml

pH final à 25 °C = 7,0 ± 0,2

Section 4 Durée de conservation et stockage

- Gélose base déshydratée : 15–25 °C en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière
- Suppléments : 2–8 °C à l'abri de la lumière

Section 5 Matériel requis non fourni

- Boîtes précoulées : 2–8 °C à l'abri de la lumière
- Boîte préparée à partir de la gélose base déshydratée : 1 mois à 2–8 °C, en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière

Section 5 Matériel requis non fourni

Matériel

- Tout le matériel de laboratoire habituel
- Plaque chauffante
- Balance, sensibilité 0,1 g
- Agitateur/homogénéisateur
- Étuve ou enceinte thermostatée, précision ± 1 °C
- Bain-marie

Produits

- Diluant pour le dénombrement : Buffered Peptone Water (BPW) (par exemple, n° de référence 3554179, 225 ml x 6 flacons ; 3564684, base déshydratée, 500 g ; 3555790, 5 L x 2 poches ; 3555795, 3 L x 4 poches) ; tryptone-sel (par exemple, n° de référence 3555754, 9 ml x 25 tubes ; 3555756, 90 ml x 6 flacons ; n° de référence 3564544, base déshydratée, 500 g ; n° de référence 3555796, 3 L x 4 poches)
- Öses d'inoculation
- Boîtes de Petri stériles
- Pipettes stériles
- Sacs de pesée stériles

Section 6 Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité

Précautions

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (EN ISO 7218). Porter un équipement de protection approprié, par exemple des gants et une blouse de laboratoire, pour travailler avec des bactéries vivantes potentiellement infectieuses telles que les *Bacillus*.
- Les milieux qui sont entrés en contact avec des échantillons alimentaires doivent être considérés comme contaminés et doivent être éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Le temps écoulé entre la fin de la préparation de la solution mère (ou dilution 10^{-1} dans le cas d'un produit solide) et le moment auquel les dilutions entrent en contact avec le milieu de culture ne doit pas excéder 45 min.
- Avant utilisation, il convient que les boîtes soient préséchées pour garantir l'absence d'humidité excessive (EN ISO 7218). Par exemple, à cet effet, il est possible de placer les boîtes, surface gélosée positionnée vers le haut, dans une enceinte à flux laminaire (à température ambiante) pendant 20 à 30 min.

Limites d'utilisation

- Un petit pourcentage de souches de *Bacillus cereus* n'exprime pas d'activité de phospholipase (colonies rouges sans halo opaque), notamment lorsque le protocole du milieu coulé est utilisé. Il convient de considérer ces colonies rouges comme typiques.

Contrôle qualité

- Chaque produit fabriqué et commercialisé par Bio-Rad est soumis à une procédure d'assurance qualité à toutes les étapes, de la réception des matières premières jusqu'à la mise sur le marché du produit fini. Chaque lot de produits finis subit un contrôle qualité conforme à EN ISO 11133 et est mis sur le marché uniquement s'il satisfait aux critères d'acceptabilité. La documentation relative à la production et au contrôle qualité de chaque lot est archivée.
- Pour consulter la fiche de données de sécurité (FDS) et le certificat d'analyse, visiter www.bio-rad.com

Section 7 Protocole

Préparation du milieu de culture déshydraté

1. Toujours agiter le flacon avant utilisation.
2. Dissoudre 36,3 g de poudre dans 950 ml d'eau distillée, attendre 5 min, puis mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène.
3. Chauffer doucement en mélangeant fréquemment, puis amener à ébullition.
4. Distribuer 475 ml dans deux flacons.
5. Stériliser en autoclave à 121 °C pendant 15 min.
6. Refroidir le milieu de culture à 44–47 °C.
7. Dans des conditions stériles, ajouter 1 flacon de supplément 1.
8. Dans des conditions stériles, ajouter 1 flacon de supplément 2, préalablement reconstitué dans 6 ml d'eau stérile.
9. Bien mélanger et couler en boîtes de Petri ou conserver en flacons pour une utilisation avec la méthode d'inoculation du milieu coulé.
10. Le milieu complet préparé avec les suppléments peut être maintenu jusqu'à 8 hr à 44–47 °C avant utilisation.
11. 500 grammes de poudre permettent de reconstituer 13,8 L de milieu.

Préparation des échantillons

Préparer l'échantillon conformément à la norme applicable au produit concerné.

Inoculation et lecture

1. **Méthode du milieu coulé** : Transférer 1 ml de l'échantillon et/ou de ses dilutions décimales dans une boîte de Petri vide. Verser le milieu fondu, refroidi à 44–47 °C, sur l'échantillon et homogénéiser en mélangeant. Laisser solidifier sur une surface fraîche.
2. **Méthode d'inoculation de surface** : Étaler 0,1 ml de l'échantillon et/ou de ses dilutions décimales sur une boîte de Petri. S'il est nécessaire d'estimer de petits nombres, étaler 1 ml d'échantillon sur trois boîtes de Ø 90 mm (~ 0,33 ml/boîte) ou sur une boîte de Ø 140 mm.
3. Pour les deux méthodes, incuber les boîtes face vers le bas à 30 ± 1 °C pendant 24 ± 3 hr.
4. La bactérie *B.cereus* produit des colonies rouges entourées d'un halo opaque, ou sans halo dans de rares cas. L'aspect des souches appartenant au groupe *B. cereus* peut être variable (aspect rhizoïde, colonies irrégulières, diamètre variable, etc.).
5. Consulter la norme EN ISO 7218 pour obtenir des informations sur l'inoculation, le comptage des colonies, les calculs et l'expression des résultats.
6. Après l'étape d'incubation, les boîtes peuvent être stockées à 2–8 °C pendant 72 hr pour l'inoculation de surface.


Section 8 Confirmation des résultats positifs

Sans objet.

Section 9 Confirmation d'autres méthodes

Sans objet.

Section 10 Performance du test et validations

Certification	Domaine	Protocole de validation	Protocole de référence	Référence de certificat
NF VALIDATION	Tous les produits alimentaires, d'alimentation animal, échantillons de l'environnement	EN ISO 16140-2	ISO 7932	 <p>BRD : 07/26–03/19 MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR LE SECTEUR AGRO- ALIMENTAIRE Certifié par AFNOR Certification http://nf-validation.afnor.org/en</p>

Section 11 Références

ISO 7932:2004/AMD 1:2020 — Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présomptifs — Technique par comptage des colonies à 30 °C.

Section 12 Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Août 2020	10000127897 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Modification importante - Nouvelle conception de document - Modification du numéro de document (version précédente RAPID_B.cereus_V2_28 novembre 2018)
Octobre 2021	10000127897 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Ajout des produits d'alimentation animal et échantillons de l'environnement au domaine d'application et à la portée de validation - Clarification du protocole d'inoculation

Visitez www.bio-rad.com/rapidmedia pour obtenir plus d'informations sur la gamme complète de milieux chromogènes RAPID

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23
Belgium 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500
Czech Republic 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23
Japan 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670
The Netherlands 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23
Poland 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23 **Russian Federation** 00 800 00 24 67 23
Singapore 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0121



RAPID'*B.cereus* Agar

Anwenderhandbuch

Chromogenes Medium zum Nachweis und zur Zählung von Keimen aus der *Bacillus cereus* Gruppe (vegetative Zellen und Sporen) in Produkte für den menschlichen Verzehr, Futtermittel und Umweltproben bei 30°C innerhalb von 24 hr ohne erforderliche Bestätigung

Katalog-Nr. 12007304, gebrauchsfertige Agarplatten, 20 Agarplatten x 90 mm

Katalog-Nr. 12007305, dehydriert, 500 g

Katalog-Nr. 12007306, Supplement 1, flüssig, 10 Fläschchen

Katalog-Nr. 12007307, Supplement 2, gefriergetrocknet, 10 Fläschchen



BIO-RAD

Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1	Einleitung	1
Abschnitt 2	RAPID' <i>B.cereus</i> Testprinzip	1
Abschnitt 3	Theoretische Zusammensetzung	1
Abschnitt 4	Haltbarkeit und Lagerung	1
Abschnitt 5	Zusätzlich benötigtes Material	2
	Geräte	2
	Zubehör	2
Abschnitt 6	Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle	2
Abschnitt 7	Protokoll	3
	Vorbereitung des dehydrierten Mediums.....	3
	Probenvorbereitung	4
	Beimpfung und Auswertung der Platten.....	4
Abschnitt 8	Bestätigung positiver Ergebnisse	4
Abschnitt 9	Bestätigung anderer Methoden	4
Abschnitt 10	Testleistung und Testvalidierungen	4
Abschnitt 11	Literatur	5
Abschnitt 12	Revisionshistorie	5

Abschnitt 1 Einleitung

Die *Bacillus cereus* Organismengruppe ist weit verbreitet, und ihre Bekämpfung kann vor allem bei der Lebensmittelproduktion eine Herausforderung darstellen, insbesondere bei verzehrfertigen und wiedererwärmbaren Erzeugnissen. Mehrere Spezies innerhalb der Gattung *Bacillus* haben unterschiedliche bakteriologische bzw. biochemische Eigenschaften gemeinsam, was ihre Differenzierung erschwert. Die herkömmliche Methode zur Kontrolle dieser sporenbildenden Organismen ist die Wärmebehandlung. Die steigende Nachfrage nach Lebensmitteln mit frischer Qualität (Textur, Farbe und Aroma) und nach Lebensmitteln mit funktionellen Inhaltsstoffen haben jedoch das Interesse an der Entwicklung von Niedrigtemperaturverfahren angefangen, um entweder Sporen zu inaktivieren oder deren Keimung und Wachstum zu verhindern.

Abschnitt 2 RAPID'*B.cereus* Testprinzip

RAPID'*B.cereus* Agar basiert auf einer chromogenen Reaktion und Phospholipaseaktivität. Charakteristisch für Kolonien von *B. cereus* sind ihre rote Farbe und der opake Hof. Einige seltene Stämme von *B. cereus* exprimieren keine Phospholipase und bilden keinen opaken Hof. Die selektive Mischung des Mediums verhindert das Wachstum der Begleitflora und ermöglicht die Analyse eines großen Spektrums von Lebensmitteln. Die Empfindlichkeit des Mediums wurde speziell optimiert, um das Wachstum aller pathogenen *Bacillus cereus*-Stämme zu ermöglichen, auch solcher, die schwer zu kultivieren sind, wie z. B. *B. cytotoxicus*. Die Auswertung von RAPID'*B.cereus* Agarplatten wird durch den hohen Kontrast zwischen der Koloniefarbe und dem Agar weiter erleichtert.

Abschnitt 3 Theoretische Zusammensetzung

Peptone	13 g
Phospholipide	5 g
Selektive Agenzien	1,1 g
Chromogenes Substrat	0,01 g
Salz	10,5 g
Agar	15 g
Destilliertes Wasser	qsp 1.000 ml

Finaler pH-Wert bei 25°C = 7,0 ± 0,2

Abschnitt 4 Haltbarkeit und Lagerung

- Dehydrierter Agar: Trocken und lichtgeschützt in einer sorgfältig verschlossenen Packung bei 15–25°C.
- Supplements: Lichtgeschützt bei 2–8°C

Abschnitt 5 Zusätzlich benötigtes Material

- Gebrauchsfertige Agarplatten: Lichtgeschützt bei 2–8°C
- Aus dehydriertem Medium hergestellte Agarplatten: 1 Monat bei 2–8°C bei trockener und lichtgeschützter Lagerung in einer sorgfältig verschlossenen Packung

Abschnitt 5 Zusätzlich benötigtes Material

Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Heizplatte
- Waage, Genauigkeit bis 0,1 g
- Rührer / Homogenisator
- Thermostatisch kontrollierter Inkubator oder Inkubationskammer, bis auf $\pm 1^\circ\text{C}$ genau
- Wasserbad

Zubehör

- Verdünnungsmittel zum Zählen: Buffered Peptone Water (BPW) (z. B. Katalog-Nr. 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; 3564684, dehydriert, 500 g; 3555790, 2 Beutel x 5 L; 3555795, 4 Beutel x 3 L); Tryptonsalz (z. B. Katalog-Nr. 3555754, 25 Röhrchen x 9 ml; 3555756, 6 Flaschen x 90 ml; Katalog-Nr. 3564544, dehydriert, 500 g; Katalog-Nr. 3555796, 4 Beutel x 3 L)
- Impfösen
- Sterile Petrischalen
- Sterile Pipetten
- Sterile Probenbeutel

Abschnitt 6 Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle

Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis einzuhalten (EN ISO 7218). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen, lebenden Bakterien wie *Bacillus* sollten angemessene Schutzvorkehrungen getroffen werden (zum Beispiel Handschuhe und Laborkittel tragen).
- Medien, die mit Lebensmittelproben in Kontakt gekommen sind, sind als kontaminiert zu betrachten und gemäß den vor Ort geltenden Vorschriften und Bestimmungen zu entsorgen.
- Zwischen dem Ende der Herstellung der Stammlösung (bzw. der 10^{-1} -Verdünnung im Fall eines festen Produkts) und dem Inkontaktbringen der Verdünnungen mit dem Kulturmedium dürfen nicht mehr als 45 min verstreichen.

- Die Platten sollten vor dem Gebrauch vorgetrocknet werden, um sicherzustellen, dass sie frei von überschüssiger Feuchtigkeit sind (EN ISO 7218). Dazu können die Platten zum Beispiel mit der Agaroberfläche nach oben für 20 bis 30 min in eine Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank (bei Raumtemperatur) gestellt werden.

Anwendungsbeschränkungen

- Ein kleiner Prozentsatz der *Bacillus cereus*-Stämme exprimiert keine Phospholipase (rote Kolonien ohne opaken Hof), insbesondere wenn das Protokoll zur Beimpfung einer gegossenen Platte durchgeführt wird. Diese roten Kolonien sind als typisch zu betrachten.

Qualitätskontrolle

- Jedes von der Firma Bio-Rad hergestellte und verkaufte Produkt unterliegt vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte einer umfassenden Qualitätssicherung. Jede Charge des fertigen Produkts wird einer Qualitätskontrolle gemäß EN ISO 11133 unterzogen und gelangt nur dann in den Vertrieb, wenn sie die Akzeptanzkriterien erfüllt. Die Dokumente im Zusammenhang mit der Herstellung und der Überprüfung jeder Charge werden archiviert.
- Das Sicherheitsdatenblatt und das Analysezertifikat für das Produkt sind im Internet auf www.bio-rad.com erhältlich.

Abschnitt 7 Protokoll

Vorbereitung des dehydrierten Mediums

1. Den Behälter vor jedem Gebrauch schütteln.
2. 36,3 g Pulver in 950 ml destilliertem Wasser lösen, 5 min warten und dann zu einer homogenen Suspension mischen.
3. Unter ständigem Rühren vorsichtig erhitzen und zum Kochen bringen.
4. In zwei Behältern jeweils 475 ml geben.
5. In einem Autoklaven 15 min bei 121°C sterilisieren.
6. Das Medium auf 44–47°C abkühlen lassen.
7. Unter sterilen Konditionen 1 Fläschchen Supplement 1 zugeben.
8. Unter sterilen Konditionen 1 Fläschchen Supplement 2 zugeben, das in 6 ml sterilem Wasser rekonstituiert worden ist.
9. Gut mischen und in Petrischalen gießen oder in Behältern aufbewahren, um ein Protokoll zur Beimpfung einer gegossenen Platte zu befolgen.
10. Das Kompletmedium mit Supplements kann vor dem Gebrauch bis zu 8 hr bei 44–47°C aufbewahrt werden.
11. 500 g Pulver ergeben 13,8 L Medium.

Probenvorbereitung

Die Probe nach der für das jeweilige Produkt geltenden Standardmethode vorbereiten.

Beimpfung und Auswertung der Platten

1. **Beimpfung einer gegossenen Platte:** 1 ml Probe und/oder ihre Dezimalverdünnungen in eine leere Petrischale gießen. Das geschmolzene auf 44–47°C abgekühlte Medium auf die Probe gießen und durch Schwenken homogenisieren. Auf einer kühlen Fläche fest werden lassen.
2. **Oberflächenbeimpfung:** 0,1 ml Probe und/oder ihre Dezimalverdünnungen auf einer Agarplatte ausstreichen. Wenn die zu schätzende Keimzahl gering ist, 1 ml Probe auf drei Agarplatten mit 90 mm Durchmesser (~ 0,33 ml/Agarplatte) oder in einer Agarplatte mit 140 mm Durchmesser verteilen.
3. Bei beiden Methoden die Platten umgedreht bei $30 \pm 1^\circ\text{C}$ für 24 ± 3 hr inkubieren.
4. *B. cereus* bildet rote Kolonien mit einem opaken Hof bzw. in einigen seltenen Fällen ohne Hof. Das Aussehen von Stämmen aus der *B. cereus*-Gruppe kann variieren (rhizoidales Aussehen, ungleichmäßige Kolonien, variabler Durchmesser usw.).
5. Die Norm EN ISO 7218 enthält Informationen zum Beimpfen, Zählen von Kolonien sowie zum Berechnen und Angeben der Ergebnisse.
6. Nach der Inkubation können die Platten für 72 hr bei 2–8°C zur Oberflächenbeimpfung gelagert werden.

Abschnitt 8

Bestätigung positiver Ergebnisse

Nicht zutreffend


Abschnitt 9

Bestätigung anderer Methoden

Nicht zutreffend

Abschnitt 10

Testleistung und Testvalidierungen

Zertifizierungsstelle	Umfang	Validierungsprotokoll	Referenzprotokoll	Zertifikat-Referenz
NF VALIDATION	Alle Lebensmittelerzeugnisse, Futtermittel, Umweltproben	EN ISO 16140-2	ISO 7932	 <p>BRD: 07/26–03/19 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Zertifiziert durch die AFNOR-Zertifizierungsstelle http://nf-validation.afnor.org/en</p>

Abschnitt 11 Literatur

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 °C.

Abschnitt 12 Revisionshistorie

Versionsdatum	Dokumentnummer	Änderung
August 2020	10000127897 Ver A	- Bedeutende Änderung - Neues Dokumentdesign - Änderung der Dokumentnummer - vorhergehende Version RAPID_B.cereus_V2_28. November 2018
Oktober 2021	10000127897 Ver B	- Hinzufügen von Futtermittel und Umweltproben als Verwendungszweck und im Bereich Validierungen - Klarstellung des Protokolls zur Inokulation

Weitere Informationen über unser vollständiges Angebot an chromogenen RAPID Medien finden Sie bei uns im Internet auf www.bio-rad.com/rapidmedia

BIO-RAD ist eine Marke der Bio-Rad Laboratories, Inc.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23
Belgium 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500
Czech Republic 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23
Japan 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670
The Netherlands 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23
Poland 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23 **Russian Federation** 00 800 00 24 67 23
Singapore 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0121



RAPID'*B.cereus* Agar

Manuale utente

Terreno cromogenico per la rilevazione e l'enumerazione del gruppo *Bacillus cereus* (cellule vegetative e spore) in prodotti per il consumo umano, mangimi, campioni ambientali a 30°C, in 24 hr senza fase di conferma

Catalogo # 12007304, piastre preparate, 90 mm x 20 piastre petri

Catalogo # 12007305, disidratato, 500 g

Catalogo #12007306, Supplemento 1, liquido, 10 flaconi

Catalogo #12007307, Supplemento 2, liofilizzato, 10 flaconi



BIO-RAD

Indice

Sezione 1	Introduzione	1
Sezione 2	Principio di RAPID' <i>B.cereus</i>	1
Sezione 3	Formula teorica	1
Sezione 4	Durata e conservazione	1
Sezione 5	Materiali necessari ma non forniti	2
	Apparecchiatura	2
	Materiali	2
Sezione 6	Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità	2
Sezione 7	Protocollo	3
	Preparazione del terreno disidratato	3
	Preparazione dei campioni	3
	Inoculazione e lettura delle piastre	4
Sezione 8	Conferma dei risultati positivi	4
Sezione 9	Conferma di altri metodi	4
Sezione 10	Performance del test e validazioni	5
Sezione 11	Riferimenti	5
Sezione 12	Cronologia delle revisioni	5

Sezione 1 Introduzione

Il gruppo di organismi *Bacillus cereus* è ampiamente diffuso nell'ambiente e la sua eliminazione può rappresentare una sfida nel settore della produzione alimentare, in particolare per i prodotti pronti al consumo e i prodotti pronti da riscaldare. La condivisione di varie caratteristiche batteriologiche, comprese quelle biochimiche, da parte di diverse specie del genere *Bacillus* rende difficoltosa la differenziazione di questi organismi. Questi organismi sporigeni vengono solitamente controllati attraverso l'applicazione del calore. Tuttavia, la domanda crescente di alimenti freschi di qualità (consistenza, colore e aroma) e il desiderio di produrre alimenti con ingredienti funzionali hanno aumentato l'interesse nello sviluppare operazioni a bassa temperatura per inattivare le spore o prevenirne la germinazione e la crescita.

Sezione 2 Principio di RAPID'*B.cereus*

Il terreno agar RAPID'*B.cereus* si basa su una reazione cromogenica e sull'attività fosfolipasica. Le colonie tipiche di *B. cereus* sviluppano un caratteristico colore rosso generalmente circondato da un alone opaco. Alcuni rari *B. cereus* non esprimono l'attività fosfolipasica e non sono in grado di produrre l'alone opaco. La miscela selettiva del terreno impedisce la crescita della flora interferente e consente l'analisi di un'ampia gamma di alimenti. La sensibilità del terreno è stata specificatamente ottimizzata per consentire la crescita di tutti i ceppi patogeni di *Bacillus cereus*, anche di quelli difficilmente coltivabili, come *B. cytotoxicus*. L'interpretazione delle piastre di agar RAPID'*B.cereus* è ulteriormente facilitata dall'elevato livello di contrasto tra il colore delle colonie e quello dell'agar.

Sezione 3 Formula teorica

Peptoni	13 g
Fosfolipidi	5 g
Agenti selettivi	1,1 g
Miscela cromogenica	0,01 g
Sale	10,5 g
Terreno di coltura agar	15 g
Acqua distillata	QSP 1.000 ml

pH finale a 25°C = 7,0 ± 0,2

Sezione 4 Durata e conservazione

- Terreno di coltura agar disidratato: 15-25°C in una confezione sigillata con cura, in un luogo asciutto e buio
- Supplementi: 2-8°C in un luogo buio

Sezione 5 Materiali necessari ma non forniti

- Piastre di agar preparate: 2-8°C in un luogo buio
- Piastra preparata con il terreno di coltura disidratato: 1 mese a 2-8°C in una confezione sigillata con cura, in un luogo asciutto e buio

Sezione 5 Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Piastra riscaldante
- Bilancia, sensibilità di 0,1 g
- Agitatore/omogeneizzatore
- Incubatore o camera di incubazione con controllo termostatico, con precisione di $\pm 1^\circ\text{C}$
- Bagnomaria

Materiali

- Diluente per l'enumerazione: Acqua Peptonata Tamponata (APT) (es. catalogo #3554179, 225 ml x 6 flaconi; 3564684, in forma disidratata, 500 g; 3555790, 5 L x 2 sacche; 3555795, 3 L x 4 sacche); sale triptone (es. catalogo #3555754, 9 ml x 25 provette; 3555756, 90 ml x 6 flaconi; catalogo #3564544, in forma disidratata, 500 g; catalogo #3555796, 3 L x 4 sacche)
- Anse per inoculazione
- Piastre petri sterili
- Pipette sterili
- Sacchi per pesata sterili con filtro

Sezione 6 Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità

Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 7218). Indossare protezioni adeguate, come guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi quali *Bacillus*
- I terreni entrati in contatto con campioni di alimenti devono essere considerati come contaminati e quindi smaltiti in conformità alle normative e direttive locali
- Il tempo che intercorre tra la fine della preparazione della soluzione concentrata (o della diluizione 10^{-1} in caso di prodotto solido) e il momento in cui le diluizioni entrano in contatto con il terreno di coltura non deve superare i 45 min

- Le piastre devono essere pre-asciugate prima dell'uso per assicurarsi che siano prive di umidità in eccesso (EN ISO 7218). Ad esempio, è possibile asciugare le piastre collocandole con la superficie dell'agar rivolta verso l'alto in una cabina di sicurezza a flusso laminare (a temperatura ambiente) per 20-30 min.

Limitazioni d'uso

- Una percentuale ridotta di ceppi di *Bacillus cereus* non esprime attività fosfolipasica (colonie rosse senza alone opaco), soprattutto quando si utilizza il protocollo di inclusione in piastra. Queste colonie rosse devono essere considerate tipiche

Controllo qualità

- Tutti i prodotti fabbricati e commercializzati dalla società Bio-Rad sono sottoposti a un sistema di assicurazione qualità dal momento del ricevimento delle materie prime fino alla commercializzazione dei prodotti finiti. Ciascun lotto di prodotto finito è soggetto a un controllo di qualità conformemente alla norma EN ISO 11133 e viene messo in commercio soltanto se risulta conforme ai criteri di accettazione. Tutta la documentazione relativa alla produzione e al controllo qualità di ciascun lotto è conservata a cura del fabbricante
- Per informazioni sulla sicurezza del prodotto (schede dati di sicurezza) e il certificato di analisi, visitare il sito www.bio-rad.com

Sezione 7 Protocollo

Preparazione del terreno disidratato

1. Agitare sempre il flacone prima dell'uso.
2. Dissolvere 36,3 g di polvere in 950 ml di acqua distillata, attendere 5 min, quindi miscelare fino ad ottenere una sospensione omogenea.
3. Riscaldare lentamente, agitando frequentemente, quindi portare a ebollizione.
4. Dispensare 475 ml in due flaconi.
5. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min.
6. Raffreddare il terreno a 44–47°C.
7. Aggiungere in condizioni asettiche 1 flacone di Supplemento 1.
8. Aggiungere in condizioni asettiche 1 flacone di Supplemento 2 ricostituito in 6 ml di acqua sterile.
9. Miscelare accuratamente e versare nelle piastre petri o conservare nei flaconi per utilizzare il metodo di inclusione in piastra.
10. Il terreno completo preparato con i supplementi può essere mantenuto a 44–47°C fino a 8 hr prima dell'uso.
11. Un flacone di polvere da 500 g produce 13,8 L di terreno.

Preparazione dei campioni

Preparare il campione secondo lo standard applicabile al prodotto in questione.

Inoculazione e lettura delle piastre

1. **Metodo di inclusione in piastra:** Trasferire 1 ml di campione e/o le sue diluizioni decimali in una piastra petri vuota. Versare il terreno fuso, raffreddato a 44–47°C, sul campione e omogeneizzare agitando. Lasciare solidificare su una superficie fredda.
2. **Metodo di inoculazione superficiale:** Distribuire 0,1 ml di campione e/o le sue diluizioni decimali su una piastra petri. Se è necessario stimare numeri ridotti, distribuire 1 ml di campione su tre piastre petri da 90 mm (~0,33 ml/piastra petri) o su una piastra petri da 140 mm.
3. Per entrambi i metodi, incubare le piastre rivolte verso il basso a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 3 hr.
4. *B. cereus* produce colonie rosse circondate da un alone opaco o senza alone in alcuni casi rari. L'aspetto dei ceppi appartenenti al gruppo *B. cereus* può essere variabile (aspetto rizoidale, colonie ruvide, diametro variabile, ecc.).
5. Fare riferimento alla norma EN ISO 7218 per l'inoculazione, la conta delle colonie, il calcolo e l'espressione dei risultati.
6. Al termine della fase di incubazione, le piastre possono essere conservate a 2–8°C per 72 hr per l'inoculazione superficiale.


Sezione 8 Conferma dei risultati positivi

Non applicabile.

Sezione 9 Conferma di altri metodi

Non applicabile.

Sezione 10 Performance del test e validazioni

Certificazione	Ambito di applicazione	Protocollo di validazione	Protocollo di riferimento	Riferimento al certificato
NF VALIDATION	Tutti i prodotti alimentari, mangimi, campioni ambientali	EN ISO 16140-2	ISO 7932	 <p>BRD: 07/26–03/19 METODI ANALITICI ALTERNATIVI PER IL SETTORE AGROALIMENTARE Certificato mediante certificazione AFNOR</p> <p>http://nf-validation.afnor.org/en</p>

Sezione 11 Riferimenti

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 °C.

Sezione 12 Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Agosto 2020	10000127897 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Modifica importante - Nuovo design del documento - Modifica al numero di documento – versione precedente RAPID_B.cereus_V2_28 Novembre 2018
Ottobre 2021	10000127897 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Aggiunta di mangimi e campioni ambientali al campo di applicazione e nello scopo della validazione - Chiarimento sul protocollo di inoculo

Per ulteriori informazioni sulla nostra gamma completa di terreni cromogenici RAPID, visitare il sito www.bio-rad.com/rapidmedia

Bio-Rad è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23
Belgium 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500
Czech Republic 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23
Japan 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670
The Netherlands 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23
Poland 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23 **Russian Federation** 00 800 00 24 67 23
Singapore 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0121



RAPID'*B.cereus* Agar

Guia do usuário

Meios cromogênicos para a detecção e enumeração do grupo *Bacillus cereus* (células vegetativas e esporos) em produtos para consumo humano, animal e amostras ambientais a 30°C em 24 hr sem confirmação

N° do catálogo 12007304, Meios de cultura preparados, 90 mm x 20 placas

N° do catálogo 12007305, Desidratado, 500 g

N° do catálogo 12007306, Supplement 1, líquido, 10 ampolas

N° do catálogo 12007307, Supplement 2, congelar seco, 10 ampolas



BIO-RAD

Índice

Seção 1	Introdução	1
Seção 2	RAPID' <i>B.cereus</i> Princípio	1
Seção 3	Fórmula Teórica	1
Seção 4	Prazo de validade e armazenamento	1
Seção 5	Materiais necessários, mas não fornecidos	2
	Equipamento	2
	Suprimentos	2
Seção 6	Precauções, limitações de uso e controle de qualidade	2
Seção 7	Protocolo	3
	Preparação do Meio Desidratado.....	3
	Preparação da amostra	3
	Inoculação e Leitura de Meios de Cultura.....	4
Seção 8	Confirmação de Resultados Positivos	4
Seção 9	Confirmação de outros métodos	4
Seção 10	Desempenho e validação do teste	5
Seção 11	Referências	5
Seção 12	Histórico de Revisão	5

Seção 1 Introdução

O grupo de organismos *Bacillus cereus* é amplamente distribuído no ambiente e eliminá-lo pode representar um desafio na produção de alimentos, principalmente em produtos prontos e para reaquecer. Diferentes características bacteriológicas, incluindo características bioquímicas, são compartilhadas por várias espécies dentro do gênero *Bacillus*, tornando difícil a diferenciação destes organismos. Estes organismos formadores de esporos têm sido tradicionalmente controlados pela aplicação de calor. Entretanto, a crescente demanda por alimentos frescos (textura, cor e aroma) e o desejo de produzir alimentos com ingredientes funcionais tem aumentado o interesse no desenvolvimento de operações de baixo aquecimento para inativar esporos ou para evitar sua germinação e crescimento.

Seção 2 RAPID'*B.cereus* Princípio

RAPID'*B.cereus* Agar é baseado em uma reação cromogênica e na atividade de fosfolipase. Colônias de *B. cereus* típicas desenvolvem uma cor vermelha característica, geralmente rodeada por uma auréola opaca. Alguns raros *B. cereus* não expressam a atividade da fosfolipase e não são capazes de produzir a auréola opaca. A mistura seletiva do meio evita o crescimento da flora interferente e possibilita a análise de uma ampla gama de alimentos. A sensibilidade do meio foi especialmente otimizada para permitir o crescimento de todas as cepas patogênicas de *Bacillus cereus*, mesmo aquelas difíceis de cultivar, como *B. cytotoxicus*. A interpretação de placas RAPID'*B.cereus* Agar é posteriormente facilitada pelo alto nível de contraste entre as cores das colônias e do ágar.

Seção 3 Fórmula Teórica

Peptonas	13 g
Fosfolípidos	5 g
Agentes seletivos	1,1 g
Mistura cromogênica	0,01 g
Sal	10,5 g
Ágar	15 g
Água destilada	qsp 1.000 ml

pH final a 25°C = 7,0 ± 0,2

Seção 4 Prazo de validade e armazenamento

- Ágar desidratado: 15–25°C em uma embalagem cuidadosamente vedada, em um ambiente seco e arejado
- Suplemento: 2–8°C em local escuro

Seção 5 Materiais necessários, mas não fornecidos

- Placas de ágar pré-distribuídas: 2–8°C em local escuro
- Meio de cultura preparado a partir do ágar desidratado: 1 mês a 2–8°C em uma embalagem cuidadosamente vedada, em um ambiente seco e arejado

Seção 5 Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Placa de aquecimento
- Escala, sensibilidade de 0,1 g
- Misturador/homogeneizador
- Incubadora ou sala de incubação controlada termostaticamente, com precisão de $\pm 1^\circ\text{C}$
- Banho-maria

Suprimentos

- Diluente para enumeração: Água peptonada tamponada (BPW) (por ex., nº do catálogo 3554179, 6 frascos de 225 ml; 3564684, desidratado, 500 g; 3555790, 2 sacos de 5 L; 3555795, 4 sacos de 3 L); sal de triptona (por ex., nº do catálogo 3555754, 25 tubos de 9 ml; 3555756, 6 frascos de 90 ml; nº do catálogo 3564544, desidratado, 500 g; nº do catálogo 3555796, 4 sacos de 3 L)
- Inoculação de loops
- Placas de Petri estéreis
- Pipetas estéreis
- Sacos de pesagem estéreis

Seção 6 Precauções, limitações de uso e controle de qualidade

Precauções

- Respeite as boas práticas de laboratório (EN ISO 7218). É necessário o uso de proteção adequada, como luvas e jalecos, ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas, como a *Bacillus*
- O meio que entrou em contato com amostras de alimentos deve ser considerado contaminado e descartado de acordo com as regras e regulamentos locais
- O tempo entre o final do preparo da solução de reserva (ou diluição 10^{-1} no caso de um produto sólido) e quando as diluições entram em contato com o meio de cultura não deve exceder 45 min

Seção 7 Protocolo

- As placas devem ser pré-secadas antes do uso para garantir que não contenham excesso de umidade (EN ISO 7218). Por exemplo, as placas podem ser secas colocando-as com a superfície de ágar voltada para cima em uma cabine de segurança de fluxo laminar (à temperatura ambiente) por 20 a 30 minutos.

Limitações de uso

- Uma pequena porcentagem das cepas de *Bacillus cereus* não expressa a atividade da fosfolipase (colônias vermelhas sem auréola opaca), especialmente quando se usa o protocolo de incorporação. Essas colônias vermelhas devem ser consideradas típicas

Controle de qualidade

- Todos os produtos fabricados e comercializados pela Bio-Rad estão sujeitos aos procedimentos de garantia de qualidade em todas as etapas, desde a recepção da matéria-prima até a comercialização do produto final. Cada lote de produto acabado passa por um controle de qualidade de acordo com a EN ISO 11133 e é comercializado apenas quando satisfaz os critérios de aceitabilidade. A documentação relativa à produção e ao controle de qualidade de cada lote é mantida arquivada
- Para informações de segurança do produto SDS e certificado de análise, visite www.bio-rad.com

Seção 7 Protocolo

Preparação do Meio Desidratado

1. Agite sempre a garrafa antes de usar.
2. Dissolva 36,3 g de pó em 950 ml de água destilada, espere 5 min e, então, misture até obter uma suspensão homogênea.
3. Aqueça delicadamente, agitando com frequência, e deixe ferver.
4. Distribuir 475 ml em dois frascos.
5. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 min.
6. Resfrie o meio até 44–47°C.
7. Adicionar assepticamente 1 ampola de Supplement 1.
8. Adicionar assepticamente 1 ampola de Supplement 2 que foi reconstituído em 6 ml de água esterilizada.
9. Misture bem e despeje em placas de Petri ou mantenha em frascos para usar o método de inoculação por placa.
10. O meio completo preparado com suplementos pode ser mantido a 44–47°C por até 8 hr antes do uso.
11. Um frasco de 500 g de pó produz 13,8 L de meio.

Preparação da amostra

Prepare a amostra de acordo com o padrão aplicável ao respectivo produto.

Inoculação e Leitura de Meios de Cultura

1. **Método de placa de incorporação:** Transfira 1 ml de amostra e/ou suas diluições decimais em uma placa de Petri vazia. Coloque o meio derretido, resfriado a 44–47°C, sobre a amostra e uniformize, girando. Deixe solidificar em uma superfície fria.
2. **Método de inoculação de superfície:** Distribua 0,1 ml de amostra e/ou suas diluições decimais em uma placa de Petri. Se for necessário estimar números pequenos, espalhar 1 ml de amostra em três placas de 90 mm (~0,33 ml/placa) ou em um placa de 140 mm.
3. Para ambos os métodos, incubar placas viradas para baixo a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 hr.
4. *B. cereus* produz colônias vermelhas com uma auréola opaca ao redor, ou sem auréola, em alguns casos raros. O aspecto das cepas pertencentes ao grupo *B. cereus* pode ser variável (aspecto rizoidal, colônias rudimentares, diâmetro variável, etc.).
5. Consulte a norma EN ISO 7218 para inoculação, contagem de colônias, cálculo e expressão de resultados.
6. Após o passo de incubação, as placas podem ser armazenadas a 2–8°C por 72 hr para inoculação de superfície.


Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos

Não se aplica.

Seção 9 Confirmação de outros métodos

Não se aplica.

Seção 10 Desempenho e validação do teste

Certificação	Escopo	Protocolo de Validação	Protocolo de Referência	Referência de Certificado
NF VALIDATION	Todos os produtos alimentares, produtos para consumo animal e amostras ambientais	EN ISO 16140-2	ISO 7932	 <p>BRD: 07/26–03/19 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA O AGRONEGÓCIO Certificado pela certificação AFNOR http://nf-validation.afnor.org/en</p>

Seção 11 Referências

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 °C.

Seção 12 Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Agosto de 2020	10000127897 Ver A	- Alteração importante - Novo design de documento - Alteração do número do documento - versão anterior RAPID_B.cereus_V2_28 novembro 2018
Outubro 2021	10000127897 Ver B	- Adição de produtos para consumo animal e amostras ambientais ao uso previsto e escopo de validação - Esclarecimento do protocolo de inoculação

Visite www.bio-rad.com/rapidmedia para obter mais informações sobre a nossa completa linha de meios cromogênicos RAPID

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23
Belgium 00 800 00 24 67 23 Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500
Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23 Finland 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23
Japan 81 3 6361 7000 Korea 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670
The Netherlands 00 800 00 24 67 23 New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23
Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23 Russian Federation 00 800 00 24 67 23
Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

Sig 0121



RAPID'*B.cereus* Agar

Manual del usuario

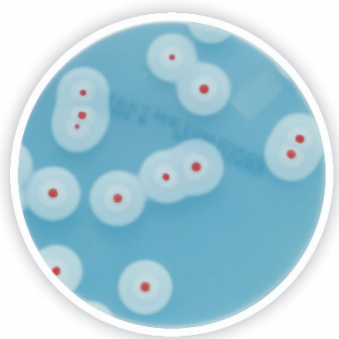
Medio cromogénico para la detección y el recuento del grupo *Bacillus cereus* (células vegetativas y esporas) en productos alimenticios para consumo humano, alimentos para animales y muestras ambientales a 30°C en 24 hr sin confirmación

Referencia #12007304, placas preparadas, placas de 90 mm x 20

Referencia #12007305, deshidratado, 500 g

Referencia #12007306, Supplement 1, líquido, 10 viales

Referencia #12007307, Supplement 2, liofilizado, 10 viales



BIO-RAD

Tabla de Contenidos

Apartado 1	Introducción	1
Apartado 2	Principio de RAPID' <i>B.cereus</i>	1
Apartado 3	Fórmula teórica	1
Apartado 4	Vida útil y conservación	1
Apartado 5	Materiales necesarios, no suministrados	2
	Equipamiento.....	2
	Fungibles.....	2
Apartado 6	Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad	2
Apartado 7	Protocolo	3
	Preparación del medio deshidratado.....	3
	Preparación de las muestras.....	3
	Inoculación y lectura de la placa	4
Apartado 8	Confirmación de los resultados positivos	4
Apartado 9	Confirmación de otros métodos	4
Apartado 10	Aplicaciones del ensayo y validaciones	5
Apartado 11	Referencias	5
Apartado 12	Historial de revisiones	5

Apartado 1 Introducción

El grupo de organismos *Bacillus cereus* está ampliamente diseminado en el medio ambiente y su eliminación puede representar un desafío en el campo de la producción de alimentos, en particular con productos listos para el consumo y productos listos para calentar. Varias especies del género *Bacillus* comparten diferentes características bacteriológicas, incluidas las bioquímicas, dificultando la diferenciación de estos organismos. Estos organismos generadores de esporas han sido tradicionalmente controlados mediante la aplicación de calor. No obstante, la creciente demanda de alimentos de calidad similar a la de los alimentos frescos (textura, color y aroma) y el deseo de producir alimentos con ingredientes funcionales han aumentado el interés en el desarrollo de operaciones a baja temperatura para inactivar las esporas o impedir su germinación y crecimiento.

Apartado 2 Principio de RAPID'*B.cereus*

RAPID'*B.cereus* Agar se basa en una reacción cromogénica y en la actividad de la fosfolipasa. Las colonias de *B. cereus* típicas desarrollan un color rojo característico generalmente rodeado de un halo opaco. Algunas colonias poco comunes de *B. cereus* no manifiestan la actividad de la fosfolipasa y no son capaces de producir el halo opaco. La mezcla selectiva del medio impide el crecimiento de la flora interferente y permite el análisis de una amplia gama de alimentos. La sensibilidad del medio se ha optimizado específicamente para permitir el crecimiento de todas las cepas patógenas de *Bacillus cereus*, incluso las que son difíciles de cultivar, como el *B. cytotoxicus*. La interpretación de las placas de RAPID'*B.cereus* Agar resulta más fácil debido al alto nivel de contraste entre el color de las colonias y el agar.

Apartado 3 Fórmula teórica

Peptonas	13 g
Fosfolípidos	5 g
Agentes selectivos	1,1 g
Mezcla cromogénica	0,01 g
Sal	10,5 g
Agar	15 g
Agua destilada	c.s.p. 1.000 ml

pH final a 25°C = 7,0 ± 0,2

Apartado 4 Vida útil y conservación

- Agar deshidratado: 15–25°C en un paquete cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro
- Suplementos: 2–8°C en un lugar oscuro

Apartado 5 Materiales necesarios, no suministrados

- Placas de agar preparadas: 2–8°C en un lugar oscuro
- Placa preparada desde agar deshidratado: 1 mes a 2–8°C en un paquete cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro

Apartado 5 Materiales necesarios, no suministrados

Equipamiento

- Todo el instrumental habitual en laboratorio
- Placa calefactada
- Balanza, sensibilidad de 0,1 g
- Agitador/homogeneizador
- Incubador o sala de incubación controlada termostáticamente , con una precisión de $\pm 1^\circ\text{C}$
- Baño termostático

Fungibles

- Diluyente para recuento: Buffered Peptone Water (APT) (p. ej. referencia #3554179, 225 ml x 6 frascos; 3564684, deshidratado, 500 g; 3555790, 5 L x 2 bolsas; 3555795, 3 L x 4 bolsas); Sal Triptona (p. ej. referencia #3555754, 9 ml x 25 tubos; 3555756, 90 ml x 6 frascos; referencia #3564544, deshidratado, 500 g; referencia #3555796, 3 L x 4 bolsas)
- Asas de siembra
- Placas de Petri estériles
- Pipetas estériles
- Bolsas estériles para pesada

Apartado 6 Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad

Precauciones

- Deben respetarse las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 7218). Se debe usar una protección adecuada, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaja con bacterias vivas potencialmente infecciosas como *Bacillus*
- Los medios que han estado en contacto con muestras de alimentos deben considerarse potencialmente contaminados y deben eliminarse de conformidad con las normas y reglamentos locales
- El tiempo que transcurre entre la finalización de la preparación de la solución de caldo (o la dilución 10^{-1} en el caso de un producto sólido) y el momento en que las diluciones entran en contacto con el medio de cultivo no debe superar los 45 min.

Apartado 7 Protocolo

- Las placas deben secarse previamente a su uso para asegurar que no tengan exceso de humedad (EN ISO 7218). Por ejemplo, las placas pueden secarse colocándolas con la superficie de agar hacia arriba en una cabina de seguridad de flujo laminar (a temperatura ambiente) durante 20 - 30 minutos.

Limitaciones de uso

- Un pequeño porcentaje de cepas de *Bacillus cereus* no manifiesta actividad de la fosfolipasa (colonias rojas sin halo opaco), especialmente cuando se utiliza el protocolo de vertido en placa o siembra en masa. Estas colonias rojas deben considerarse típicas

Control de calidad

- Todos los productos fabricados y comercializados por Bio-Rad están sujetos a un protocolo de garantía de calidad en todas las etapas, desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización de los productos acabados. Cada lote de producto acabado se somete a un control de calidad según la norma EN ISO 11133 y su comercialización está condicionada a que cumpla los criterios de aceptabilidad. Asimismo, se mantiene un registro de toda la documentación relativa a la producción y el control de calidad de cada lote
- Para información de seguridad del producto SDS y del certificado de análisis, visite www.bio-rad.com

Apartado 7 Protocolo

Preparación del medio deshidratado

1. Agitar siempre el frasco antes de usar.
2. Disuelva 36,3 g de polvo en 950 ml de agua destilada, espere 5 min. y mezcle hasta obtener una suspensión homogénea.
3. Caliente suavemente, agitando frecuentemente, y luego lleve a ebullición.
4. Dispense 475 ml en dos frascos.
5. Esterilice en autoclave a 121 °C durante 15 min.
6. Enfríe el medio a 44–47°C.
7. Asépticamente, agregue 1 vial del Supplement 1.
8. Asépticamente, agregue 1 vial del Supplement 2 habiendo sido reconstituido en 6 ml de agua estéril.
9. Mezcle bien y viértalo en placas de Petri o consérvelo en frascos para su utilización con el método de inoculación por vertido en placa o siembra en masa.
10. El medio completo preparado con suplementos puede conservarse a 44–47°C hasta 8 hr antes de su uso.
11. Un frasco de 500 g de polvo permite obtener 13,8 L de medio.

Preparación de las muestras

Prepare la muestra según la norma estandarizada aplicable al producto en cuestión

Inoculación y lectura de la placa

1. Método de vertido en placa o siembra en masa: Dispense 1 ml de muestra y/o de sus diluciones decimales en una placa de Petri vacía. Vierta el medio fundido, enfriado a 44–47 °C, sobre la muestra y homogeneice con movimientos circulares. Deje solidificar en una superficie nivelada.
2. Método de siembra en superficie: Distribuya 0,1 ml de la muestra y/o de sus diluciones decimales en una placa de Petri. Si es necesario estimar bajas concentraciones, extienda 1 ml de muestra sobre tres placas de 90 mm (~0,33 ml/placa) o sobre una placa de 140 mm.
3. Para ambos métodos, incube las placas invertidas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 hr.
4. El grupo de organismos *B. cereus* produce colonias rojas rodeadas de un halo opaco o sin halo (casos poco frecuentes). El aspecto de las cepas pertenecientes al grupo *B. cereus* puede ser variable (aspecto rizoidal, colonias desiguales, diámetro variable, etc.).
5. Consulte en la norma EN ISO 7218 la inoculación, el recuento de colonias, el cálculo y la expresión de los resultados.
6. Tras la etapa de incubación, las placas pueden almacenarse a 2-8°C durante 72 hr para la siembra en superficie.


Apartado 8 Confirmación de los resultados positivos

No aplicable.

Apartado 9 Confirmación de otros métodos

No aplicable.

Apartado 10 Aplicaciones del ensayo y validaciones

Certificación	Alcance	Protocolo de validación	Protocolo de referencia	Referencia de certificado
NF VALIDATION	Todos los productos alimentarios, alimentos para animales, muestras ambientales	EN ISO 16140-2	ISO 7932	 BRD: 07/26-03/19 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA AGROINDUSTRIA Certificado mediante certificación AFNOR http://nf-validation.afnor.org/en

Apartado 11 Referencias

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 °C.

Apartado 12 Historial de revisiones

Fecha de publicación	Número de documento	Cambio
Agosto 2020	10000127897 Ver A	- Cambio significativo - Nuevo diseño del documento - Cambio en el número de documento - versión anterior RAPID' <i>B.cereus</i> _V2_28 noviembre de 2018
Octubre 2021	10000127897 Ver B	- Inclusión de muestras ambientales y alimentos para animales al uso previsto y al alcance de la validación - Clarificación del protocolo de inoculación

Visite www.bio-rad.com/rapidmedia para más información sobre nuestra gama completa de medios cromogénicos RAPID

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23
Belgium 00 800 00 24 67 23 Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500
Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23 Finland 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23
Japan 81 3 6361 7000 Korea 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670
The Netherlands 00 800 00 24 67 23 New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23
Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23 Russian Federation 00 800 00 24 67 23
Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 6511 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

Sig 0121

