

**LEGIONELLA BCYE AGAR BASE**

Terreno di coltura in flacone

Legionella Agar
colonie di *Legionella pneumophila* e di flora**DESTINAZIONE D'USO**

Terreno di base da aggiungere con supplemento di crescita e con i supplementi selettivi per l'isolamento ed il conteggio di *Legionella* spp. da campioni ambientali e di origine clinica e per la prova di conferma delle colonie.

FORMULA TIPICA DEL TERRENO PRONTO IN FLACONE ***LEGIONELLA BCYE AGAR BASE**

Carbone attivo	2,0 g
Estratto di lievito	10,0 g
Agar	13,0 g
Acqua purificata	1000 mL

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

ARRICCHIMENTI E SUPPLEMENTI SELETTIVI**LEGIONELLA BCYE GROWTH SUPPLEMENT****Contenuto del flacone** (per 500 mL)

Tampone ACES /Potassio idrossido	6,4 g
Pirofosfato ferrico	125 mg
L-Cisteina HCl	200 mg
Acido alfa-chetoglutarico	0,5 g

LEGIONELLA BCYE GROWTH SUPPLEMENT W/O CYSTEINE**Contenuto del flacone** (per 500 mL)

Tampone ACES /Potassio idrossido	6,4 g
Pirofosfato ferrico	125 mg
Acido alfa-chetoglutarico	0,5 g

LEGIONELLA GVPC SELECTIVE SUPPLEMENT**Contenuto del flacone** (per 500 mL)

Glicina	1,5 g
Vancomicina	0,5 mg
Polimixina B	40.000 UI
Cicloeximide	40 mg

LEGIONELLA AB SELECTIVE SUPPLEMENT**Contenuto del flacone** (per 500 mL)

Cefazolina	4,5 mg
Polimixina B	40000 UI
Pimaricina (natamicina)	35 mg

LEGIONELLA MWY SELECTIVE SUPPLEMENT

(con natamicina)

Contenuto del flacone (per 500 mL)

Glicina	1,5 g
Vancomicina	0,5 mg
Polimixina B	3,2 mg
Natamicina	100 mg
Bromotimolo blu	5,0 mg
Bromocresolo porpora	5,0 mg

LEGIONELLA MWY SELECTIVE SUPPLEMENT (ISO)

(con anisomicina)

Contenuto del flacone (per 500 mL)

Glicina	1,5 g
Polimixina B	25.000 UI
Vancomicina HCl	0,5 mg
Anisomicina	40 mg
Blu bromo timolo	5 mg
Porpora bromo cresolo	5 mg

LEGIONELLA BMPA SELECTIVE SUPPLEMENT**Contenuto del flacone** (per 500 mL)

Cefamandolo	2,0 mg
Polimixina B	5,0 mg
Natamicina	100 mg

DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Le Legionelle sono bacilli Gram-negativi, aerobi obbligati non fermentanti, mobili per uno o più flagelli sia laterali sia polari, generalmente delle dimensioni di 1,5 - 5 µm per 0,3 - 0,9 µm, ma che possono presentare anche forme filamentose.

Sono microrganismi difficili da coltivare e richiedono un terreno di crescita contenente L-cisteina, sali di ferro, carbone attivo ed estratto di lievito; questi due ultimi composti sono inclusi nel terreno di base Legionella BCYE Agar Base, la L-



cisteina ed i sali di ferro sono inclusi nel supplemento di crescita. Il terreno con il supplemento di crescita può essere reso selettivo mediante l'aggiunta di antibiotici ed antimicotici, forniti sotto forma di supplementi selettivi liofilizzati.

La coltura è la tecnica di riferimento per la diagnosi di laboratorio, possiede specificità del 100 % ed una sensibilità variabile con le caratteristiche del campione studiato e con le procedure adottate: infatti la carica batterica è spesso minima, l'eventuale flora batterica contaminante può mascherare la presenza di *Legionella* e la selettività dei terreni può ostacolare la crescita di alcune specie.

Sono consigliabili per un'esecuzione ottimale dell'analisi sia l'uso di terreni selettivi che non selettivi, il pretrattamento per campioni contaminati ed una minima diluizione che serve ad allontanare le sostanze inibenti la crescita. Per quanto riguarda la diluizione va ricordato che la soluzione fisiologica può inibire lo sviluppo di *Legionella*.

Per la preparazione dei terreni indicati dalla norma ISO 11731 per il conteggio di *Legionella* spp. nelle acque, al terreno di base, oltre al supplemento di crescita, si richiede l'aggiunta dei supplementi selettivi GVPC, AB, MWY (con anisomicina). La scelta della metodologia e dei terreni da usare per il conteggio di *Legionella* nelle acque è legata a diversi fattori, quali l'origine e le caratteristiche del campione, il livello di sensibilità richiesta, la carica di *Legionella* e di contaminanti attesa. Per le matrici decisionali si rimanda alla norma ISO citata.

PREPARAZIONE

Scaldare il terreno in flacone in bagnomaria a 100 °C portando ad ebollizione, agitando di tanto in tanto. Raffreddare a 47-50 °C ed aggiungere il supplemento di crescita e, se richiesto, uno dei supplementi selettivi qui descritti. Mescolare bene e trasferire in piastre di Petri sterili.

Terreno selettivo BCYE - GVPC

Addizionare al terreno di base sciolto in bagnomaria come sopra descritto il supplemento Legionella BCYE α -Growth Supplement (cod. 423210) ed il supplemento Legionella GVPC Selective Supplement (cod. 423215) ricostituiti secondo le indicazioni riportate nelle confezioni e nella tabella che segue.

Terreno selettivo BCYE - AB

Addizionare al terreno di base sciolto in bagnomaria come sopra descritto il supplemento Legionella BCYE α -Growth Supplement (cod. 423210) ed il supplemento Legionella AB Selective Supplement (cod. 423225), ricostituiti secondo le indicazioni riportate nelle confezioni e nella tabella che segue.

Terreno selettivo BCYE - MWY (con anisomicina)

Addizionare al terreno di base sciolto in bagnomaria come sopra descritto il supplemento Legionella BCYE α -Growth Supplement (cod. 423210) ed il supplemento Legionella MWY Selective Supplement (ISO) (cod. 423220), ricostituiti secondo le indicazioni riportate nelle confezioni e nella tabella che segue.

Terreno selettivo BCYE - MWY (con natamicina)

Addizionare al terreno di base sciolto in bagnomaria come sopra descritto il supplemento Legionella BCYE α -Growth Supplement (cod. 423210) ed il supplemento di Legionella MWY Selective Supplement (cod. 421SLG2-A), ricostituiti secondo le indicazioni riportate nelle confezioni e nella tabella che segue.

Terreno selettivo BCYE - BMPA

Addizionare al terreno di base sciolto in bagnomaria come sopra descritto il supplemento Legionella BCYE α -Growth Supplement (cod. 423210) ed il supplemento Legionella BMPA Selective Supplement (cod. 421SLG3-A), ricostituiti secondo le indicazioni riportate nelle confezioni e nella tabella che segue.

Terreno non selettivo completo di cisteina: BCYE w/L-cysteine

Addizionare al terreno di base sciolto in bagnomaria come sopra descritto il supplemento Legionella BCYE α -Growth Supplement (cod. 423210) ricostituito secondo le indicazioni riportate nelle confezioni e nella tabella che segue.

Terreno non selettivo privo di cisteina: BCYE w/o L-cysteine

Addizionare al terreno di base sciolto in bagnomaria come sopra descritto il supplemento Legionella BCYE α -Growth Supplement w/o Cysteine (cod. 423212) ricostituito secondo le indicazioni riportate nelle confezioni e nella tabella che segue.

Supplemento	codice	caratteristiche liofilizzato e soluzione	mL per ricostituzione	mL per flacone da 90 mL	mL per flacone da 180 mL
Legionella BCYE α -Growth Supplement	423210		50	9,0	18
Aspetto del liofilizzato		pastiglia di medie dimensioni, rosa			
Aspetto della soluzione		giallo chiaro, opalescente			
Legionella BCYE α -Growth Supplement w/o Cysteine	423212		50	9,0	18
Aspetto del liofilizzato		pastiglia di medie dimensioni, rosa			
Aspetto della soluzione		giallo chiaro, opalescente			



Legionella GVPC Selective Supplement	423215	10	1,8	3,6
Aspetto del liofilizzato	pastiglia alta, bianca			
Aspetto della soluzione	incolore, limpida			
Legionella AB Selective Supplement	423225	5	0,9	1,8
Aspetto del liofilizzato	pastiglia alta, bianca			
Aspetto della soluzione	biancastra, torbida			
Legionella MWY Selective Supplement (ISO)	423220	10	1,8	3,6
Aspetto del liofilizzato	pastiglia alta, bluastrea			
Aspetto della soluzione	blu, torbida			
Legionella MWY Selective Supplement	42ISLG2-A	20	3,6	7,2
Aspetto del liofilizzato	pastiglia alta, bluastrea			
Aspetto della soluzione	blu, torbida			

CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in polvere fine granulometria, nerastra.
Aspetto dei terreni descritti sopra in soluzione ed in piastra nero, opaco.
pH finale a 25°C dei terreni descritti sopra 6,9 ± 0,1

MATERIALI FORNITI

Flaconi con 90 mL o 180 mL di terreno di coltura Legionella BCYE Agar Base pronto per essere sciolto in bagnomaria, supplementi selettivi ed arricchimenti in forma liofilizzata.

MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, piastre di Petri sterili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

CAMPIONI

Legionella può essere ricercata nel tessuto polmonare, nel materiale proveniente da biopsia polmonare, nelle secrezioni respiratorie (espettorato, broncolavaggio alveolare, aspirato bronchiale, ecc.) ed in diversi siti extrapolmonari come sangue, midollo osseo e valvole cardiache. Le secrezioni respiratorie sono considerate il campione di prima scelta. Trasferire il campione il più presto possibile in laboratorio; utilizzare un terreno di trasporto se il campione non può essere processato immediatamente. Prima della semina si consiglia una minima diluizione dei campioni per allontanare sostanze inibenti la crescita. Operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione in Laboratorio dei campioni.

I campioni ambientali che possono essere potenziali sorgenti di infezione e sui quali ricercare legionella sono: acqua da rubinetti, docce, vasche idromassaggio e serbatoi di accumulo, acqua di pozzo, termale, di piscine e fontane, acqua di condensa degli impianti di condizionamento e di umidificazione, acqua proveniente da sgocciolamento dalle torri di raffreddamento, sedimento da serbatoi di accumulo dell'acqua, di incrostazioni da tubi e serbatoi ed il prelievo con tampone sterile sulla superficie del filtro rompi-getto del rubinetto o del bulbo della doccia.

Per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni non di origine clinica fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili (es. ISO 19458, ISO 11731).

PROCEDURA DELL'ANALISI**Campioni clinici**

1. Utilizzare il terreno di coltura in piastra portato preventivamente a temperatura ambiente.
2. Se già non sono stati diluiti al momento del prelievo, è opportuno diluire l'escreato ed il tessuto polmonare con 0,5-1 ml di acqua distillata sterile oppure in brodo preferibilmente non contenente NaCl. Se l'espettorato fosse molto denso, deve essere risospeso con 0,2-1 ml di fluidificante a base di ditiotreitolo.
3. Centrifugare i campioni, diluiti e non, per concentrare le legionelle in essi eventualmente contenute (3000±100 g per 15 min). Allo stesso modo anche le emocolture e l'omogenato di tessuto polmonare o altri campioni organici sottoposti ad analisi possono essere concentrati per centrifugazione.
4. I campioni dovranno essere in parte trattati a 50°C per 30 min per eliminare interferenza nella moltiplicazione di *Legionella* causata da altra flora microbica eventualmente presente. Oppure, in alternativa, potranno essere trattati diluendoli 1:10 con una soluzione tamponata di HCl-KCl a pH 2,2, mantenendoli a temperatura ambiente per 5 min. Inoculare 0,2 ml dei campioni trattati e non trattati distribuendo il campione con una spatola sterile su 2 o più piastre del terreno non selettivo (BCYE w/L-cysteine) e due o più piastre di terreno selettivo (BCYE-GVPC o BCYE-MWY). Maggiore è il numero di piastre inoculate più alta sarà la probabilità di recuperare *Legionella* dal campione.
5. Incubare a 36 ± 2°C in aerobiosi, in ambiente umido, con 2,5% di CO₂. Esaminare dopo 2 e 5 giorni ed eliminare una piastra come negativa solo dopo almeno 10 giorni di incubazione. Le colonie sono normalmente visibili microscopicamente dopo 2 giorni e, macroscopicamente, dopo 3-5 giorni.



Campioni ambientali

Le procedure di lavoro descritte nella norma ISO 11731 sono diversificate in rapporto all'origine del campione, alle sue caratteristiche, agli scopi della ricerca ed in funzione delle concentrazioni attese del microrganismo target e della flora contaminante.

Schematicamente le diverse possibilità di trattamento e di semina dei campioni sono riassunte qui di seguito.

1. Per campioni con un elevato numero di Legionelle ed un basso numero di contaminanti: semina diretta del campione su una piastra di terreno non selettivo BCYE w/L-cysteine e su una piastra di terreno selettivo BCYE-AB.
2. Per campioni con un basso numero di Legionelle ed un basso numero di contaminanti: filtrazione su membrana e posizionamento del filtro non trattato su piastra di terreno non selettivo BCYE w/L-cysteine, posizionamento del/i filtro/i trattato/i con acidi su una o più piastre di terreno selettivo o altamente selettivo (BCYE-AB o BCYE-GVPC o BCYE-MWY); lavare la membrana non trattata e trattata con acidi o con calore e seminare da 0,1 a 0,5 ml su piastra di terreno non selettivo e su piastre di uno o più terreni selettivi ed altamente selettivi (BCYE+-AB o BCYE-GVPC o BCYE-MWY).
3. Per campioni con un elevato numero di contaminanti: seminare il campione non concentrato, concentrato e diluito 1:10; suddividere ciascun sottocampione in tre aliquote: una non trattata, una trattata con calore ed una trattata con acidi; seminare da 0,1 a 0,5 ml di ciascuna aliquota su piastra di terreno selettivo (BCYE-GVPC o BCYE-MWY).
4. Per campioni con un numero molto elevato di contaminanti: seminare il campione non concentrato e diluito 1:10 e 1:100 dopo un pre-trattamento con una combinazione di calore seguito dalla soluzione acida. Preparare le diluizioni con l'appropriato diluente dopo il trattamento acido. Dopo agitazione su vortex seminare da 0,1 a 0,5 ml di ciascuna aliquota su piastra di terreno selettivo (BCYE-GVPC o BCYE-MWY).

Lasciare assorbire bene l'inoculo quindi incubare le piastre capovolte in atmosfera umida a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 7-10 giorni, osservando le piastre ai giorni 2, 3, 4, 5 e quindi al termine del periodo di incubazione.

Gli elementi procedurali sopra riportati sono del tutto schematici. Per i dettagli delle tecniche di conteggio di *Legionella* nelle acque si rimanda alla norma ISO 11731 o ad altre linee guida applicabili.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie.

Le colonie di *Legionella*, in linea di massima, appaiono bianco-grigio, rotonde con bordi interi, lucenti, bombate di diametro da 1 a 4 mm. Generalmente e soprattutto nei primi 2 giorni di incubazione il bordo mostra una iridescenza rosa o blu-verde mentre il centro è grigio opalescente con un aspetto simile al vetro tagliato. Osservate sotto lampada UV (366 nm), alcune specie mostrano una autofluorescenza blu-bianca, altre una autofluorescenza rosso vivo. *L. pneumophila* e le legionelle comuni, normalmente non mostrano autofluorescenza. Con il prolungamento del tempo di incubazione, le colonie diventano più larghe, il centro assume un colore bianco crema e perdono gran parte della loro iridescenza. Una caratteristica comune alle colonie di *Legionella* è la difficoltà a prelevarle con l'ansa dalla superficie dell'agar.

Un primo criterio per differenziare le colonie di *Legionella* è costituito dalla loro incapacità a crescere, con rare eccezioni, su terreno privo di L-cisteina; può quindi essere utile il ritrapianto delle colonie coltivate su terreno non selettivo preparato con L-cisteina (BCYE w/L-cysteine) e su terreno non selettivo preparato senza L-cisteina (BCYE w/o L-cysteine). Le colonie che crescono su terreno con cisteina e non crescono su terreno senza cisteina possono essere presuntivamente riconosciute come *Legionella*.

Sulle colonie presunte *Legionella* eseguire una colorazione Gram fissando lo striscio su vetrino con metanolo e controcolorando a lungo con safranina (Gram Staining kit cat. n° 17PL805525). Le colonie che mostrano bastoncini Gram negativi e che non crescono su agar privo di cisteina, sono presuntivamente identificate come *Legionella*.

Le piastre con crescite caratteristiche e con colonie presuntivamente identificate come *Legionella*, devono essere sottoposte a prove di conferma con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato.

CONTROLLO QUALITÀ

Ciascun lotto dei prodotti qui descritti è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. E' comunque responsabilità 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.

La scelta dei ceppi di *Legionella* e microrganismi non target deve essere in funzione del terreno (selettivo o non selettivo) preparato.

LIMITI DEL METODO

- In microbiologia clinica, la diagnosi di Legionellosi deve basarsi su un approccio interdisciplinare che comprenda i risultati radiologici, i risultati colturali, la determinazione dell'antigene urinario. I terreni ed i supplementi qui descritti sono da intendersi come un ausilio alla diagnosi dell'infezione: l'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.
- Le procedure di trattamento dei campioni, di semina, di lettura ed interpretazione dei risultati sono complesse e per maggiori dettagli si rimanda alla letteratura citata sia per l'esame clinico che per la conta di *Legionella* nelle acque.



- Alcuni ceppi di *Legionella*, per le proprie caratteristiche metaboliche, possono non coltivare sui terreni qui descritti.

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in flacone qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente.
- Consultare le schede di sicurezza dei supplementi prima del loro impiego.
- Il terreno in flacone qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale. Esso deve essere usato in Laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni poiché le colture microbiche e le provette seminate sono da considerare come potenzialmente infettive.
- Il terreno in flacone qui descritto è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave ma, non essendo sottoposto a test di sterilità con metodo normato, non è etichettato come "sterile" e deve essere quindi inteso come prodotto a biocontaminazione controllata e nei limiti di specifiche definite.
- Prima dell'utilizzo verificare l'integrità del tappo a vite.
- Non utilizzare i flaconi oltre la data di scadenza. Non utilizzare i flaconi se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, colore alterato).
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire i flaconi del terreno di base ed i supplementi non utilizzati, le piastre inoculate con i campioni o con i ceppi microbici in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.

CONSERVAZIONE

Terreno pronto in flacone: conservare a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

Supplementi selettivi ed arricchimenti liofilizzati: conservare a 2-8°C. In queste condizioni i prodotti sono validi fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data.

BIBLIOGRAFIA

- http://www.legionellaonline.it/linee_guida.htm
- ISO 11731:2017 Water quality - Enumeration of *Legionella*.
- Mac Faddin, J.F. (1985) Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Ministero della Salute: Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi-
www.iss.it/binary/iss4/cont/C_17_pubblicazioni_2362.pdf. Data di pubblicazione: 13 maggio 2015

CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Legionella BCYE Agar Base	Terreno in flacone di vetro con tappo a vite.	5115822 5115824#	6 flaconi da 90 mL in scatola di cartone 6 flaconi da 180 mL in scatola di cartone
Legionella BCYE α Growth Supplement°	Supplemento liofilizzato	423210	4 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Legionella BCYE α Growth Supplement w/o Cysteine°	Supplemento liofilizzato	423212	4 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Legionella GVPC Selective Supplement°	Supplemento liofilizzato	423215	4 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Legionella AB Selective Supplement	Supplemento liofilizzato	423225	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Legionella MWY Selective Supplement (ISO)	Supplemento liofilizzato	423220	4 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Legionella MWY Selective Supplement **	Supplemento liofilizzato	42ISLG2-A	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Legionella BMPA Selective Supplement **	Supplemento liofilizzato	42ISLG3-A	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

*IVD con marcatura CE - CODICE CND: W0104010306

°IVD con marcatura CE - CODICE CND W0104010104; *** Produttore : Abteck (UK)

RDM: 1553303/R



Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, Milano, Italia.