

**ISTRUZIONI PER L'USO****LEGIONELLA AGAR (BCYE)****Piastre pronte all'uso**Legionella Agar (BCYE): colonie di *L. pneumophila* e di flora contaminante**1 - DESTINAZIONE D'USO**Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno non selettivo per l'isolamento ed il conteggio di *Legionella* spp. in campioni clinici e nelle acque.**2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA \***

Carbone attivo	2,0 g
Estratto di lievito	10,0 g
Agar	13,0 g
Tampone ACES /potassio idrossido	12,8 g
Acido alfa-chetoglutarico	1,0 g
Pirofosfato ferrico	250,0 mg
L-Cisteina HCl	400,0 mg
Acqua purificata	1000 mL

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

**3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO**

Le legionelle sono gammaproteobatteri mesofili, mobili, asaccarolitici, aerobi obbligati, nutrizionalmente esigenti, Gram-negativi, non sporigeni.<sup>1</sup> *Legionella pneumophila*, la specie più studiata, mostra pleomorfismo, dimostrando forme coccoidi, bacillari e/o filamentose lunghe, influenzate dalla temperatura, dall'ambiente di crescita e dal tipo di terreno.<sup>2</sup> Tutte specie di *Legionella* (con rare eccezioni) condividono la dipendenza da L-cisteina per la crescita, che è inoltre stimolata dalla presenza di composti del ferro.<sup>1</sup> Le legionelle crescono su diversi tipi di terreni artificiali complessi, tuttavia, il terreno che ha dimostrato le migliori prestazioni è stato il Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar contenente pirofosfato ferrico,  $\alpha$ -chetoglutarato e L-cisteina.<sup>2</sup>

La coltura è la tecnica di riferimento per la diagnosi di laboratorio: ha una specificità del 100% e una sensibilità variabile a seconda delle caratteristiche del campione, dell'esperienza e della competenza tecnica del personale di laboratorio, nonché dal tempo intercorrente tra raccolta del campione e la sua semina, dall'uso di terapie antimicrobiche in corso e dalla sovra-crescita di batteri contaminanti.<sup>2,3</sup>

Per una resa ottimale dell'isolamento di *Legionella* spp. da campioni clinici è consigliabile l'utilizzo di diversi tipi di terreni di coltura: una piastra con terreno non selettivo (BCYE) e due con terreno selettivo.<sup>1</sup>

La scelta del metodo utilizzato per il conteggio di *Legionella* spp. nelle acque è legata a diversi fattori, quali l'origine e le caratteristiche del campione, lo scopo dell'indagine, il livello di sensibilità richiesta, le cariche di *Legionella* e di contaminanti attese; una matrice decisionale per la scelta del metodo appropriato è descritta da ISO 11731.<sup>4</sup>

Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE) è stato sviluppato da Feeley *et al.*<sup>5</sup> e poi ulteriormente modificato da Pasculle *et al.*<sup>6</sup> con l'aggiunta del tampone ACES e da Edelstein<sup>7</sup> con l'introduzione di  $\alpha$ -chetoglutarato.

Legionella Agar (GVPC) è preparato secondo la formulazione raccomandata da ISO 11731.<sup>4</sup>

L'estratto di lievito è una fonte di azoto, carbonio e vitamine per la crescita microbica. Il carbone attivo rimuove il perossido di idrogeno e altri prodotti tossici. Il tampone ACES/KOH è utilizzato per la stabilizzazione del pH, l' $\alpha$ -chetoglutarato ed il pirofosfato ferrico stimolano la crescita di *Legionella*. La L-cisteina, è un amminoacido essenziale ed un'importante fonte di energia per la crescita di *Legionella* spp.

**4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO**

Aspetto del terreno in piastra	nero, opaco
pH finale a 20-25°C	6,9 $\pm$ 0,1

**5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Legionella Agar (BCYE) CND: W0104010405; EDMA:14.01.04.01; RDM: 1444151/R	Piastre pronte all'uso	549945	2 x 10 piastre $\varnothing$ 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

**6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI**

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, reattivi per il trattamento dei campioni, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione completa delle colonie.

**7 - CAMPIONI**

Legionella Selective Agar (GVPC) può essere seminato con diversi campioni clinici umani, compresi quelli del tratto respiratorio inferiore, come espettorato, liquido pleurico, aspirati bronchiali e fluido di lavaggio alveolare bronchiale (BAL); anche campioni di tessuto polmonare e biopsie sono appropriati per l'esame culturale.<sup>1,8</sup> Raccogliere i campioni prima della terapia antimicrobica, ove possibile. Trasferire il campione il prima possibile al laboratorio; utilizzare un terreno di trasporto se il campione non può essere processato immediatamente. I campioni non clinici includono diverse tipologie di acque: potabili, naturali, industriali, reflue e campioni correlati all'acqua (ad esempio biofilm, sedimenti, ecc.).<sup>4</sup> Consultare lo Standard ISO 11731 per i metodi di campionamento e le procedure di trattamento dei campioni. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni.

**8 - PROCEDURA DELL'ANALISI**

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno.

**Campioni clinici**<sup>1,8</sup>





Per una resa ottimale dell'isolamento di *Legionella* spp. da campioni clinici è consigliare attenersi alle seguenti regole:

- Diluire 1:10 in Tryptic Soy Broth o acqua distillata per ridurre l'inibizione da parte di fattori tissutali e sierici, nonché degli antibiotici. Se l'espettorato è molto denso, deve essere ri-sospeso con 0,2-1 mL di fluidificante a base di ditiotreitolo.
- Pretrattare il campione per ridurre la flora contaminante diluendo 1:10 con un tampone KCl-HCl a pH acido (2,2) e incubando a temperatura ambiente per 4 minuti. Un'alternativa all'acidificazione del campione è il riscaldamento a 50°C per 30 min.
- Utilizzare una varietà di terreni: una piastra con terreno non selettivo (BCYE) e due con terreni selettivi.

Inoculare circa 0,1 mL sul primo quadrante della piastra, e strisciare con un'ansa sugli altri quadranti per ottenere colonie ben isolate.

Incubare a 35-37°C in aerobiosi con umidificazione per 14 giorni. Una bassa concentrazione di CO<sub>2</sub> (2,5%) può aumentare la crescita di alcune delle specie più esigenti di *Legionella* (es. *L.sainthelensi* e *L.oakridgensis*). Questa bassa concentrazione di CO<sub>2</sub> non ha influenza sulla crescita di *L.pneumophila*, ma livelli di CO<sub>2</sub> superiori al 2,5% ne possono inibire la crescita.

#### Campioni di acque<sup>4</sup>

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 microorganismo 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 con L-cisteina<sup>^</sup> 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 con L-cisteina<sup>^</sup>, 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 ± 2°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<sup>4</sup> o ad altre linee guida applicabili.

<sup>^</sup> 549945 LEGIONELLA AGAR (BCYE); <sup>\*</sup>549947 LEGIONELLA AB SELECTIVE AGAR; <sup>\*\*</sup>549995 or 499995 LEGIONELLA SELECTIVE AGAR-GVPC <sup>\*\*\*</sup> 549948 LEGIONELLA SELECTIVE AGAR MWY-ISO

#### Conferma delle colonie

Un primo criterio per differenziare le colonie di *Legionella* è la loro incapacità di crescere, con rare eccezioni (*L.oakridgensis*, *L.jordanis* e *L.nagasakiensis*, *L.spiritis*),<sup>2,4,12</sup> su terreno privo di L-cisteina. In presenza di un'unica tipologia morfologica di colonie sospette sulle piastre del terreno di prima semina, selezionare 3 colonie e trapiantarle su piastre di *Legionella* Agar w/o Cysteine (REF 549943) e su piastre di *Legionella* Agar (BCYE) (REF 549945) completo di cisteina. Nel caso vi fossero sul terreno di prima semina più di una tipologia di colonie, trapiantare sui due terreni citati almeno 1 colonia per ciascuna tipologia osservata.<sup>4</sup> Assicurarsi di non asportare il terreno di coltura insieme alla colonia e seminare prima il terreno privo di cisteina e poi il terreno con cisteina. Incubare le piastre inoculate a 36 ± 2°C per 2-5 giorni.<sup>4</sup>

### 9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

#### Isolamento e conteggio

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

Le colonie di *Legionella* spp. appaiono sulle piastre dopo 2 giorni di incubazione. È molto raro che le colonie appaiano dopo 5 giorni di incubazione. Alcuni ceppi possono richiedere fino a 14 giorni di incubazione prima che compaia la crescita, tuttavia questo è un evento estremamente raro. È quindi ragionevole ispezionare le piastre nei giorni da 2 a 5 e poi di nuovo al giorno 14.<sup>1</sup> Nelle prime 24-36 ore di incubazione l'osservazione della piastra al microscopio con luce incidente che illumina la superficie dell'agar ad angolo acuto può aiutare nel riconoscimento delle colonie di *Legionella* e dei contaminanti.

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 smerigliato. Osservate sotto lampada UV (366 nm), alcune specie (*L.anisa*, *L.bozemanii*, *L.cherrii*, *L.dumoffii*, *L.gormanii*, *L.gratiana*, *L.parisiensis*, *L.steigerwaltii* and *L.tucsonensis*) mostrano una autofluorescenza blu-bianca, altre (*L.erythra* and *L.rubrilucens*) 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.

Per i dettagli del conteggio di *Legionella* spp. nelle acque consultare la norma ISO 11731.<sup>4</sup>

#### Conferma delle colonie

Dopo l'incubazione, considerare come *Legionella* spp. le colonie che, trapiantate sui due terreni sopra indicati, sviluppano crescita sul terreno con cisteina e non sviluppano crescita sul terreno senza cisteina.

L'identificazione presuntiva deve essere completata mediante colorazione di Gram, effettuata su colonie prelevate dal terreno contenente cisteina: le cellule di *Legionella* appaiono come bastoncini Gram-negativi con colorazione scarsa o debole, che possono essere filamentosi nelle colture più vecchie.<sup>4</sup>

### 10 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

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 responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative



vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>L.pneumophila</i> ATCC 33152	35-37°C / 44-48 h / A	buona crescita
<i>L.anisa</i> ATCC 35292	35-37°C / 3-5 giorni / A	buona crescita

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

### 11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre pronte all'uso di Legionella Agar (BCYE) vengono testati per la produttività con metodo quantitativo, confrontando i risultati con un lotto di BCYE Agar non selettivo precedentemente approvato (Reference Batch-RB), con i seguenti ceppi target: *L. pneumophila* ATCC 33152, *L. pneumophila* d'isolamento clinico e *L.anisa* ATCC 35292. Il lotto di prova ed il lotto di riferimento vengono inoculati con appropriate diluizioni decimali in soluzione salina delle sospensioni delle colonie e incubati a 35-37°C per 44-48 ore (*L. pneumophila*) e 3-5 giorni (*L. anisa*). Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività ( $Pr = CFU_{TB} / CFU_{RB}$ ). Se  $Pr \geq 0,5$  i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

### 12 - LIMITI DEL METODO

- Alcune Legionelle non possono essere coltivate sui normali terreni di coltura e sono state definite Legionella-like amoebal pathogens (LLAPs), perché si sviluppano in alcune specie di ameba.<sup>9</sup>
- Le colonie di *Legionella* coltivate su filtri a membrana bianca possono avere un aspetto diverso da quelle che si sviluppano su un filtro con fondo nero o scuro.
- Non incubare il terreno con concentrazioni di CO<sub>2</sub> superiori al 2,5% poiché la crescita di *L. pneumophila* può essere inibita.<sup>5</sup>
- Non tutti i campioni positivi per *Legionella* possono essere individuati con un unico metodo di coltura. Una combinazione di terreni non selettivi e selettivi è fortemente raccomandata.<sup>1,8,10</sup>
- Le piastre con crescita caratteristica e con colonie presumibilmente identificate come *Legionella*, devono essere sottoposte a test di conferma con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa. Se pertinente, eseguire test di sensibilità agli antibiotici.
- 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.
- Il terreno di coltura qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

### 13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- Quando si manipolano le colture di *Legionella*, è importante evitare la formazione di aerosol. Pulire e disinfettare accuratamente tutte le aree di lavoro.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it).
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

### 14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°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, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

### 15 - BIBLIOGRAFIA


- Edelstein PH, Luck C. *Legionella*. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke PH et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015.
- Mercante JW, Winchell JM. Current and Emerging Legionella Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations. Clin Microbiol Rev. 2015; 28:95-147
- Descours G, Cassier P, Forey F, Ginevra C, Etienne J, G. Jarraud LS. Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of Legionella species from respiratory samples. J Microbiol Meth 2014; 98:119-121
- ISO 11731:2017 Water quality — Enumeration of Legionella
- Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, Baine WB, Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for Legionella pneumophila, J Clin Microbiol 1979; 10:437-441.
- Pasculle AW, Feeley JC, Gibson RJ et al. Pittsburgh Pneumonia Agent: Direct Isolation from Human Lung Tissue. J Infect Dis 1980; 141:727.
- Edelstein P.H., Improved semiselective medium for isolation of Legionella pneumophila from contaminated clinical and environmental specimens. J Clin Microbiol 1981; 14:298-303
- Public Health England. UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of Legionella species. ID18, Issue no: 3, Issue date: 14.04.15
- Legionella and the prevention of legionellosis- Edited by: Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, Surman-Lee S. World Health Organization 2007.





10. Kusnetsov JM, Jousimies-Somer HR, Nevalainen AI, Martikainen PJ. Isolation of Legionella from water samples using various culture methods. J Appl Bacteriol. 1994 76(2):155-62.

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Non riutilizzare	 Fragile maneggiare con cura

**CRONOLOGIA DELLE REVISIONI**

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 8	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	10/2020

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

