



## LEGIONELLA AGAR

Piastre pronte



Colonie di *Legionella pneumophila*  
e di flora contaminante

### DESTINAZIONE D'USO

Terreno non selettivo pronto all'uso in piastra per l'isolamento ed il conteggio di *Legionella* spp. da campioni ambientali e di origine clinica e per il test di conferma delle colonie.

### FORMULA TIPICA\*

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

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

### 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.

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.

Legionella Agar è preparato aggiungendo al terreno di base un supplemento contenente importanti fattori di crescita per *Legionella* (tampone Aces, potassio idrossido, L-cisteina HCL, acido alfa-chetoglutarico) ed omettendo il supplemento selettivo.

### CARATTERISTICHE DEL TERRENO IN PIASTRA

Aspetto: terreno opaco, nero con granuli visibili di carbone  
pH finale a 25 °C: 6,9 ± 0,1

### MATERIALI FORNITI

Piastre pronte all'uso di Legionella Agar

### MATERIALI NON FORNITI

Anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori, materiali per la generazione dell'atmosfera di incubazione controllata, termostato e strumentazione di laboratorio, cappa a flusso laminare Biohazard di classe 2.

### CAMPIONI

**Campioni per il test di conferma:** colonie isolate su terreno di prima semina per l'isolamento ed il conteggio di *Legionella*.

**Campioni clinici:** *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.

**Campioni ambientali:** 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, sedimenti 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

##### Test di conferma delle colonie

In presenza di un'unica tipologia morfologica di colonie sospette sulle piastre del terreno di prima semina del campione, selezionare 3 colonie e trapiantarle su

- piastre di Legionella Agar w/o Cysteine (REF 549943), senza cisteina
- piastre di Legionella Agar (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 sopra almeno 1 colonia per ciascuna tipologia osservata.

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  $36 \pm 2$  °C per 2-5 giorni.

##### Campioni clinici

Utilizzare il terreno di coltura in piastra non selettivo Legionella Agar in abbinamento al terreno selettivo BCYE-GVPC (REF 549995) quando nel campione si sospetta una carica bassa di legionelle ed una bassa carica di contaminanti.

1. Portare il terreno in piastra 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 Legionella Selective Agar (BCYE-GVPC). Maggiore è il numero di piastre inoculate più alta sarà la probabilità di recuperare *Legionella* dal campione.
5. Incubare a  $36 \pm 2$  °C in aerobiosi, in ambiente umido, con 2,5% di CO<sub>2</sub>. 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 alle concentrazioni attese del microrganismo target e della flora contaminante. Legionella Agar, corrispondente al terreno indicato dalla norma ISO come BCYE w/L-cysteine, è indicato, in abbinamento ad uno o più terreni selettivi, per l'esame di:

- campioni con un elevato numero di Legionelle ed un basso numero di contaminanti
- campioni con un basso numero di Legionelle ed un basso numero di contaminanti:

Si rimanda alla Scheda Tecnica del terreno in polvere Legionella Agar Base (REF 401582) ed alla norma ISO citata per le indicazioni sulla scelta dei terreni selettivi e sui dettagli procedurali.

#### LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI PER LA PROCEDURA DI 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 (Legionella Agar) e non sviluppano crescita sul terreno senza cisteina (Legionella Agar w/o Cysteine).

Le colonie presuntivamente identificate come *Legionella*, devono essere identificate e sierotipizzate con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa.

#### LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI PER LA PROCEDURA D'ISOLAMENTO E CONTEGGIO

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 Legionella Selective Agar, su terreno non selettivo preparato con L-cisteina (BCYE w/L-cysteine, REF 549945) e su terreno non selettivo preparato senza L-cisteina (BCYE w/o L-cysteine, REF 549943). 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 REF 17PL805525). Le colonie che mostrano bastoncini Gram negativi e che non crescono su agar sangue 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

E' responsabilità dell'utilizzatore eseguire il controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE	RISULTATI ATTESI
<i>L. pneumophila</i> ATCC 33152	T° / t / ATM 37°C / 48 h / A	BUONA CRESCITA, COLONIE TIPICHE
<i>L. anisa</i> CB Z103	37°C / 5 gg / A	BUONA CRESCITA, COLONIE TIPICHE

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

### LIMITI DEL METODO

- Sono consigliabili per un'esecuzione ottimale dell'analisi sia l'uso di terreni selettivi che non selettivi, il pretrattamento per campioni contaminati e una minima diluizione che serve ad allontanare le sostanze inibenti la crescita.
- Per quanto riguarda la diluizione dei campioni va ricordato che la soluzione fisiologica può inibire lo sviluppo di *Legionella*.
- *L. oakridgensis* e *L. spiritensis* richiedono L-cisteina e ferro (III) per la crescita ma, a volte, possono crescere lentamente anche sul terreno privo di cisteina. Per questa ragione l'interpretazione dei risultati va fatta comparando attentamente la crescita ottenuta sul terreno con cisteina con l'eventuale crescita ottenuta sul terreno senza cisteina.
- 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.
- 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 sul terreno qui descritto.
- Il terreno qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni da Legionella. 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.

### PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente.
- Il prodotto qui descritto contiene peptoni di origine animale. Scaricare da sito web [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it) il documento con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alla TSE.
- Il terreno in piastra qui descritto è un diagnostico *in vitro* 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. *Legionella* spp. hanno spiccate caratteristiche di patogenicità (livello di biosicurezza 2): consultare le linee guida appropriate (D.Lgs n. 81/2008) per la manipolazione dei materiali potenzialmente infettivi. E' importante, durante tutte le fasi del lavoro, evitare la formazione di aerosol. Pulire e disinfettare con cura l'area di lavoro.
- 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 e nei limiti di specifiche definite.
- Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire i rifiuti in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare le piastre con l'imballaggio deteriorato; 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, colore alterato)
- Il Certificato d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it)

### CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta.



**Biolife**

## Scheda tecnica - foglio istruzioni

N°ST-549945.doc rev 7 2018/10/02 pag. 4 di 4

### BIBLIOGRAFIA

- [http://www.legionellaonline.it/linee\\_guida.htm](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](http://www.iss.it/binary/iss4/cont/C_17_pubblicazioni_2362.pdf). Data di pubblicazione: 13 maggio 2015

### CONFEZIONI

#### 549945 Legionella Agar

20 piastre da 90 mm, confezionate in film plastico, in scatola di cartone.

CODICE CND W0104010405 RDM: 1444151/R



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