



LEGIONELLA SELECTIVE AGAR - GVPC LEGIONELLA SELECTIVE AGAR - AB LEGIONELLA SELECTIVE AGAR - MWY LEGIONELLA SELECTIVE AGAR - MWY ISO Piastrine pronte all'uso



Colonie di *Legionella pneumophila*

IMPIEGO PREVISTO

Terreni di coltura selettivi pronti in piastra per l'isolamento ed il conteggio di *Legionella* spp. nei campioni ambientali.

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 terreni di crescita contenente L-cisteina, sali di ferro, carbone attivo ed estratto di lievito; i terreni selettivi contengono miscele di antibiotici ed antimicotici, diversi nelle diverse formulazioni, al fine di calibrarne il grado di selettività. 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 e 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*.

I terreni indicati dalla norma ISO 11731 per il conteggio di *Legionella* spp. nelle acque presentano nella formulazione, oltre al supplemento di crescita, i supplementi selettivi GVPC o AB o MWY (con anisomicina o natamicina). 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.

PIASTRE PRONTE ALL'USO - FORMULE TIPICHE *

LEGIONELLA SELECTIVE AGAR MWY (REF 549996)

(BCYE-MWY con natamicina)

Glicina	3 g
Vancomicina	1 mg
Polimixina B	6,4 mg
Natamicina	200 mg
Bromotimolo blu	10 mg
Bromocresolo porpora	10 mg
Tampone ACES /Potassio idrossido	12,8 g
Pirofosfato ferrico	250 mg
L-Cisteina HCl	400 mg
Acido alfa-chetoglutarico	1 g
Carbone attivo	2,0 g
Estratto di lievito	10,0 g
Agar	13,0 g
Acqua purificata	1000 mL

LEGIONELLA SELECTIVE AGAR-GVPC (REF 499995) diametro 55 mm

(BCYE-GVPC)

Glicina	3 g
Vancomicina HCl	1 mg
Polimixina B	80.000 UI
Cicloeximide	80 mg
Tampone ACES /Potassio idrossido	12,8 g
Pirofosfato ferrico	250 mg
L-Cisteina HCl	400 mg
Acido alfa-chetoglutarico	1 g
Carbone attivo	2,0 g
Estratto di lievito	10,0 g
Agar	13,0 g
Acqua purificata	1000 mL



LEGIONELLA SELECTIVE SUPPLEMENT MWY-ISO (REF 549948)

(BCYE-MWY ISO-con anisomicina)

Glicina	3 g
Polimixina B	50.000 UI
Vancomicina HCl	1 mg
Anisomicina	80 mg
Blu bromo timolo	10 mg
Porpora bromo cresolo	10 mg
Tampone ACES /Potassio idrossido	12,8 g
Pirofosfato ferrico	250 mg
L-Cisteina HCl	400 mg
Acido alfa-chetoglutarico	1 g
Carbone attivo	2,0 g
Estratto di lievito	10,0 g
Agar	13,0 g
Acqua purificata	1000 mL

LEGIONELLA AB SELECTIVE AGAR (REF 549947)

(BCYE-AB)

Cefazolina	9 mg
Polimixina B	80.000 UI
Pimaricina (natamicina)	70 mg
Tampone ACES /Potassio idrossido	12,8 g
Pirofosfato ferrico	250 mg
L-Cisteina HCl	400 mg
Acido alfa-chetoglutarico	1 g
Carbone attivo	2,0 g
Estratto di lievito	10,0 g
Agar	13,0 g
Acqua purificata	1000 mL

* I terreni possono essere compensati e/o corretti per adeguare le prestazioni alle specifiche.

CARATTERISTICHE CHIMICO FISICHE

Aspetto dei terreni in piastra: nero, opaco.

pH finale a 25°C dei terreni in piastra: 6,9 ± 0,1

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

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).

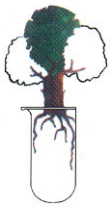
Lasciare assorbire bene l'inoculo quindi incubare le piastre capovolte in atmosfera umida a 36 ± 2°C per 7-10 giorni, osservando le piastre ai giorni 2, 3, 4, 5 e quindi al termine del periodo di incubazione.

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 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

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

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I prodotti qui descritti non sono classificati come pericolosi ai sensi della legislazione vigente.
- I prodotti qui descritti NON contengono peptoni di origine animale.
- I terreni in piastra qui descritti sono per uso professionale per le analisi su campioni ambientali; essi devono essere usati 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 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)
- Scaricare il Certificato d'Analisi dei prodotti dal sito www.biolifeitaliana.it

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare i prodotti qui descritti nella confezione originale a 2-8 °C al riparo della luce. In queste condizioni le piastre pronte sono valide fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

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

PRODOTTI

499995	LEGIONELLA SELECTIVE AGAR-GVPC, 6 x 5 piastre ø 55 mm, confezionate in film plastico / scatola di cartone	CODICE CND: W0104010405
549947	LEGIONELLA AB SELECTIVE AGAR 2 x 10 piastre ø 90 mm, confezionate in film plastico / scatola di cartone	CODICE CND: W0104010405
549996	LEGIONELLA SELECTIVE AGAR MWY 2 x 10 piastre ø 90 mm, confezionate in film plastico / scatola di cartone	CODICE CND: W0104010405
549948	LEGIONELLA SELECTIVE AGAR MWY-ISO 2 x 10 piastre ø 90 mm, confezionate in film plastico / scatola di cartone	CODICE CND: W0104010405



Biolife Italiana Srl, Viale Monza 272, 20128 Milano.