

## LEGIONELLA SELECTIVE AGAR MWY

### IMPIEGO PREVISTO

Piastre pronte all'uso con terreno selettivo (BCYE/MWY) per l'isolamento di *Legionella* spp.

### FORMULA TIPICA (PER LITRO)

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

pH 6,9 ± 0,1

### DESCRIZIONE

La malattia dei legionari colpì i partecipanti al raduno annuale della Legione Americana a Filadelfia il 22 luglio 1976. Dopo l'isolamento del microrganismo chiamato *Legionella*, successivi studi dimostrarono che esso era responsabile di molte polmoniti atipiche mortali.

Il primo terreno sul quale fu possibile coltivare *Legionella* fu descritto da Feeley e coll. nel 1979. Lo stesso autore modificò in seguito il terreno sostituendo l'estratto di carne ed il peptone di caseina con l'estratto di lievito e sostituendo l'amido con il carbone attivo. Questo terreno fu chiamato Charcoal Yeast Extract (CYE) Agar. Successive modifiche al terreno furono apportate da Pasculle e coll. con l'introduzione del tampone ACES per garantire un pH ottimale durante la crescita di *Legionella* e da Edelstein e coll. con l'introduzione dell'idrossido di potassio e dell'acido alfa-chetoglutarico. Il terreno qui proposto è preparato con la base BCYE, ed un supplemento di crescita: l'estratto di lievito e l'acido alfa-chetoglutarico favoriscono la crescita delle legionelle, la cisteina HCl ed il pirofosfato ferrico sono fattori essenziali per lo sviluppo di *Legionella*, il carbone agisce come detossificante, il tampone mantiene un pH ottimale durante la crescita microbica: Il terreno inoltre contiene la miscela di antimicrobici MWY con polimixina B per l'inibizione dei batteri Gram negativi, la vancomicina, antibiotico attivo sui gram positivi e la natamicina come antifungino: Il blu di bromotimolo ed il porpora di Bromocresolo colorano le colonie.

### METODO D'IMPIEGO

#### CAMPIONI AMBIENTALI

- 1 - Centrifugare 10 ml di campione a 2500 rpm per 20 minuti (utilizzando provette sigillate); asportare il sovrantante lasciandone circa 1 ml.
- 2 - Risospendere il sedimento aggiungendo 9 ml di tampone HCl-KCl pH 2,2, agitare e lasciare a temperatura ambiente per 5 minuti. Dal sedimento risospeso seminare 0,1 ml su piastre di *Legionella* Agar non selettivo e su *Legionella* Selective Agar MWY. (Tampone HCl-KCl pH 2,2: 3,9 ml di HCl 0,2M + 25 ml di KCl 0,2 M - aggiustare a pH 2,2 con KOH 1M).
- 3 - Incubare a 36 ± 2°C in aerobiosi ed in ambiente umido ed osservare giornalmente per 7 giorni.. Le colonie di *Legionella pneumophila* sono visibili dopo 2-5 giorni di incubazione e sono di colore blu chiaro o blu-grigio e del diametro di 1-2 mm

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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.

Selezionare tre colonie caratteristiche per *Legionella* da ciascuna delle piastre di agar MWY.

Eseguire le sottocolture su piastre di BCYE con cisteina (REF 549945) e BCYE senza cisteina (REF 549943).

Inserire in un termostato a 36 ± 2°C per almeno 2 giorni. Colonie, che crescono sul BCYE con cisteina ma che non si sviluppano sul BCYE senza cisteina (oppure su piastre di agar sangue) sono specie sospette di *Legionella*. Calcolare e registrare poi il numero confermato di ciascun tipo di colonia di *Legionella*.

### TEST DI CONFERMA SIEROLOGICO

Le specie *Legionella* possono essere identificate con metodi diversi, inclusa l'immunofluorescenza o l'agglutinazione con lattice. Per le richieste di routine è sufficiente identificare con l'agglutinazione al lattice i ceppi a livello di *L.pneumophila* sierogruppo 1, *L. pneumophila* sierogruppi 2 -14 o specie *Legionella* diversa da *L. pneumophila*. Allo scopo è possibile utilizzare il kit Biolife Legionella Rapid Latex Test ( REF 96271050). In corso di ricerche epidemiologiche, gli isolati dovrebbero essere conservati e le sottocolture inviate al laboratorio di riferimento per una completa identificazione e sierotipizzazione.

### CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare a 2-8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni di deterioramento.

### PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI

Prima dell'impiego consultare le specifiche schede di sicurezza, disponibili sul sito web: [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it). I prodotti qui descritti sono per uso diagnostico *in vitro* e devono essere usati in laboratorio, da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni. Sterilizzare le piastre dopo il loro uso e prima dell'eliminazione come rifiuto. Quando si manipolano campioni in cui si sospetta la presenza di *Legionella* evitare la formazione di aerosol, pulire e disinfettare l'area di lavoro.

### BIBLIOGRAFIA

- Balows et al. (1991) Manual of Clinical Microbiology. ASM, Washington, D.C.
- BSI Document 85/53406
- Dennis, P.J.L. et al. (1988) A Laboratory Manual of *Legionella*.
- Edelstein, P.H. (1982) J.Clin.Microbiol. 16, 697
- Edelstein, P.H. et al. (1981) J.Clin.Microbiol. 14, 298.
- Feeley J. et al (1978) J.Clin.Microbiol. 8, 320
- Feeley J. et al (1979) J.Clin.Microbiol. 10, 437.
- ISO 11731: 1998 Water quality — Detection and enumeration of *Legionella*.
- ISO 11731-2: 2004 Water quality — Detection and enumeration of *Legionella* – Part 2 Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts.
- Pasculle et al. (1980) J. Inf. Dis. 141, 727
- Regione Lombardia Direzione Generale della Sanità , Servizio Prevenzione Sanitaria. Sorveglianza e Controllo delle legionellosi, 5 Novembre 1999.
- Wadoswsky et al. (1981) Appl.Envir. Microbiol. 42, 768

### CONFEZIONI

549996                      LEGIONELLA SELECTIVE AGAR MWY                      20 piastre Ø 90 mm

### SONO DISPONILI ANCHE I SEGUENTI TIPI DI PIASTRE PRONTE ALL'USO

549995                      LEGIONELLA SELECTIVE AGAR (GVPC)°                      20 piastre Ø 90 mm  
499995                      LEGIONELLA SELECTIVE AGAR (GVPC)                      30 piastre Ø 55 mm  
549945                      LEGIONELLA AGAR°                      20 piastre Ø 90 mm  
549943                      LEGIONELLA AGAR W/O CYSTEINE°                      20 piastre Ø 90 mm

° CODICE CND W0104010405