

**MODE D'EMPLOI****LEGIONELLA BCYE AGAR BASE****LEGIONELLA BCYE α -GROWTH SUPPLEMENT
LEGIONELLA BCYE α -GROWTH SUPPLEMENT W/O CYSTEINE****LEGIONELLA GVPC SELECTIVE SUPPLEMENT
LEGIONELLA AB SELECTIVE SUPPLEMENT
LEGIONELLA MWY SELECTIVE SUPPLEMENT (ISO)****Milieu de culture déshydraté et suppléments**

Legionella Agar (BCYE) : colonies de *L. pneumophila*
et de contaminer la flore

1 - UTILISATION PREVUE

Diagnostic *in vitro*. Base de milieu, suppléments de croissance et sélectifs pour l'isolement et le dénombrement de *Legionella* spp. à partir d'échantillons cliniques et d'échantillons d'eau.

2 - COMPOSITIONS**LEGIONELLA BCYE AGAR BASE****FORMULE TYPE (APRES RECONSTITUTION AVEC 1 L D'EAU) ***

Activated charcoal	2.0 g
Yeast extract	10.0 g
Agar	13.0 g

*La formule peut être ajustée et/ou complétée pour répondre aux critères de performance requis.

LEGIONELLA BCYE α -GROWTH SUPPLEMENT**(CONTENU DES FLACONS POUR 500 ML DE MILIEU)**

ACES Buffer/Potassium hydroxide	6.4 g
α -ketoglutarate	0.5 g
Ferric pyrophosphate	125.0 mg
L-Cysteine HCl	200.0 mg

LEGIONELLA AB SELECTIVE SUPPLEMENT**(CONTENU DU FLACON POUR 500 ML DE MILIEU)**

Cefazolin	4.5 mg
Polymyxin B	40,000 UI
Pimaricin (natamycin)	35 mg

LEGIONELLA MWY SELECTIVE SUPPLEMENT (ISO)**(AVEC ANISOMYCINE)****(CONTENU DU FLACON POUR 500 ML DE MILIEU)**

Glycine	1.5 g
Vancomycin HCl	0.5 mg
Polymyxin B	25,000 UI
Anisomycin	40 mg
Bromothymol blue	5.0 mg
Bromocresol purple	5.0 mg

**LEGIONELLA BCYE α -GROWTH SUPPLEMENT W/O CYSTEINE
(CONTENU DU FLACON POUR 500 ML DE MILIEU)**

ACES Buffer/Potassium hydroxide	6.4 g
α -ketoglutarate	0.5 g
Ferric pyrophosphate	125.0 mg

LEGIONELLA GVPC SELECTIVE SUPPLEMENT**(CONTENU DU FLACON POUR 500 ML DE MILIEU)**

Glycine	1.5 g
Vancomycin HCl	0.5 mg
Polymyxin B	40,000 IU
Cycloheximide	40.0 mg

3 - PRINCIPE DE LA METHODE ET EXPLICATION DE LA PROCEDURE

Les légionelles sont des gammaprotéobactéries mésophiles, mobiles, a-saccharolytiques, obligatoirement aérobies, nutritionnellement fastidieuses, Gram négatives, non sporulées.¹ *Legionella pneumophila*, l'espèce la plus étudiée, présente un pléomorphisme, avec des formes coccoïdes, bacillaires et/ou de longs filaments qui sont influencés par la température, les nutriments ou métabolites disponibles, l'environnement de croissance et le type de milieu.² Les espèces de *Legionella* ont en commun la dépendance de la croissance à la L-cystéine et l'augmentation de la croissance par le fer.¹ Les légionelles se développent sur plusieurs types de milieux artificiels complexes, mais le milieu le plus efficace est la gélose au charbon de bois tamponné et à l'extrait de levure (BCYE) contenant du pyrophosphate ferrique, de l' α -cétoglutarate et de la L-cystéine.²

La culture est la technique de référence pour le diagnostic en laboratoire : elle présente une spécificité de 100 % et une sensibilité variable en fonction des caractéristiques de l'échantillon, de l'expérience et de la compétence technique du personnel de laboratoire, ainsi que des délais de traitement des échantillons respiratoires, de l'utilisation préalable de thérapies antimicrobiennes et de la prolifération d'autres bactéries oropharyngées dans la culture.^{2,3}

Pour une isolation optimale de *Legionella* spp. à partir d'échantillons cliniques, il est conseillé d'utiliser différents types de milieux de culture : une plaque avec un milieu non sélectif (BCYE) et deux plaques avec un milieu sélectif.¹

Le choix de la méthode utilisée pour le dénombrement de *Legionella* spp. dans l'eau dépend de l'origine et des caractéristiques de l'échantillon, du but de l'enquête, de la concentration attendue de micro-organismes interférents et de la limite de détection requise ; une matrice de décision pour le choix de la méthode appropriée est décrite dans la norme ISO 11731.⁴

La gélose à l'extrait de levure au charbon de bois tamponné (BCYE) a été mise au point par Feeley et al.⁵, puis modifiée par Edelstein⁶ en introduisant de l' α -cétoglutarate, et par Pasculle et al.⁷ en ajoutant du tampon ACES.

Wadowsky et Yee⁸ ont proposé une version sélective du BCYE en introduisant dans la formulation de la glycine, de la vancomycine et de la polymyxine B, ce qui a donné lieu à la formation du milieu GVP. Une autre modification en 1984 par Dennis et al.⁹ a rendu le milieu encore plus sélectif pour la *Legionella* par l'ajout de cycloheximide, ce qui a donné le milieu GVPC. Vickers et al.¹⁰ ont introduit 0.001%





de pourpre de bromocrésol et de bleu de bromothymol dans la gélose BCYE pour différencier les membres de la famille des *Legionellaceae*. Edelstein en 1982¹¹ a proposé le milieu MWY comme une modification du milieu GVP de Wadowsky et Yee, en incluant du bleu de bromothymol, du pourpre de bromocrésol et un agent antifongique.

Les milieux de culture et les suppléments décrits ici sont conformes aux exigences de la norme ISO 11731. ⁴

L'extrait de levure est une source d'azote, de carbone et de vitamines pour la croissance microbienne. Le charbon actif élimine le peroxyde d'hydrogène et d'autres produits toxiques. Le tampon ACES est utilisé pour la stabilisation du pH, l'α-cétoglutarate et le pyrophosphate ferrique stimulent la croissance des *légi*onelles. La L-cystéine est un acide aminé essentiel et une source d'énergie importante pour *Legionella* spp. La glycine et la polymyxine B sont des inhibiteurs de bactéries Gram négatif, la céfazoline est active contre les bactéries Gram positif et certaines bactéries Gram négatif, la vancomycine supprime la croissance des bactéries Gram positif tandis que le cycloheximide, la natamycine et l'anisomycine sont utilisés comme agents antifongiques.

4- INSTRUCTIONS POUR LA PREPARATION DES SUPPORTS

Suspendre 12.5 g de Legionella BCYE Agar Base dans 450 mL d'eau purifiée froide. Porter à ébullition en agitant et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Refroidir à 47-50°C. Ajouter les suppléments de croissance et les suppléments sélectifs appropriés. Après l'ajout des suppléments, en maintenant le milieu sous agitation, répartir dans des boîtes de Pétri stériles.

MILIEU TRES SELECTIF BCYE-GVPC

Ajouter à la base de milieu refroidie à 47-50°C le contenu d'un flacon de Legionella BCYE α-Growth Supplement (REF 423210) reconstitué avec 50 mL d'eau purifiée stérile et le contenu d'un flacon de Legionella GVPC Selective Supplement (REF 423215) reconstitué avec 10 mL d'eau purifiée stérile.

MILIEU SELECTIF BCYE-AB

Ajouter à la base de milieu refroidie à 47-50°C le contenu d'un flacon de Legionella BCYE α-Growth Supplement (REF 423210) reconstitué avec 50 mL d'eau purifiée stérile et le contenu d'un flacon de Legionella AB Selective Supplement (REF 423225), reconstitué avec 5 mL d'eau purifiée stérile.

MILIEU HAUTEMENT SELECTIF BCYE-MWY (AVEC ANISOMYCINE)

Ajouter à la base de milieu refroidie à 47-50°C le contenu d'un flacon de Legionella BCYE α-Growth Supplement (REF 423210) reconstitué avec 50 mL d'eau purifiée stérile et le contenu d'un flacon de Legionella MWY Selective Supplement (ISO) (REF 423220), reconstitué avec 10 mL d'eau purifiée stérile.

MILIEU NON SELECTIF AVEC CYSTEINE : BCYE AVEC L-CYSTEINE

Ajouter à la base de milieu refroidie à 47-50°C le contenu d'un flacon de Legionella BCYE α-Supplément de croissance (REF 423210), reconstitué avec 50 mL d'eau purifiée stérile.

MILIEU NON SELECTIF SANS CYSTEINE : BCYE SANS L-CYSTEINE

Ajouter à la base de milieu refroidie à 47-50°C le contenu d'un flacon de Legionella BCYE α-Supplément de croissance sans cystéine (REF 423212), reconstitué avec 50 mL d'eau purifiée stérile.

5 - CARACTERISTIQUES PHYSIQUES

Legionella BCYE Agar Base (REF 4015822-4015824)

Aspect moyen déshydraté

Aspect des plaques préparées

poudre noire, homogène, fine et fluide
noir, opaque homogène

Legionella BCYE α-Supplément de croissance (REF 423210)

Complément lyophilisé aspect

Aspect de la solution

taille moyenne, pastille rose
jaune clair, opalescent

Legionella BCYE α-Supplément de croissance sans cystéine (REF 423212)

Complément lyophilisé aspect

Aspect de la solution

granulés de taille moyenne, rose foncé
jaune clair, opalescent

Legionella GVPC Supplément sélectif (REF 423215)

Complément lyophilisé apparence

Aspect de la

granulés blancs de grande taille
solution incolore, clair

Supplément sélectif Legionella AB (REF 423225),

Complément lyophilisé apparence

Aspect de la solution

granulés blancs de grande taille
blanchâtre, trouble

Supplément sélectif Legionella MWY (ISO) (REF 423220),

Complément lyophilisé apparence

Aspect de la solution

granulés bleutés de grande taille
bleu, nuageux

pH final du milieu complète 20-25°C

6,8 ± 0,2

6 - MATÉRIEL FOURNI - EMBALLAGE

Produit	Type	REF	Emballage
Legionella BCYE Agar Base	Milieu déshydraté	4015822 4015824	500 g (20 L) 5 kg (200 L)
Legionella BCYE α-Growth Supplement	Supplément lyophilisé	423210	4 flacons, chacun pour 500 mL de milieu
Legionella BCYE α-Growth Supplement w/o Cysteine	Supplément lyophilisé	423212	4 flacons, chacun pour 500 mL de milieu
Legionella GVPC Selective Supplement	Supplément lyophilisé	423215	4 flacons, chacun pour 500 mL de milieu
Legionella AB Selective Supplement	Supplément lyophilisé	423225	10 flacons, chacun pour 500 mL de milieu Pour le contrôle microbiologique de l'eau uniquement
Legionella MWY Selective Supplement (ISO)	Supplément lyophilisé	423220	4 flacons, chacun pour 500 mL de milieu Pour le contrôle microbiologique de l'eau uniquement

7 - MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

Boucles et écouvillons stériles, incubateur et équipement de laboratoire nécessaire, réactifs pour le traitement des échantillons, milieux de culture auxiliaires et réactifs pour l'identification des colonies.





8 - SPECIMENS

Legionella BCYE Agar Base, Legionella BCYE α -Growth Supplement et le supplément sélectif GVPC sont destinés au traitement bactériologique de plusieurs échantillons cliniques humains, y compris ceux provenant des voies respiratoires inférieures, tels que les expectorations, le liquide pleural, les aspirats bronchiques, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (BAL), les tissus pulmonaires et les échantillons de biopsie.^{1,12} Dans la mesure du possible, prélevez les échantillons avant la thérapie antimicrobienne. Transférer l'échantillon dès que possible au laboratoire ; utiliser un milieu de transport si l'échantillon ne peut être traité immédiatement. Legionella BCYE Agar Base, Legionella BCYE α -Growth Supplement et les suppléments sélectifs GVPC, MWY et AB sont destinés au traitement bactériologique d'échantillons non cliniques : tous les types d'échantillons d'eau tels que les eaux potables, industrielles, usées, naturelles et les échantillons liés à l'eau (par ex. biofilms, sédiments, etc.).⁴ Consulter la norme ISO 11731 pour les méthodes d'échantillonnage et les procédures de traitement des échantillons.⁴ Il convient d'appliquer les bonnes pratiques de laboratoire pour la collecte, le transport et le stockage des échantillons.

Legionella BCYE Agar Base complétée par Legionella BCYE α -Growth Supplement w/o Cysteine, doit être inoculée avec des colonies cultivées sur des milieux d'isolement sélectifs ou non sélectifs pour la confirmation présomptive des colonies de *Legionella*.

9 - PROCEDURE DE TEST

Amener les plaques à température ambiante et laisser sécher la surface du support.

Isolement à partir d'échantillons cliniques^{1,12}

Pour obtenir un rendement optimal de *Legionella* spp. à partir d'échantillons cliniques, il faut généralement se rendre sur le site¹ :

- Ce spécimen est dilué au 1/10 dans du bouillon tryptique de soja ou de l'eau distillée pour réduire l'inhibition par les facteurs tissulaires et sériques, ainsi que par les antibiotiques. Si les expectorations sont très denses, elles doivent être remises en suspension avec 0.2 à 1 mL de fluidifiant à base de dithiothréitol.
- Le spécimen doit être prétraité pour réduire la flore contaminante. Pour ce faire, l'échantillon est dilué au 1/10 dans un tampon KCl-HCl à faible pH (pH 2.2) et incubé à température ambiante pendant 4 minutes. Une alternative à l'acidification de l'échantillon est le chauffage à 50°C pendant 30 minutes.
- Ces différents milieux sont utilisés : une plaque avec un milieu non sélectif (BCYE) et deux avec un milieu sélectif.

Inoculer environ 0.1 mL sur le premier quadrant de chaque plaque et strier avec une boucle sur les autres quadrants pour obtenir des colonies bien isolées.

Incuber à 35-37°C dans de l'air humidifié. Une faible supplémentation en CO₂ (2.5 %) peut favoriser la croissance de certaines *Legionella* spp. plus fastidieuses, telles que *L. sainthelsi* et *L. oakridgensis*. Ce faible niveau de supplémentation en CO₂ ne nuit pas à la croissance de *L. pneumophila*, mais des niveaux de CO₂ supérieurs à 2.5 % peuvent inhiber la croissance.

Les colonies sont normalement visibles au microscope après 2 jours et au macroscopie après 3 à 5 jours.

Dénombrement dans les échantillons d'eau⁴

Les procédures de travail décrites dans la norme ISO 11731 diffèrent en fonction de l'origine de l'échantillon, de ses caractéristiques, des objectifs de la recherche et des concentrations attendues du micro-organisme cible et de la flore contaminante.

Schématiquement, les différentes possibilités de traitement et d'inoculation des échantillons sont résumées ci-dessous.

1. Pour les échantillons présentant un nombre élevé de légionelles et un faible nombre de contaminants : inoculation directe de l'échantillon sur un milieu non sélectif BCYE w/L-cystéine[^] et sur une plaque de milieu sélectif BCYE-AB*.
2. Pour les échantillons présentant un faible nombre de légionelles et un faible nombre de contaminants : filtration sur membrane et positionnement du filtre non traité sur une plaque de milieu non sélectif BCYE w/ L-cystéine[^], positionnement du (des) filtre(s) traité(s) par des acides sur une ou plusieurs plaques de milieu sélectif ou hautement sélectif (BCYE-AB* ou BCYE-GVPC** ou BCYE-MWY***) ; lavage de la membrane non traitée et traitée par des acides ou par la chaleur et ensemencement de 0.1-0.5 mL sur une plaque de milieu non sélectif et sur des plaques d'un ou plusieurs milieux sélectifs et hautement sélectifs (BCYE-AB* ou BCYE-GVPC** ou BCYE-MWY***).
3. Pour les échantillons contenant un nombre élevé de contaminants : inoculer l'échantillon non concentré, concentré et dilué au 1:10 ; diviser chaque sous-échantillon en trois aliquotes : une non traitée, une traitée à la chaleur et une traitée aux acides ; inoculer 0,1-0,5 mL de chaque aliquote sur une plaque de milieu sélectif (BCYE-GVPC **ou BCYE-MWY***).
4. Pour les échantillons contenant un très grand nombre de contaminants : inoculer l'échantillon non concentré et dilué 1:10 et 1:100 après un prétraitement par une combinaison de chaleur suivie d'une solution acide. Préparer les dilutions avec le diluant approprié après le traitement à l'acide. Après agitation au vortex, ensemencer 0.1-0.5 mL de chaque aliquote sur une plaque de milieu sélectif (BCYE-GVPC** ou BCYE-MWY***).

Laisser l'inoculum bien absorber puis incubé les plaques inversées dans une atmosphère humide à 36 ± 2°C pendant 7-10 jours, en observant les plaques aux jours 2, 3, 4, 5 puis à la fin de la période d'incubation.

Les éléments de procédure décrits ci-dessus sont entièrement schématiques. Pour plus de détails sur les techniques de dénombrement des légionelles dans l'eau, se référer à la norme ISO 11731⁴ ou à d'autres lignes directrices applicables.

PLAQUES PRÉPARÉES COMME DÉCRIT CI-DESSUS OU PLAQUES BIOLIFE PRÊTES À L'EMPLOI : [^] 549945 LEGIONELLA AGAR (BCYE) ; *549947 LEGIONELLA AB SELECTIVE AGAR ; **549995 ou 499995 LEGIONELLA SELECTIVE AGAR-GVPC *** 549948 LEGIONELLA SELECTIVE AGAR MWY-ISO.

Confirmation des colonies

Un premier critère pour différencier les colonies de *Legionella* est leur incapacité à se développer, à de rares exceptions près (*L. oakridgensis*, *L. jordanis*, et *L. nagasakiensis*, *L. spiritensis*)^{2,4,12}, sur un milieu dépourvu de L-cystéine.

S'il n'y a qu'un seul type de colonie, prélever trois colonies présomptives ; si plusieurs types morphologiques différents de colonies présomptives de *Legionella* se développent sur la plaque, prélever au moins une colonie de chaque type.⁴

Subculture sur une plaque de BCYE avec/cystéine (REF 549945) et une plaque de BCYE sans cystéine (REF 549943).

Veiller à ne pas retirer le milieu avec la colonie et ensemencer d'abord le milieu sans cystéine, puis le milieu avec cystéine.

Incuber à 36 ± 2°C pendant 2 à 5 jours.⁴

10 - LECTURE ET INTERPRÉTATION

Examen des plaques

Après incubation, observer la croissance bactérienne et noter les caractéristiques morphologiques et chromatiques des colonies.

Les colonies de *Legionella* spp. commencent à apparaître sur les boîtes de culture au deuxième jour d'incubation. Il est très rare que les colonies bactériennes apparaissent sur les plaques après 5 jours d'incubation. Certaines *Legionella* spp. très rarement isolées peuvent nécessiter jusqu'à 14 jours d'incubation avant qu'une croissance n'apparaisse ; il s'agit d'un événement extrêmement rare. Quoi qu'il en soit, il est raisonnable d'inspecter les boîtes de culture entre les jours 2 et 5, puis à nouveau au jour 14.¹

Au cours des 24 à 36 premières heures d'incubation, l'observation de la plaque au microscope binoculaire de faible puissance, la lumière incidente éclairant la surface de la gélose à un angle aigu, peut aider à reconnaître les colonies de *Legionella* et de contaminants.





En principe, les colonies de *Legionella* apparaissent blanc-gris, avec des bords entiers et brillants, arrondis, d'un diamètre de 1 à 4 mm. En général, et surtout au cours des deux premiers jours d'incubation, le bord présente une iridescence rose ou bleu-vert tandis que le centre est gris opalescent avec un aspect de verre dépoli. Observées sous lampe UV (366 nm), certaines espèces (*L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. gratiana*, *L. parisiensis*, *L. steigerwaltii* et *L. tucsonensis*) présentent une auto-fluorescence bleu-blanc, d'autres (*L. erythra* et *L. rubrilucens*) une auto-fluorescence rouge vif. *L. pneumophila* et les légionelles communes ne présentent normalement pas d'auto-fluorescence. Avec la prolongation du temps d'incubation, les colonies deviennent plus larges, le centre prend une couleur blanc crème et perd une grande partie de son iridescence. Une caractéristique commune des colonies de *Legionella* est la difficulté de les prélever avec l'anse à la surface de la gélose.

Pour plus de détails sur le dénombrement de *Legionella* spp. dans les échantillons d'eau, consulter la norme ISO.⁴

Confirmation des colonies

Après incubation, observer la croissance bactérienne sur les deux plaques inoculées. Considérer comme *Legionella* les colonies qui se développent sur la plaque de BCYE avec cystéine mais qui ne se développent pas sur la plaque de BCYE sans cystéine. L'identification présomptive doit être complétée par une coloration de Gram préparée à partir d'une gélose contenant uniquement de la cystéine : Les cellules de *Legionella* sont des bâtonnets fins Gram-négatifs peu ou faiblement colorés, qui peuvent être filamenteux dans les cultures plus anciennes.⁴

11 - CONTROLE DE LA QUALITE DE L'UTILISATEUR

Tous les lots fabriqués du produit sont mis en vente après que le contrôle de qualité a été effectué pour vérifier la conformité aux spécifications. Toutefois, l'utilisateur final peut effectuer son propre contrôle de qualité conformément aux réglementations locales applicables, aux exigences d'accréditation et à l'expérience du laboratoire. Le choix des souches de *Legionella* et des micro-organismes non ciblés doit être fait en fonction du milieu préparé, sélectif ou non sélectif, et du domaine d'application (clinique ou analyse de l'eau). Consulter la littérature citée pour les détails des procédures de contrôle de qualité.^{4,13-15}

12 - CARACTERISTIQUES DES SPECTACLES

Avant la mise en vente, un échantillon représentatif de tous les lots de *Legionella* Agar Base REF 401582 déshydratée (Test Batch-TB) complétée par le BCYE α -Growth Supplement et le *Legionella* GVPC Selective Supplement est testé pour la productivité et la sélectivité, en comparant les résultats avec un lot précédemment approuvé (Reference Batch-RB).

La productivité est testée par une méthode quantitative, avec les souches suivantes : *L. pneumophila* ATCC 33152, *L. pneumophila*, isolat clinique et *L. anisa* ATCC 35292. Les lots d'essai et de référence sont inoculés avec des dilutions décimales dans l'eau des suspensions de colonies et incubés à 35-37°C pendant 44-48 heures (*L. pneumophila*) et 3-5 jours (*L. anisa*). Les colonies sont dénombrées sur les deux lots et le ratio de productivité ($Pr = UFC / UFC_{TBRB}$) est calculé. Si Pr est $\geq 0,7$ et si la morphologie des colonies est typique, les résultats sont considérés comme acceptables et conformes aux spécifications.

La productivité de la *Legionella* BCYE Agar Base REF 401582 est également évaluée avec l'ajout du seul BCYE α -Growth Supplement avec la souche cible *L. pneumophila* ATCC 33152 avec les mêmes critères d'acceptation que ceux décrits ci-dessus pour le milieu GVPC. La sélectivité est évaluée à l'aide de la méthode modifiée de goutte en surface de Miles-Misra en inoculant les plaques avec des dilutions décimales appropriées dans une solution saline d'une suspension de 0,5 McFarland des souches non ciblées suivantes : *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *C. albicans* ATCC 18804. Après incubation à 35-37°C pendant 72 heures, la croissance de la souche non ciblée est observée et enregistrée : *S. aureus*, *E. faecalis* et *E. coli* sont totalement inhibés, tandis que *P. aeruginosa* et *C. albicans* sont partiellement inhibés.

13 - LIMITES DE LA MÉTHODE

- Certaines légionelles ne peuvent pas être cultivées sur les milieux de culture habituels et ont été appelées *Legionella*-like amoebal pathogens (LLAP), parce qu'elles se développent dans certaines espèces d'amibes hôtes.¹⁶
- Les colonies de *Legionella* cultivées sur des filtres à membrane blancs peuvent avoir un aspect différent de celles qui se développent sur un filtre à fond noir ou sombre.
- Feeley et al.⁵ recommandent de ne pas incuber le milieu avec des concentrations de CO₂ supérieures à 2,5% en raison de la possibilité d'inhibition de la croissance de *L. pneumophila*.
- La glycine contenue dans le milieu peut inhiber certaines souches non *pneumophiles*.¹⁷
- Les milieux BCYE sélectifs contenant de la vancomycine peuvent ne pas favoriser la croissance de toutes les *Legionella* spp.¹⁸
- La performance des milieux de culture est un facteur critique dans l'isolement des légionelles à partir d'échantillons respiratoires. Il a été rapporté³ que le BMPA et le MWY ont produit des taux d'isolement significativement plus élevés que le GVPC et les milieux BCYE non sélectifs, avec des échantillons contenant un petit nombre de *Legionella* et des niveaux élevés de contaminants.
- Une seule méthode de culture ne permet pas d'identifier tous les échantillons positifs pour les légionelles. Il est fortement recommandé de combiner des milieux sélectifs et non sélectifs.^{1,12,19}
- Les plaques présentant une croissance caractéristique et contenant des colonies présumées être des *Legionella* doivent être soumises à des tests de confirmation par des techniques biochimiques, immunologiques, moléculaires ou de spectrométrie de masse. Le cas échéant, effectuer des tests de sensibilité aux antimicrobiens.
- En microbiologie clinique, le diagnostic de la légionellose doit être basé sur une approche interdisciplinaire qui inclut les résultats radiologiques, les résultats culturels, la détermination de l'antigène urinaire.
- Legionella* BCYE Agar Base et ses compléments sont destinés à aider au diagnostic de l'infection : l'interprétation des résultats doit être faite en tenant compte de l'histoire clinique du patient, de l'origine de l'échantillon et des résultats des tests microscopiques et/ou d'autres tests de diagnostic.

14 - PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- Le milieu de base déshydraté et les suppléments BCYE, BCYE sans cystéine et GVPC sont des diagnostics qualitatifs *in vitro* ; les suppléments AB et MWY sont uniquement destinés au contrôle microbiologique. Les produits décrits ici sont réservés à un usage professionnel et doivent être utilisés par un personnel de laboratoire qualifié et formé de manière adéquate, en respectant les précautions contre les risques biologiques et les techniques aseptiques approuvées.
- Le milieu de base et les suppléments doivent être utilisés en association, conformément aux instructions décrites.
- Appliquer les bonnes pratiques de fabrication dans le processus de production des milieux préparés.
- Les compléments sont stérilisés par filtration sur membrane.





- Les milieux déshydratés et les suppléments contenant des antibiotiques doivent être manipulés avec une protection adéquate. Avant l'utilisation, consulter les fiches de données de sécurité.
- Tous les échantillons de laboratoire doivent être considérés comme infectieux.
- Lors de la manipulation de *Legionella* spp. il est important d'éviter la formation d'aérosols. Nettoyez et désinfectez soigneusement toutes les zones de travail.
- La zone du laboratoire doit être contrôlée afin d'éviter les contaminants tels que le milieu en poudre et le supplément ou les agents microbiens.
- Stériliser tous les déchets à risque biologique avant de les éliminer. Éliminer le milieu et le supplément inutilisés ainsi que les plaques stérilisées inoculées avec des échantillons ou des souches microbiennes conformément à la législation locale en vigueur.
- Ne pas utiliser le milieu de culture et les suppléments comme principes actifs de préparations pharmaceutiques ou comme matériaux de production destinés à la consommation humaine et animale.
- Les certificats d'analyse et les fiches de données de sécurité des produits sont disponibles sur le site www.biolifeitaliana.it.
- Notifier à Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) et aux autorités compétentes tout incident grave lié à l'utilisation du diagnostic *in vitro*.
- Les informations fournies dans ce document ont été définies au mieux de nos connaissances et de nos capacités et représentent une ligne directrice pour l'utilisation correcte du produit, mais sans obligation ni responsabilité. Dans tous les cas, les lois, réglementations et procédures standard locales en vigueur doivent être respectées pour l'examen des échantillons prélevés dans les districts organiques humains et animaux, pour les échantillons environnementaux et pour les produits destinés à la consommation humaine ou animale. Nos informations ne dispensent pas nos clients de leur responsabilité de vérifier l'adéquation de notre produit à l'usage auquel il est destiné.

15 - CONDITIONS DE STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Milieu déshydraté

Dès réception, conserver à +10°C /+30°C à l'abri de la lumière et dans un endroit sec. S'il est correctement stocké, il peut être utilisé jusqu'à la date de péremption. Ne pas utiliser au-delà de cette date. Éviter d'ouvrir le flacon dans un endroit humide. Après utilisation, le récipient doit être fermé hermétiquement. Jeter le produit si le récipient et/ou le bouchon sont endommagés, ou si le récipient n'est pas bien fermé, ou en cas de détérioration évidente de la poudre (changement de couleur, durcissement, gros morceaux).

Suppléments

Dès réception, conserver le produit dans son emballage d'origine à +2°C /+8°C à l'abri de la lumière directe. S'il est correctement conservé, le produit peut être utilisé jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette ; ne pas utiliser au-delà de cette date. Après ouverture du flacon et reconstitution du produit lyophilisé, la solution obtenue doit être utilisée immédiatement. Avant utilisation, examiner le produit lyophilisé et reconstitué et le jeter s'il présente des signes évidents de détérioration (par exemple, contamination, couleur atypique ou autres caractéristiques anormales).

L'utilisateur est responsable des processus de fabrication et de contrôle de la qualité des milieux préparés et de la validation de leur durée de conservation, en fonction du type (plaques/tubes/bouteilles) et des conditions de stockage appliquées (température et emballage).

Selon la norme ISO 11731¹, les plaques préparées peuvent être conservées à 5 ± 3 °C dans des récipients hermétiques, à l'abri de la lumière :

BCYE-avec cystéine : jusqu'à 3 mois

BCYE-sans cystéine : jusqu'à 3 mois

BCYE-GVPC : jusqu'à 4 semaines

BCYE-MWY : jusqu'à 4 semaines

BCYE-AB : jusqu'à 3 mois

16 - RÉFÉRENCES

1. Edelstein PH, Luck C. *Legionella*. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015.
2. Mercante JW, Winchell JM. Current and Emerging Legionella Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations. Clin Microbiol Rev. 2015; 28:95-147
3. 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
4. ISO 11731:2017 Water quality — Enumeration of Legionella
5. 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.
6. Edelstein P.H., Improved semiselective medium for isolation of Legionella pneumophila from contaminated clinical and environmental specimens. J Clin Microbiol 1981; 14:298-303
7. Pasculle AW, Feeley JC, Gibson RJ et al. Pittsburgh Pneumonia Agent: Direct Isolation from Human Lung Tissue. J Infect Dis 1980; 141:727.
8. Wadowsky RM, Yee RB. Glycine-Containing Selective Medium for Isolation of Legionellaceae from Environmental Specimens. Appl Environ Micro 1981; 42:768-772
9. Dennis PJL, Bartlett CLR, Wright AE. 1984. Comparison of Isolation Methods for Legionella spp. In Thronsbury, C. et al. (ed.) Legionella: Proceedings of the 2nd International Symposium. Washington, D.C. ASM.; 294- 296.
10. Vickers RM, Brown A, Garrity GM. Dye-containing BCYE medium for differentiation of members of the family Legionellaceae. J Clin Microbiol 1981; 13:380.
11. Edelstein PH Comparative Study of Selective Media for Isolation of Legionella pneumophila from Potable Water. J Clin Microbiol 1982; 16:697.
12. Public Health England. UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of Legionella species. ID18, Issue no: 3, Issue date: 14.04.15
13. ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media
14. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004.
15. The Australian Society for Microbiology. Guidelines for Assuring Quality of Medical Mycological Culture Media. 2012
16. Legionella and the prevention of legionellosis- Edited by: Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, Surman-Lee S. World Health Organization 2007.
17. Lück PC, Igel L, Helbig JH, Kuhlisch E, Jatzwauk L. Comparison of commercially available media for the recovery of Legionella species. Int J Hyg Environ Health 2004; 207(6):589-93.
18. Lee TC, Vickers RM, Yu VL, Wagener MM. Growth of 28 Legionella species on selective culture media: a comparative study. J Clin Microbiol 1993;31(10):2764-8.
19. 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.

423210 LEGIONELLA BCYE α-GROWTH SUPPLEMENT

SDS rev 2

Règlement (UE) 2020/878



**Mélanges contenant de l'hydroxyde de potassium****Classification**

Substance ou mélange corrosif pour les métaux, catégorie 1
Corrosion cutanée, catégorie 1A
Lésions oculaires graves, catégorie 1

H290 Peut être corrosif pour les métaux
Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires.
Provoque des lésions oculaires graves

Étiquetage

Pictogramme



Mot de signal

Avertissement

Mentions de danger

H290 Peut être corrosif pour les métaux

H314 Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires

Conseils de prudence :

P260 Ne pas respirer les poussières / fumées / gaz / brouillards / vapeurs / pulvérisations.

P305+P351+P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer prudemment à l'eau pendant plusieurs minutes. Retirer les lentilles de contact, si elles sont présentes et faciles à enlever.

Poursuivre le rinçage.

P303+P361+P353 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau [ou prendre une douche].

P280 Porter des gants de protection / des vêtements de protection / un équipement de protection des yeux / un équipement de protection du visage.

P310 Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON / un médecin / . . .

P264 Laver soigneusement après manipulation.

423212 LEGIONELLA BCYE α -GROWTH SUPPLEMENT W/O CYSTEINE

SDS rev 2

Règlement (UE) 2020/878

Mélanges contenant de l'hydroxyde de potassium**Classification**

Substance ou mélange corrosif pour les métaux, catégorie 1H290
Toxicité aiguë, catégorie 4
Corrosion cutanée, catégorie 1A
Lésions oculaires graves, catégorie 1

Peut être corrosif pour les métaux

Nocif en cas d'ingestion.

Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires

Provoque des lésions oculaires graves

Étiquetage

Pictogramme



Mot de signal

Avertissement

Mentions de danger

H290 Peut être corrosif pour les métaux

H302 Nocif en cas d'ingestion

H314 Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires

Conseils de prudence :

P260 Ne pas respirer les poussières / fumées / gaz / brouillards / vapeurs / pulvérisations.

P305+P351+P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer prudemment à l'eau pendant plusieurs minutes Retirer les lentilles de contact, si elles sont présentes et faciles à enlever.

Poursuivre le rinçage.

P303+P361+P353 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau [ou prendre une douche].

P280 Porter des gants de protection / des vêtements de protection / un équipement de protection des yeux / un équipement de protection du visage

P310 Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON / un médecin / .

P264 Laver . . . soigneusement après manipulation

423215 LEGIONELLA SELECTIVE SUPPLEMENT GVPC

SDS rev 3

Règlement (UE) 2020/878



**Mélange contenant du cycloheximide****Classification**

Cellules germinales mutagénicité, catégorie 2
Toxicité pour la reproduction, catégorie 1A
Toxicité aiguë, catégorie 3
Dangereux pour l'environnement aquatique, toxicité chronique, catégorie 3

Susceptible de provoquer des anomalies génétiques
Peut nuire à la fertilité ou à l'enfant à naître
Toxique en cas d'ingestion
Nocif pour la vie aquatique avec des effets à long terme

Étiquetage

Pictogramme



Mot de signalisation Danger

Mentions de danger

H341 Susceptible de provoquer des anomalies génétiques
H360 Toxique en cas d'ingestion
H412 Nocif pour la vie aquatique avec des effets durables.
Réservé aux utilisateurs professionnels.

Conseils de prudence :

P201 Obtenir des instructions spéciales avant l'utilisation
P280 Porter des gants de protection / des vêtements de protection / un équipement de protection des yeux / un équipement de protection du visage
P308+P313 EN CAS d'exposition ou d'inquiétude : Consulter un médecin.
P301+P310 EN CAS D'INGESTION : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON / un médecin / . . .
P264 Laver . . . soigneusement après manipulation
P273 Éviter le rejet dans l'environnement Peut nuire à la fertilité ou à l'enfant à naître.

423225 LEGIONELLA AB SELECTIVE SUPPLEMENT

SDS rev 1

Règlement (UE) 2020/878

Mélange contenant de la céfazoline sodique**Classification**

Sensibilisation respiratoire, catégorie 1 Peut provoquer des symptômes d'allergie ou d'asthme ou des difficultés respiratoires en cas d'inhalation
Sensibilisation cutanée, catégorie 1 Peut provoquer une réaction allergique cutanée

Étiquetage

Pictogramme



Mots de signalisation : Danger

Mentions de danger

H334 Peut provoquer des symptômes d'allergie ou d'asthme ou des difficultés respiratoires en cas d'inhalation
H317 Peut provoquer une réaction allergique cutanée

Conseils de prudence

P261 Éviter de respirer les poussières / fumées / gaz / brouillards / vapeurs / pulvérisations
P280 Porter des gants de protection
P342+P311 En cas de symptômes respiratoires : Appeler un CENTRE ANTIPOISON / un médecin / . . .
P304+P340 EN CAS D'INHALATION : Transporter la personne à l'air frais et la mettre à l'aise pour qu'elle puisse respirer.
P333+P313 En cas d'irritation de la peau ou d'éruption cutanée Consulter un médecin.
P362+P364 Enlever les vêtements contaminés et les laver avant de les réutiliser





TABEAU DES SYMBOLES APPLICABLES

REF ou REF Numéro de catalogue	LOT Code du lot	IVD Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>	Fabricant	De ce côté-ci	Stocker dans un endroit sec
Limitation de la température	Contenu suffisant pour <n> tests	Consulter le mode d'emploi	Utilisation avant	Fragile	Tenir à l'écart de la lumière directe

HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Version	Description des changements	Date
Révision 8	Mise à jour de la présentation et du contenu	2020/10
Révision 9	Mise à jour des "précautions et avertissements", des "conditions de stockage et durée de conservation", des mentions de danger	2022/04
Révision 10	Suppression de la classification obsolète	2023/04
Révision 11	Mise à jour du pH des milieux finaux, inclusion des conditions de stockage des plaques préparées par les utilisateurs, précautions et avertissements en spécifiant les produits DIV et non DIV.	2024/04

Note : les modifications typographiques, grammaticales et de formatage mineures ne sont pas incluses dans l'historique des révisions.

