



## ISTRUZIONI PER L'USO

# LEGIONELLA BCYE AGAR BASE

## LEGIONELLA BCYE $\alpha$ -GROWTH SUPPLEMENT

## LEGIONELLA BCYE $\alpha$ -GROWTH SUPPLEMENT w/o CYSTEINE

## LEGIONELLA GVPC SELECTIVE SUPPLEMENT

## LEGIONELLA AB SELECTIVE SUPPLEMENT

## LEGIONELLA MWY SELECTIVE SUPPLEMENT (ISO)

Terreno in polvere e supplementi liofilizzati

BCYE Agar: colonie di *Legionella pneumophila* e di flora contaminante

**LEGIONELLA MWY SELECTIVE SUPPLEMENT (ISO)**  
**CONTENUTO DEL FLACONE (PER 500 ML DI TERRENO)**

Glicina	1,5 g
Vancomicina HCl	0,5 mg
Polimixina B	25,000 UI
Anisomicina	40,0 mg
Bromotimolo blu	5,0 mg
Bromocresolo porpora	5,0 mg

**LEGIONELLA AB SELECTIVE SUPPLEMENT**  
**CONTENUTO DEL FLACONE (PER 500 ML DI TERRENO)**

Cefazolina	4,5 mg
Polimixina B	40,000 UI
Pimaricina (natamicina)	35,0 mg

**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Diagnostici *in vitro*. Terreno di base e supplementi selettivi e di crescita per l'isolamento ed il conteggio di *Legionella* spp. in campioni clinici e nelle acque.

**2 - COMPOSIZIONI****LEGIONELLA BCYE AGAR BASE****FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA) \***

Carbone attivo	2,0 g
Estratto di lievito	10,0 g
Agar	13,0 g

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

**LEGIONELLA BCYE  $\alpha$ -GROWTH SUPPLEMENT****CONTENUTO DEL FLACONE (PER 500 ML DI TERRENO)**

Tampone ACES /Potassio idrossido	6,4 g
Pirofosfato ferrico	125 mg
L-cisteina HCl	200 mg
Acido alfa-chetoglutarico	0,5 g

**LEGIONELLA BCYE  $\alpha$ -GROWTH SUPPLEMENT W/O CYSTEINE****CONTENUTO DEL FLACONE (PER 500 ML DI TERRENO)**

Tampone ACES /Potassio idrossido	6,4 g
Pirofosfato ferrico	125 mg
Acido alfa-chetoglutarico	0,5 g

**LEGIONELLA GVPC SELECTIVE SUPPLEMENT****CONTENUTO DEL FLACONE (PER 500 ML DI TERRENO)**

Glicina	1,5 g
Vancomicina HCl	0,5 mg
Polimixina B	40,000 IU
Cicloeximide	40,0 mg

**3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO**

Le legionelle sono gammaproteobatteri mesofili, mobili, asaccarolitici, aerobi obbligati, nutazionalmente esigenti, Gram-negativi, asporigeni.<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 le 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 ed 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 del tempo intercorrente tra raccolta del campione e la sua semina, delle terapie antimicrobiche in corso e della 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 (BCYE) agar è stato sviluppato da Feeley *et al.*<sup>5</sup>, poi 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. Wadowsky e Yee<sup>8</sup> hanno ideato una versione selettiva del BCYE, includendo nella formulazione glicina, vancomicina e polimixina (terreno GVP). Infine, nel 1984 Dennis *et al.*<sup>9</sup> hanno proposto l'introduzione della cicloeximide rendendo il terreno ancora più selettivo per *Legionella*, ottenendo il terreno GVPC.





Vickers et al.<sup>10</sup> hanno incluso nella formulazione dell'agar BCYE lo 0,001% di bromocresolo porpora e di bromo timolo blu per la differenziazione tra i membri della famiglia delle *Legionellaceae*. Edelstein nel 1982<sup>11</sup> propose il terreno MWY come una modifica del terreno GVP di Wadowsky e Yee, includendo il bromotimolo blu, il bromocresolo porpora ed un agente antifungino.

I terreni di coltura e i supplementi qui descritti sono conformi ai requisiti della norma 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. La glicina e la polimixina B sono inibitori dei batteri Gram-negativi, la cefazolina agisce sui Gram positivi e su alcuni Gram negativi la vancomicina sopprime la crescita dei batteri Gram positivi, mentre la cicloesimide, la natamicina e l'anisomicina sono composti antifungini.

#### 4 - METODI DI PREPARAZIONE

Sospendere 12,5 g di Legionella BCYE Agar Base in 450 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C. Aggiungere il supplemento di crescita ed il supplemento selettivo in accordo alla tipologia di terreno che si desidera preparare. Dopo l'aggiunta dei supplementi, mantenendo il terreno sotto agitazione, distribuire in piastre di Petri sterili.

#### Terreno altamente selettivo BCYE - GVPC

Aggiungere al terreno di base il contenuto di un flacone di Legionella BCYE  $\alpha$ -Growth Supplement (cod. 423210) ricostituito con 50 mL di acqua purificata sterile ed il contenuto di un flacone di Legionella GVPC Selective Supplement (cod. 423215) ricostituito con 10 mL di acqua purificata sterile.

#### Terreno selettivo BCYE - AB

Aggiungere al terreno di base il contenuto di un flacone di Legionella BCYE  $\alpha$ -Growth Supplement (cod. 423210) ricostituito con 50 mL di acqua purificata sterile ed il contenuto di un flacone di Legionella AB Selective Supplement (cod. 423225), ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile.

#### Terreno altamente selettivo BCYE - MWY (con anisomicina)

Aggiungere al terreno di base il contenuto di un flacone di Legionella BCYE  $\alpha$ -Growth Supplement (cod. 423210) ricostituito con 50 mL di acqua purificata sterile ed il contenuto di un flacone di Legionella MWY Selective Supplement (ISO) (cod. 423220), ricostituito con 10 mL di acqua purificata sterile.

#### Terreno non selettivo completo di cisteina: BCYE w/L-cysteine

Aggiungere al terreno di base il contenuto di un flacone di Legionella BCYE  $\alpha$ -Growth Supplement (cod. 423210) ricostituito con 50 mL di acqua purificata sterile

#### Terreno non selettivo privo di cisteina: BCYE w/o L-cysteine

Aggiungere al terreno di base il contenuto di un flacone di Legionella BCYE  $\alpha$ -Growth Supplement w/o Cysteine (cod. 423212) ricostituito con 50 mL di acqua purificata sterile.

#### 5 - CARATTERISTICHE FISICHE

##### Legionella BCYE Agar Base (REF 4015822-4015824)

Aspetto del terreno in polvere

polvere nera, omogenea, fine, scorrevole  
nero, opaco.

Aspetto dei terreni in soluzione ed in piastra

##### Legionella BCYE $\alpha$ -Growth Supplement (REF 423210)

Aspetto del liofilizzato

pastiglia di medie dimensioni, rosa  
giallo chiaro, opalescente

Aspetto della soluzione

##### Legionella BCYE $\alpha$ -Growth Supplement w/o Cysteine (REF 423212)

Aspetto del liofilizzato

pastiglia di medie dimensioni, rosa scuro  
giallo chiaro, opalescente

Aspetto della soluzione

##### Legionella GVPC Selective Supplement (REF 423215)

Aspetto del liofilizzato

pastiglia alta, bianca  
incolore, limpida

Aspetto della soluzione

##### Legionella AB Selective Supplement (REF 423225),

Aspetto del liofilizzato

pastiglia alta, bianca  
biancastra, torbida

Aspetto della soluzione

##### Legionella MWY Selective Supplement (ISO) (REF 423220),

Aspetto del liofilizzato

pastiglia alta, bluastro  
blu, torbida

Aspetto della soluzione

pH finale a 25°C dei terreni completi

6,8  $\pm$  0,2

#### 6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezioni
Legionella BCYE Agar Base	Terreno disidratato	4015822	500 g (20 L)
		4015824	5 kg (200 L)
Legionella BCYE $\alpha$ -Growth Supplement	Supplemento liofilizzato	423210	4 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Legionella BCYE $\alpha$ -Growth Supplement w/o Cysteine	Supplemento liofilizzato	423212	4 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Legionella GVPC Selective Supplement	Supplemento liofilizzato	423215	4 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Legionella AB Selective Supplement	Supplemento liofilizzato	423225	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno Solo per analisi delle acque
Legionella MWY Selective Supplement (ISO)	Supplemento liofilizzato	423220	4 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno Solo per analisi delle acque

#### 7 - 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.





## 8 - CAMPIONI

Legionella BCYE Agar Base, Legionella BCYE  $\alpha$ -Growth Supplement ed il supplemento selettivo GVPC sono destinati all'esame batteriologico di diversi campioni clinici di origine umana quali quelli del tratto respiratorio inferiore: liquido pleurico, aspirati bronchiali e fluido di lavaggio alveolare bronchiale (BAL), campioni di tessuto polmonare e biopsie.<sup>1,12</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.

Legionella BCYE Agar Base, Legionella BCYE  $\alpha$ -Growth Supplement ed i supplementi selettivi GVPC, MWY-ISO ed AB sono destinati al conteggio di *Legionella* in diverse tipologie di acque: potabili, naturali, industriali, reflue ed in 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.

Legionella BCYE Agar Base addizionato di Legionella BCYE  $\alpha$ -Growth Supplement w/o Cysteine, deve essere inoculato con colonie coltivate su terreno di isolamento selettivo o non selettivo per la prova di conferma di *Legionella*.

## 9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

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

### Isolamento da campioni clinici<sup>1,12</sup>

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

- Diluire il campione 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 fosse molto denso, deve essere ri-sospeso con 0,2-1 mL di fluidificante a base di ditioneitol.
- 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 terreno selettivo.

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.

### Conteggio nei campioni di acqua<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 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 con L-cisteina<sup>A</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>A</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.

PIASTRE PREPARETE COME SOPRA DESCRITTO O PIASTRE PRONTE ALL'USO BIOLIFE: <sup>A</sup> 549945 LEGIONELLA AGAR (BCYE); \*549947 LEGIONELLA AB SELECTIVE AGAR; \*\*549995 o 499995 LEGIONELLA SELECTIVE AGAR-GVPC \*\*\* 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. spiritensis*),<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 (piastre preparate come sopra descritto o piastre pronte all'uso Biolife REF 549943) e su piastre di Legionella Agar (BCYE) (piastre preparate come sopra descritto o piastre pronte all'uso Biolife 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>

## 10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

### Esame delle piastre

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>

#### 11 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto dei prodotti qui descritti è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà 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. La scelta dei ceppi di *Legionella* e microrganismi non target deve essere in funzione del terreno (selettivo o non selettivo) preparato. Consultare la letteratura citata per le procedure di controllo qualità.<sup>4,13-15</sup>

#### 12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di terreno in polvere Legionella BCYE Agar Base REF 401582 (Test Batch-TB) addizionato di BCYE  $\alpha$ -Growth Supplement e di Legionella GVPC Selective Supplement è testato per la produttività e la selettività, comparando i risultati con un lotto precedentemente approvato ed addizionato dei medesimi supplementi (Reference Batch-RB).

La produttività del Test Batch-TB è valutata con metodo quantitativo 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 acquosa 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 enumerate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività ( $Pr = CFU_{TB} / CFU_{RB}$ ). Se  $Pr \geq 0,7$  i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La produttività di Legionella BCYE Agar Base REF 401582 è valutata anche con la sola aggiunta di BCYE  $\alpha$ -Growth Supplement con un ceppo target: *L. pneumophila* ATCC 33152 con i medesimi criteri di accettazione descritti sopra per il terreno addizionato anche di GVPC. Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato appropriate diluizioni di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non-target: *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *C. albicans* ATCC 18804. Dopo incubazione a 35-37°C per 72 ore in aerobiosi, *S. aureus*, *E. faecalis* ed *E. coli* risultano completamente inibiti mentre *P. aeruginosa* e *C. albicans* risultano parzialmente inibiti.

#### 13 - LIMITI DEL METODO

- Alcune Legionelle non possono essere coltivate sui normali terreni di coltura e sono state definite Legionella-like amoebal pathogens (LLAPs), perché crescono in alcune specie di ameba.<sup>16</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>
- I terreni contenenti glicina, possono inibire alcuni ceppi di *Legionella* non *pneumophila*.<sup>17</sup>
- I terreni selettivi BCYE che contengono vancomicina potrebbero non supportare la crescita di tutte le specie di *Legionella*.<sup>18</sup>
- Le prestazioni dei terreni di coltura sono un fattore critico nell'isolamento delle legionelle da campioni respiratori. È stato riportato<sup>3</sup> che BMPA e MWY hanno prodotto tassi di isolamento significativamente più elevati rispetto ai terreni GVPC e BCYE non selettivi, con campioni contenenti un numero ridotto di Legionelle e alti livelli di contaminanti.
- 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>1,12,19</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 ed i supplementi qui descritti sono 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.

#### 14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura disidratato ed i supplementi BCYE, BCYE senza cisteina e GVPC sono diagnostici *in vitro* di tipo qualitativo; i supplementi AB e MWY sono solo per controllo microbiologico. I prodotti qui descritti sono per uso professionale e devono essere utilizzati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il terreno di coltura e i supplementi qui descritti devono essere usati congiuntamente in accordo ai metodi di preparazione indicati.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura in piastra, in provetta ed in flacone.
- I terreni in polvere ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza.
- Trattare 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 contaminanti come terreno di coltura, supplemento o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno di base, i supplementi non utilizzati ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti qui descritti sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it).





- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego dei prodotti, 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.

## 15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

### Terreno in polvere

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

### Supplementi

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; non utilizzare oltre questa data. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Esaminare il prodotto liofilo ed il prodotto ricostituito al momento dell'uso e scartare se vi fossero segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

L'utilizzatore è responsabile del ciclo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia (piastre/flaconi/provette), dei supplementi impiegati e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

Secondo la norma ISO 11731<sup>4</sup>, le piastre preparate in laboratorio possono essere conservate a  $5 \pm 3$  °C in contenitori ermetici al buio:

BCYE con cisteina: fino a 3 mesi

BCYE-senza cisteina: fino a 3 mesi

BCYE-GVPC: fino a 4 settimane

BCYE-MWY: fino a 4 settimane

BCYE-AB: fino a 3 mesi

## 16 - BIBLIOGRAFIA

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 P.J.L, 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 $\alpha$ -GROWTH SUPPLEMENT

SDS rev 2

Regolamento (UE) 2020/878

### Miscela contenente il composto pericoloso potassio idrossido

#### Classificazione

Classificazione e indicazioni di pericolo:

Sostanza o miscela corrosiva per i metalli, categoria 1	H290	Può essere corrosivo per i metalli.
Corrosione cutanea, categoria 1A	H314	Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
Lesioni oculari gravi, categoria 1	H318	Provoca gravi lesioni oculari.



**Etichettatura**

## Pittogramma



Avvertenze: Pericolo

Indicazioni di pericolo:

H290 Può essere corrosivo per i metalli.

H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

Consigli di prudenza:

P260 Non respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P303+P361+P353 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle [o fare una doccia].

P280 Indossare guanti / indumenti protettivi e proteggere gli occhi / il viso.

P310 Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI / un medico / . . .

P264 Lavare accuratamente . . . dopo l'uso.

**423212 LEGIONELLA BCYE  $\alpha$ -GROWTH SUPPLEMENT W/O CYSTEINE**

SDS rev 2

Regolamento (UE) 2020/878

**Miscela contenente il composto pericoloso potassio idrossido****Classificazione**

Classificazione e indicazioni di pericolo:

Sostanza o miscela corrosiva per i metalli, categoria 1

H290 Può essere corrosivo per i metalli.

Tossicità acuta, categoria 4

H302 Nocivo se ingerito.

Corrosione cutanea, categoria 1A

H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

Lesioni oculari gravi, categoria 1

H318 Provoca gravi lesioni oculari.

**Etichettatura**

Avvertenze: Pericolo

Indicazioni di pericolo:

H290 Può essere corrosivo per i metalli.

H302 Nocivo se ingerito.

H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

Consigli di prudenza:

P260 Non respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P303+P361+P353 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle [o fare una doccia].

P280 Indossare guanti / indumenti protettivi e proteggere gli occhi / il viso.

P310 Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI / un medico / . . .

P264 Lavare accuratamente . . . dopo l'uso.

**42315 LEGIONELLA GVPC SELECTIVE SUPPLEMENT**

SDS rev 3

Regolamento (UE) 2020/878

**Miscela contenente il composto pericoloso cicloeximide****Classificazione**

Mutagenicità sulle cellule germinali, categoria 2

H341 Sospettato di provocare alterazioni genetiche.

Tossicità per la riproduzione, categoria 1A

H360 Può nuocere alla fertilità o al feto.

Tossicità acuta, categoria 3

H301 Tossico se ingerito.

Pericoloso per l'ambiente acquatico, tossicità cronica, categoria 3

H412 Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.



**Etichettatura**

## Pittogramma



## Avvertenza Pericolo

## Indicazioni di pericolo

H341	Sospettato di provocare alterazioni genetiche.
H360	Può nuocere alla fertilità o al feto.
H301	Tossico se ingerito.
H412	Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

Uso ristretto agli utilizzatori professionali.

## Consigli di prudenza:

P201	Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
P280	Indossare guanti / indumenti protettivi e proteggere gli occhi / il viso.
P308+P313	IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
P301+P310	IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI / un medico / . . .
P264	Lavare accuratamente . . . dopo l'uso.
P273	Non disperdere nell'ambiente.

**423225 LEGIONELLA AB SELECTIVE SUPPLEMENT**

SDS rev 1

Regolamento (UE) 2020/878

**Miscela contenente il composto pericoloso cefazolina sodica****Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008**

Sensibilizzazione respiratoria, categoria 1	H334	Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.
Sensibilizzazione cutanea, categoria 1	H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.

**Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008**

## Pittogramma



## Avvertenza Pericolo

## Indicazioni di pericolo

H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
H334	Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.

## Consigli di prudenza

P261	Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.
P280	Indossare guanti protettivi.
P342+P311	In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI / un medico / . . .
P304+P340	IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.
P333+P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P362+P364	Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

<b>REF</b> Numero di catalogo	o REF	<b>LOT</b> Numero di lotto	<b>IVD</b> Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Lato superiore	Proteggere dall'umidità
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Proteggere dalla luce	Fragile, maneggiare con cura	

**CRONOLOGIA DELLE REVISIONI**

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 11	Aggiornamento del contenuto e del layout	10/2020
Revisione 12	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità", simbologie di pericolo	04/2022
Revisione 13	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023
Revisione 14	Aggiornamento del pH finale dei terreni, inclusione delle condizioni di conservazione delle piastre preparate dagli utenti, precauzioni e avvertenze specificando i prodotti IVD e non IVD.	04/2024

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

