

**ISTRUZIONI PER L'USO****LEGIONELLA GVPC SELECTIVE SUPPLEMENT****Supplemento selettivo liofilo****1 - DESTINAZIONE D'USO**

Diagnostico *in vitro*. Miscela di antimicrobici da aggiungere a Legionella BCYE Agar Base per l'isolamento ed il conteggio di *Legionella* spp. in campioni clinici e nelle acque.

2 - COMPOSIZIONE - 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

Legionella GVPC Antimicrobial Supplement è una miscela liofila di composti antimicrobici da utilizzare come supplemento del terreno BCYE Agar Base (REF 401582) per l'isolamento ed il conteggio di *Legionella* spp. in campioni clinici e nelle acque.

La glicina e la polimixina B sono inibitori dei batteri Gram-negativi, la vancomicina sopprime la crescita dei batteri Gram positivi, mentre la cicloesimide, è inclusa come composto antifungino.

4 - METODO DI PREPARAZIONE DEL TERRENO COMPLETO

Ricostituire il contenuto di un flacone di Legionella GVPC Selective Supplement con 10 mL di acqua purificata sterile.

Aggiungere a 450 mL di Legionella BCYE Agar Base (REF 401582) autoclavato a 121°C per 15 minuti e raffreddato a 47-50°C con le precauzioni dell'asepsi. Aggiungere inoltre il contenuto di un flacone di Legionella BCYE α -Growth Supplement (cod. 423210) ricostituito con 50 mL di acqua purificata sterile. Mescolare bene e distribuire in piastre di Petri sterili

5 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto del liofilizzato	pastiglia alta, bianca
Aspetto della soluzione	incolore, limpida

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Legionella GVPC Selective Supplement	Supplemento liofilizzato	423215	4 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Legionella BCYE Agar Base (REF 401582), autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse e tamponi sterili da microbiologia, reattivi per il trattamento dei campioni, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione completa delle colonie.

8 - CAMPIONI

Il terreno completo è destinato all'esame batteriologico di diversi campioni clinici di origine umana^{1,2} e per il conteggio di *Legionella* in diverse tipologie di acque³

Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

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

Isolamento da campioni clinici^{1,2}

Inoculare circa 0,1 mL del campione trattato 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.

Per i dettagli operativi consultare la bibliografia citata e le istruzioni per l'uso del terreno disidratato (REF 401582)

Conteggio nei campioni di acqua³

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. Per i dettagli operativi consultare la bibliografia citata e le istruzioni per l'uso del terreno disidratato (REF 401582).

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie.

Per i dettagli consultare la bibliografia citata e le istruzioni per l'uso del terreno disidratato (REF 401582)

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.^{4,5,6}

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Legionella GVPC Selective Supplement (Test Batch-TB) addizionato al terreno in polvere Legionella BCYE Agar Base REF 401582, e con l'aggiunta di BCYE α -Growth 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 salina 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.

Per valutare la selettività del supplemento vengono seminate con metodo Miles Misra modificate 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.⁷
- 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 CO₂ superiori al 2,5% poiché la crescita di *L.pneumophila* può essere inibita.⁸
- I terreni contenenti glicina, possono inibire alcuni ceppi di *Legionella* non *pneumophila*.⁹
- I terreni selettivi BCYE che contengono vancomicina potrebbero non supportare la crescita di tutte le specie di *Legionella*.¹⁰
- 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.^{1,2,11}
- 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 il supplemento 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 supplemento qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il prodotto qui descritto è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente; consultare la Scheda di Sicurezza prima dell'uso.
- Il supplemento GVPC ed il terreno di base devono essere usati in associazione secondo le indicazioni sopra descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Il supplemento GVPC è sottoposto a sterilizzazione con membrana filtrante.
- Porre molta attenzione nell'apertura della ghiera metallica per evitare lesioni.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il supplemento, i terreni di coltura e con gli agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione; smaltire il supplemento non utilizzato ed i terreni di coltura seminati con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il supplemento GVPC come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano e animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito 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 del prodotto, 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

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 processo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

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.
2. Public Health England. UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of Legionella species. ID18, Issue no: 3, Issue date: 14.04.15 Microbiology; 2015.
3. ISO 11731:2017 Water quality — Enumeration of Legionella
4. ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media
5. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004.
6. The Australian Society for Microbiology. Guidelines for Assuring Quality of Medical Mycological Culture Media. 2012
7. Legionella and the prevention of legionellosis- Edited by: Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, Surman-Lee S. World Health Organization 2007.
8. 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





9. 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
10. 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-
11. 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.

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

Tossicità per la riproduzione, categoria 1A

Tossicità acuta, categoria 3

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

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.

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.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 2	Aggiornamento del contenuto e del layout	12/2021
Revisione 3	Rimozione classificazione obsoleta	04/2023

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

