



LEGIONELLA AB SELECTIVE SUPPLEMENT

Supplemento selettivo liofilo

1 - DESTINAZIONE D'USO

Miscela di antimicrobici da aggiungere a Legionella BCYE Agar Base per il conteggio di *Legionella* spp. nelle acque in accordo alla norma ISO 11731

2 - COMPOSIZIONE - CONTENUTO DEL FLACONE (PER 500 ML DI TERRENO)

Cefazolina	4,5 mg
Pimaricina (natamicina)	35,0 mg
Polimixina B	40.000 UI

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Legionella AB Selective Supplement è una miscela liofilizzata di composti antimicrobici da utilizzare come additivo al BCYE Agar Base (REF 401582) addizionato con Legionella BCYE α Growth Supplement (REF 423210), per l'isolamento e l'enumerazione di *Legionella* spp. in campioni d'acqua, in conformità alla norma ISO 11731.¹

La polimixina B è un inibitore dei batteri Gram-negativi, la cefazolina è attiva contro i batteri Gram-positivi e alcuni Gram-negativi e la pimaricina (natamicina) è utilizzata come agente antimicotico.

4 - METODO DI PREPARAZIONE DEL TERRENO COMPLETO

Ricostituire il contenuto di un flacone di Legionella AB Selective Supplement con 5 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	biancastra, torbida

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Legionella AB Selective Supplement	Supplemento liofilizzato	423225	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Legionella BCYE Agar Base (REF 401582), Legionella BCYE α -Growth Supplement (code 423210), 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'enumerazione di *Legionella* in diversi tipi di acqua: potabili, naturali, industriali, reflue ed in campioni correlati all'acqua (ad esempio biofilm, sedimenti, ecc.). Consultare la norma ISO 11731 per i metodi di campionamento e le procedure di trattamento dei campioni.¹ Applicare le buone pratiche 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.

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 semina dei campioni con il terreno BCYE-AB sono riassunte di seguito.¹

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[^] 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[^], 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***).

Lasciare assorbire bene l'inoculo quindi incubare le piastre capovolte in atmosfera umida a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 11731¹ o ad altre linee guida applicabili.

PIASTRE PREPARATE IN LABORATORIO O PIASTRE PRONTE ALL'USO BIOLIFE: [^] 549945 LEGIONELLA AGAR (BCYE); *549947 LEGIONELLA AB SELECTIVE AGAR; **549995 or 499995 LEGIONELLA SELECTIVE AGAR-GVPC *** 549948 LEGIONELLA SELECTIVE AGAR MWY-ISO

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 14.¹ 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 11731.¹

Conferma delle colonie

Dopo l'incubazione, considerare come *Legionella* spp. le colonie che 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.⁴

11 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto 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. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO		INCUBAZIONE T° / t / ATM	SPECIFICHE
<i>L. pneumophila</i>	ATCC 33152	35-37 °C / 44-48 H / A	crescita
<i>L. anisa</i>	ATCC 35292	35-37 °C / 3-5 days / A	crescita
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	35-37 °C / 3 days / A	parziale inibizione
<i>E. faecalis</i>	ATCC 319433	35-37 °C / 3 days / A	totalmente inibito

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Legionella AB 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 il terreno non selettivo BCYE (Reference Batch-RB).

La produttività del Test Batch-TB è valutata con metodo quantitativo con i seguenti ceppi target: *L. pneumophila* ATCC 33152, *L. anisa* ATCC 35292. Il lotto di prova ed il lotto di riferimento vengono inoculati con appropriate diluizioni decimali in acqua 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 $Pr \geq 0,5$ i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

Per valutare la selettività del supplemento 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, *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans* sono totalmente inibiti, mentre *S. aureus* e *P. aeruginosa* sono parzialmente inibiti.

13 - LIMITI DEL METODO

- 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.
- 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.²
- 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.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il supplemento qui descritto è per controlli microbiologici e per uso professionale; 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 AB 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 AB 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.
- 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 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 AB 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.
- 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).

Secondo la norma ISO 11731¹, le piastre preparate in laboratorio con il supplemento AB possono essere conservate a 5 ± 3 °C in contenitori ermetici al buio per un massimo di 3 mesi.

16 - BIBLIOGRAFIA

1. ISO 11731:2017 Water quality — Enumeration of Legionella
2. 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.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 2	Aggiornamento del contenuto e del layout	12/2021

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

