

## LEGIONELLA SELETTIVO ISO11731-2:2004 : per l'isolamento di *Legionella spp.* da campioni ambientali e clinici

REF	CONFEZIONE
1077	20 piastre 90 mm
20200	10 contact 55 mm (senza menisco)
2277	10 piastre 60 mm
4077	10 piastre contact 55 mm
6650	Disidratato (agar base) 500 gr

### PRINCIPIO

La Legionella non cresce nei comuni terreni da batteriologia compreso il sangue Columbia. Il carbone attivo presente inattiva il perossido d'idrogeno tossico e i radicali superossido. La L-cisteina, un aminoacido contenente gruppi solforici, è utilizzato dal batterio per la sua crescita così come il pirofosfato ferrico. Il tampone ACES serve per stabilizzare il pH a 6,8-6,9, valore ottimale, inoltre l' $\alpha$  chetoglutarato stimola la crescita. Gli antibiotici, presenti nel supplemento, inibiscono la crescita dei microrganismi che fanno parte della flora normale o che si possono trovare in infezioni miste.

### FORMULA

Sono riportati i costituenti del terreno (espressi in grammi) su 900 di acqua deionizzata

Estratto di lievito	10,00
Carbone attivo	2,00
Agar batteriologico	12,00
Potassio idrossido (1)	2,80
L-cisteina(1)	0,40
Buffer ACES(1)	10,0
Ferrico pirofosfato(1)	0,25
$\alpha$ chetoglutarato(1)	1,0
Polimixina(2)	80000 ui
Glicina (2)	3,0
Cicloeximide (2)	0,08
Vancomicina (2)	0,001

pH finale a 25°C :6,8 +/- 0,2

### PREPARAZIONE

Sospendere 12 gr in 450 ml di acqua, scaldare fino ad ebollizione. Sterilizzare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 48°C e aggiungere 5 fiale di (1) LEGIONELLA CYE GROWTH SUPPLEMENT CODICE 6382 ricostituito e 1 fiala (2) LEGIONELLA GVPC SUPPLEMENT CODICE 6395. Miscelare bene e distribuire in contenitori sterili.

### CONSERVAZIONE

Conservare il prodotto pronto a 4-8°C, al riparo della luce.  
Il terreno pronto ha validità 180 giorni.  
Conservare il flacone del disidratato ben chiuso in luogo fresco e secco.

### PROCEDURA

**Procedura per materiali provenienti da siti normalmente sterili** (aspirato transcricotiroideo, spazzolato bronchiale protetto, omogenato da biopsia polmonare) :

- diluire il campione 1:5 in Mueller Hinton Brodo (codice 1160)
- vortexare per 5 -10 secondi e inoculare 100  $\mu$ l su LEGIONELLA SELETTIVO (codice 1077) e LEGIONELLA BCYE (codice 20500)

**Procedura per campioni provenienti da siti contaminati** ( espettorato , aspirato bronchiale, broncolavaggio alveolare ) :

- Diluire 1:10 il campione in Mueller Hinton Brodo (codice 1160) ; per il broncolavaggio centrifugare a 1500 giri per 15 minuti, scartare il sovrantante, risospingere il pellet vortexando e prelevare 2 ml.
- vortexare per 5 -10 secondi e inoculare 100  $\mu$ l su LEGIONELLA SELETTIVO (codice 1077) e LEGIONELLA BCYE (codice 20500)
- Ripetere le stesse procedure di diluizione e agitazione con il TAMPONE ACIDO (codice 20709) e inoculare su LEGIONELLA SELETTIVO (codice 1077) e LEGIONELLA BCYE (codice 20500)

### Procedura per campioni ambientali

- Inoculare 100 µl di campione non trattato e 100 µl di campione trattato con Tampone acido o a caldo in doppio su LEGIONELLA SELETTIVO (codice 1077)

### Trattamento con Tampone acido

- Centrifugare 10 ml di campione a 3000 rpm per 20 minuti. Eliminare il sovrantante lasciandone solamente 1 ml
- Aggiungere al pellet 9 ml di Tampone acido (codice 20709) agitare e lasciare a temperatura ambiente per 5 minuti.

### Trattamento a caldo

- Incubare 10 ml di campione a 50°C per 30 minuti.

### Procedura per le acque

#### Semina per filtrazione

- Filtrare un litro di campione di acqua con membrana di policarbonato di 0.22 µm.
- Porre la membrana in un recipiente sterile
- Sonicare per 3 minuti
- Concentrare
- Procedere alla semina diretta o eseguire il trattamento a caldo o con tampone acido sopra riportati.
- Per la semina diretta inoculare 100 µl del concentrato o 100 µl della diluizione 1:10 in PBS BUFFER (codice 20534)
- Incubare a 37°C per 24-72 ore 5 % CO<sub>2</sub>

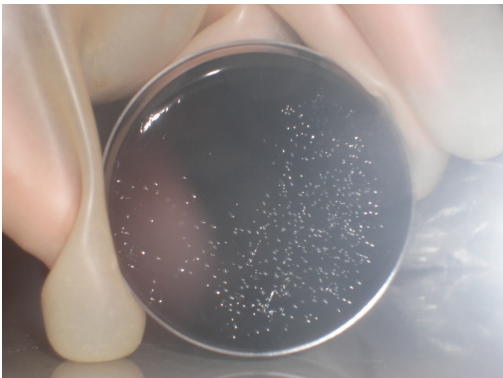
#### Conferma

- Eseguire una subcultura delle colonie sospette in SANGUE COLUMBIA (codice 1023) o in LEGIONELLA BCYE SENZA CISTEINA (codice 20281) e su LEGIONELLA SELETTIVO (codice 1077) o LEGIONELLA BCYE (codice 20500).
- Incubare a 37°C per 3 gg.
- Se dopo tale periodo si osserva crescita microbica sui primi due terreni significa che non siamo in presenza di Legionella in quanto non è in grado di coltivare su terreni privi di cisteina.
- Se invece non si osserva crescita sui primi due terreni, ma si osserva su LEGIONELLA SELETTIVO (codice 1077) o LEGIONELLA BCYE (codice 20500) significa che le colonie analizzate potrebbero essere Legionella.
- Su queste colonie eseguire una colorazione di GRAM MODIFICATA utilizzando come colorante di contrasto la FUCSINA BASICA della Ziehl-Neelsen.

### CONTROLLO DI QUALITA'

Incubazione a 37°C per 24-72 ore 5 % CO<sub>2</sub> Protrarre l'incubazione fino a 10 gg prima di considerare il campione negativo.

Microrganismi	Crescita	Colore Colonie
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC33152	Buona	Bianco



*Legionella pneumophila*

### BIBLIOGRAFIA

E.W.Koneman. Testo Atlante di Microbiologia Diagnostica 2ed 19  
 ISO 11731 – 2:2004 BS 6068-4.18:2004 Water quality - Detection and enumeration of Legionella