

LEGIONELLA BCYE ISO11731: per la coltura di *Legionella spp.*

20500	20 piastre 90 mm
20161	10 piastre 60 mm
20413	10 piastre contact

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' α chetoglutarato stimola la crescita.

FORMULA

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

Estratto di lievito	10,00
Carbone attivo	2,00
Agar batteriologico	12,00
Potassio idrossido	2,80
Buffer ACES	10,0
L- cisteina	0,40
Ferrico pirofosfato	0,25
α chetoglutarato	1,0

pH finale a 25°C :6,8 +/- 0,2

CONSERVAZIONE

Conservare il prodotto a 4-8°C, e al riparo della luce.

Il terreno ha validità 180 giorni.

PROCEDURA

Procedura per materiali provenienti da siti normalmente sterili (aspirato trascricotiroideo, 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 μ 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, risospendere il pellet vortexando e prelevare 2 ml.
- vortexare per 5 -10 secondi e inoculare 100 μ 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 μ l di campione non trattato e 100 μ l 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 % CO₂

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 % CO₂ Protrarre l'incubazione fino a 10 gg prima di considerare il campione negativo.

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

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