

**LEGIONELLA (BCYE) SENZA CISTEINA ISO11731: Per la conferma di *Legionella spp.***

REF	CONFEZIONE
20281	20 piastre 90 mm
20611	10 piastre da 60 mm
6291	Disidratato 500 gr

**PRINCIPIO**

La Legionella non cresce nei comuni terreni da batteriologia compreso il sangue Columbia e in terreni privi di L-cisteina, pertanto si esegue una subcoltura delle colonie sospette su Legionella senza cisteina.

**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
Ferrico pirofosfato	0,25
$\alpha$ 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  $\mu$ 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, risospendere 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  $\mu$ l di campione non trattato e 100  $\mu$ 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 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
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC33152	Nulla

#### **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