

## LEGIONELLA SELECTIVE AGAR LEGIONELLA AGAR Piastre pronte

**IMPIEGO PREVISTO**

Piastre pronte con terreno selettivo (BCYE/GVPC) e non selettivo per l'isolamento di *Legionella* spp.

**LEGIONELLA SELECTIVE AGAR****FORMULA TIPICA ( per litro)**

Carbone attivo	2,0 g
Estratto di lievito	10,0 g
Agar	13,0 g
Potassio idrossido/ Tampone ACES	12,8 g
Pirofosfato ferrico	250,0 mg
L-Cisteina HCl	400,0 mg
Acido alfa-chetoglutarico	1,0 g
Glicina	3,0 g
Vancomicina HCl	1,0 mg
Polimixina B	79.200 UI
Cicloeximide.	80 mg

pH 6,9 ± 0,1

**LEGIONELLA AGAR****FORMULA TIPICA ( per litro)**

Carbone attivo	2,0 g
Estratto di lievito	10,0 g
Agar	13,0 g
Potassio idrossido/ Tampone ACES	12,8 g
Pirofosfato ferrico	250,0 mg
L-Cisteina HCl	400,0 mg
Acido alfa-chetoglutarico	1,0 g

pH 6,9 ± 0,1

**DESCRIZIONE**

La malattia dei legionari colpì i partecipanti al raduno annuale della Legione Americana a Filadelfia il 22 luglio 1976. Dopo l'isolamento del microrganismo chiamato *Legionella*, successivi studi dimostrarono che esso era responsabile di molte polmoniti atipiche mortali.

Il primo terreno sul quale fu possibile coltivare *Legionella* fu descritto da Feeley e coll. nel 1979. Lo stesso autore modificò in seguito il terreno sostituendo l'estratto di carne ed il peptone di caseina con l'estratto di lievito e sostituendo l'amido con il carbone attivo. Questo terreno fu chiamato Charcoal Yeast Extract (CYE) Agar. Successive modifiche al terreno furono apportate da Pasculle e coll. con l'introduzione del tampone ACES per garantire un pH ottimale durante la crescita di *Legionella* e da Edelstein e coll. con l'introduzione dell'idrossido di potassio e dell'acido alfa-chetoglutarico. I terreni qui proposti sono preparati con la base BCYE ed un supplemento di crescita: l'estratto di lievito e l'acido alfa-chetoglutarico favoriscono la crescita delle legionelle, la cisteina HCl ed il pirofosfato ferrico sono fattori essenziali per lo sviluppo di *Legionella*, il carbone agisce come detossificante, il tampone mantiene un pH ottimale durante la crescita microbica; il terreno selettivo contiene polimixina B per l'inibizione dei batteri Gram negativi, la vancomicina, antibiotico a largo spettro e la cicloeximide, un antifungino.

**METODO D'IMPIEGO****CAMPIONI CLINICI**

1- Trasferire il campione il più presto possibile in laboratorio senza esporlo a temperature troppo alte o troppo basse; utilizzare un terreno di trasporto se il campione non può essere processato immediatamente.

2 - Omogeneizzare il campione in Phosphate Buffered Saline (cat. n° 401919)

3 - Osservare al microscopio con la tecnica di immunofluorescenza e con colorazione Gram.

4 - Inoculare i campioni positivi all'immunofluorescenza e senza microrganismi contaminanti su terreno BCYE non selettivo; inoculare i campioni in cui si sia osservata la presenza di contaminanti con o senza presenza di *Legionella* su terreno BCYE selettivo. Utilizzare terreni di coltura in piastra portati preventivamente a temperatura ambiente. Buona regola, nella ricerca di *Legionella* è comunque quella di utilizzare sempre un terreno non selettivo ed un terreno selettivo.

5 - Incubare a 37°C in aerobiosi ed in ambiente umido ed osservare giornalmente per 7 giorni. Le colonie sono normalmente visibili microscopicamente dopo 2 giorni e, macroscopicamente, dopo 3-5 giorni.

**CAMPIONI AMBIENTALI**

1 - Centrifugare 10 ml di campione a 2500 rpm per 20 minuti (utilizzando provette sigillate); asportare il sovrantante lasciandone circa 1 ml.

2 - Risospesare il sedimento aggiungendo 9 ml di tampone HCl-KCl pH 2,2, agitare e lasciare a temperatura ambiente per 5 minuti. Dal sedimento risospeso seminare 0,1 ml su piastre con e senza supplemento selettivo. (Tampone HCl-KCl pH 2,2: 3,9 ml di HCl 0,2M + 25 ml di KCl 0,2 M - aggiustare a pH 2,2 con KOH 1M).

3 - Incubare a 37°C in aerobiosi ed in ambiente umido ed osservare giornalmente per 7 giorni. Le colonie sono normalmente visibili microscopicamente dopo 2 giorni e, macroscopicamente, dopo 3-5 giorni.

**INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Un primo criterio per differenziare le colonie di *Legionella* è costituito dalla loro incapacità a crescere, con rare eccezioni, su terreno privo di L-cisteina; può quindi essere utile la semina concomitante del campione su agar BCYE con e senza supplemento selettivo e su piastre di agar sangue. In alternativa le colonie coltivate su BCYE Agar

possono essere ritrapiantate su agar sangue e BCYE Agar. Le colonie che crescono su BCYE Agar e non su agar sangue possono essere presuntivamente riconosciute come *Legionella*.

Le colonie di *Legionella* appaiono rotonde con bordi interi, lucenti, bombate con 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 tagliato. Osservate sotto lampada UV (366 nm), alcune specie mostrano una autofluorescenza blu-bianca, altre una autofluorescenza rosso vivo. *L.pneumophila* e le legionelle comuni, normalmente non mostrano autofluorescenza. Con il prolungamento del tempo di incubazioni, 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.

Sulle colonie coltivate su terreno BCYE e non su agar sangue eseguire una colorazione Gram fissando lo striscio su vetrino con metanolo e controcolorando a lungo con safranina (Gram Staining kit cat. n° 17PL805525). Le colonie che mostrano bastoncini Gram negativi e che non crescono su agar sangue sono presuntivamente identificate come Legionella.

#### TEST DI CONFERMA

Eseguire il test DFA per la conferma di *Legionella*, utilizzando anticorpi monoclonali polivalenti (sierogruppi 1-14) coniugati con fluoresceina (Prolab cat. n° 17PL242). L'impiego di anticorpi monoclonali assicura una sensibilità ed una specificità elevatissime.

In caso di risposta positiva eseguire la determinazione del sierogruppo 1 con lo specifico anticorpo monoclonale coniugato con fluoresceina ( test DFA Prolab cat n° 17PL241) o se necessario la sierotipizzazione con i singoli anticorpi monovalenti per i sierogruppi dal 2 al 14 (Prolab cat. n° 17PL205 - 17PL283).

Nel caso si desideri utilizzare la tecnica di agglutinazione su vetrino eseguire sulle colonie sospette il test al lattice per il sierogruppo 1 (Prolab cat.n° 17PL226: Legionella Latex Test con anticorpi monoclonali.)

#### NOTE

E' consigliabile l'utilizzo di piastre con terreno selettivo e non selettivo.

I terreni di coltura qui descritti sono impiegati per l'isolamento e l'identificazione presuntiva di *Legionella*; è suggerita l'esecuzione degli appropriati test sierologici per una identificazione completa. Quando si manipolano campioni in cui si sospetta la presenza di *Legionella* evitare la formazione di aerosol, pulire e disinfettare l'area di lavoro.

#### CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare a 2-8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni di deterioramento. Validità dalla data di produzione: 3 mesi

#### PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI

I preparati qui descritti non sono classificati come pericolosi ai sensi della legislazione vigente né contengono sostanze pericolose in concentrazioni  $\geq 1\%$ .

I terreni in piastra qui descritti sono diagnostici *in vitro* per uso professionale e devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni. Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima dell'eliminazione come rifiuto.

#### BIBLIOGRAFIA

- \* Balows et al. (1991) Manual of Clinical Microbiology. ASM, Washington, D.C.
- \* BSI Document 85/53406.
- \* Dennis, P.J.L. et al. (1988) A Laboratory Manual of *Legionella*.
- \* Edelstein, P.H. (1982) J.Clin.Microbiol. 16, 697.
- \* Edelstein, P.H. et al. (1981) J.Clin.Microbiol. 14, 298.
- \* Feeley J. et al (1978) J.Clin.Microbiol. 8, 320.
- \* Feeley J. et al (1979) J.Clin.Microbiol. 10, 437.
- \* Pasculle et al. (1980) J. Inf. Dis. 141, 727.
- \* Wadoswsky et al. (1981) Appl.Envir. Microbiol. 42, 768.
- \* Metodo Regione Lombardia
- \* Ricerca e Det. Legionella in acque per consumo umano (1999).

#### CONFEZIONI

**549995 LEGIONELLA SELECTIVE AGAR**, 20 piastre da 90 mm, confezionate in film plastico, in scatola di cartone.

**549945 LEGIONELLA AGAR**, 20 piastre da 90 mm, confezionate in film plastico, in scatola di cartone.

CODICE CND W0104010405

