

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 - Risospendere 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

