

LEGIONELLA BCYE AGAR BASE**LEGIONELLA BCYE α -GROWTH SUPPLEMENT
LEGIONELLA BCYE α -GROWTH SUPPLEMENT W/O CYSTEINE****LEGIONELLA GVPC SELECTIVE SUPPLEMENT
LEGIONELLA MWY SELECTIVE SUPPLEMENT
LEGIONELLA BMPA SELECTIVE SUPPLEMENT**

Terreno di base, supplementi di crescita e supplementi selettivi per l'isolamento di *Legionella* spp.

LEGIONELLA BCYE AGAR BASE**FORMULA TIPICA** (g per litro)

Carbone attivo	2,0
Estratto di lievito	10,0
Agar	13,0

LEGIONELLA BCYE GROWTH SUPPLEMENT**FORMULA** (per fiala da 500 ml)

Tampone ACES /Potassio idrossido	5,0 g
Pirofosfato ferrico	125 mg
L-Cisteina HCl	200 mg
Acido alfa-chetoglutarico	0,5 g

**LEGIONELLA BCYE GROWTH SUPPLEMENT
W/O CYSTEINE****FORMULA** (per fiala da 500 ml)

Tampone ACES /Potassio idrossido	5,0 g
Pirofosfato ferrico	125 mg
Acido alfa-chetoglutarico	0,5 g

LEGIONELLA GVPC SELECTIVE SUPPLEMENT**FORMULA** (per fiala da 500 ml)

Glicina	1,5 g
Vancomicina	0,5 mg
Polimixina B	39600 UI
Cicloeximide	40 mg

LEGIONELLA MWY SELECTIVE SUPPLEMENT**FORMULA** (per fiala da 500 ml)

Glicina	1,5 g
Vancomicina	0,5 mg
Polimixina B	3,2 mg
Natamicina	100 mg
Bromotimolo blu	5,0 mg
Bromocresolo porpora	5,0 mg

LEGIONELLA BMPA SELECTIVE SUPPLEMENT**FORMULA** (per fiala da 500 ml)

Cefamandolo	2,0 mg
Polimixina B	5,0 mg
Natamicina	100 mg

PREPARAZIONE

Sciogliere 12,5 g di Legionella BCYE Agar Base (cod. 401582) in 450 ml di acqua distillata fredda. Portare delicatamente ad ebollizione sotto agitazione fino a dissoluzione completa del terreno. Autoclavare a 121 °C quindi raffreddare a 45-50 °C ed aggiungere:

TERRENO SELETTIVO PER L'ISOLAMENTO: BCYE- GVPC

* il contenuto di un flacone di Legionella BCYE α -Growth Supplement (cod. 423210) ricostituito secondo le indicazioni riportate nella confezione.

* il contenuto di un flacone di Legionella GVPC Selective Supplement (cod. 423215) ricostituito secondo le indicazioni riportate nella confezione.

TERRENO SELETTIVO PER L'ISOLAMENTO: BCYE- MWP

* il contenuto di un flacone di Legionella BCYE α -Growth Supplement (cod. 423210) ricostituito secondo le indicazioni riportate nella confezione.

* il contenuto di un flacone di Legionella MWY Selective Supplement (cod. 42ISLG2-A), ricostituito secondo le indicazioni riportate sui flaconi.

TERRENO SELETTIVO PER L'ISOLAMENTO BCYE-BMPA

* il contenuto di un flacone di Legionella BCYE α -Growth Supplement (cod. 423210) ricostituito secondo le indicazioni riportate nella confezione.

* il contenuto di un flacone di Legionella BMPA Selective Supplement (cod. 42ISLG3-A), ricostituito secondo le indicazioni riportate sui flaconi.

TERRENO NON SELETTIVO COMPLETO DI CISTEINA PER LA PROVA DI CONFERMA: BCYE

* il contenuto di un flacone di Legionella BCYE α -Growth Supplement (cod. 423210) ricostituito secondo le indicazioni riportate nella confezione.

TERRENO NON SELETTIVO PRIVO DI CISTEINA PER LA PROVA DI CONFERMA: BCYE W/O CYSTEINE

* il contenuto di un flacone di Legionella BCYE α -Growth Supplement w/o Cysteine (cod. 423212) ricostituito secondo le indicazioni riportate nella confezione.

Mantenendo il terreno sotto agitazione, distribuire in piastre Petri sterili. Il terreno appare omogeneamente opaco di colore nero.

Il pH dei terreni così preparati deve essere $6,9 \pm 0,1$

PREPARAZIONE DEL TERRENO PRONTO ALL'USO IN FLACONE

In un bagnomaria termoregolato a 100°C introdurre i flaconi richiesti e riscaldare fino ad ebollizione ed a dissoluzione completa. Raffreddare a 45-50°C, aggiungere i supplementi richiesti come indicato nel capito precedente frazionando il contenuto delle fiale dei supplementi. Miscelare bene e versare in piastre sterili.

INTRODUZIONE

Le Legionelle sono bacilli Gram-negativi aerobi obbligati non fermentanti, mobili per uno o più flagelli sia laterali sia polari, generalmente delle dimensioni di 1,5 - 5 per 0,3 - 0,9 μm , ma che possono presentare anche forme filamentose.

Sono microrganismi difficilmente coltivabili che richiedono terreni contenenti L-cisteina, sali di ferro, carbone attivo ed estratto di lievito e che possono essere resi selettivi mediante l'aggiunta di antibiotici ed antimicotici.

Le Legionelle sono sempre state isolate in ambiente umido e mai in ambiente secco. Sono associate all'acqua superficiale, termale e a quella delle apparecchiature dell'aria condizionata, ma sono state comunque riscontrate anche nell'acqua potabile in modo particolare in quella di rubinetti, docce e nebulizzatori di ambienti ospedalieri.

Legionelle sono state isolate da campioni di masse d'acqua (laghi, fiumi, corsi d'acqua, acque termali) e di acque stagnanti a temperature comprese fra 5,7°C e 63°C e a pH compresi tra 5,4 e 8,1.

Esistono prove sicure che *Legionella pneumophila* ha la capacità di moltiplicarsi nell'acqua (specialmente in quella calda) dei sistemi di distribuzione dell'acqua potabile, sia di grandi dimensioni (a livello di ospedali, alberghi, ecc.) sia di piccole dimensioni (a livello di case private).

Le sezioni caldo-umide dei sistemi di raffreddamento per il condizionamento dell'aria e gli umidificatori dell'aria stessa nei sistemi di ventilazione costituiscono una nicchia ecologica rilevante quali veicoli di diffusione di *Legionella spp*

Alcune epidemie di legionellosi sono state imputate all'utilizzo di acqua riscaldata, contaminata da *Legionella pneumophila* in vasche da idromassaggio e/o piscine.

"Legionellosi" è la definizione di tutte le forme morbose causate da batteri Gram-negativi aerobi del genere *Legionella*. Essa si può manifestare sia in forma di polmonite, sia in forma febbrile extrapolmonare o in forma subclinica. La specie più frequentemente coinvolta in casi umani è *Legionella pneumophila*. Oltre a *L. pneumophila*, di cui si conoscono 15 sierogruppi differenti, sono state isolate altre specie di Legionella nel corso di infezioni nell'uomo, quali *L. micdadei* e *L. feeleii* (entrambe responsabili di casi sporadici di pneumopatia acuta), *L. bozemanii*, *L. jordanis* e *L. hackeliae* (tutte responsabili, probabilmente, sia di casi di pneumopatia sia di febbre di Pontiac)

La coltura è la tecnica di riferimento per la diagnosi di laboratorio, possiede specificità del 100 % ed una sensibilità variabile con le caratteristiche del campione studiato e con le procedure adottate. Infatti la carica batterica è spesso minima, l'eventuale flora batterica contaminante può mascherare la presenza di *Legionella*, la selettività dei terreni può ostacolare la crescita di alcune specie.

Sono consigliabili per un' esecuzione ottimale sia l'uso di terreni selettivi che non selettivi, il pretrattamento per campioni contaminati e una minima diluizione che serve per allontanare sostanze inibenti la crescita. Per quanto riguarda la diluizione va ricordato che la soluzione fisiologica può inibire lo sviluppo di *Legionella*.

I terreni selettivi raccomandati per la ricerca di *Legionella* in campioni clinici ed ambientali sono quelli che impiegano i supplementi selettivi GVPC o MWY.

PROCEDURE

Procedura per la coltura su materiali non contaminati (aspirato trascricotiroideo, spazzolato bronchiale protetto, omogenato da biopsia polmonare) :

1. diluire 1:5 in Mueller Hinton Broth
2. vortexare per 5 -10 secondi e seminare 0,1 ml su BCYE selettivo e su BCYE non selettivo.

Procedura per la coltura su materiali potenzialmente contaminati (espettorato, aspirato bronchiale, broncolavaggio alveolare) :

1. non utilizzare gli usuali criteri microscopici di valutazione dell'idoneità dell'espettorato alla coltura ed analizzare sempre il campione
2. diluire 1 :10 espettorato o aspirato tracheale in Mueller Hinton Broth. Il broncolavaggio alveolare va prima centrifugato a 1500 g per 15 minuti e si utilizzano i residui 2 ml dopo risospensione con vortex.
3. vortexare per 5 -10 secondi e seminare 0,1 ml su BCYE non selettivo, su BCYE selettivo.
4. ripetere le stesse procedure di diluizione e agitazione con Vortex con la soluzione acida a pH 2,2 e seminare le stesse piastre

Procedura per campioni ambientali (acqua, incrostazioni, filtri da impianti di condizionamento ecc.)

Seminare 0,1 ml di campione tal quale e 0,1 ml di campione trattato con acidi o a caldo, in doppio su terreno selettivo.

Trattamento acido:

1. Centrifugare 10 ml di campione a 3000 r.p.m. per 20 minuti ed asportare il sovrantante lasciandone circa 1 ml.
2. Al sedimento aggiungere 9 ml di tampone HCl-KCl pH 2,2, agitare delicatamente e lasciare a temperatura ambiente per 5 minuti. 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.

Trattamento a caldo:

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

Tempi e ambiente di incubazione

incubare a 35 - 37°C in atmosfera <5% di CO₂ (il CO₂ è tossico per concentrazioni > 5%; piuttosto che concentrazioni di CO₂ ≥ 5% meglio incubare in aria) e con umidità elevata. Se si utilizza un termostato a CO₂ verificare l'acqua nella vaschetta, se si utilizza una giara creare umidità con una provetta aperta di acqua distillata; in alternativa chiudere le piastre in buste di plastica per evitarne l'essiccamento. Leggere giornalmente e protrarre l'osservazione fino a 10 giorni prima di considerare negativa la coltura.

Per analisi di campioni di acque in regime di accreditamento, seguire le istruzioni delle norme ISO applicabili (ISO 11731 ed ISO 11731-2).

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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 un' autofluorescenza blu-bianca, altre un' autofluorescenza rosso vivo. *L.pneumophila* e le legionelle comuni, normalmente non mostrano autofluorescenza. Con il prolungamento del tempo d' incubazione, 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.

TEST DI CONFERMA

Un primo criterio per differenziare le colonie di *Legionella* è costituito dalla loro incapacità di crescere, con rare eccezioni, su terreno BCYE privo di cisteina o su agar-sangue.

Le colonie coltivate sui terreni selettivi (almeno 3-5 colonie per piastra) devono quindi essere trapiantate sulle seguenti piastre :

Terreno non selettivo BCYE completo (preparato come sopra descritto)

Terreno non selettivo BCYE senza cisteina (preparato come sopra descritto)

Incubare detti terreni a 36°C ± 2°C per 2 giorni

Le colonie che crescono su terreno non selettivo BCYE completo e non crescono su terreno non selettivo BCYE senza cisteina sono da considerare come appartenenti al genere *Legionella*.

Su tali colonie eseguire una colorazione Gram modificata, utilizzando come colorante di contrasto la fucsina basica della colorazione Ziehl Neelsen: Crystal Violet (17PL7000) – Soluzione di Lugol (17PL7052) – Ziehl Neelsen Carbol Fucsina (17PL7018)

TEST DI IDENTIFICAZIONE

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 1 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 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 per un' 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.

Criteri di identificazione di *Legionella* (*)

	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Legionella micdadei</i>	<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Legionella gormanii</i>	<i>Legionella lonbeachae</i>	<i>Legionella jordanis</i>
BCYE agar (crescita)	+	+	+	+	+	+	+
Terreno senza cisteina o Agar sangue	-	-	-	-	-	-	-
Fluorescenza 366 nm	-	+	-	+	+	-	-
Ossidasi	±	-	+	-	-	+	+
Catalasi	+	+	+	+	+	+	+
Ureasi	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinasi	+	+	-	+	+	+	+
β-lattamasi	+	±	-	+	+	±	+
Idrolisi ippurato	+	-	-	-	-	-	-

(*) Regione Lombardia Direzione Generale della Sanità , Servizio Prevenzione Sanitaria. Sorveglianza e Controllo delle legionellosi, 5 Novembre 1999.

CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE (TERRENI SELETTIVI)

Microrganismo

L.pneumophila ATCC 33152

Incubazione

48-72 ore 35°C, aerobiosi

Risultati

crescita, colonie bianco-grigie/blu-grigie

CONSERVAZIONE

Terreno in polvere: conservare a 10-30°C al riparo della luce, in luogo asciutto. In queste condizioni il terreno è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento della polvere ecc.). Conservare le piastre preparate in laboratorio per un massimo di 7 giorni a 2-8°C.

Supplementi: conservare il supplemento fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, a 2 - 8°C.

Terreno pronto in flacone e piastre pronte: conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI

Terreno in polvere: il preparato qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente né contiene sostanze pericolose in concentrazioni ≥1%. Come per tutti i terreni in polvere anche la manipolazione di questo terreno deve essere effettuata con una adeguata protezione delle vie respiratorie.

Supplementi:

Legionella BCYE α-Growth Supplement e Legionella BCYE α-Growth Supplement non sono classificati come pericolosi ai sensi della legislazione vigente né contengono sostanze pericolose in concentrazioni ≥1%.

Legionella GVP Selective Supplement contiene cicloeximide ed è classificato come T (tossico) ai sensi della legislazione vigente. Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

Piastre pronte e flaconi all'uso: i preparati qui descritti non sono classificati come pericolosi ai sensi della legislazione vigente né contengono sostanze pericolose in concentrazioni ≥1%.

I prodotti qui descritti sono per uso diagnostico *in vitro* 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 il loro 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.
- ISO 11731: 1998 Water quality — Detection and enumeration of *Legionella*.
- ISO 11731-2: 2004 Water quality — Detection and enumeration of *Legionella* – Part 2 Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts.
- Pasculle et al. (1980) J. Inf. Dis. 141, 727
- Regione Lombardia Direzione Generale della Sanità , Servizio Prevenzione Sanitaria. Sorveglianza e Controllo delle legionellosi, 5 Novembre 1999.
- Wadoswsky et al. (1981) Appl.Envir. Microbiol. 42, 768

CONFEZIONI

TERRENO DI BASE IN POLVERE

4015822 LEGIONELLA BCYE AGAR BASE 500 g (20 l)

TERRENO DI BASE PRONTO IN FLACONE

5215823 LEGIONELLA BCYE AGAR BASE 6 flaconi da 180 ml

5215822 LEGIONELLA BCYE AGAR BASE 6 flaconi da 90 ml

SUPPLEMENTI DI CRESCITA

423210 LEG. BCYE α GROWTH SUPPLEMENT 4 fiale ciascuna per 500 ml di terreno

423212 LEG. BCYE α GROWTH SUPPL. W/O CYTEINE 4 fiale ciascuna per 500 ml di terreno

SUPPLEMENTI SELETTIVI

423215 LEGIONELLA GVPC SEL. SUPPL. 4 fiale, ciascuna per 500 ml di terreno

42ISLG2-A LEGIONELLA MWY SEL. SUPPL. 10 fiale, ciascuna per 500 ml di terreno *

42ISLG3-A LEGIONELLA BMPA SEL. SUPPL. 10 fiale, ciascuna per 500 ml di terreno *

PIASTRE PRONTE ALL'USO

549995 LEGIONELLA SELECTIVE AGAR (GVPC) 20 piastre

549945 LEGIONELLA AGAR 20 piastre

549943 LEGIONELLA AGAR W/O CYSTEINE 20 piastre

* MWY e BMPA : Produttore : Abteck (UK)