

Sinonimia

CYE

Especificación

 Medio sólido usado para la detección, aislamiento y enumeración de *Legionella* en aguas de acuerdo a las normas ISO 11731:2017.

Fórmula * en g/L

Carbón activo.....	2,00
Extracto de levadura.....	10,00
Agar.....	15,00

Final pH a 25 °C, 6,8 ± 0,2

*Fórmula ajustada y/o suplementada según necesidades para cumplir los criterios de recuperación

Reconstitución

 Suspender 13,5 g del polvo en 500 mL de agua destilada y llevarla a ebullición hasta su total disolución. Esterilizar a la autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar hasta unos 47-50°C y, asépticamente, añadir el contenido de un vial (Ref. DSHB3069) Suplemento de Crecimiento para *Legionella* BCYE. Mezclar suavemente y verter en placas de Petri. El pH final a 25°C debe ajustarse a 6,8 ± 0,2.

 Si se desea un medio selectivo se puede obtener añadiendo además un vial de la Ref. DSHB3070 Suplemento Selectivo GVPC para *Legionella*.

Descripción

 La actual formulación de este medio se ha hecho de acuerdo a las normas ISO 11731, pero el agar BCYE está basado en una modificación de medios descritos anteriormente. En 1979, Freeley y colaboradores describieron el Agar de Carbón y Extracto de Levadura (CYE Agar) como una modificación de Agar F-G. Habían reemplazado el almidón del medio F-G por carbón activo y habían substituido el hidrolizado de caseína por extracto de levadura, consiguiendo una mejor recuperación de *Legionella pneumophila*. Pasculle, en 1980 informó que el agar CYE podía mejorarse tamponándolo con tampón ACES y un año después, Edelstein aumentaba la sensibilidad del medio añadiendo a-cetoglutarato.

 El Agar BCYE consiste en un Medio Basal suplementado por unos factores de crecimiento imprescindibles para las legionelas y la selectividad se consigue suplementando el medio con inhibidores para suprimir la microbiota indeseable acompañante. El extracto de levadura proporciona los nutrientes básicos, ya que el medio no tiene ningún azúcar fermentable. La L-Cisteína, el pirofosfato férrico y el a-glutarato se incorporan porque son factores de crecimiento indispensables para las legionelas. El carbón activo descompone el peróxido de hidrógeno, un producto metabólico tóxico, puede también bloquear el CO₂ y modifica la tensión superficial. La adición del tampón ACES ayuda a mantener el pH adecuado para un crecimiento óptimo. La selectividad se alcanza dosificando Vancomicina/ Cefazolina sódica que son activas contra las bacterias gram-positivas, Polimixina B que actúa contra las gram-negativas, Anisomicina que es de amplio espectro y Cicloheximida o Natamicina que son fungicidas que inhiben bien a las levaduras.

Suplemento necesario para completar el medio Base:

 -Suplemento de Crecimiento para *Legionella* BCYE (Ref. DSHB3069)

Composición por vial:

Cantidad necesaria para 500 mL de medio completo.

Tampón ACES.....	5,000 g
Hidroxido potásico.....	1,400 g
Pirofosfato férrico.....	0,125 g
L-Cisteína HCl.....	0,200 g
a-Ketoglutarato potásico.....	0,500 g
Disolvente estéril	

 -Suplemento Selectivo para *Legionella* GVPC (Ref. DSH3070)

Composición por vial:

Cantidad necesaria para 500 mL de medio completo.

Vancomicina.....	0,50 mg
Polimixina B sulfato.....	40000,0 UI
Cicloheximida.....	40,0 mg
Glicina (libre de amonio).....	1,50 g
Agua destilada (Disolvente)	

Técnica

Para la obtención de colonias aisladas a partir de las distintas muestras remítase a cualquier metodología normalizada, p. ej. ISO 11731:2017.

Las placas inoculadas se dejan reposar hasta que han absorbido el inóculo y entonces se incuban, invertidas a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta 2,3,5-10 días. Para asegurar que la atmósfera esté suficientemente húmeda es recomendable poner un recipiente con agua en la estufa y rellenarla, si es preciso, cada vez que se examinen las placas. La incubación en una atmósfera de aire con un 2,5% (v/v) de CO_2 puede ser muy beneficiosa para el crecimiento de algunas legionelas, pero no es crítico.

Las placas se examinan con una lupa adecuada, al menos en tres ocasiones a intervalos de 2,3,5 días durante el periodo de incubación (10 días), ya que las legionelas son de crecimiento lento y pueden quedar enmascaradas por el crecimiento de otros microorganismos. Anotar el número presente de cada tipo de colonia reconocida.

Las colonias de *Legionella* frecuentemente son de color blanco-grisáceo-azulado-púrpura, pero pueden ser marrones, rojas oscuras, verde-claro e incluso rosadas. Son mucosas, con el borde entero y presentan un aspecto característico de granito de cuarzo. Bajo la luz ultravioleta las colonias de algunas especies presentan una auto-fluorescencia blanca brillante, pero otras son rojas y *Legionella pneumophila* se presenta como verde oscura con tintes amarillentos. En cualquier caso las colonias presuntivas deberán ser confirmadas por métodos culturales, bioquímicos, serológicos y genéticos.

Control de calidad

Temperatura de incubación: $36^\circ\text{C} \pm 2$

Tiempo de incubación : 2 - 5 - 10 días

Inóculo: Rango práctico 100 ± 20 UFC ; Min. 50 UFC (Productividad) / 10^4 - 10^6 CFU (Selectividad) según UNE-EN ISO 11133:2014/Amd 1:2018 . Método de siembra en espiral y MF.

Microorganismo

Crecimiento

Observaciones

<i>Legionella pneumophila</i> ATCC® 33152	Productividad > 0.50	Colonias blanco - grisáceas (2-5 d)
<i>Leg. pneumophila</i> ATCC® 33152 (MF method)	Productividad > 0.50	Colonias blanco - grisáceas (2-5 d)
<i>Legionella anisa</i> ATCC® 35292	Productividad > 0.50	Colonias blanco - grisáceas (5-10 d)
<i>Legionella anisa</i> ATCC® 35292 (MF method)	Productividad > 0.50	Colonias blanco - grisáceas (5-10 d)
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 8739	Inhibición parcial	con suplemento GVPC (3 d)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 9027	Inhibición parcial	con suplemento GVPC (3 d)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 19433	Inhibido	con suplemento GVPC (3 d)

Bibliografía

- ATLAS, R.M. & L.C. PARKS (1993) Handbook of Microbiological Media. CRC Press. BocaRaton. Fla. USA.
- CLESCERI, L.S., A.E. GREENBERG & A.D. EATON (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater. 9-106. 20th edition. APHA-AWWA-WEF. Washington DF, USA.
- EDELSTEIN, P.H., (1981) Improved semiselective medium for the isolation of *Legionella pneumoniae* from contaminated clinical and environmental specimens. J. Clin Microbiol. 14(3):298.
- FEELEY, J.C., R.J. GIBSON, G.W. GORMAN, N.C. LANGFORD, J.K. RASHEED, C.D. MACKEL, & W.B. BAINE (1979) Charcoal-Yeast Extract Agar: Primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 10 (4) 437.
- ISO 11731 Standard (2017) Water Quality - Enumeration of *Legionella*.
- ISO 11133:2014/ Adm 1:2018. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- MacFADDIN, J.F. (1985) Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria.
- PASCULLE, A.W., J.C. FEELEY, R.J. GIBSON, L.G. CORDES, R.L. MYEROWITZ, C.M. PATTON, G.W. GORMAN, C.L. CARMACK, J.W. EZZELL & J.N. DOWLING (1980) Pittsburgh pneumonia agent: Direct isolation from human lung tissue. J. Infect. Dis., 141:727.
- WARD, K.W. (1995) Processing and interpretation of specimens for *Legionella* spp. In "Clinical Microbiology Procedures Handbook" Chap. 12.1 edited b H.D. Isenberg. ASM Press. Washington DC, USA.

Almacenamiento

Solo para uso de laboratorio. Mantener bien cerrado, al resguardo de la luz, en lugar fresco y seco (entre 4°C y 30°C).