

## Especificación

Suplemento estéril selectivo que permite el aislamiento de *Legionella* en muestras de aguas.

## Presentación

	Encajado	Caducidad	Almacenamiento
10 Viales liofilizados			
Vial con: $9 \pm 0.1$ g	1 caja con 10 viales de vidrio de 23x60 mm, con tapón de plástico. Etiquetados.	49 meses	2-25 °C

## Composición

Composición (g/vial)

Glicina (libre de amonio).....	1.5000
Vancomicina.....	0.0005
Polimixina B sulfato.....	40000 IU
Cicloheximida.....	0.0400

Reconstituir con la adición de :

Agua destilada estéril..... 10 ml

## Descripción/Técnica

### Descripción:

El descubrimiento del agente causal de la enfermedad del legionario ha permitido un gran progreso en los estudios en torno a ella. Los nuevos medios para el cultivo y la enumeración de *Legionella spp* se han desarrollado en los últimos años. El suplemento de GVPC se añade a la base de crecimiento para obtener un crecimiento selectivo de este microorganismo. La selectividad se alcanza dosificando Vancomicina que es activa contra las bacterias gram-positivas, Polimixina B que actúa contra las gram-negativas, Cicloheximida o Natamicina que son fungicidas que inhiben bien a las levaduras.

### Técnica:

Recoger, diluir y preparar muestras y volúmenes según sea necesario de acuerdo a las especificaciones, directivas, reglamentos oficiales estándar y / o resultados esperados.

Disolver el 1 vial de suplemento inhibidor GVPC con 10 ml del agua destilada estéril. Agitar, hasta su total disolución y añadir a 500 ml de A. BASE BCYE *Legionella*, mantenida a 47-50 °C y previamente suplementada con 1 vial del Suplemento de Crecimiento para *Legionella* BCYE. Mezclar suavemente y verter en placas de Petri.

Las placas inoculadas (directamente o bien MF) 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  $\text{CO}_2$  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

### Control Físico/Químico

Color : Beige claro

pH: a 25°C

### Control de Fertilidad

Rehidratar 1 vial como se indica en COMPOSITION; agitar y disolver completamente.

Añadir 1 vial a 500 ml de medio base. NO CALENTAR una vez suplementado.

Metodología analítica acorde con ISO 11133:2014/A1:2018; A2:2020.

Aerobiosis. Incubación a  $36 \pm 2$  °C. Lectura 2-5 días para *L. pneumophila*, 5-10 días para *L. anisa*, y 3 días para selectividad.

Control microbiológico según norma ISO 11133:2014/A1:2018.

#### Microorganismo

*L. anisa* ATCC® 35292, WDCM 00106 (by MF)

*Legionella anisa* ATCC® 35292, WDCM 00106

*L. pneumophila* ATCC® 33152, WDCM 00107 (by MF)

*Legionella pneumophila* ATCC® 33152, WDCM 00107

*Escherichia coli* ATCC® 25922, WDCM 00013

*Enterococcus faecalis* ATCC® 19433, WDCM 00009

the reference medium is GVPC validated.

#### Desarrollo

Bueno ( $\geq 70\%$ ) colonias gris-azul

Bueno ( $\geq 70\%$ ) colonias gris-azul

Bueno ( $\geq 70\%$ ) colonias gris-azul

Bueno ( $\geq 70\%$ ) colonias gris-azul

Inhibición (Parcial a completa)

Inhibido

### Control de Esterilidad

Añadir 5 mL de muestra a 100 mL de TSB y a 100 mL de Tioglicolato.

Incubación 48 h a 30-35°C y 48 h a 20-25 °C: SIN CRECIMIENTO

Verificación a 7 días tras incubación en las mismas condiciones.

## 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. 20<sup>th</sup> 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/ Adm1 :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.
- UNE-EN ISO 11133 (2014). Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua.-Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.
- 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.