

## Especificación

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

## Presentación

	Encajado	Caducidad	Almacenamiento
20 Placas 90 mm con: 23 ± 1 ml	1 caja con 2 paquetes de 10 placas, envueltas por bolsa de celofán y con etiquetado lateral	3 meses	2-14 °C

## Composición

Composición (g/l):	
Carbón activado.....	2,000
Extracto levadura.....	10,000
Aces buffer.....	10,000
KOH.....	2,800
Alfa-cetoglutarato.....	1,000
Cisteina HCl.....	0,400
Pirofosfato férrico.....	0,250
Cefazolina sódica.....	0,009
Polimixina B.....	80.000UI
Pimaricina (sin. Natamicina).....	0,070
Agar.....	15,000

## Descripción/Técnica

### 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 CO<sub>2</sub> y modifica la tensión superficial. La adición del tampón ACES ayuda a mantener el pH adecuado para un crecimiento óptimo. La selectividad se alcanza con Cefazolina sódica que es activa contra las bacterias gram-positivas, Polimixina B que actúa contra las gram-negativas, y Natamicina (pimaricina) que es un fungicida que inhibe bien a las levaduras.

### 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 ± 2°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<sub>2</sub> 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.

*Nota:* Si el medio se utiliza por el método de membranas filtrantes deberá tenerse en cuenta que el color y tamaño de las colonias puede modificarse por la composición y tipo de la membrana por lo cual se recomienda al usuario del medio, una validación previa del tipo de membrana filtrante utilizada.

**Control de Calidad****Control Físico/Químico**

Color : Negro

pH: 6,8 ± 0,2 a 25°C

**Control de Fertilidad**Siembra espiral / Método MF ; Rango práctico 100 ± 20 UFC; Min. 50 CFU (Productividad) / 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> CFU (Selectividad).

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

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

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

El medio de referencia es BCYE+AB validado

**Desarrollo**

Bueno (≥ 70%) colonias gris-azul

Bueno (≥ 70%) colonias gris-azul

Bueno (≥ 70%) colonias gris-azul

Bueno (≥ 70%) colonias gris-azul

Inhibición (Parcial a completa)

Inhibido

**Control de Esterilidad**

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.