



Legionella BCYE Agar

Medium for detection and enumeration of
Legionella spp, according to ISO 11731.

DESCRIPTION

Legionella BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) Agar is a non selective isolation medium used for the cultivation of *Legionella* species from clinical specimens and environmental samples.

This composition of Legionella BCYE Agar complies with ISO 11731.

TYPICAL FORMULA (per liter of medium)

Yeast Extract	10.0 g
Activated Charcoal	2.0 g
α-Ketoglutarate	1.0 g
ACES Buffer	10.0 g
Potassium Hydroxide	2.8 g
L-Cysteine HCl	0.4 g
Iron(III) Pyrophosphate	0.25 g
Agar	12.0 g

Final pH 6.8 ± 0.2 at 25°C

METHOD PRINCIPLE

Yeast extract provides amino acids, nitrogen, carbon, vitamins and minerals. Activated charcoal decomposes hydrogen peroxide, a metabolic product toxic to *Legionella* spp, and may also collect carbon dioxide and modify surface tension. Alpha-ketoglutarate stimulates organism growth. ACES buffer and potassium hydroxide are included to maintain the proper pH for optimal growth. L-cysteine is an essential amino acid which is incorporated along with ferric pyrophosphate to satisfy specific nutritional requirements of *Legionella* species. Agar is the solidifying agent.

TEST PROCEDURE

Inoculate clinical specimens from swab by rolling it over the agar surface (90 mm plate) in order to obtain isolated colonies.

Contact plates are recommended for surface sampling. Selected surfaces are sampled by firmly pressing the agar medium against the test area.

For water testing according to ISO 11731, the choice of the method is down to the individual laboratory, as it depends on the type of the sample (e.g., whether the water has low, high, or extremely high bacterial background flora) and the reason of the investigation. A scheme showing detection methods and procedures can be found at the end of the instructions for use (english). For more details refer to the ISO standard.

To ensure detection, water samples may be concentrated by membrane filtration or, alternatively, by centrifugation (when the number of legionellae in any given sample is not known, concentration technique are usually performed). Dilution is necessary when high concentrations of *Legionella* and/or other bacteria are expected. Heat treatment, acid treatment, or a combination of both may be also required before culturing on selective media.

Incubate inoculated plates at 36 ± 2°C for 7 to 10 days in humidified atmosphere (air with 2.5% CO₂ can be beneficial for the growth of some *Legionella* but is not essential).

INTERPRETING RESULTS

Inspect plates for the first time either on day 2, 3, 4 or 5 followed by a final inspection at the end of the incubation period. Examine for growth and fluorescence under long-wave UV light.

Colonies of *Legionella* are white-grey in general but can also appear in other colours. They are smooth with an entire edge and exhibit a characteristic ground-glass appearance. Under UV light, colonies usually exhibit brilliant white fluorescence.

For confirmation, regard as *Legionella* those colonies which grow on Legionella BCYE Agar but fail to grow on the medium without cysteine (Legionella BCYE Agar w/o Cysteine, 90 mm Plate, ref. 10412).

APPEARANCE

Opaque, black.

STORAGE

Store at 10-25°C away from light. Do not use the product beyond its expiry date on the label or if product shows any evidence of contamination or any sign of deterioration.

SHELF LIFE

6 months.

QUALITY CONTROL

Plates are inoculated with the microbial strains indicated in the QC table.

Inoculum for productivity: 50-100 CFU.

Incubation conditions: 2 to 5 days / 36 ± 2°C.

QC Table.

Microorganism		Growth	Colour
<i>Legionella pneumophila</i>	WDCM 00107	Good (≥70%)	White-gray colonies

WARNING AND PRECAUTIONS

The product does not contain hazardous substances in concentrations exceeding the limits set by current legislation and therefore is not classified as dangerous. It is nevertheless recommended to consult the safety data sheet for its correct use. The product is intended for professional use only and must be used by properly trained operators.

DISPOSAL OF WASTE

Disposal of waste must be carried out according to national and local regulations in force.








BIBLIOGRAPHY

1. ISO 11731:2017. Water quality – Enumeration of *Legionella*.
2. EN ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
3. 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.

PRESENTATION	Format	Packaging	Ref.
Legionella BCYE Agar	60 mm Plate (membrane filter placement)	20 plates	163362 ●
Legionella BCYE Agar	55 mm Contact Plate	20 plates	15334 ●
Legionella BCYE Agar	90 mm Plate	20 plates	10051
Legionella BCYE Agar	90 mm Plate	100 plates	10051*

●, not intended for use in the diagnosis of disease or other conditions in humans

TABLE OF SYMBOLS

LOT Batch code	IVD In Vitro Diagnostic Medical device	 Manufacturer	 Use by	 Fragile, handle with care
REF Catalogue number	 Temperature limitation	 Contains sufficient for <n> tests	 Caution, consult Instruction For Use	 Do not reuse

The 4-step decision matrix, which is provided in Annex J of the ISO 11731:2017, is summarised below:

1. Determine the origin and characteristics of the sample;
2. Select one or more method(s) on the basis of the desired lower limit of detection level;
3. Select the required and optional treatment(s);
4. Select the required and optional culture media.

Water sample with an expected	Method	Treatment	Culture media
Low concentration of interfering microorganisms (e.g. potable water)			
and high concentration of <i>Legionella</i> spp. (>10 ⁴ cfu/l)	<u>Direct plating</u> of the unconcentrated sample (0.1 - 0.5 ml) • LoD = 10 ⁴ cfu/l		BCYE and BCYE+AB
and low concentration of <i>Legionella</i> spp.	<u>Membrane filtration and direct placing</u> of the filter on plate • LoD = 10 ² cfu/l	Filter the water sample (untreated, acid treated and, if required, heat treated) and place the untreated membrane filter on plate	BCYE
		Place filters treated with acid on selective plates	BCYE+AB or GVPC or MWY
	<u>Filtration followed by washing procedure</u> • LoD = 10 ² - 10 ³ cfu/l	Use each concentrated portion of the sample (untreated, heat treated and acid treated) for plate inoculation by spreading (0.1 - 0.5 ml)	BCYE+AB and BCYE+AB or GVPC or MWY
high concentration of interfering microorganisms (e.g. cooling tower)	<u>Plating after dilution</u> • LoD = 10 ⁶ - 10 ⁷ cfu/l	Use sample unconcentrated, concentrated or diluted and divide each subsample into three portions, i.e. untreated, heat treated and acid treated, for spreading on plate (0.1 - 0.5 ml)	GVPC or MWY
extremely high concentration of interfering microorganisms (e.g. waste water)	<u>Plating after dilution</u> • LoD = 10 ⁶ - 10 ⁷ cfu/l	After pre-treatment with a combination of heat and acid, spread sample unconcentrated and diluted on plate (0.1 - 0.5 ml)	GVPC or MWY

cfu/l: colony forming units per litre LoD: Limit of Detection

Ordering information for the other ready-to-use media

Description	Plate format (ref.)
Legionella BCYE+AB Agar	90 mm (10448)
Legionella Agar (GVPC)	90 mm (10128), 60 mm (163362), 55 mm Contact Plate (15376)
Legionella MWY Agar	90 mm (10127), 60 mm (163382)



LIOFILCHEM® s.r.l.

Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (Te) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330 www.liofilchem.com



See non-CE marked products under PRESENTATION



Legionella BCYE Agar

Terreno per ricerca e conteggio di *Legionella* spp, secondo ISO 11731.

DESCRIZIONE

Legionella BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) Agar è un terreno non selettivo utilizzato per la coltivazione di specie di *Legionella* da campioni clinici ed ambientali.

La composizione di Legionella BCYE Agar soddisfa i requisiti della ISO 11731.

FORMULA TIPICA (per litro di terreno)

Estratto di Lievito	10.0 g
Carbone Attivo	2.0 g
α-Chetoglutarato	1.0 g
Tampone ACES	10.0 g
Potassio Idrossido	2.8 g
L-Cisteina HCl	0.4 g
Ferro(III) Pirofosfato	0.25 g
Agar	12.0 g

pH Finale 6.8 ± 0.2 a 25°C

PRINCIPIO DEL METODO

L'estratto di lievito fornisce aminoacidi, azoto, carbonio, vitamine e minerali. Il carbone attivo decompone il perossido di idrogeno, un metabolita tossico per *Legionella* spp, e può anche assorbire il diossido di carbonio e modificare la tensione superficiale. L'alfa-chetoglutarato stimola la crescita dei microrganismi. Il tampone ACES e l'idrossido di potassio sono inclusi per mantenere il pH adeguato per una crescita ottimale. La cisteina è un aminoacido essenziale che viene incorporato insieme al ferro pirofosfato per soddisfare i requisiti nutrizionali specifici di *Legionella*. L'agar è l'agente solidificante.

PROCEDURA DEL TEST

Inoculare i campioni clinici da tampone strisciando il tampone direttamente sulla superficie dell'agar (piastra 90 mm) per ottenere colonie ben separate.

Per il campionamento delle superfici si raccomandano le piastre da contatto. Le superfici selezionate vengono campionate premendo fermamente la superficie dell'agar sull'area da testare.

Per l'analisi delle acque secondo ISO 11731, la scelta del metodo è una responsabilità del laboratorio, in quanto essa dipende dal tipo di campione (es. se l'acqua ha un contenuto di flora batterica contaminata basso, elevato, o estremamente elevato) e dal motivo dell'esame. Lo schema presente alla fine delle istruzioni per l'uso in lingua inglese riassume i metodi di ricerca e le procedure. Per maggiori informazioni vedere la norma ISO.

Per massimizzare la capacità di rilevazione di *Legionella*, i campioni d'acqua possono essere concentrati attraverso filtrazione su membrana o, in alternativa, mediante centrifugazione (in generale la concentrazione viene sempre effettuata quando non si conosce il numero di legionelle in un dato campione). La diluizione è necessaria quando si prevedono concentrazioni elevate di *Legionella* e/o di altri batteri. Può essere necessario effettuare il trattamento termico, con acido, o una combinazione di entrambi, prima della coltura su terreni selettivi.

Incubare le piastre inoculate a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ da 7 a 10 giorni in atmosfera umidificata (l'incubazione in atmosfera aerobica con 2.5% CO₂ può risultare benefica per la crescita di alcune legionelle ma non è essenziale).

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Ispezionare le piastre per la prima volta al giorno 2, 3, 4 o 5 ed effettuare un'ispezione finale alla fine del periodo di incubazione. Esaminare la crescita e la fluorescenza alla luce UV.

Le colonie di *Legionella* sono in generale di colore bianco-grigio, ma possono anche apparire di altri colori. Sono lisce con bordo intero e mostrano il caratteristico aspetto di vetro smerigliato. Sotto luce UV, le colonie di solito mostrano fluorescenza bianca brillante.

Per la conferma, considerare come *Legionella* quelle colonie che crescono su Legionella BCYE Agar ma non crescono sul terreno senza cisterna (Legionella BCYE Agar w/o Cysteine, Piastra 90 mm, ref. 10412).

ASPETTO

Opaco, nero.

CONSERVAZIONE

Conservare a 10-25°C al riparo dalla luce. Non usare il prodotto dopo la sua data di scadenza indicata sull'etichetta o se il prodotto mostra segni di contaminazione o deterioramento.

VALIDITÀ

6 mesi.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Le piastre vengono inoculate con i ceppi microbici indicati nella tabella CQ.

Inoculo per produttività: 50-100 UFC.

Condizioni di incubazione: 2-5 giorni / 36 ± 2°C.

Tabella CQ.

Microrganismo		Crescita	Colore
<i>Legionella pneumophila</i>	WDCM 00107	Buona (≥70%)	Colonie bianche-grigie

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Il prodotto non contiene sostanza nocive in concentrazioni superiori ai limiti fissati dall'attuale legislazione e perciò non è classificato come pericoloso. Ciononostante si raccomanda di consultare la scheda di sicurezza per il suo corretto uso. Il prodotto è da intendersi per uso in ambito professionale e deve essere utilizzato esclusivamente da operatori adeguatamente addestrati.

SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

Lo smaltimento dei rifiuti deve essere effettuato in conformità alle normative nazionali e locali in vigore.








BIBLIOGRAFIA

- ISO 11731:2017. Water quality – Enumeration of *Legionella*.
- EN ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- 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.

PRESENTAZIONE	Formato	Confezione	Ref.
Legionella BCYE Agar	Piastra 60 mm (posizionamento membrana)	20 piastre	163362 ●
Legionella BCYE Agar	Piastra da contatto 55 mm	20 piastre	15334 ●
Legionella BCYE Agar	Piastra 90 mm	20 piastre	10051
Legionella BCYE Agar	Piastra 90 mm	100 piastre	10051*

●, non destinato all'utilizzo nella diagnosi di malattie o altre condizioni nell'uomo

TABELLA DEI SIMBOLI

LOT Codice del lotto	IVD Dispositivo Medico Diagnostico <i>In Vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro	 Fragile, maneggiare con cura
REF Numero di catalogo	 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Attenzione, Consultare le istruzioni per l'uso	 Non riutilizzare



LIOFILCHEM® s.r.l.

Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (Te) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330 www.liofilchem.com liofilchem@liofilchem.com