

### Principe

Base de milieu solide utilisée pour la détection, l'isolement et le dénombrement des légionelles dans l'eau, conformément à la norme ISO 11731: 2017.

### Formule \* en g/L

Charbon actif .....	2.00
Extrait de levure .....	10.00
Agar .....	15.00

pH final 6.8 ±0.2 à 25 °C

\*Ajuster et/ou compléter au besoin pour répondre aux critères de performance

### Préparation

Suspendre 13,5 g de poudre dans 500 mL d'eau distillée et porter à ébullition en dissolvant complètement. Stériliser par autoclavage à 121 ° C pendant 15 minutes. Laisser refroidir à 47-50 ° C et ajouter aseptiquement un flacon reconstitué (Réf. N ° DSHB3069 ) de Legionella BCYE Growth Supplement Mélanger doucement et verser dans des boîtes de Pétri Le pH final à 25 ° C doit être ajusté à 6,8 ± 0,2.

Si un milieu sélectif est souhaité, il peut être obtenu en ajoutant en plus un flacon de GVPC Selective Supplement for Legionella (Réf.DSHB3070).

### Description

La formulation actuelle de ce milieu est conforme aux normes ISO 11731: 2017, mais la gélose BCYE est basée sur une modification d'un milieu précédemment décrit. En 1979, Feeley et ses collaborateurs ont décrit la gélose au charbon Extrait de levure (CYE) comme une modification de Gélose FG . Ils ont remplacé l'Amidon de la Gélose FG par du Charbon actif et substitué l'extrait de levure par la Caséine hydrolysé, ce qui a permis une meilleure récupération de Legionella pneumophila. Pasculle, en 1980, a signalé que la Gélose CYE pourrait être amélioré en tamponnant le milieu avec le tampon ACES et un an plus tard, Edelstein a augmenté la sensibilité du milieu en ajoutant de l'a-cétoglutarate qui est la formulation actuelle (gélose BCYE).

Le milieu est constitué d'une base moyenne supplémentée en facteurs de croissance (gélose BCYE) et du milieu sélectif complété par des inhibiteurs de la flore d'accompagnement indésirable. L'Extrait de levure fournit les nutriments de base car le milieu ne contient pas de glucides fermentescibles. La L-cystéine, le pyrophosphate ferrique et l'a-cétoglutarate sont incorporés pour satisfaire les besoins nutritionnels spécifiques des espèces de Legionella.

Le Charbon actif décompose le peroxyde d'hydrogène, un produit métabolique toxique, et peut également capter du CO2 et modifier la tension superficielle. L'ajout du tampon aide à maintenir le pH approprié pour une croissance optimale. La sélectivité est augmentée par l'ajout de vancomycine / céfazoline sodium. Ils agissent contre les bactéries gram-positives, la polymyxine B, qui inhibe les bactéries gram-négatives, l'anisomycine qui a un large spectre d'activité et le cycloheximide ou la natamycine qui, en tant qu'agents antifongiques, inhibe la croissance des levures.

Compléments nécessaires pour compléter à la base moyenne:

-Legionella BCYE Growth Supplement (Art. N ° DSHB3069)

Contenu du flacon:

Quantité nécessaire pour 500 ml de milieu complet.

Tampon ACES 5000 g

Hydroxyde de potassium 1400 g

Pyrophosphate ferrique 0,125 g

L-cystéine HCl 0,200 g

A-cétoglutarate de potassium 0,500 g

Solvant stérile

-Legionella GVPC Selective Supplement (Art. N ° DSHB3070)

Contenu du flacon:

Quantité nécessaire pour 500 ml de milieu complet.

Vancomycine 0,50 mg

Sulfate de polymyxine B 40000,00 UI

Cycloheximide 40,00 mg

Glycine (sans ammoniaque) 1,50 g

Eau distillée (solvant)

### Utilisation

Se réfère à la norme ISO 11731: 2017 ou à d'autres procédures standard pour obtenir des colonies isolées à partir d'échantillons et d'échantillons. Laisser reposer les plaques inoculées jusqu'à ce que l'inoculum ait été absorbé. Inverser les plaques et incuber à  $36 \pm 2$  ° C jusqu'à 5-10 Pour vous assurer que l'atmosphère dans l'incubateur est humide, placez un plateau d'eau dans le fond de l'incubateur. Remplissez ce plateau avec de l'eau fraîche (si nécessaire) chaque fois que les plaques sont examinées. % (fraction volumique) CO<sub>2</sub> peut être bénéfique pour la croissance de certaines légionelles, mais ce n'est pas essentiel.

Examiner les plaques avec un microscope à plaques au moins trois fois à des intervalles de 2 à 4-5 jours pendant la période d'incubation de 10 jours, car la légionelle se développe lentement et peut être masquée par la croissance d'autres organismes. Enregistrer le nombre de chaque type de colonie présent.

Les colonies de Legionella sont souvent de couleur blanc-gris-bleu-violet, mais peuvent être brunes, roses, vert lime ou rouge foncé. Ils sont lisses avec des bords lisses et présentent un aspect caractéristique de verre dépoli. Sous la lumière ultraviolette, les colonies de plusieurs espèces sont d'un blanc brillant autofluorescent, mais d'autres sont rouges et L. pneumophila apparaît d'un vert terne souvent teinté de jaune. Toutes les colonies présumées doivent être confirmées par des méthodes culturelles, biochimiques, sérologiques ou génétiques.

### Contrôle qualité

**Température d'incubation:**  $36 \text{ °C} \pm 2$

**Temps d'incubation:** 2 - 5 - 10 J

**Inoculum:** Gamme d'utilisation  $100 \pm 20$  UFC. Min. 50 UFC (Productivité) /  $10^4$ - $10^6$  UFC (sélectivité) selon ISO 11133: 2014 / Amd 1: 2018.

### Micro-organismes

### Croissance

### Remarques

<i>Legionella pneumophila</i> ATCC® 33152	Productivité > 0.50	
<i>Leg. pneumophila</i> ATCC® 33152 (MF method)	Productivité > 0.50	
<i>Legionella anisa</i> ATCC® 35292	Productivité > 0.50	
<i>Legionella anisa</i> ATCC® 35292 (MF method)	Productivité > 0.50	
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 8739	Inhibition partielle à totale	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 9027	Inhibition partielle à totale	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 19433	Inhibée	

### Références

- 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.

### Conservation

Pour usage professionnel uniquement. À conserver fermé, loin de la lumière, dans un endroit frais et sec (+4°C à 30°C).