

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

<b>MCC P/A</b>	<b>COSMETIKIT®</b>	<b>DRY PLATES®</b>	<b>MUGPLUS</b>
<b>CRIOTECA®</b>	<b>CHROMOSALM</b>	<b>DESINFECTEST®</b>	<b>CCNT</b>
<b>PLAQUIS®</b>	<b>KITPRO-PLUS</b>	<b>CROMOKIT®</b>	<b>MBS</b>
<b>M-IDENT®</b>	<b>SEILAGUA®</b>	<b>SALMOQUICK</b>	<b>AIRESANO</b>
<b>NEOGRAM</b>	<b>ENVIROCOUNT</b>		

## **LEGIONELLA GVPC, BCYE (con Fe y Cys), BCYE-Cys, (AGAR BASE)**

Aislamiento selectivo de Legionella por el método MF o por siembra directa (ISO 11731:2017, ISO 11731-2:2004)

### COMPOSICIÓN

#### Medio BASE:

Carbón activado	2,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
Agar-Agar	22,0 g
Alfa-ketoglutarato (sal mono-K) *	1,0 g
(Fórmula por litro)	
pH final: 6,9 ± 0,1	

\* por ser cristalino e higroscópico, se incluye en el suplemento



#### GVPC Suplemento Selectivo+Nutritivo estéril en solución 200 ml SBL604

Agite contundentemente y añada en asepsia 40 ml a 500 ml de medio enfriado a 50 °C (o bien 8 ml a 100 ml de medio). Puede contener precipitados por su elevada concentración pero desaparecen al diluir en el medio BCYE base. c.s.p. 2'5 l de medio. Contiene las proporciones precisas, según ISO 11731, de: Tampón ACES, ∇-Cetoglutarato, KOH, Clorhidrato de L-Cisteína, Pirofosfato férrico, Vancomicina, Cicloheximida, Polimixina y Glicina. Contiene elementos tóxicos, evitar el contacto con la piel.

NOTA 1: La ref. **SBL609** es idéntica al suplemento GVPC (con Fe y Cys) pero sin los tres antibióticos del GVPC selectivo, para elaborar el BCYE (con Fe y Cys). La ref. **SBL605** es idéntica al suplemento GVPC pero sin la Cisteína, para elaborar el BCYE-Cys, aunque éste se puede sustituir por simple TSA.

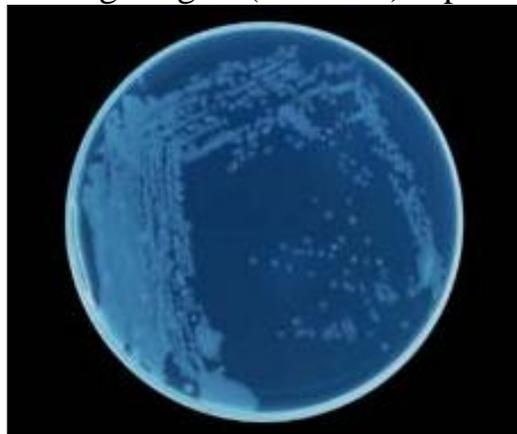
NOTA 2: EL caldo GVPC para preenriquecimiento revitalizador, es idéntico al Agar GVPC pero sin Agar-Agar y con el carbón granulado (ver kit P/A Legionella en tubos preparados, ref.**RPL330**). Ideal para usar antes de la ISO 11731 y encontrar de forma mucho más eficaz la Legionella tras revitalización.

## **PREPARACIÓN** (conversión del medio deshidratado en medio preparado)

Disolver 17 gramos de medio en 500 ml de agua bidestilada. Calentar hasta hervir para la total disolución. Autoclavar a 121 °C, 15 minutos. El color final del medio es negro. Enfriar a 45-50 °C y, para el medio selectivo GVPC, añadir asepticamente 40 ml de Legionella Supplement-200 ml (SBL604, tampón ACES/KOH; nutritivo con  $\alpha$ -ketoglutarato, clorhidrato de L-cisteina y pirofosfato férrico; y selectivo, con Vancomicina, Polimixina, Cicloheximida y Glicina); para el medio no-selectivo BCYE con Fe y Cys, añadir 40 ml de SBL609 (con Fe y Cys pero sin los antibióticos). Para el medio BCYE-Cys, añadir 40 ml de Legionella-Cys Supplement-200 ml (SBL605, tampón ACES/KOH,  $\alpha$ -ketoglutarato y pirofosfato férrico), aunque como es para ver que en él no crecen las Legionellas, se puede sustituir por simple TSA, donde tampoco crecen. Mezclar muy bien y verter 20 ml/placa cuando el medio esté a punto de solidificar, para que la distribución del carbón activo sea lo más homogénea posible. No sobrecalentar o el agar se volverá demasiado blando: Es posible que sea necesario añadir aún más Agar-agar (BCB006) para minimizar la friabilidad del agar, si se va a sembrar con asa (aceptado en ISO 11731).

Tras la ISO 11731:2017:

**BCYE:** Yeast extract 10 g/L, Agar E 12 g/L, carbón activo en polvo 2 g/L, alfa-ketoglutarato monopotásico 1 g, tampón ACES 10 g, KOH pellets 2,8 g, L-cisteina HCl monohidrato 0,4 g, Hierro (Pirofosfato Férrico) 0,25 g. Se prepara antes la solución de 0,4 g Cisteina y 0,25 g Hierro en 10 ml de agua bidestilada (un frasco pinchable de 100 ml dará para 10 L), esterilizar por



filtración con jeringa y pirindola 0,2  $\mu$ m, se mantiene congelada máximo 3 meses, no se autoclava. Se prepara antes la solución de 10g ACES en 500 ml de agua bidestilada a 45-50°C. Se prepara antes la solución de 2,8 g de pellets de KOH bien disueltos en 500 ml de agua. Se mezclan las dos (ACES+KOH) y se agita bien. Se añade aquí por este orden el carbón, el extracto de levadura y el alfa-ketoglutarato. Ajustar el pH a exactamente 6,8 con potasa o con ácido sulfúrico (no clorhídrico) 0,1 N. Añadir el agar E, mezclar bien. Autoclavar a 121°C 15'. Enfriar a 48°C. Añadir entonces la solución de Fe-Cys. Mezclar y dispensar 20 ml en placas de 90 ml (salen 50 placas/L, que es la unidad de venta). Mantener en cabina hasta que no haya vaho en las tapas. Marcar 3 meses de caducidad. **GVPC:** Igual pero con (3 antibióticos y) Glicina libre de amonio: 3 g/L (añadir esta glicina tras el alfa-ketoglutarato) y después ajustar el pH a 6,8 clavados. Tras autoclavar y enfriar a 48°C, y tras añadir la solución de Fe-Cys, añadir los antibióticos: Polimixina B sulfato 80.000 UI/L (14.545 UI en 5,5 ml de agua bidestilada, esterilizar por filtración con jeringa y pirindola 0,2  $\mu$ m, hacer frascos pinchables y mantenerlos congelados un máximo de 3 meses). Vancomicina hidrocloreuro 0,001 g/L (añadir 20 mg en 20 ml de agua bidestilada, esterilizar por filtración con jeringa y pirindola 0,2  $\mu$ m, hacer frascos pinchables y mantenerlos congelados un máximo de 3 meses), Cicloheximida 0,08 g/L (añadir 2 g en 100 ml de agua bidestilada, esterilizar por filtración con jeringa y pirindola 0,2  $\mu$ m, hacer frascos pinchables y mantenerlos congelados un máximo de 3

meses). No se pueden mezclar estos componentes entre si hasta que se prepare el medio para hacer las placas. Se añaden al L de medio 5,5 ml de polimixina, 1 ml de vancomicina y 4 ml de cicloheximida. Etiquetar con 1 mes de caducidad. Cajas de 50u.

PARA USO EXCLUSIVO  
EN LABORATORIO.  
MANTENGA EL BOTE BIEN CERRADO  
EN LUGAR SECO, FRESCO Y OSCURO.

DESHIDRATADO CODIGO: **DMT007**

### **CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS GVPC y BCYE + Fe + Cys**

Realizado en nuestro laboratorio; es prudente repetirlo en su laboratorio, siempre que varíen las condiciones (más de 3 meses sin usar, tras desinfectar laboratorio, tras conservar a alta T<sup>a</sup>, cuando adquiere aspectos extraños aunque no haya llegado la fecha de caducidad teórica de la etiqueta,...)

DESHIDRATADO: Polvo, Negro

PREPARADO: Estéril, Negro.

CONTROL DE CRECIMIENTO 2 semanas a 37°C aproximadamente:

*Legionella pneumophila* WDCM00107 serogrupo 1, Correcto en GVPC tras 2-15 días, colonias gris-azuladas, cristalinas, mucosas, látex M-LEGIONELLA aglutina el gr 1. Sin añadir el suplemento, no crece. Con respecto a PCA suplementado, recuento medio 126%. En el medio BCYE con suplemento nutritivo pero sin antibióticos, crece aproximadamente el doble de población que en el GVPC.

*Legionella pneumophila* serogrupo 2-15, Idem.

*Escherichia coli* WDCM00013, parcialmente inhibido en GVPC: con respecto a PCA suplementado, recuento 27%.

*Micrococcus luteus* MKTA9341\*\*, inhibido en GVPC.

\* El que cumple con recuperación superior al 92-125% con respecto a cepas cuantitativas trazables a la cepa tipo. Incertidumbres detectadas entre todos los lotes a lo largo de un año (la mayoría de la incertidumbre se debe a la cepa y a la proporción de cepas acompañantes inoculadas, no al medio).

**PRESENTACION:** MEDIO DESHIDRATADO (BCYE BASE) Y SUPL. GVPC / BCYE+Fe+Cys, KITS P/A caldo revitalizante, PLAQUIS HERMÉTICAS Y PLACAS MF GVPC, FRASCOS PREPARADOS 100 ml (BCYE-BASE) + SUPL. GVPC / BCYE+Fe+Cys. Suplemento selectivo + nutritivo para GVPC (SBL604). Suplemento sin Cysteina para BCYE-Cys. Suplemento nutritivo Fe + Cys sin antibióticos para BCYE.

**Nuevo: Placa preparada GVPC (con glicina, cisteína, hierro, ACES y antibióticos) pH 6,8 s/ISO 11731:2017 (Ref: PPLMGV7) y placa**



**preparada BCYE (idem sin antibióticos ni glicina) pH 6,8 s/ISO 11731:2017 (Ref: PPLMBC7), SÓLO PEDIDOS PROGRAMADOS.**

### **MODO DE EMPLEO E INTERPRETACION DE RESULTADOS**

Medio selectivo GVPC: Inocular una membrana de filtración de 0'22 µm (VAC022, no usar de 0,45 µm), o mejor 0'1 ml de un extracto del fondo del tubo tras la centrifugación a 2500 r.p.m., 20' de una muestra rascada, o bien 0'1 ml del fondo del caldo de enriquecimiento concentrado (RPL330) sobre una placa. O aplicar una placa de contacto sobre la superficie, o bien introducirla en un aparato de control de aire. Preincubar estrictamente 30 minutos a 50 °C para eliminar la flora competitiva acompañante. Incubar a 35 °C aproximadamente, en atmósfera húmeda de 2 a 14 días. Las colonias de *Legionella pneumophila* son blanco-azuladas, brillantes, mucosas, de 1-2 mm Ø, circulares, lisas, algo elevadas y con los bordes enteros, fluorescentes (verde mate a menudo teñido de amarillo) en la oscuridad bajo luz UVA (linterna MICROKIT VMT050). Subcultivar 3 colonias en BCYE+Fe+Cys (sin antibióticos) y en BCYE-Cys (o TSA), al menos 2 días a 36 ± 1°C. *Legionella* crece en BCYE (con Fe y Cys) sin antibióticos (y en GVPC), pero no crece en BCYE-Cys (ni en medios generales tipo TSA, agar sangre, PCA, YEA, Nutrient Agar...). Las colonias deben confirmarse con oxidasa positivo, a menudo lento (KOT050), catalasa positiva (KMT299) y serotipado (MICROKIT-LEGIONELLA-VIRAPID VR002, QUE PUEDE USARSE DIRECTAMENTE EN EL PRIMER AISLAMIENTO DE GVPC Y AHORRARSE ASÍ EL TIEMPO Y COSTE DE LAS OTRAS PLACAS DE BCYE (con Fe y Cys) y BCYE-Cys (o TSA). Contar sólo la placa de GVPC con más colonias de *Legionella pneumophila*. Si no se encuentra, expresar los resultados como “no detectada”, ya que a veces está presente y no crece. Peligro, microorganismos de alto riesgo para inmunodeprimidos, por inhalación de aerosoles (pero no llega a considerarse de Clase III).

**NOTA:** Los otros dos medios mencionados en la ISO 11731:2017 (BCYE con suplementos selectivos: BCYE+AB, Modified Wadowsky Yee: MWY) son alternativos, no son necesarios. Esta nueva versión 2017 de la Norma describe la fluorescencia de otras especies de *Legionella*: *L.anisa*, *L.bozemanii*, *L.cherrii*, *L.dumoffii*, *L.gormanii*, *L.gratiana*, *L.parisiensis*, *L.steigerwaltii* y *L.tucsonensis*) tienen autofluorescencia blanca brillante; *L.erythra* y *L.rubrilucens* aparecen rojas; *L.pneumophila* verde mate, a menudo teñido de amarillo .

**El usuario final es el único responsable de la destrucción de los organismos que se hayan multiplicado, según la legislación medioambiental vigente. Autoclavar antes de desechar a la basura.**

Medio fabricado en la UE por MICROKIT desde 1989, bajo ISO 9001, ISO 11133 y GMPs, revisado en Julio-2020