Instructions For Use
ENGLISH

Legionella Agar (GVPC)

Selective medium for detection and enumeration of *Legionella* spp.

DESCRIPTION

Legionella Agar (GVPC) is a selective medium used for primary isolation of *Legionella* species from water samples and water related matrices according to ISO 11731.

This medium is also used for detection of *Legionella* in clinical specimens.

TYPICAL FORMULA* (Per litre of Purified Water)

Yeast Extract	10.0 g
Charcoal Activated	2.0 g
ACES Buffer	10.0 g
Potassium Hydroxyde	2.8 g
α-Ketoglutarate	1.0 g
Ferric Pyrophosphate	0.25 g
L-Cysteine	0.4 g
Agar	13.0 g
Glycine	3.0 g
Vancomycin	0.001 g
Polymyxin B	80000 IU
Cycloheximide	0.08 g

Final pH 6.9 ± 0.2 at 25°C

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications.

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. ACES buffer (N-2- acetamido-2-aminoethane sulfonic acid) and potassium hydroxide maintain the proper pH for optimal growth. Alpha-ketoglutarate, cysteine and ferric pirophosphate are incorporated to satisfy the specific nutritional requirements of Legionella species. Agar is the solidifying agent. Glycine, vancomycin and polymyxin B inhibit or suppress most non-target bacterial species, both Gram-positive and Gram-negative, including common contaminants such as enterococci, coliform, and *Pseudomonas* spp, while cycloheximide suppresses the growth of yeasts and moulds.

TEST PROCEDURE

For use in clinical analysis, inoculate respiratory specimens directly by rolling the swab over the agar surface (90 mm plate) to obtain isolated colonies or following centrifugation. If contamination flora is abundant, it is recommended to treat specimens by acidification (HCl 0.2M), followed by neutralization (NaOH 0.01M) and/or heating (30 minutes at 50°C).

Contact plates are suitable for environmental monitoring, e.g. surfaces and aerosols generated from air conditioning systems. Selected surfaces are sampled by firmly pressing the agar medium against the test area for about 10 seconds. Do not move laterally the plate. Residues of the medium should be subsequently removed from the area tested. For active air sampling, place the plate, lid up, in the air sampler, remove the lid of the plate and sample a specific volume of air according to laboratory procedure.

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.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. For more details refer to the ISO standard.

Incubate inoculated plates inverted at 36 ± 2°C for 7 to 10 days in humidified atmosphere (air with 2.5% CO_2 can be beneficial for growth of some *Legionella* but is not essential).

Regarding sample transport and storage, analysis should begin as soon as possible after the sample has been taken, preferably on the same day. Samples should be protected from heat and sunlight, kept between 6-20°C and transported to the laboratory within 24 hours of collection.

DOWNLOAD BUTSCHER SAS

INTERPRETING RESULTS

Examine for growth and fluorescence under long-wave UV light at regular intervals during the incubation period starting from the second day.

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.

Select colonies characteristic of *Legionella* on each plate for subculture onto plates of Legionella BCYE Agar (90 mm, ref. 10051) and Legionella BCYE Agar w/o cysteine (90 mm, ref. 10412). Incubate at 36 ± 2°C for at least 2 days in humidified atmosphere. Regard as *Legionella* those colonies which grow on Legionella BCYE Agar but fail to grow on Legionella BCYE Agar w/o cysteine.

APPEARANCE

Opaque, black.

STORAGE

Store at 2-8°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.

Avoid quick temperature shifts to prevent condensation.

SHELF LIFE

6 months.

QUALITY CONTROL

To check the performance of the medium the following microbial strains are used.

Strain		Inoculum	Incubation	Criteria	Specification
Legionella pneumophila	WDCM 00107	50-100 CFU	2-5 d / 36 ± 2°C	$P_R \geq 0.5$	White-grey-blue-purple colonies with entire edge and characteristic ground-glass appearance
Legionella anisa	WDCM 00106		5-10 d / 36 ± 2°C		
Enterococcus faecalis	WDCM 00087	10^4-10^6 CFU	3 d / 36 ± 2°C	Total inhibition	—
Escherichia coli	WDCM 00013			Total or partial inhibition	—

A productivity ratio (P_R) of 0.5 is equivalent to a recovery rate of 50%
BCYE agar used as reference medium

LIMITATIONS

- Some strains of *Pseudomonas*, Enterobacteria or yeasts may develop on this medium but do not produce typical colonies.
- Some strains of *Legionella* may not develop on this medium due to their growth requirements and/or antimicrobial sensitivity.
- For use in medical microbiology, this medium is intended as an aid to the diagnosis of the infection: the interpretation of the results must be made considering the patient's clinical history, the origin of the sample and the results of the microscopic and/or other diagnostic tests.

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

See the references at the end of this document.

TABLE OF SYMBOLS

See the table of symbols at the end of this document.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

The product is available in the various configurations listed below. There may be additional product ref. numbers as well. For an updated listing of available products, visit **liofilchem.com**

Product	Format	Packaging	Ref.
Legionella Agar (GVPC)	90 mm Plate	20 plates	10128 [a]
Legionella Agar (GVPC)	90 mm Plate	100 plates	10128* [a]
Legionella Agar (GVPC)	60 mm Plate (membrane placement)	20 plates	163392 [b]
Legionella Agar (GVPC)	Contact Plate	20 plates	15376 [b]

[a] For *In Vitro* Diagnostic Use (CE marked)

[b] Not intended for the diagnosis of disease or other conditions in humans (non-CE marked)

This document is available from the online Support Center:
liofilchem.com/ifu-sds

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

LIOFILCHEM® s.r.l.
Via Scozia, 64026 Roseto degli Abruzzi (TE) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330 www.liofilchem.com liofilchem@liofilchem.com

CE IVD See product list

Legionella Agar (GVPC)

Terreno selettivo per la ricerca ed il conteggio di *Legionella* spp.

DESCRIZIONE

Legionella Agar (GVPC) è un terreno selettivo utilizzato per l'isolamento primario delle specie di *Legionella* da campioni di acqua e matrici legate all'acqua secondo ISO 11731.

Questo terreno è utilizzato anche per la ricerca di *Legionella* nei campioni clinici.

FORMULA TIPICA* (Per Litro di Acqua Purificata)

Estratto di Lievito	10.0 g
Carbone Attivato	2.0 g
Tampone ACES	10.0 g
Potassio Idrossido	2.8 g
α-Chetoglutarato	1.0 g
Pirofosfato Ferrico	0.25 g
L-Cisteina	0.4 g
Agar	13.0 g
Glicina	3.0 g
Vnacomicina	0.001 g
Polimixina B	80000 UI
Cicloesimide	0.08 g

pH Finale 6.9 ± 0.2 a 25°C

*Adattata e/o integrata per soddisfare le specifiche di performance richieste.

PRINCIPIO DEL METODO

L'estratto di lievito fornisce aminoacidi, azoto, carbonio, vitamine e minerali. Il carbone attivato scompone il perossido di idrogeno, un prodotto metabolico tossico per *Legionella* spp, e che è anche in grado di assorbire l'anidride carbonica e modificare la tensione superficiale. Il tampone ACES (acido sulfonico N-2-acetamino-2-aminoetano) e l'idrossido di potassio mantengono il pH appropriato per una crescita ottimale. Alfa-chetoglutarato, cisteina e pirofosfato ferrico sono incorporati per soddisfare i requisiti nutrizionali specifici per le specie di *Legionella*. L'agar è l'agente solidificante. Glicina, vancomicina e polimixina B inibiscono o sopprimono la maggior parte dei batteri contaminanti, sia Gram positivi che Gram negativi, incluso contaminanti comuni come enterococchi, coliformi, e *Pseudomonas* spp, mentre la cicloesimide sopprime la crescita di lieviti e muffe.

PROCEDURA DEL TEST

Per l'uso nelle analisi cliniche, inoculare i campioni del tratto respiratorio strisciando il tampone direttamente sulla superficie dell'agar (piastra 90 mm) per ottenere colonie ben separate o dopo centrifugazione. In presenza di una flora contaminazione importante, si raccomanda il trattamento dei campioni con acido (HCl 0.2M) seguito da neutralizzazione (NaOH 0.01M) e/o riscaldamento (30 minuti a 50°C).

Le piastre da contatto (contact plate) sono adatte al monitoraggio ambientale, ad esempio di superfici e aerosol generati dai sistemi di condizionamento dell'aria. Le superfici selezionate vengono campionate premendo fermamente la superficie dell'agar sull'area da testare per circa 10 secondi. Non spostare la piastra lateralmente. I residui del terreno devono essere successivamente rimossi dall'area testata. Per il campionamento attivo dell'aria, posizionare la piastra, con il coperchio verso l'alto, nel campionatore d'aria, rimuovere il coperchio della piastra e campionare un volume specifico di aria secondo la procedura di laboratorio.

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 una contenuto di flora batterica contaminate basso, elevato, o estremamente elevato) e dal motivo dell'esame. 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 legionellae 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. Per maggiori informazioni vedere la norma ISO.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Incubare le piastre inoculate a 36 ± 2°C da 7 a 10 giorni in atmosfera umidificata (l'incubazione in atmosfera aerobica con 2.5% CO_2 può risultare benefica per la crescita di alcune legionelle ma non è essenziale).

Riguardo al trasporto ed alla conservazione del campione, l'analisi dovrebbe iniziare il prima possibile subito dopo il prelievo, preferibilmente il giorno stesso. I campioni dovrebbero essere mantenuti in un range di temperatura di 6-20°C al riparo dalla luce e da fonti di calore e trasportati in laboratorio entro 24 ore dalla raccolta.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Esaminare la crescita e la fluorescenza delle colonie esposte a luce UV ad intervalli regolari durante il periodo di incubazione a partire dal secondo giorno.

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.

Selezionare su ciascuna piastra colonie caratteristiche per *Legionella* ed ottenere la subcoltura su piastre di Legionella BCYE Agar (90 mm, ref. 10051) e Legionella BCYE Agar w/o cysteine (90 mm, ref. 10412). Incubare a 36 ± 2°C for almeno 2 giorni in atmosfera umidificata. Considerare come *Legionella* quelle colonie capaci di svilupparsi su Legionella BCYE Agar e che invece non crescono su Legionella BCYE Agar w/o cysteine.

ASPETTO

Nero, opaco.

CONSERVAZIONE

Conservare a 2-8°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.

Evitare rapidi cambiamenti di temperatura per prevenire la formazione di condensa.

VALIDITÀ

6 mesi.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Per il controllo delle performance del terreno si utilizzano i seguenti ceppi microbici.

Ceppo		Inoculo	Incubazione	Criteri	Specifiche
Legionella pneumophila	WDCM 00107	50-100 UFC	2-5 giorni / 36 ± 2°C	$P_R \geq 0.5$	Colonie di colore bianco-grigio-blu-viola con bordo intero e caratteristico aspetto smerigliato
Legionella anisa	WDCM 00106		5-10 giorni / 36 ± 2°C		
Enterococcus faecalis	WDCM 00087	10^4-10^6 UFC	3 giorni / 36 ± 2°C	Inibizione totale	—
Escherichia coli	WDCM 00013			Inibizione parziale o totale	—

Un rapporto di produttività (P_R) di 0.5 equivale a un tasso di recupero del 50%.
BCYE agar utilizzato come terreno di riferimento

LIMITI

- Alcuni ceppi di *Pseudomonas*, di Enterobatteri o di lieviti possono crescere su questo terreno ma non producono le colonie caratteristiche.
- Alcuni ceppi di *Legionella* possono non crescere su questo terreno per via delle loro esigenze nutrizionali e/o sensibilità agli antimicrobici.
- Per l'uso in microbiologia medica, questo terreno è inteso come ausilio alla diagnosi dell'infezione: l'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione e i risultati dell'esame microscopico e/o di altri test diagnostici.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Il prodotto non contiene sostanze 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.

DOMINIQUE DUTSCHER S.A.S.

BIBLIOGRAFIA

Vedere i riferimenti alla fine di questo documento.

TABELLA DEI SIMBOLI

Vedere la tabella dei simboli alla fine di questo documento.

Il prodotto è disponibile in diverse configurazioni. Vedere l'elenco nella lingua inglese.

Questo documento è disponibile dal Support Center online:

liofilchem.com/ifu-sds

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFIA

1. EN ISO 11133:2014+Amd1:2018. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
2. ISO 11731:2017. Water quality – Enumeration of *Legionella*.
3. Montagna M.T. et al. (2014) Legionella spp contamination in indoor air: preliminary results of an italian multicenter study. Epidemiol Prev; 38(6) Suppl 2: 62-65. https://core.ac.uk/download/pdf/53299093.pdf
4. 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.

TABLE OF SYMBOLS / TABELLA DEI SIMBOLI

IVD	*In Vitro* Diagnostic Medical device / Dispositivo Medico Diagnostico *In Vitro*
LOT	Batch code / Codice del lotto
REF	Catalogue number / Numero di catalogo
	Manufacturer / Fabbricante
	Use by / Utilizzare entro
	Fragile, handle with care / Fragile, maneggiare con cura
	Temperature limitation / Limiti di temperatura
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi
	Consult Instruction For Use / Consultare le istruzioni per l'uso
	Do not reuse / Non riutilizzare
	Keep away from light / Tenere al riparo dalla luce

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

LIOFILCHEM® s.r.l.

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

CE IVD See product list / Vedere l'elenco prodotti