

Base de Agar para Legionella BCYE ISO

Cat. 1311

Medio selectivo para el cultivo de Legionella.

Información práctica

Aplicaciones	Categorías
Recuento selectivo	Legionella

Industria: Aguas de consumo

Regulaciones: ISO 11133 / ISO 11731

Principios y usos

La Base de Agar para Legionella BCYE y sus suplementos han demostrado ser óptimos para el cultivo de Legionella con períodos de incubación más cortos a partir de muestras ambientales y clínicas.

Feeley et al. describieron una modificación del Agar F-G en el que la caseína ácida hidrolizada se reemplazó por el extracto de levadura como fuente de proteína, y el almidón se reemplazó por el carbón activado. Este medio, al que denominaron Agar CYE, se ha complementado con Buffer ACES y a-cetoglutarato. Actualmente, en la literatura se denomina como Medio BCYE-a, y se ha demostrado que propicia una recuperación óptima de Legionellaceae en un período de incubación más corto a partir de muestras ambientales y clínicas.

El extracto de levadura proporciona vitaminas, en particular del grupo B, y otros cofactores de crecimiento. L-cisteína proporciona la fuente nutricional requerida. El carbón activado es un agente protector que neutraliza y absorbe los metabolitos tóxicos producidos por el crecimiento bacteriano. Descompone el peróxido de hidrógeno, un producto metabólico tóxico, y también puede absorber CO₂ y modificar la tensión superficial.

La ISO 11731 recomienda el siguiente procedimiento para el aislamiento de Legionella y su recuento en muestras de agua. Las muestras se concentran mediante filtración por membrana, se diluyen o se inoculan directamente en placa dependiendo del origen y las características de la muestra. Fracciones independientes de la muestra diluida deberían someterse a tratamientos con calor o ácido en caso de prever una alta concentración de Legionella y otras bacterias. Estas muestras se transfieren a las placas con el medio de cultivo selectivo elegido para Legionella.

Fórmula en g/L

Carbón activado	2	Agar bacteriológico	13
Extracto de levadura	10		

Preparación

Suspender 12,5 gramos del medio en 450 ml de agua destilada. Calentar hasta que hierva y hasta que el medio esté completamente disuelto. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 48±3 °C y agregar aseptícamente 5 viales de Suplemento para el Crecimiento de Legionella BCYE (Cat. 6022), previamente reconstituidos en 10 ml de agua destilada, estéril y tibia. Para obtener agar GVPC, agregar también 1 vial de Suplemento para el Crecimiento de Legionella GVPC (Cat. 6025), previamente reconstituido con 5 ml de agua destilada estéril o desionizada hasta el 80% del volumen del vial (ver preparación de Cat. 6025), o 1 vial de Suplemento Selectivo MWY para Legionella (Cat. 6067), previamente reconstituido en un 80% del volumen total de agua destilada o desionizada, para obtener agar MWY. Mezclar bien y distribuir en recipientes adecuados.

Instrucciones de uso

Para el cultivo de legionella según la ISO 11731:

Si la muestra contiene una alta concentración de Legionella y una baja concentración de microorganismos interferentes:

- Inocular directamente 0,1-0,5 ml de la muestra distribuyéndola uniformemente sobre una placa de Agar BCYE (Cat. 1311 + Cat. 6022) y sobre una placa BCYE+AB.

Si la muestra contiene una baja concentración de Legionella y una baja concentración de microorganismos interferentes:

- Filtrar por membrana la muestra inicial.
- Colocar el filtro de membrana sobre la placa BCYE.
- Repetir el proceso para el agar GVPC (Cat. 1311 + Cat. 6025) y/o agar MWY (Cat. 1311 + Cat. 6067).

Si la muestra contiene una alta concentración de microorganismos interferentes:

- Se inoculará directamente, concentrada o diluida.
- Dividir cada tipo de muestra en tres porciones. Una de ellas se utilizará sin tratar, la segunda se somete a un tratamiento térmico y la tercera a un tratamiento ácido.
- Inocular 0,1-0,5 ml sobre placas de agar GVPV y agar MWY.

Si la muestra contiene una cantidad extremadamente alta de microorganismos interferentes:

- Se inoculará directamente y diluida.
- Cada muestra se somete a un tratamiento combinado térmico y ácido.
- Inocular 0,1-0,5 ml sobre placas de agar GVPC y agar MWY.

- Dejar reposar las placas sembradas hasta que el inóculo se haya absorbido e incubar a 36 ± 2 °C durante 7-10 días.
- Confirmar las colonias presuntivas de Legionella en agar BCYE y agar BCYE-cys.

Control de calidad

Solubilidad	Apariencia	Color del medio deshidratado	Color del medio preparado	Final pH (25°C)
Sin restos	Polvo fino	Negro	Negro	$6,9\pm 0,2$

Test microbiológico

De acuerdo a la ISO 11133:

Condiciones de incubación: (36 ± 2 °C / 2-5 días).

Condiciones de inoculación: Productividad cuantitativa (100 ± 20 . Min. 50 CFU).

Medio de referencia: Lote de BCYE ya validado.

Microrganismos	Especificación	Reacción característica
Legionella pneumophila ATCC 33152	Buen crecimiento >70%	Colonias de color blanco-gris-azul-púrpura con el borde completo y apariencia característica de vidrio esmerilado.

Almacenamiento

Temp. Min.: 2 °C
Temp. Max.: 25 °C

Bibliografía

Feeley J.C., Groman G.W., Weaver R.E., Mackel D.C..

International standard ISO 11731 water quality- Detection and enumeration of Legionella.