

KVALITETSKONTROLPROCEDURER

I INDLEDNING

BD BBL BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract, trækulsgærekstrakt tilsat buffer) agar bruges til isolering og rendyrkning af *Legionella* arter.

II FUNKTIONSTESTPROCEDURE

- Inokulér repræsentative prøver med de kulturer, der er anført herunder.
 - Tilfør 0,1 mL af en kultur indeholdende 30 til 300 CFU/0,1 mL til hver plade, og inokulér ved hjælp af spredning med en steril glasspreder.
 - Inkubér pladerne ved $35 \pm 2^\circ\text{C}$ i en aerob atmosfære.
 - Inkludér plader af et tidligere testet parti af **BD BBL BCYE Agar** og **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (Trypticase sojaagar med 5 % fåreblod)** plader som henholdsvis positive og negative vækstkontroller.
- Undersøg pladerne efter 18 til 24 h og 48 til 72 h for vækst, pigmentering og fluorescens.
- Forventede resultater

CLSI kontrolorganismer (ATCC stammer)	ATCC	Genopretning	Colony Farve / Fluorescens
* <i>Legionella pneumophila</i>	33152	Vækst ved 72 h	Kolonier er hvidgrå, grå til blågrå.**
* <i>Fluoribacter (Legionella) bozemanii</i>	33217	Vækst ved 72 h	Kolonier er hvidgrå, grå til blågrå; blåhvid fluorescens under langbølge-ultraviolet lys.
<i>Tatlockia (Legionella) micdadei</i>	33204	Vækst ved 72 h	
Yderligere anvendte stammer			
<i>Fluoribacter (Legionella) dumoffii</i>	33279	Vækst	Kolonier er hvidgrå, grå til blågrå. Kun blåhvidfluorescens under langbølge-ultraviolet lys af kolonier.

* Anbefalet organismestamme til brugerkvalitetskontrol.

** CLSI standard M22-A3 omfatter "gulgrøn fluorescens under langbølge-ultraviolet lys." Faktisk fluorescerer denne art ikke.^{1,2} CLSI-underkomiteen er underrettet om denne uoverensstemmelse.

BEMÆRK! Brugerkvalitetskontroltestning af fritagne medier, som anvendes til kræsne organismer såsom *Legionella* arter, anbefales varmt i CLSI M22-A3.

III YDERLIGERE KVALITETSKONTROL

- Undersøg pladerne som beskrevet under "Produktforringelse."
- Undersøg visuelt repræsentative plader for at sikre, at eventuelle eksisterende fysiske defekter ikke vil påvirke anvendelsen.
- Bestem pH potentiometrisk ved stuetemperatur for at overholde specifikationen på $6,9 \pm 0,2$.
- Bemærk pladernes fasthed under inokuleringsproceduren.
- Inkubér ikke-inokulerede repræsentative plader ved $35 \pm 2^\circ\text{C}$ i 72 h, og undersøg dem for mikrobiel kontaminering.

PRODUKTINFORMATION

IV TILSIGTET BRUG

Trækulsgærekstrakt tilsat buffer (**BD BBL BCYE**) agar bruges til primær isolering og rendyrkning af *Legionella pneumophila* og andre *Legionella* arter fra miljømæssige prøver og kliniske præparater.

V RESUMÉ OG FORKLARING

BD BBL BCYE Agar er baseret på Edelsteins modifikation af tidligere beskrevne medier. I 1979 beskrev Feely et al. trækulsgærekstrakt (Charcoal Yeast Extract, CYE) agar som en modifikation af et eksisterende medium, F-G Agar.^{1,2} De erstattede stivelsen i F-G agaren med aktivt trækul og erstattede kaseinhydrolysat med gærekstrakt, hvilket resulterede i bedre isolering af *L. pneumophila*. I 1980 rapporterede Pasculle, at CYE agar kunne blive bedre ved at tilsætte ACES buffer.³ Et år senere øgede Edelstein yderligere følsomheden af mediet ved at tilsætte alfa-ketoglutarat (BCYE Agar).⁴

VI PROCEDURENS PRINCIPPER

BD BBL BCYE Agar er et beriget medium til isolering og rendyrkning af *Legionella* arter. Gærekstrakt leverer proteinet og andre næringsstoffer, som er nødvendige for at understøtte vækst. L-cystein, en vigtig aminosyre, og opløseligt ferripyrophosphat, et jernsupplement, er inkorporeret for at tilfredsstille specifikke ernæringsmæssige krav fra *Legionella* species. Alfa-ketoglutarat tilsættes for at stimulere væksten. Aktivt trækul nedbryder hydrogenperoxid, et metabolisk produkt, der er giftigt for *Legionella* arter, og kan også samle kuldioxid og modificere overfladespændingen. ACES buffer tilsættes for at opretholde den korrekte pH for at få optimal vækst.

VII REAGENSER

BD BBL BCYE Agar

Omtrentlig formel* pr. liter rensat vand

Gærekstrakt.....	10,0 g	Trækul, aktivt.....	2,0 g
L-cysteinhydrochlorid	0,4 g	Alfa-Ketoglutarat.....	1,0 g
Ferripyrophosphat	0,25g	Agar.....	15,0 g
ACES Buffer	10,0 g		

* Justeret og/eller suppleret som påkrævet for at leve op til funktionskriterier.

Advarsler og forholdsregler

Til *in vitro* diagnostik.

Hvis der ses for kraftig fugtighed, inverteres bunden over et forskudt låg, hvilket giver mulighed for lufttørring for at forhindre dannelse af en forsejling mellem toppen og bunden af pladen under inkubation.

Patogene mikroorganismer, inklusive hepatitisvira og humant immundefekt virus, kan forekomme i kliniske præparater.

"Standardforholdsregler"⁵⁻⁸ og institutionelle retningslinier skal overholdes ved håndtering af alle emner, der er kontamineret med blod og andre legemsvæsker. Efter brug skal præparerede plader, prøvebeholdere og andre kontaminede materialer steriliseres ved autoklavering, inden de kasseres.

Opbevaringsinstruktioner

Opbevares efter modtagelse i mørke ved 2–8 °C. Undgå nedfrysning eller overopvarmning. Må ikke åbnes, før de skal bruges. Minimér eksponering for lys. Klargjorte plader, der opbevares i deres originale emballage ved 2–8 °C indtil lige før brug, kan inokuleres indtil udløbsdatoen og inkuberes i de anbefalede inkubationstider. Lad mediet opnå stuetemperatur inden inokulering.

Produktforringelse

Pladerne må ikke anvendes, hvis de viser tegn på mikrobiel kontaminering, misfarvning, udtørring eller andre tegn på forringelse.

VIII PRØVEINDSAMLING OG -HÅNDTERING

En lang række podedinde og beholdere er blevet udtænkt til opsamling af præparater. Præparater skal være opsamlet, inden der indgives antimikrobielle stoffer. Sørg for prompte levering til laboratoriet. Adskillige opbevaringsmedier eller transportsystemer, som fx **BBL** prøveindsamlings- og transportprodukter, er blevet udtænkt til at forlænge mikroorganismers overlevelse, når der forventes en betydelig forsinkelse mellem indsamling og endelig dyrkning.

Der henvises til relevante tekster for detaljer om procedurer for prøveindsamling og -håndtering.^{9,10}

IX PROCEDURE

Materiale vedlagt

BD BBL BCYE Agar

Nødvendige materialer, der ikke er vedlagt

Hjælpedyrkningsmedier, reagenser, kvalitetskontrolorganismer og laboratorieudstyr som påkrævet.

Testprocedure

Overhold aseptisk teknik.

Agaroverfladen skal være glat, fast og fugtig, men uden overdreven fugt.

Lav dyrkning af præparatet så hurtigt som muligt efter modtagelse i laboratoriet. Hvis man vil dyrke et præparat fra en podedind, inokuleres mediet ved at rulle podedinden over en tredjedel af agaroverfladen og udstryge resten af pladen for at få isolerede kolonier. Materiale, der ikke dyrkes fra podedinde, kan stryges på mediet med en steriliseret inokuleringsløkke. Udstrykningspladeteknikken anvendes primært til at isolere rene kulturer fra præparater, der indeholder blandet flora.

Inkubér pladerne i omvendt position (agarsiden opad) ved 35 ± 2 °C i mindst 3 dage. Vækst bliver normalt synlig inden for 3 til 4 dage, men kan tage op til 2 uger om at fremkomme.

Bruger kvalitetskontrol

Hvert medieparti er blevet testet ved hjælp af passende kvalitetskontrolorganismer, og denne testning opfylder produktspecifikationerne og CLSI-standarderne, hvor det er relevant. Kvalitetskontroltestning skal som altid udføres i overensstemmelse med gældende lokale eller nationale regulativer, akkrediteringskrav og/eller laboratoriets standardkvalitetskontrolprocedurer.

X RESULTATER

Efter sufficient inkubation bør pladerne vise isolerede kolonier i udstrøgne områder og sammenflydende vækst i områder med kraftig inokulering. *Legionella pneumophila* producerer små til store, glatte, farveløse til blege, blågrå, let slimagtige kolonier. Læs litteraturen vedrørende morfologi, tilstedeværelse af og farve på fluorescens osv. af andre arter.^{11,12}

Der skal udføres en gramfarvning, biokemiske tests og serologiske procedurer for at bekræfte fundene.

XI PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

Der kan udføres nogle diagnostiske tests med den primære plade. Der anbefales imidlertid en ren kultur til biokemiske tests og andre identifikationsprocedurer. Læs de relevante tekster for detaljerede oplysninger og anbefalede procedurer.^{11, 13, 14}

XII FUNKTIONSDATA

Inden frigivelse testes alle partier af **BD BBL BCYE Agar** for funktionsdata. Repræsentative prøver af partiet testes med en cellesuspension af *Legionella*, der er inokuleret ved at sprede cellesuspensionen, fortyndet i isotonisk saltvand til at give 30–300 CFU/plade, over agarfladen. Plader inkuberes ved 35–37 °C i tre dage i en aerob atmosfære. Der ses moderat til kraftig vækst og korrekt farve af kolonier og fluorescens under langbølge-ultraviolet lys.

XIII BESTILLING

Kat. nr.	Beskrivelse
221808	BD BBL BCYE Agar

XIV LITTERATUR

1. Feeley, J.C., R.J. Gibson, G.W. Gorman, N.C. Langford, J.K. Rasheed, D.C. Mackel, and W.B. Baine. 1979. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 10:437–441.
2. Feeley, J.C., G.W. Gorman, R.E. Weaver, D.C. Mackel, and H.W. Smith. 1978. Primary isolation media for Legionnaires' disease bacterium. J. Clin. Microbiol. 8:320–325.
3. 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, and J.N. Dowling. 1980. Pittsburgh pneumonia agent: direct isolation from human lung tissue. J. Infect. Dis. 141:727–732.
4. Edelstein, P.H. 1981. Improved semi-selective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. J. Clin. Microbiol. 14:298–303.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
6. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. 17:53–80.
7. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
8. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021–0045.
9. Isenberg, H.D., F.D. Schoenknecht, and A. von Graevenitz. 1979. Cumitech 9, Collection and processing of bacteriological specimens. Coordinating ed., S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Miller, J.M. and H.T. Holmes. 1999. Specimen collection, transport, and storage, p.33–63. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Winn, W.C., Jr. 1999. *Legionella*, p. 572–585. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Weaver, R.E. 1978. Cultural and staining characteristics, p. 40–43. In G.L. Jones, and G.A. Herbert (ed.), "Legionnaires'" the disease, the bacterium, and methodology. USDHEW, Center for Disease Control, Atlanta.
13. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, and W.C. Winn, Jr. 1997. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th ed. J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
14. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.

Teknisk service og support: skal De kontakte den lokale BD repræsentant eller besøg www.bd.com.



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.