

MASSNAHMEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE**I EINFÜHRUNG**

BCYE Agar (BCYE-Agar (BCYE = Buffered Charcoal Yeast Extract; gepufferter Holzkohle-Hefeextrakt) dient zur Isolierung und Kultivierung der *Legionella*-Spezies.

II LEISTUNGSPRÜFUNG

1. Repräsentative Proben mit den nachstehend aufgeführten Kulturen inokulieren.
 - a. Jeder Platte 0,1 mL einer Kultur mit 30 bis 300 KBE/0,1 mL hinzufügen und zur Inokulation mit einem sterilen Glasverteiler ausstreichen.
 - b. Platten bei 35 ± 2 °C aerob inkubieren.
 - c. Jeweils Platten einer zuvor getesteten Charge mit BCYE Agar und **Trypticase-Sojaagar** mit 5 % Schafblut als positive bzw. negative Wachstumskontrollen mittesten.
2. Die Platten nach 18 bis 24 h und 48 bis 72 h auf Wachstum, Pigmentierung und Fluoreszenz untersuchen.
3. Zu erwartende Ergebnisse

CLSI-Kontrollorganismen (ATCC-Stämme)

Legionella pneumophila* (33152) Wachstum nach 72 h; Kolonien sind weiß-grau, grau bis blaugrau.

**Fluoribacter (Legionella) bozemanii* (33217) Wachstum nach 72 h; Kolonien sind weiß-grau, grau bis blaugrau, blau-weiße Fluoreszenz unter langwelligem UV-Licht.

Tatlockia (Legionella) micdadei 33204 Wachstum nach 72 h

Weiterer verwendeter Stamm

Fluoribacter (Legionella) dumoffii ATCC 33279 Wachstum; Kolonien sind weiß-grau, grau bis blaugrau Blau-weiße Fluoreszenz nur der Kolonien unter langwelligem UV-Licht.

* Empfohlener Stamm des Mikroorganismus für Qualitätssicherung durch den Anwender.

** Der CLSI-Standard M22-A3 beschreibt zudem „gelb-grüne Fluoreszenz unter langwelligem UV-Licht.“ Tatsächlich fluoresziert diese Spezies nicht.^{1,2} Dem CLSI-Subkomitee wurde diese Diskrepanz mitgeteilt.

HINWEIS: Gemäß CLSI M22-A3 wird ausdrücklich empfohlen, dass der Anwender Qualitätskontrolltests für Medien durchführt, die keinem Kontrolltest unterliegen und für anspruchsvolle Organismen wie beispielsweise *Legionella* sp. verwendet werden.

III ZUSÄTZLICHE QUALITÄTSKONTROLLE

1. Die Agarplatten, wie unter „Haltbarkeit des Produkts“ beschrieben, begutachten.
2. Die repräsentativen Platten auf sichtbare Beschädigungen prüfen, durch die ihre Verwendung beeinträchtigt werden könnte.
3. Den pH-Wert mit dem Potentiometer bei Raumtemperatur darauf überprüfen, ob ein Bereich von $6,9 \pm 0,2$ eingehalten wird.
4. Die Festigkeit der Agarplatten während der Inokulation beachten.
5. Unbeimpfte repräsentative Platten 72 h bei 35 ± 2 °C inkubieren und auf mikrobielle Kontamination untersuchen.

PRODUKTINFORMATIONEN**IV VERWENDUNGSZWECK**

Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) Agar (BCYE Agar) dient zur primären Isolierung und Kultivierung von *Legionella pneumophila* und anderen *Legionella*-Spezies aus Umgebungsproben und klinischen Proben.

V ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

BCYE Agar basiert auf Edelsteins Modifizierung der zuvor beschriebenen Medien. 1979 beschrieben Feely et al. Holzkohle-Hefeextrakt-Agar (Charcoal Yeast Extract; CYE) als Modifikation eines bestehenden Mediums, F-G-Agar.^{1,2} Sie ersetzen die Stärke in F-G-Agar durch Aktivkohle und Hefeextrakt durch Caseinhydrolysat, was zu einer besseren Isolierung von *L. pneumophila* führte.

1980 berichtete Pasculle, dass CYE-Agar durch Pufferung des Mediums mit dem ACES-Puffer verbessert werden konnte.³ Ein Jahr später konnte Edelstein die Empfindlichkeit des Mediums zur den Zusatz von alpha-Ketoglutarat (BCYE Agar) noch weiter verbessern.⁴

VI VERFAHRENSGRUNDLAGEN

BCYE Agar ist ein angereichertes Medium zur Isolierung und Kultivierung der *Legionella*-Spezies. Hefeextrakt liefert das zur Wachstumsförderung wichtige Protein und andere Nährstoffe. L-Cystein, eine essenzielle Aminosäure, und lösliches Eisenpyrophosphat, ein Eisenzusatz, sind zur Erfüllung bestimmter ernährungsspezifischer Bedürfnisse der *Legionella*-Spezies integriert. Alpha-Ketoglutarat wird zur Wachstumsstimulierung hinzugefügt. Aktivkohle wandelt Wasserstoffperoxid, ein Stoffwechselprodukt, das für die *Legionella*-Spezies toxisch ist, um und kann zudem Kohlendioxid binden und die Oberflächenspannung verändern. ACES-Puffer wird zum Erhalt des korrekten pH-Wertes für ein optimales Wachstum zugesetzt.

VII REAGENZIEN

BCYE Agar

Ungefähre Zusammensetzung* pro L destilliertem Wasser

Hefeextrakt	10,0 g
L-Cystein-HCl	0,4 g
Eisen (III)-Pyrophosphat.....	0,25 g
ACES Puffer	10,0 g
Aktivkohle.....	2,0 g
Alpha-Ketoglutarat.....	1,0 g
Agar	15,0 g

*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum.

Wenn übermäßige Feuchtigkeit vorhanden ist, das Unterteil umdrehen, versetzt auf den Deckel legen und in der Luft trocknen lassen, um zu verhindern, dass während der Inkubation eine Abdichtung zwischen dem Deckel und dem Unterteil entsteht.

Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, wie z.B. Hepatitis-Viren und HIV, enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die „Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen“⁵⁻⁸ sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten. Gebrauchsfertige Agarplatten, Probenbehälter und sonstige kontaminierte Materialien nach der Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

Aufbewahrung

Agarplatten nach Erhalt bei 2 – 8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nicht einfrieren oder Überhitzen. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor Lichteinwirkung schützen. Gebrauchsfertige Platten, die bis zur Verwendung in der Originalverpackung bei 2 – 8 °C aufbewahrt wurden, können bis zum Verfallsdatum inokuliert und für die empfohlene Inkubationsdauer inkubiert werden. Medium vor der Inokulation Raumtemperatur annehmen lassen.

Haltbarkeit des Produkts

Agarplatten bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

VIII PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Zur Probenentnahme wurden eine Vielzahl von Abstrichtupfern und Behältern entwickelt. Die Probenentnahme sollte vor der Behandlung mit Antibiotika erfolgen. Für einen ungehinderten Transport zum Labor ist zu sorgen. Mehrere Aufbewahrungsmedien oder Transportsysteme, wie beispielsweise die Probenentnahme- und Transportprodukte von **BBL**, werden für die Verlängerung der Lebensdauer von Mikroorganismen empfohlen, wenn eine signifikante Verzögerung zwischen Entnahme und endgültiger Kultivierung zu erwarten ist.

Einzelheiten zur Probenentnahme und -handhabung sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.^{9,10}

IX VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

BCYE Agar

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und Laborgeräte nach Bedarf.

Testverfahren

Aseptisch vorgehen.

Die Agarfläche sollte glatt, fest und feucht sein, jedoch ohne überschüssige Feuchtigkeit.

Die Probe nach dem Eintreffen im Labor schnellstmöglich kultivieren. Zur Kultivierung einer Probe von einem Ausstrichupfer das Medium inokulieren, indem der Ausstrichupfer über ein Drittel der Agarfläche gerollt und die restliche Platte dann ausgestrichen wird, um isolierte Kolonien zu erhalten. Material, das nicht von Ausstrichupfern kultiviert wird, kann mit einer sterilisierten Inokulationsöse auf das Medium ausgestrichen werden. Die Ausstrichplattenmethode dient primär zur Gewinnung von isolierten Kolonien aus Proben mit Mischflora.

Die Platten umgedreht (mit der Agarseite nach oben) mindestens 3 Tage bei 35 ± 2 °C inkubieren. Wachstum lässt sich üblicherweise innerhalb von 3 bis 4 Tagen beobachten, es kann jedoch bis zu 2 Wochen dauern.

Qualitätssicherung durch den Anwender

Siehe „Maßnahmen zur Qualitätskontrolle“.

Es sind die geltenden gesetzlichen und behördlichen und die in den Akkreditierungsbedingungen festgelegten Vorschriften zur Qualitätskontrolle sowie die laborinternen Standardvorgaben zur Qualitätskontrolle zu beachten. Benutzer sollten die relevanten CLSI-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

X ERGEBNISSE

Nach hinreichender Inkubation sollten die Platten in Ausstrichbereichen isolierte Kolonien und in stark inokulierten Bereichen ineinander übergehendes Wachstum zeigen. *Legionella pneumophila* bildet kleine bis große, glatte, farblose bis blasse, blau-graue, leicht mukoide Kolonien. Nähere Informationen finden Sie in der Literatur zur Morphologie, dem Vorhandensein und der Farbe der Fluoreszenz usw. anderer Spezies.^{11,12}

Zur Bestätigung der Befunde sollten eine Gramfärbung, biochemische Tests sowie serologische Verfahren durchgeführt werden.

XI VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Mit der primären Platte können einige Diagnostests durchgeführt werden. Für biochemische Tests und andere Nachweisverfahren wird jedoch die Verwendung einer Reinkultur empfohlen. Detaillierte Informationen und empfohlene Verfahren sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.^{11,13,14}

XII LEISTUNGSMERKMALE

Vor der Freigabe werden alle Chargen von BCYE Agar auf ihre Leistungsmerkmale getestet. Repräsentative Proben der Charge werden mit Zellsuspensionen von *Legionella* getestet, die durch Verteilung der Zellsuspension über die Agarfläche inokuliert werden, wobei die Zellsuspension zuvor in normaler Kochsalzlösung auf 30 bis 300 KBE/Platte verdünnt wird. Die Platten werden 3 Tage lang bei $35 - 37$ °C in einer aeroben Atmosphäre inkubiert. Ein mäßiges bis starkes Wachstum und die korrekte Farbe der Kolonien und der Fluoreszenz unter langwelligem UV-Licht lässt sich beobachten.

XIII LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr. Beschreibung

221808 **BBL BCYE Agar, Packung mit 10 Platten**

215102 **BBL BCYE Agar, Karton mit 100 Platten**

XIV LITERATUR

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., FD. 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. Tenover, 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. Tenover, 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.

 Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA
800-638-8663
www.bd.com/ds

 Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo, BBL and Trypticase are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2011 BD