

## PROCEDURY KONTROLI JAKOŚCI

### I WPROWADZENIE

Podłoże BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) Agar (Zbuforowany agar z wyciągiem z drożdży, z węglem drzewnym [BCYE]) jest stosowane do izolacji i hodowli gatunków bakterii z rodzaju *Legionella*.

### II PROCEDURA TESTU

- Zaszczepić reprezentatywne próbki podłoża hodowlami wymienionych poniżej szczepów.
  - Dodać do każdej płytki 0,1 mL hodowli zawierającej 30–300 CFU/0,1 mL i posiać za pomocą jałowej szpatułki szklanej.
  - Inkubować płytki w temperaturze  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  w warunkach tlenowych.
  - Dołączyć płytki z uprzednio badanej partii płytek z podłożem BCYE Agar oraz **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood jako kontrole, odpowiednio: dodatnie i ujemne.
- Zbadać płytki po upływie 18–24 i 48–72 h, oceniając stopień wzrostu, zabarwienie i fluorescencję.
- Oczekiwane wyniki

| Mikroorganizmy CLSI                          | ATCC  | Wzrost         | Zabarwienie kolonii/Fluorescencja                                                                                      |
|----------------------------------------------|-------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * <i>Legionella pneumophila</i>              | 33152 | Wzrost po 72 h | Biało-szare, szare aż do niebiesko-szarego**                                                                           |
| * <i>Fluoribacter (Legionella) bozemanii</i> | 33217 | Wzrost po 72 h | Biało-szare, szare aż do niebiesko-szarego; niebiesko-biała fluorescencja pod wpływem światła UV o dużej długości fali |
| <i>Tatlockia (Legionella) micdadei</i>       | 33204 | Wzrost         |                                                                                                                        |
| <b>Dodatkowy mikroorganizm</b>               |       |                |                                                                                                                        |
| <i>Fluoribacter (Legionella) dumoffii</i>    | 33279 | Wzrost         | Biało-szare, szare aż do niebiesko-szarego; niebiesko-biała fluorescencja pod wpływem światła UV o dużej długości fali |

\* Szczep zalecany do przeprowadzania kontroli jakości przez użytkownika.

\*\* Standard CLSI M22-A3 obejmuje „żółto-zieloną fluorescencję pod wpływem światła UV o dużej długości fali”. W rzeczywistości ten gatunek nie wykazuje fluorescencji.<sup>1,2</sup> O tej rozbieżności poinformowano podkomisję CLSI.

**UWAGA:** Standard CLSI M22-A3 zdecydowanie zaleca kontrolę jakości przez użytkownika podłoży nieobjętych tym wymogiem, używanych do hodowli drobnoustrojów o wysokich wymaganiach odżywczych, takich jak *Legionella* sp.

### III DODATKOWA KONTROLA JAKOŚCI

- Sprawdzić płytki zgodnie z punktem „Pogorszenie jakości produktu”.
- Wzrokowo ocenić reprezentatywne płytki, aby upewnić się, że żadne istniejące wady fizyczne nie będą przeszkadzały w ich użytkowaniu.
- Określić potencjometrycznie wartość pH w temperaturze pokojowej, aby upewnić się, że odczyn jest zgodny ze specyfikacją i wynosi  $6,9 \pm 0,2$ .
- Podczas procedury zaszczepiania zwrócić uwagę na twardość podłoża na płytkach.
- Inkubować niezaszczepione, reprezentatywne płytki w temperaturze  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  przez 72 h, po czym zbadać je pod kątem skażenia drobnoustrojami.

## INFORMACJA O PRODUKCIE

### IV PRZEZNACZENIE

Podłoże Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) Agar (Zbuforowany agar z wyciągiem z drożdży, z węglem drzewnym [BCYE]) jest stosowane do pierwotnej izolacji i hodowli *Legionella pneumophila* i innych gatunków bakterii z rodzaju *Legionella* z próbek pochodzenia środowiskowego i klinicznego.

### V STRESZCZENIE I OBJAŚNIENIE

Podłoże BCYE Agar jest wytwarzane w oparciu o modyfikację opisanego wcześniej podłoża, wprowadzoną przez Edelsteina. W 1979 roku Feely i wsp. opisali podłoże Charcoal Yeast Extract (CYE) Agar jako modyfikację istniejącego podłoża, F-G Agar.<sup>1,2</sup> Zastąpili obecną w podłożu F-G Agar skrobię węglem aktywowanym, zamienili też hydrolizat kazeinowy na wyciąg z drożdży, uzyskując lepszy wzrost *L. pneumophila*. W 1980 roku Pasculle doniósł o możliwości ulepszenia podłoża CYE Agar poprzez zbuforowanie go za pomocą buforu ACES Buffer.<sup>3</sup> Rok później Edelstein zwiększył czułość podłoża, dodając alfa-ketoglutaran (podłoże BCYE Agar).<sup>4</sup>

### VI ZASADY PROCEDURY

Podłoże BCYE Agar jest wzbogaconym podłożem do izolacji i hodowli gatunków bakterii z rodzaju *Legionella*. Wyciąg z drożdży dostarcza białka oraz innych składników odżywczych potrzebnych do wzrostu. L-cysteina (niezbędny aminokwas) oraz rozpuszczalny pirofosforan żelaza (dodatek uzupełniający żelazo) zostały włączone w skład podłoża w celu spełnienia specyficznych wymagań odżywczych gatunków bakterii z rodzaju *Legionella*. Dodatek alfa-ketoglutaranu służy do stymulacji wzrostu. Aktywowany węgiel drzewny rozkłada nadtlenuk wodoru, produkt metabolizmu toksyczny dla gatunków bakterii z rodzaju *Legionella*, może też absorbować dwutlenek węgla i modyfikować napięcie powierzchniowe. Bufor ACES dodano w celu utrzymania właściwego pH dla optymalnego wzrostu.

## VII ODCZYNNIKI

### BCYE Agar

Przybliżony skład\* w przeliczeniu na 1 litr wody oczyszczonej

|                                |        |                                   |        |
|--------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|
| Wyciąg z drożdży .....         | 10,0 g | Węgiel drzewny (aktywowany) ..... | 2,0 g  |
| Chlorowodorek L-cysteiny ..... | 0,4 g  | Alfa-ketoglutaran .....           | 1,0 g  |
| Pirofosforan żelaza .....      | 0,25 g | Agar .....                        | 15,0 g |
| ACES Buffer .....              | 10,0 g |                                   |        |

\* Skorygowany lub uzupełniony zgodnie z wymaganiami kryteriów działania.

**Ostrzeżenia i środki ostrożności:** Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.

W razie zaobserwowania nadmiernego zawilgocenia należy wysuszyć dolną powierzchnię płytki na powietrzu, aby nie dopuścić do powstawania warstwy wody między górną a dolną częścią płytki w trakcie inkubacji.

W próbkach klinicznych mogą być obecne mikroorganizmy chorobotwórcze, w tym wirusy zapalenia wątroby i wirus HIV. Podczas pracy z wszelkimi materiałami zanieczyszczonymi krwią i innymi płynami ustrojowymi należy stosować „Standardowe środki ostrożności”<sup>5-8</sup> oraz przestrzegać wytycznych obowiązujących w danym laboratorium. Po użyciu gotowe podłoża na płytkach, pojemniki na próbki oraz inne materiały skażone należy przed wyrzuceniem poddać sterylizacji w autoklawie.

**Instrukcje dotyczące przechowywania:** Otrzymane płytki przechowywać w zaciemnionym miejscu w temperaturze 2–8 °C. Unikać zamrażania i przegrzewania. Otwierać dopiero bezpośrednio przed użyciem. Ograniczać do minimum ekspozycję na światło. Na gotowych podłożach przechowywanych do momentu użycia w oryginalnych opakowaniach w formie rękawa, w temperaturze 2–8 °C, można wykonywać szereg podłoży podtrzymujących lub systemów transportowych, takich jak produkty **BBL** do pobierania próbek i ich transportu. Przed posiewem ogrzać podłoże do temperatury pokojowej.

**Pogorszenie jakości produktu:** Nie używać płytek, jeżeli są na nich widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia lub inne objawy pogorszenia jakości.

## VIII POBIERANIE PRÓBEK I POSTĘPOWANIE Z NIMI

Do pobierania próbek opracowano różnorodne wymazówki i pojemniki. Próbkę należy pobierać przed podaniem środków przeciwbakteryjnych. Konieczne jest zapewnienie szybkiej dostawy do laboratorium. W celu przedłużenia przeżywalności bakterii w sytuacji, gdy można się spodziewać znacznego opóźnienia pomiędzy pobraniem próbek a ostatecznym posianiem drobnoustrojów, opracowano szereg podłoży podtrzymujących lub systemów transportowych, takich jak produkty **BBL** do pobierania próbek i ich transportu. Szczegółowe informacje na temat pobierania próbek i postępowania z nimi znajdują się w odpowiednich pozycjach piśmiennictwa.<sup>9,10</sup>

## IX PROCEDURA

**Dostarczane materiały:** BCYE Agar

**Materiały wymagane, ale niedostarczane:** Pomocnicze pożywki hodowlane, odczynniki, drobnoustroje do kontroli jakości i wyposażenie laboratoryjne zgodnie z wymaganiami.

**Procedura testowa:** Stosować techniki aseptyczne.

Powierzchnia podłoża agarowego powinna być gładka, twarda i wilgotna, lecz bez nadmiernej wilgoci.

Wykonać posiew próbki możliwie jak najszybciej po dostarczeniu materiału do laboratorium. W celu wykonania posiewu próbki z wymazówki zaszczyć podłoże, przetaczając wymazówkę poprzez jedną trzecią powierzchni podłoża agarowego, po czym posiać pasmowo próbkę na pozostałej części płytki dla uzyskania izolowanych kolonii. Materiał nie pochodzący z wymazówek można posiać pasmowo na podłoże jałową eż do posiewów. Technika posiewu pasmowego na płytkę stosuje się przede wszystkim do uzyskiwania izolowanych kolonii z próbek zawierających florę mieszaną.

Płytki inkubować w położeniu odwróconym (stroną agarową w górę) w temperaturze 35 ± 2 °C co najmniej przez 3 dni. Wzrost jest zwykle widoczny w ciągu 3–4 dni, ale czas potrzebny do jego pojawienia się może też trwać do 2 tygodni.

**Kontrola jakości przez użytkownika:** Patrz „Procedury kontroli jakości”.

Każda partia podłoża została przetestowana przy użyciu odpowiednich drobnoustrojów do kontroli jakości. Ten rodzaj testowania jest zgodny ze specyfikacją produktu i standardami CLSI, jeśli mają zastosowanie. Jak zwykle, testy należy wykonać zgodnie z obowiązującymi wymogami kontroli jakości, wynikającymi z przepisów miejscowych, stanowych, federalnych lub krajowych, wymogami akredytacji i/lub rutynowymi procedurami kontroli jakości w danym laboratorium.

## X WYNIKI

Po odpowiednim okresie inkubacji płytki powinny zawierać pojedyncze kolonie w miejscach pasmowego posiewu oraz wzrost zlewny w obszarach gęstego zaszczenia. *Legionella pneumophila* tworzy kolonie od małych do dużych, gładkie, od bezbarwnych do zabarwionych na błędy kolor niebiesko-szary, z lekką domieszką śluzu. Informacje na temat morfologii kolonii innych gatunków oraz obecności i barwy ich fluorescencji znajdują się w odpowiednich pozycjach piśmiennictwa.<sup>11,12</sup>

W celu potwierdzenia obserwacji należy wykonać barwienie metodą Grama, testy biochemiczne oraz badania serologiczne.

## XI OGRANICZENIA PROCEDURY

Niektóre testy diagnostyczne można przeprowadzać na koloniach z płytki z hodowlą po izolacji pierwotnej. Jednakże do testów biochemicznych oraz innych badań identyfikacyjnych zaleca się używanie czystych hodowli. Dodatkowe informacje oraz zalecane procedury znajdują się w odpowiednich pozycjach piśmiennictwa.<sup>11,13,14</sup>

## XII CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA

Przed dopuszczeniem do obrotu wszystkie partie podłoża BCYE Agar sprawdza się pod kątem ich skuteczności. Reprezentatywne próbki z danej partii bada się z użyciem zawieszin komórek bakterii *Legionella*, zaszczeniając je poprzez rozprowadzenie na powierzchni podłoża agarowego zawiesziny komórek bakteryjnych, rozcieńczonej w normalnym roztworze soli fizjologicznej do stężenia 30–300 CFU/płytkę. Płytki inkubuje się w warunkach tlenowych w temperaturze 35–37 °C przez trzy dni. Obserwuje się następnie umiarkowany lub silny wzrost drobnoustrojów z prawidłowym zabarwieniem kolonii i fluorescencją pod wpływem światła ultrafioletowego o dużej długości fali.

### XIII DOSTĘPNOŚĆ

| Nr kat. | Opis             |
|---------|------------------|
| 221808  | BD BBL BCYE Agar |
| 215102  | BD BBL BCYE Agar |

### XIV PIŚMIENICTWO

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. 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.

Dział Obsługi Technicznej firmy BD Diagnostics: należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem BD lub odwiedzić stronę [www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds).



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.

BD, BD Logo, and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD