

PROCEDIMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE

I INTRODUÇÃO

O **BD BBL BCYE** (Buffered Charcoal Yeast Extract) Agar (Ágar de extracto de levedura com carvão tamponado) é utilizado para isolamento e cultura de espécies de *Legionella*.

II PROCEDIMENTO DO TESTE DE DESEMPENHO

- Inocule as amostras representativas com as culturas listadas abaixo.
 - Adicione 0,1 mL de uma cultura com 30 a 300 UFC/0,1 mL a cada placa e espalhe o inóculo com uma espátula de vidro estéril.
 - Incube as placas a 35 ± 2 °C numa atmosfera aeróbia.
 - Inclua placas de um lote previamente testado de placas de **BD BBL BCYE Agar** e **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** (Ágar de soja **Trypticase** com sangue ovino a 5%) como controlos de crescimento positivo e negativo, respectivamente.
- Examine as placas após 18 a 24 h e 42 a 48 h, verificando se ocorreu crescimento, pigmentação e fluorescência.
- Resultados esperados

Microrganismos de controlo do CLSI (Estirpes ATCC)	ATCC	Recuperação	Colónias de cor/Fluorescência
* <i>Legionella pneumophila</i>	33152	Crescimento por volta das 72 h	Colónias de cor branca-acinzentada, ou cinzenta a cinzenta azulada.**
* <i>Fluoribacter (Legionella) bozemanii</i>	33217	Crescimento por volta das 72 h	Colónias de cor branca-acinzentada, ou cinzenta a cinzenta azulada; fluorescência branca-azulada sob luz UV de elevado comprimento de onda.
<i>Tatlockia (Legionella) micdadei</i>	33204	Crescimento	
Estirpe adicional utilizada			
<i>Fluoribacter (Legionella) dumoffii</i>	33279	Crescimento	Colónias de cor branca-acinzentada, ou cinzenta a cinzenta azulada. Fluorescência branca-azulada, apenas das colónias, sob luz UV de elevado comprimento de onda.

* Estirpe do microrganismo recomendada para o controlo de qualidade do utilizador.

** A norma M22-A3 do CLSI inclui "fluorescência amarela-esverdeada sob luz UV de elevado comprimento de onda". De facto, esta espécie não apresenta fluorescência.^{1,2} O subcomité do CLSI já foi informado desta discrepância.

NOTA: A norma CLSI M22-A3 recomenda vivamente o teste de controlo de qualidade a meios isentos utilizados para organismos exigentes, tais como a *Legionella* sp.

III CONTROLO DE QUALIDADE ADICIONAL

- Examine as placas, conforme descrito em "Deterioração do produto".
- Examine visualmente as placas representativas, para assegurar que eventuais defeitos físicos não irão interferir com a utilização.
- Determine o pH, através de potenciometria, à temperatura ambiente, para cumprimento da especificação de pH de $6,9 \pm 0,2$.
- Durante o procedimento de inoculação, tenha atenção à solidez das placas.
- Incube as placas representativas não inoculadas a 35 ± 2 °C durante 72 h e examine-as, verificando se existe contaminação microbiana.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

IV UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O Buffered Charcoal Yeast Extract (**BD BBL BCYE**) Agar (Ágar de extracto de levedura com carvão tamponado) é utilizado para isolamento primário e cultura de *Legionella pneumophila* e de outras espécies de *Legionella*, a partir de amostras colhidas no ambiente e amostras clínicas.

V RESUMO E EXPLICAÇÃO

O **BD BBL BCYE Agar** baseia-se na modificação de Edelstein de meios anteriormente descritos. Em 1979, Feely et al. descreveram o Ágar de levedura com carvão (CYE) como uma modificação de um meio existente, o Ágar F-G.^{1,2} Estes autores substituíram o amido presente no Ágar F-G por carvão activado e substituíram o extracto de levedura por hidrolisado de caseína, o que resultou numa melhor recuperação de *L. pneumophila*. Em 1980, Pasculle referiu que o Ágar CYE podia ser melhorado através do tamponamento do meio com Tampão ACES.³ Um ano mais tarde, Edelstein aumentou ainda mais a sensibilidade do meio através da adição de alfa-cetoglutarato (Ágar BCYE).⁴

VI PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O **BD BBL BCYE Agar** é um meio enriquecido utilizado para isolamento e cultura de espécies de *Legionella*. O extracto de levedura fornece proteína e outros nutrientes necessários ao crescimento. A L-cisteína, um aminoácido essencial, e o pirofosfato férrico solúvel, um suplemento de ferro, são incorporados para satisfazer as necessidades nutricionais específicas das espécies de *Legionella*. O alfa-cetoglutarato é adicionado para estimular o crescimento. O carvão activado decompõe o peróxido de hidrogénio, um produto metabólico tóxico para as espécies de *Legionella*, e pode igualmente adsorver dióxido de carbono, modificando a tensão de superfície. O tampão ACES é adicionado para manter o pH adequado para optimização do crescimento.

VII REAGENTES

BD BBL BCYE Agar

Fórmula* aproximada por litro de água purificada

Extracto de levedura	10,0 g	Carvão, activado	2,0 g
HCl L-cisteína	0,4 g	Alfa-cetoglutarato	1,0 g
Pirófosfato férrico	0,25 g	Agar	15,0 g
Tampão ACES	10,0 g		

*Ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho.

Advertências e Precauções

Para diagnóstico *in vitro*.

Caso seja observada humidade excessiva, deve inverter a parte inferior da placa sobre uma tampa inclinada e deixar secar ao ar para evitar a formação de um selo entre a parte superior e a parte inferior da placa durante a incubação.

Nas amostras podem existir microrganismos patogénicos, incluindo os vírus das hepatites e o vírus da imunodeficiência humana. No manuseamento de todos os itens contaminados com sangue e outros fluidos corporais, devem ser seguidas as "Precauções padrão"⁵⁻⁸ e as linhas de orientação da instituição. Após a utilização e antes de serem eliminados, as placas preparadas, os recipientes de amostras e outros materiais contaminados devem ser esterilizados em autoclave.

Instruções de armazenamento

Após a recepção, armazenar as placas em local escuro entre 2 e 8 °C. Evitar congelar ou aquecer excessivamente. Abrir apenas quando estiver pronto a utilizar. Minimizar a exposição à luz. As placas preparadas que forem armazenadas no seu invólucro inicial, entre 2 e 8 °C, até ao momento imediatamente anterior à sua utilização, podem ser inoculadas até ao fim do prazo de validade e incubadas durante os períodos de incubação recomendados. Antes da inoculação, deixar o meio aquecer até à temperatura ambiente.

Deterioração do produto

Não utilize placas que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secagem ou outros sinais de deterioração.

VIII COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Foram criadas várias zaragatoas e recipientes para a colheita de amostras. As amostras devem ser obtidas antes de ser administrada terapêutica antimicrobiana. Devem tomar-se as providências necessárias para a entrega imediata no laboratório. Foram criados vários meios de conservação ou sistemas de transporte, tais como os produtos de colheita e transporte de amostras **BBL**, para prolongar a sobrevivência de microrganismos quando se esperar um atraso significativo entre a colheita e a repicagem definitiva.

Para obter pormenores sobre a colheita e preparação de amostras, consulte os textos apropriados.^{9,10}

IX PROCEDIMENTO

Material Fornecido

BD BBL BCYE Agar

Material Necessário Mas Não Fornecido

Meios de cultura auxiliares, reagentes, microrganismos de controlo da qualidade e equipamento laboratorial, conforme necessário.

Procedimento do teste

Utilizar técnicas assépticas.

A superfície do ágar deve estar lisa, firme e húmida, mas sem humidade excessiva.

Efectue a cultura da amostra o mais rapidamente possível após a recepção no laboratório. Para proceder à cultura de uma amostra a partir de uma zaragatoa, inocule o meio, fazendo rolar a zaragatoa sobre um terço da superfície do ágar e fazendo riscas sobre a restante placa, de forma a obter colónias isoladas. O material que não é cultivado a partir de zaragatoas poderá ser semeado, fazendo riscas no meio com uma ansa de inoculação esterilizada. A técnica das riscas na placa é utilizada principalmente para obter culturas isoladas provenientes de amostras que contêm flora mista.

Incube as placas em posição invertida (com o lado do ágar voltado para cima), a uma temperatura de 35 ± 2 °C, durante um período mínimo de 3 dias. Normalmente, o crescimento é visível após 3 a 4 dias, embora possa demorar até 2 semanas para aparecer.

Controlo de qualidade pelo utilizador

Cada lote de meio foi testado com microrganismos de controlo de qualidade adequados e estes testes cumprem as especificações do produto e as normas CLSI, quando aplicáveis. Como é norma, os testes de CQ devem ser realizados de acordo com os regulamentos locais, nacionais e/ou comunitários aplicáveis, os requisitos de acreditação e/ou os procedimentos padrão de controlo de qualidade do laboratório.

X RESULTADOS

Após uma incubação suficiente, as placas devem exibir colónias isoladas nas áreas que foram semeadas com riscas e um crescimento confluyente nas áreas de inoculação intensa. A *Legionella pneumophila* produz colónias lisas, ligeiramente mucóides, incolores a azul-acinzentadas claras, de pequena a grande dimensão. Relativamente à morfologia, presença e cor da fluorescência para as outras espécies, etc., consulte as referências bibliográficas.^{11,12}

Para confirmar os resultados, deve realizar-se uma coloração Gram, testes bioquímicos, bem como procedimentos serológicos.

XI LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Alguns testes de diagnóstico podem ser executados com a placa primária. Contudo, é recomendada uma cultura pura para os testes bioquímicos e para outros procedimentos de identificação. Para obter informações pormenorizadas e sobre os procedimentos recomendados, consulte os textos apropriados.^{11,13,14}

XII CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Antes de serem comercializados, todos os lotes de **BD BBL BCYE Agar** são testados relativamente às características do desempenho. As amostras representativas do lote são testadas com suspensões celulares de *Legionella* diluídas em soro fisiológico normal para produzir 30-300 UFC/placas; a inoculação é efectuada fazendo riscas sobre a superfície do ágar. As placas são incubadas a uma temperatura entre 35 e 37 °C, durante três dias, numa atmosfera aeróbia. É observado um crescimento moderado a intenso, a cor correcta das colónias e a fluorescência sob luz UV de elevado comprimento de onda.

XIII APRESENTAÇÃO

N.º de cat.	Descrição
221808	BD BBL BCYE Agar

XIV BIBLIOGRAFIA

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.

Assistência Técnica e Suporte: contacte o representante local da BD ou visite 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.