

KALİTE KONTROLÜ PROSEDÜRLERİ (İSTEĞE BAĞLI)

I GİRİŞ

BD BBL BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract (Tamponlu Kömür Maya Ekstraktı)) Agar *Legionella* türlerinin izolasyonu ve kültürasyonu için kullanılmaktadır.

II PERFORMANS TESTİ PROSEDÜRÜ

- Aşağıda listelenen kültürler ile temsili örnekleri inoküle edin.
 - Her plağa 30–300 CFU/0,1 mL içeren 0,1 mL kültür ekleyin ve steril bir cam yayıcıyla yayarak inoküle edin.
 - Plakları 35 ± 2 °C'de aerobik atmosferde inkübe edin.
 - Önceden test edilmiş **BD BBL BCYE** Agar ve %5 Koyun Kanı içeren **BD BBL Trypticase** Soy Agar lotuna ait plakları sırasıyla pozitif ve negatif büyüme kontrolleri olarak dahil edin.
- Plakları 18–24 ve 48–72 saat sonra gelişim, pigmentasyon ve floresans açısından inceleyin.
- Beklenen Sonuçlar

CLSI Organizmaları	ATCC	Geri Kazanım	Koloni Rengi/Floresans
* <i>Legionella pneumophila</i>	33152	72 saatte gelişim	Beyaz-gri, gri ile mavi-gri**
* <i>Fluoribacter (Legionella) bozemanæ</i>	33217	72 saatte gelişim	Beyaz-gri, gri ile mavi-gri; uzun dalga UV ışığı altında mavi-beyaz floresans
<i>Tatlockia (Legionella) micdadei</i>	33204	Gelişim	
Ek Organizmalar			
<i>Fluoribacter (Legionella) dumoffii</i>	33279	Gelişim	Beyaz-gri, gri ile mavi-gri; uzun dalga UV ışığı altında mavi-beyaz floresans

* Kullanıcı tarafından Kalite Kontrolü için tavsiye edilen organizma.

** CLSI standardı M22-A3 uzun dalga UV ışığı altında sarı-yeşil floresans" içerir. Aslında, bu tür floresans ışığı yaymaz.^{1,2} CLSI alt komitesine bu uyumsuzluk konusunda tavsiye verilmiştir.

NOT: *Legionella* sp. gibi zor gelişen organizmalar için kullanılan serbest besiyerinin kullanıcı KK testi, CLSI M22-A3 tarafından önemle tavsiye edilir.

III EK KALİTE KONTROLÜ

- Plakları "Ürünün Bozulması" altında tanımlandığı şekilde inceleyin.
- Mevcut olan herhangi bir fiziksel bozukluğun kullanımı etkilemeyeceğinden emin olmak için temsili plakları görsel olarak inceleyin.
- $6,9 \pm 0,2$ spesifikasyonuna uyması için pH değerini oda sıcaklığında potansiyometrik olarak belirleyin.
- İnokülasyon prosedürü sırasında plakların sağlamlığına dikkat edin.
- İnoküle edilmiş temsili plakları 35 ± 2 °C'de 72 saat boyunca inkübe edin ve mikrobiyal kontaminasyon açısından inceleyin.

ÜRÜN BİLGİLERİ

IV KULLANIM AMACI

Buffered Charcoal Yeast Extract (**BD BBL BCYE**) Agar *Legionella pneumophila* ve diğer *Legionella* türlerinin çevresel örneklerden ve klinik numunelerden primer izolasyonu ve kültürasyonu için kullanılır.

V ÖZET VE AÇIKLAMA

BD BBL BCYE Agar Edelstein'in önceki açıklanan besiyerlerinin modifikasyonunu temel alır. In 1979'da, Feely ve ark. Charcoal Yeast Extract (CYE) Agar'ın mevcut besiyeri olan F-G Agar'ın bir modifikasyonu olduğunu açıkladı.^{1,2} F-G Agar'daki nişastayı etkinleştirilen kömür ile değiştirdiler ve yerine kazein hidrolizat için maya ekstratı koydular, bu da daha iyi *L. pneumophila* geri kazanımıyla sonuçlandı. 1980'de, Pasculle CYE Agar'ın ACES Tamponuna sahip besiyerini tamponlayarak geliştirilebileceğini bildirdi.³ Bir yıl sonra, Edelstein alfa-ketoglutarat (BCYE Agar) ekleyerek besiyerinin duyarlılığını daha da arttırdı.⁴

VI PROSEDÜR İLKELERİ

BD BBL BCYE Agar *Legionella* türlerinin izolasyonu ve kültürasyonu için zenginleştirilmiş bir besiyeridir. Maya ekstraktı gelişimi desteklemek için gerekli proteini ve diğer besinleri sağlar. L-Sistein, temel bir amino asit ve çözünür ferric pirofosfat, bir demir takviyesi *Legionella* türlerinin spesifik beslenme gereksinimlerini karşılamak için devreye alınır. Alfa-ketoglutarat gelişimi stimüle etmek için eklenir. Etkinleştirilen kömür, *Legionella* türleri için toksik metabolik bir ürün olan hidrojen peroksidi dekompoze eder ve ayrıca karbondioksit toplayabilir ve yüzey gerilimini modifiye edebilir. Optimum gelişim için düzgün pH'ı korumak üzere ACES tamponu eklenir.

VII REAKTİFLER

BD BBL BCYE Agar

1 Litre Saf Su için Yaklaşık Formül*

Maya Ekstraktı.....	10,0 g	Kömür, Aktif	2,0 g
L-Sistein HCl	0,4 g	Alfa-ketoglutarat	1,0 g
Ferrik Pirofosfat	0,25 g	Agar	15,0 g
ACES Tamponu	10,0 g		

*Performans kriterlerini karşılamak üzere gereken şekilde ayarlanmış ve/veya desteklenmiştir.

Uyarılar ve Önlemler: *In vitro* Diyagnostik Kullanım içindir.

Aşırı nem gözlenirse, tabanı dengeli bir kapak üzerinde ters çevirin ve inkübasyon esnasında plağın altı ve üstü arasında bir engel oluşmasını önlemek için havayla kurumasını sağlayın.

Klinik örneklerde hepatit virüsleri ve İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü de dahil olmak üzere patojenik mikroorganizmalar bulunabilir. Kan veya diğer vücut sıvılarıyla kontamine olan tüm öğelerle çalışılırken, "Standart Önlemler"⁵⁻⁸ ve kurumsal düzenlemeler takip edilmelidir. Kullanımdan sonra, hazırlanan plaklar, örnek kapları ve diğer kontamine malzemeler atılmadan önce otoklavlanarak sterilize edilmelidir.

Saklama Talimatları: Alındığında, plakları 2–8 °C'de, karanlıkta saklayın. Dondurmaktan ve aşırı ısıtmaktan kaçının. Kullanıma hazır olana kadar açmayın. Işığa maruz kalmamasını sağlayın. Kullanılmadan önce orijinal kaplı ambalajlarıyla 2–8 °C'de saklanan hazırlanmış plaklar, son kullanma tarihine kadar ve tavsiye edilen inkübasyon sürelerinde inkübe edilebilir. Besiyerinin inokülasyon öncesinde oda sıcaklığına gelmesini bekleyin.

Ürünün Bozulması: Mikrobiyal kontaminasyon belirtileri, renk değişimi, kuruma veya diğer bozulma belirtileri görmeniz halinde plakları kullanmayın.

VIII ÖRNEK TOPLAMA VE İŞLEME

Örnek almak için çeşitli swablar ve kaplar tasarlanmıştır. Örnekler antimikrobiyal tedavi uygulanmadan önce alınmalıdır. Örneklerin laboratuvara hızlı bir şekilde ulaştırılması için gerekli düzenlemeler yapılmalıdır. Toplama ve tanımlama amaçlı kültür oluşturma sırasında önemli bir gecikme beklendiği durumlarda mikroorganizmaların hayatta kalma sürelerini uzatmak için **BBL** örnek toplama ve nakil ürünleri gibi çeşitli saklama besiyerleri tasarlanmıştır.

Örnek toplama ve işleme prosedürlerinin ayrıntıları için ilgili metinlere bakın.^{9,10}

IX PROSEDÜR

Sağlanan Malzemeler: BD BBL BCYE Agar

Gerekli Fakat Sağlanmamış Malzemeler: Yardımcı kültür besiyeri, reaktifler, kalite kontrol organizmaları ve gerekli laboratuvar ekipmanı.

Test Prosedürü: Aseptik teknikleri uygulayın.

Agar yüzeyi düz, sağlam ve nemli olmalı, fakat aşırı nemli olmamalıdır.

Örnek laboratuvara ulaştığında olabildiğince kısa sürede örneği kültürleyin. Bir swabdan bir örneği kültürlemek için, swabı agar yüzeyinin üçte biri üzerinde döndürerek ve izole edilen koloniler elde etmek için plağın kalanında sürme yöntemi ile ekim yaparak besiyerini inoküle edin. Swablardan kültürlenmeyen malzeme sterilize bir inokülasyon özesi ile besiyerine sürme yöntemi ile ekilebilir. Sürme plak tekniği, temel olarak karışık flora içeren örneklerden izole edilmiş kolonileri elde etmek için kullanılır.

Plakları 35 ± 2 °C'de minimum 3 gün boyunca ters konumda (agar kısmı üstte) inkübe edin. Gelişim genellikle 3–4 gün içinde görünür olur, ancak belirmesi 2 haftaya kadar sürebilir.

Kullanıcı tarafından Kalite Kontrolü:

Her bir ortam lotu uygun kalite kontrol organizmaları kullanılarak test edilmiştir; bu test, ürünün teknik özelliklerini ve ilgili olduğu yerlerde CLSI standartlarını karşılamaktadır. Her zamanki gibi gerekli kalite kontrolleri ilgili yerel, resmi, federal düzenlemelere veya ülke düzenlemelerine, akreditasyon gerekliliklerine ve/veya laboratuvarınızın standart kalite kontrol prosedürlerine uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

X SONUÇLAR

Yeterli inkübasyondan sonra, plaklar sürme yöntemi ile ekim yapılmış alanlarda izole koloniler ve ağır inokülasyon yapılan alanlarda birleşik gelişim göstermelidir. *Legionella pneumophila* küçük ila büyük, pürüzsüz, renksiz ila soluk, mavi-gri, hafifçe mükoid koloniler üretir. Diğer türlerin morfolojisi, varlığı ve floresans rengi, vs. için referanslara danışın.^{11,12}

Bulguları doğrulamak için bir Gram suşu, biyokimyasal testler ve serolojik prosedürler gerçekleştirilmelidir.

XI PROSEDÜRÜN KISITLI OLDUĞU ALANLAR

Birincil plak ile bazı tanı testleri gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte, biyokimyasal testler ve diğer tanımlama prosedürleri için saf bir kültür önerilmektedir. Detaylı bilgiler ve tavsiye edilen prosedürler için ilgili metinlere bakın.^{11,13,14}

XII PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

Piyasaya sürülmeden önce tüm **BD BBL** BCYE Agar lotları, performans özellikleri açısından test edilir. Lotun temsili örnekleri *Legionella* hücre süspansiyonları ile test edilir, hücre süspansiyonu yayılarak inoküle edilir, agar yüzeyi boyunca 30–300 CFU/plak vermesi için normal salinde seyreltilir. Plaklar aerobik atmosferde 35–37 °C'de üç gün boyunca inkübe edilir. Orta ila yoğun gelişim ve kolonilerin ve uzun dalga UV ışığı altında floresansın doğru rengi gözlemlenir.

XIII TİCARİ TAKDİM ŞEKLİ

Kat. No.	Açıklama
221808	BD BBL BCYE Agar

XIV REFERANSLAR

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.

Teknik Desteği: yerel BD temsilcinizle temasa geçin veya www.bd.com adresine başvurun.



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.