

PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ

I INTRODUZIONE

Il terreno **BBL BCYE** (Buffered Charcoal Yeast Extract) Agar (agar carbone estratto di lievito con tampone) è usato per l'isolamento e la coltivazione di *Legionella* spp.

II PROCEDURA DEL TEST

- Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sottoelencate.
 - In ogni piastra, dispensare 0,1 mL di una coltura avente una concentrazione di 30–300 UFC/0,1 mL e inoculare distribuendo con un apposito diffusore sterile di vetro.
 - Incubare le piastre a 35 ± 2 °C in aerobiosi.
 - Includere piastre di un lotto precedentemente testato di BCYE Agar e **Trypticase Soy Agar** con sangue di montone al 5% rispettivamente come controlli di crescita positivi e negativi.
- Esaminare le piastre dopo 18–24 e 48–72 h per verificare crescita, pigmentazione e fluorescenza.
- Risultati attesi

Microorganismi di controllo CLSI (ceppi ATCC)

Legionella pneumophila* (33152) Crescita entro 72 h; le colonie sono bianco-grigie, da grigie a blu-grigie.

**Fluoribacter (Legionella) bozemanii* (33217) Crescita entro 72 h; le colonie sono bianco-grigie, da grigie a blu-grigie; fluorescenza blu-bianca a luce UV a onda lunga.

Tatlockia (Legionella) micdadei 33204 Crescita entro 72 h

Altro ceppo utilizzato

Fluoribacter (Legionella) dumoffii ATCC 33279 Crescita; le colonie sono bianco-grigie, da grigie a blu-grigie. Fluorescenza blu-bianca a luce UV a onda lunga delle sole colonie.

* Ceppo batterico raccomandato per il controllo di qualità a cura dell'utente.

** La norma CLSI M22-A3 include "fluorescenza giallo-verde a luce UV a onda lunga". Di fatto, questa specie non emette fluorescenza.^{1,2} Il comitato CLSI è stato informato di questa discrepanza.

NOTA: La norma M22-A3 del CLSI raccomanda di eseguire il test di controllo qualità sui terreni esenti che vengono usati per organismi esigenti come *Legionella* sp.

III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

- Esaminare le piastre come descritto in "Deterioramento del prodotto".
- Eeguire un esame visivo delle piastre rappresentative per garantire che l'eventuale presenza di difetti fisici non interferisca con l'uso.
- Determinare il pH mediante potenziometria a temperatura ambiente per verificare che rientri nel range specificato di $6,9 \pm 0,2$.
- Verificare la stabilità delle piastre durante la procedura di inoculo.
- Incubare a 35 ± 2 °C per 72 h le piastre rappresentative non inoculate ed esaminarle per verificare la contaminazione microbica.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

IV USO PREVISTO

Il terreno Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) Agar è usato per l'isolamento primario e la coltivazione di *Legionella pneumophila* e altre specie di *Legionella* da campioni ambientali e clinici.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

L'agar BCYE si basa sulla modifica apportata da Edelstein a terreni precedentemente descritti. Nel 1979, Feely et al. descrissero l'agar carbone estratto di lievito (Charcoal Yeast

Extract, CYE) come modifica di un terreno esistente, l'agar F-G.^{1,2} Feely et al. sostituirono l'amido presente nell'agar F-G con carbone attivo e l'idrolisato di caseina con l'estratto di lievito, migliorando in tal modo il recupero di *L. pneumophila*. Nel 1980, Pasculle illustrò che l'agar CYE poteva essere migliorato tamponando il terreno con tampone ACES.³ Un anno dopo, Edelstein migliorò ulteriormente la sensibilità del terreno aggiungendo alfa-ketoglutarato (agar BCYE).⁴

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

L'agar BCYE è un terreno arricchito per l'isolamento e la coltivazione di *Legionella* spp. L'estratto di lievito fornisce la proteina e le altre sostanze nutritive necessarie per supportare la crescita. L-cisteina, un aminoacido essenziale e pirofosfato ferrico solubile, un supplemento del ferro, sono stati incorporati per soddisfare i fabbisogni nutrizionali di *Legionella* spp. L'alfa-ketoglutarato è stato aggiunto per stimolare la crescita. Il carbone attivo decompone il perossido di idrogeno, un prodotto metabolico tossico per *Legionella* spp. e può anche assorbire l'anidride carbonica e modificare la tensione superficiale. Il tampone ACES è stato aggiunto per mantenere il pH appropriato per una crescita ottimale.

VII REAGENTI

BCYE Agar

Formula approssimata* per L di acqua purificata

| | |
|---------------------------|--------|
| Estratto di lievito | 10,0 g |
| HCl L-cisteina | 0,4 g |
| Pirofosfato di ferro..... | 0,25g |
| Tampone ACES | 10,0 g |
| Carbone attivo..... | 2,0 g |
| Alfa-ketoglutarato | 1,0 g |
| Agar | 15,0 g |

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di performance.

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

Se si riscontra un'umidità eccessiva, capovolgere il fondo su un coperchio e lasciare asciugare all'aria per evitare la formazione di aderenze tra la parte superiore e inferiore della piastra durante l'incubazione.

I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e i virus dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle norme dell'istituto e alle "Precauzioni standard".⁵⁻⁸ Dopo l'uso, le piastre preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati devono essere sterilizzati in autoclave prima dello smaltimento.

Istruzioni per la conservazione

Al ricevimento, conservare le provette al buio a 2–8 °C. Evitare congelamento e surriscaldamento. Aprire soltanto al momento dell'uso. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. Le piastre preparate, conservate nell'involucro originario a 2–8 °C sino al momento dell'uso, possono essere inoculate fino alla data di scadenza e incubate per i tempi di incubazione raccomandati. Prima dell'inoculo, attendere che il terreno si porti a temperatura ambiente.

Deterioramento del prodotto

Non usare le piastre se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, essiccamento o altri segni di deterioramento.

VIII RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per la raccolta dei campioni, sono stati concepiti svariati tamponi e contenitori. Raccogliere i campioni prima della somministrazione di terapia antibiotica. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio. Per prolungare la sopravvivenza dei microrganismi allorché si prevede un intervallo di tempo significativo tra raccolta e coltura definitiva, sono stati concepiti numerosi terreni di conservazione o sistemi di trasporto, come per esempio i prodotti per la raccolta e il trasporto dei campioni **BBL**.

Per informazioni dettagliate sulle procedure di raccolta e preparazione dei campioni, consultare la documentazione appropriata.^{9,10}

IX PROCEDURA

Materiale fornito

BCYE Agar

Materiali necessari ma non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Procedura del test

Adottare tecniche asettiche.

La superficie agar deve essere omogenea, compatta e non eccessivamente umida.

Porre il campione in coltura non appena perviene in laboratorio. Per eseguire una coltura da un campione su tampone, inoculare il terreno facendo rotolare il tampone su un terzo della superficie agar e strisciare la parte restante della piastra per ottenere colonie isolate. Il materiale non posto in coltura da tamponi può essere strisciato sul terreno con un'ansa da inoculo sterilizzata. La tecnica di striscio su piastra è usata principalmente per ottenere colonie isolate da campioni contenenti flora mista.

Incubare le piastre capovolte (lato agar rivolto verso l'alto) a 35 ± 2 °C per almeno 3 giorni. La crescita è generalmente visibile entro 3–4 giorni ma per la sua comparsa è talvolta necessario attendere sino a 2 settimane.

Controllo di qualità a cura dell'utente

Vedere "Procedure di controllo di qualità".

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione CLSI in merito.

X RISULTATI

Dopo una sufficiente incubazione, le provette devono evidenziare colonie isolate nelle aree strisciate e crescita confluyente nelle aree di inoculo rilevante. *Legionella pneumophila* produce colonie da piccole a grandi, omogenee, da incolori a blu – grigio pallido, leggermente mucoidi. Per morfologia, presenza e colore di fluorescenza, ecc., di altre specie, consultare la bibliografia.^{11,12}

Per la conferma dei riscontri, è necessario eseguire colorazione di Gram, test biochimici e procedure sierologiche.

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Alcuni test diagnostici possono essere eseguiti con la piastra primaria. Per i test biochimici e altre procedure di identificazione, si raccomanda tuttavia una coltura pura. Per informazioni dettagliate e procedure raccomandate, consultare la documentazione appropriata.^{11,13,14}

XII PERFORMANCE

Prima della spedizione, vengono testate le prestazioni metodologiche di tutti i lotti di BCYE Agar. Campioni rappresentativi del lotto vengono testati con sospensioni cellulari di *Legionella*, inoculate distribuendo la sospensione cellulare diluita in soluzione fisiologica in modo da ottenere una concentrazione di 30–300 UFC/piastra, su tutta la superficie agar. Le piastre vengono incubate a 35–37 °C per tre giorni, in aerobiosi. A luce UV a onda lunga, si osservano crescita moderata – intensa e colore appropriato delle colonie nonché la fluorescenza.

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat. Descrizione


221808 BBL BCYE Agar, confezione da 10 piastre


215102 BBL BCYE Agar, conf. da 100 piastre

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.

 Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 USA
800-638-8663

 BENEX Limited
Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate
Shannon, County Clare, Ireland
Tel: 353-61-47-29-20
Fax: 353-61-47-25-46

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo, BBL and Trypticase are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2007 BD