

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

I INTRODUCCION

BD BBL BCYE Agar (agar de carbón tamponado y extracto de levadura) se utiliza para el cultivo de las especies *Legionella*.

II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

1. Inocular muestras representativas con los cultivos enumerados a continuación.
 - a. Añadir 0,1 mL de cultivo con una concentración de 30–300 UFC/0,1 mL a cada placa e inocular mediante extensión con un esparcidor de vidrio estéril.
 - b. Incubar las placas a 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia.
 - c. Incluir placas de un lote de **BD BBL BCYE Agar** analizado anteriormente y placas de agar de soja **BD BBL Trypticase** con sangre de carnero al 5% como controles de crecimiento positivo y negativo, respectivamente.
2. Examinar las placas después de 18–24 h y 48–72 h para determinar crecimiento, pigmentación y fluorescencia.
3. Resultados previstos

Organismos de control CLSI (cepas ATCC)	ATCC	Recuperación	El color de la colonia / Fluorescencia
* <i>Legionella pneumophila</i>	33152	Crecimiento a las 72 h	Colonias de color gris blancuzco, de gris a gris azulado.**
* <i>Fluoribacter (Legionella) bozemanii</i>	33217	Crecimiento a las 72 h	Colonias de color gris blancuzco, de gris a gris azulado; fluorescencia de color azul-blanca bajo luz UV de onda larga.
<i>Tatlockia (Legionella) micdadei</i>	33204	Crecimiento a las 72 h	
Cepa adicional utilizada			
<i>Fluoribacter (Legionella) dumoffii</i>	33279	Crecimiento	Colonias de color gris blancuzco, de gris a gris azulado. Fluorescencia azul-blanca bajo luz UV de onda larga sólo en las colonias.

* Cepa de organismo recomendada para control de calidad del usuario.

** La norma M22-A3 de CLSI incluye la fluorescencia de color amarillo-verde bajo luz UV de onda larga. De hecho, esta especie no produce fluorescencia^{1,2}. Se ha notificado al subcomité de CLSI acerca de esta discrepancia.

NOTA: En conformidad con CLSI M22-A3, se recomienda encarecidamente que el usuario realice pruebas de control de calidad de los medios exentos, utilizados para organismos exigentes como *Legionella* sp.

III CONTROL DE CALIDAD ADICIONAL

1. Examinar las placas como se describe en la sección "Deterioro del producto".
2. Examinar visualmente las placas representativas para asegurarse de que los defectos físicos existentes no interfieran con el uso.
3. Determinar el pH potenciométricamente a temperatura ambiente para verificar el cumplimiento de la especificación de $6,9 \pm 0,2$.
4. Tomar en cuenta la firmeza de las placas durante el procedimiento de inoculación.
5. Incubar las placas representativas sin inocular a 35 ± 2 °C durante 72 h y examinar para detectar contaminación microbiana.

INFORMACION DEL PRODUCTO

IV USO PREVISTO

El **BD BBL BCYE Agar** (agar de carbón tamponado y extracto de levadura) se utiliza para el aislamiento primario y cultivo de *Legionella pneumophila* y otras especies *Legionella* a partir de muestras ambientales y clínicas.

V RESUMEN Y EXPLICACION

BD BBL BCYE Agar se basa en la modificación de Edelstein de medios anteriormente descritos. En 1979, Feely et al describieron el agar CYE (agar de carbón y extracto de levadura) como una modificación de un medio existente, el agar F-G^{1,2}. Reemplazaron el almidón en el agar F-G con carbón activado y sustituyeron el extracto de levadura con hidrolizado de caseína, lo que permitió una mejor recuperación de *L. pneumophila*. En 1980, Pasculle informó que CYE Agar podía mejorarse añadiendo tampón ACES al medio³. Un año después, Edelstein aumentó aun más la sensibilidad del medio añadiendo alfa-cetoglutarato (BCYE Agar)⁴.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

BD BBL BCYE Agar es un medio enriquecido para el aislamiento y cultivo de las especies *Legionella*. El extracto de levadura suministra proteína y otros nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento. L-cisteína, un aminoácido esencial, y pirofosfato férrico soluble, un suplemento de hierro, se incorporan para satisfacer los requisitos nutritivos específicos de las especies *Legionella*. Se añade alfa-cetoglutarato para estimular el crecimiento. El carbón activado descompone el peróxido de hidrógeno, un producto de metabolismo tóxico para las especies *Legionella*, y también puede recoger dióxido de carbono y modificar la presión superficial. Se añade el tampón ACES para mantener el pH adecuado para un crecimiento óptimo.

VII REACTIVOS

BD BBL BCYE Agar

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Extracto de levadura	10,0 g	Carbón activado	2,0 g
Clorhidrato de L-cisteína	0,4 g	Alfa-cetoglutarato	1,0 g
Pirófosfato férrico	0,25 g	Agar	15,0 g
Tampón ACES	10,0 g		

* Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Si se observa humedad en exceso, invertir la parte inferior sobre una tapa desplazada y permitir que se seque al aire para impedir que se forme una barrera estanca entre la parte superior y la inferior de la placa durante la incubación.

En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales deben seguirse las "Precauciones estándar" ⁵⁻⁸ y las directrices del centro. Después de su uso, las placas preparadas, los recipientes de muestra y otros materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser desechados.

Instrucciones para el almacenamiento

Al recibir las placas, almacenarlas en un lugar oscuro a 2–8 °C. No congelar ni sobrecalentar. No abrir hasta que vayan a utilizarse. Reducir al mínimo la exposición a la luz. Las placas preparadas almacenadas en su envase original a una temperatura de 2–8 °C hasta momentos antes de su utilización pueden inocularse hasta su fecha de caducidad e incubarse durante los períodos de incubación recomendados. Permitir que el medio se caliente a temperatura ambiente antes de la inoculación.

Deterioro del producto

No utilizar las placas si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación o cualquier otro signo de deterioro.

VIII RECOGIDA Y MANIPULACION DE LAS MUESTRAS

Se han diseñado diversos recipientes y torundas para recolectar las muestras. Las muestras deben obtenerse antes de administrar el tratamiento antimicrobiano. Deben adoptarse las medidas necesarias para un transporte inmediato al laboratorio. Se han diseñado varios medios de conservación o sistemas de transporte, tales como los productos de recogida y transporte de muestras **BBL**, para prolongar la supervivencia de los microorganismos cuando se prevé una demora significativa entre la recogida y el cultivo definitivo.

Consultar los textos correspondientes para conocer los detalles relativos a los procedimientos de recogida y manipulación de muestras^{9,10}.

IX PROCEDIMIENTO

Material suministrado

BD BBL BCYE Agar

Materiales necesarios pero no suministrados

Medios de cultivo auxiliar, reactivos, organismos para el control de calidad y el equipo de laboratorio que se requiera.

Procedimiento de análisis

Emplear técnicas asépticas.

La superficie del agar debe estar lisa, firme y húmeda, pero sin humedad en exceso.

Cultivar las muestras tan pronto como sea posible después de recibirlas en el laboratorio. Para cultivar una muestra empleando una torunda, inocular el medio haciendo girar la torunda en un tercio de la superficie del agar y extender al resto de la placa para obtener colonias aisladas. El material que no se cultiva de las torundas puede inocularse en el medio con un asa de inoculación esterilizada. La técnica de extensión en placa se utiliza principalmente para obtener colonias aisladas de las muestras con flora mixta.

Incubar las placas en posición invertida (con el lado del agar hacia arriba) a 35 ± 2 °C durante un mínimo de 3 días. El crecimiento generalmente se hace visible dentro de los 3–4 días, pero puede demorar hasta 2 semanas en aparecer.

Control de calidad del usuario

Cada lote de medios se ha probado con los microorganismos de control de calidad adecuados mediante una prueba que cumple las especificaciones del producto y los criterios aplicables del CLSI. Como siempre, las pruebas de control de calidad se deben llevar a cabo conforme a la normativa local, estatal, federal o nacional aplicable, a los requisitos de los organismos de acreditación y/o a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio.

X RESULTADOS

Después de una incubación suficiente, las placas deben mostrar colonias aisladas en áreas extendidas y crecimiento confluyente en áreas de inoculación densa. *Legionella pneumophila* produce colonias de pequeñas a grandes, lisas, de incoloras a pálidas, de color gris azulado y ligeramente mucoides. Consultar las referencias para obtener información acerca de la morfología, la presencia y el color de la fluorescencia, etc., de otras especies^{11,12}.

Realizar tinción de Gram, pruebas bioquímicas y procedimientos serológicos para confirmar los resultados.

XI LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Algunas pruebas diagnósticas pueden realizarse con la placa primaria. Sin embargo se recomienda un cultivo puro para realizar las pruebas bioquímicas y otros procedimientos de identificación. Consultar los textos correspondientes para obtener información detallada y procedimientos recomendados^{11,13,14}.

XII CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de **BD BBL BCYE Agar** se analizan para determinar las características de rendimiento. Se analizan muestras representativas del lote con suspensiones de células de *Legionella* (inoculadas mediante extensión de la suspensión de células y diluidas en solución salina normal hasta una concentración de 30–300 UFC/placa), sobre la superficie de agar. Las placas se incuban a 35–37 °C durante 3 días en atmósfera aerobia. Se observa crecimiento de moderado a denso, color correcto de colonias y fluorescencia bajo luz UV de onda larga.

XIII DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
221808	BD BBL BCYE Agar

XIV REFERENCIAS

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.

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o 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.