

# **BD BBL Crystal™ Identification Systems**

## Anaerobe ID Kit



8809491JAA(02)  
2014-07

English:	pages	1 – 10	Italiano:	pagine	29 – 37
Français :	pages	11 – 20	Português:	páginas	38 – 47
Deutsch:	Seiten	20 – 28	Español:	páginas	48 – 57

CLIA COMPLEXITY: HIGH  
CDC IDENTIFIER CODES  
ANALYTE: 0412  
TEST SYSTEM: 07561

Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Pokupny vám poskytne místní zástupce společnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Ota yhteyts lähimpään BD:n edustajaan ohjeiden saamiseksi. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőtől. / Нұсқаулар үшін жергілікті BD өкілімен хабарласыңыз. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Neem contact op met uw plaatselijke BD-vertegenwoordiger voor instructies. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielem BD. / Contacte o reprezentante local da BD para instruções. / Pentru instrucțiuni, contactați reprezentantul local BD. / Для получения указаний обратитесь к местному представителю компании BD. / Instrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Kontakta närmaste BD-representant för anvisningar. / Talimatlar için yerel BD temsilcinizle temasa geçin. / За інструкціями зверніться до місцевого представника компанії BD.

### INTENDED USE

The **BBL Crystal™** Anaerobe (ANR) Identification (ID) System is a miniaturized identification method employing modified conventional, fluorogenic and chromogenic substrates. It is intended for the identification of frequently isolated anaerobic bacteria.<sup>1-9</sup>

### SUMMARY AND EXPLANATION

Micromethods for the biochemical identification of microorganisms were reported as early as 1918.<sup>10</sup> Several publications reported on the use of the reagent-impregnated paper discs and micro-tube methods for differentiating enteric bacteria.<sup>10-14</sup> The interest in miniaturized identification systems led to the introduction of several commercial systems in the late 1960s, and they provided advantages in requiring little storage space, extended shelf life, standardized quality control and ease of use.

In general, many of the tests used in the **BBL Crystal** ID Systems are modifications of classical methods. These include tests for fermentation, oxidation, degradation and hydrolysis of various substrates. In addition, there are chromogen and fluorogen linked substrates, as in the **BBL Crystal** ANR ID panel, to detect enzymes that microbes use to metabolize various substrates.<sup>12,15-22</sup>

The **BBL Crystal** ANR ID kit is comprised of (i) **BBL Crystal** ANR ID panel lids, (ii) **BBL Crystal** bases and (iii) **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid (IF) tubes. The lid contains 29 dehydrated substrates and a fluorescence control on tips of plastic prongs. The base has 30 reaction wells. Test inoculum is prepared with the inoculum fluid and is used to fill all 30 wells in the base. When the lid is aligned with the base and snapped in place, the test inoculum rehydrates the dried substrates and initiates test reactions.

Following an incubation period, the wells are examined for color changes or presence of fluorescence that result from metabolic activities of the microorganisms. The resulting pattern of the 29 reactions is converted into a ten- digit profile number that is used as the basis for identification.<sup>23</sup> Biochemical and enzymatic reaction patterns for the 29 **BBL Crystal** ANR ID substrates for a wide variety of microorganisms are stored in the **BBL Crystal** ANR ID data base. Identification is derived from a comparative analysis of the reaction pattern of the test isolate to those held

in the database. A complete list of taxa that comprises the current database is provided in Table 1.

### PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The **BBL Crystal** ANR ID panels contain 29 dried biochemical and enzymatic substrates. A bacterial suspension in the inoculum fluid is used for rehydration of the substrates. The tests used in the system are based on microbial utilization and degradation of specific substrates detected by various indicator systems. Enzymatic hydrolysis of fluorogenic substrates containing coumarin derivatives of 4-methylumbelliferone (4MU) or 7-amino-4- methylcoumarin (7-AMC), results in increased fluorescence that is easily detected visually<sup>15-19</sup> with a UV light source.<sup>19-21</sup> Chromogenic substrates upon hydrolysis produce color changes that can be detected visually. In addition, there are tests that detect the ability of an organism to hydrolyze, degrade, reduce or otherwise utilize a substrate in the **BBL Crystal** ID Systems.

Reactions employed by various substrates and a brief explanation of the principles employed in the system are described in Table 2. Panel location in referred tables indicates the row and column where the well is located (example: 1J refers to Row 1 in column J).

Table 1

## Taxa in BBL Crystal™ ANR ID System

Gram-Negative Bacilli		
<b>Bile Tolerant</b>	<b>Bile Sensitive</b>	<b>Non Pigmented,</b>
<i>Bacteroides fragilis</i> group	<b>Non Pigmented</b>	<b>Pitting</b>
<i>B. caccae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>B. distasonis</i> group <sup>10</sup>	<i>P. bivia</i>	<i>B. ureolyticus</i>
<i>B. eggerthii</i>	<i>P. buccae</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>P. buccalis</i>	<i>C. gracilis</i>
<i>B. ovatus</i>	<i>P. disiens</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>B. stercoris</i>	<i>P. oralis</i>	<i>F. gonidiaformans</i> <sup>1,11</sup>
<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>P. oris</i>	<i>F. mortiferum</i>
<i>B. uniformis</i>	<i>P. veroralis</i> <sup>11</sup>	<i>F. necrophorum</i>
<i>B. vulgatus</i>	<b>Non Pigmented,</b>	<i>F. nucleatum</i>
<b>Other:</b>	<b>Non Pitting</b>	<i>F. russii</i>
<i>B. splanchnicus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>F. varium</i>
<i>Porphyromonas levii</i> <sup>11</sup>	<i>B. capillosus</i>	<i>Leptotrichia</i>
<b>Bile Sensitive Pigmented</b>	<i>Tissierella</i>	<i>L. buccalis</i>
<i>Capnocytophaga</i> species	<i>T. praeacuta</i>	
<b>Prevotella</b>	<b>Bile Tolerant</b>	
<i>P. corporis</i>	<b>Non Pigmented</b>	
<i>P. denticola</i>	<i>Bilophila</i>	
<i>P. intermedia</i>	<i>B. wadsworthia</i>	
<i>P. loescheii</i>	<i>Desulfomonas</i>	
<i>P. melaninogenica</i>	<i>D. pigra</i>	
<b>Porphyromonas</b>	<i>Desulfovibrio</i> species	
<i>P. asaccharolytica</i>	<i>Campylobacter</i>	
<i>P. endodontalis</i>	<i>C. curvus/rectus</i>	
<i>P. gingivalis</i>		

- Key: 1 = Taxon in **BBL Crystal**, **BBL** Schaedler database only.  
 2 = Taxon in **BBL Crystal**, **BBL** Schaedler and **BBL Crystal** alternate Blood Agar databases only.  
 3 = Includes *B. distasonis* and *B. merdae*.  
 4 = These taxa have < 10 unique **BBL Crystal** profiles in the current database.

Clostridia	Non-Spore Forming Gram-Positive Bacilli	Gram-Positive Cocci
<b>Clostridium</b>	<b>Actinomyces</b>	<b>Gemella</b>
<i>C. baratii</i>	<i>A. bovis</i>	<i>G. morbillorum</i>
<i>C. beijerinckii</i>	<i>A. israelii</i>	<b>Peptostreptococcus</b>
<i>C. bifermentans</i>	<i>A. meyeri</i>	<i>P. anaerobius</i>
<i>C. botulinum</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>P. asaccharolyticus</i>
<i>C. butyricum</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>P. indolicus</i>
<i>C. cadaveris</i>	<i>A. pyogenes</i>	<i>P. magnus</i>
<i>C. clostridioforme</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>P. micros</i>
<i>C. difficile</i>	<b>Atopobium</b>	<i>P. prevotii</i>
<i>C. glycolicum</i>	<i>A. minutum</i>	<i>P. tetradius</i>
<i>C. hastiforme</i>	<b>Bifidobacterium</b>	<b>Ruminococcus</b>
<i>C. histolyticum</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>R. productus</i> <sup>11</sup>
<i>C. innocuum</i>	<i>B. dentium</i>	<b>Staphylococcus</b>
<i>C. limosum</i>	<i>B. species</i>	<i>S. saccharolyticus</i>
<i>C. novyi</i> A	<b>Eubacterium</b>	<b>Streptococcus</b>
<i>C. paraputrificum</i> <sup>11</sup>	<i>E. aerofaciens</i>	<i>S. constellatus</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>E. lentum</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>C. putrificum</i> <sup>1</sup>	<i>E. limosum</i>	<b>Gram-Negative Cocci</b>
<i>C. ramosum</i>	<b>Mobiluncus</b>	<i>Veillonella</i> species
<i>C. septicum</i>	<i>M. curtisii</i>	
<i>C. sordellii</i>	<i>M. mulieris</i>	
<i>C. sphenoides</i>	<i>M. species</i> <sup>2,11</sup>	
<i>C. sporogenes</i>	<b>Propionibacterium</b>	
<i>C. subterminale</i>	<i>P. acnes</i>	
<i>C. tertium</i>	<i>P. avidum</i>	
<i>C. tetani</i> <sup>4</sup>	<i>P. granulosum</i> <sup>4</sup>	
	<i>P. propionicus</i>	
	<b>Lactobacillus</b>	
	<i>L. acidophilus</i>	
	<i>L. casei</i>	
	<i>L. catenaformis</i>	
	<i>L. fermentum</i>	
	<i>L. jensenii</i>	
	<i>L. johnsonii</i>	
	<i>L. rhamnosus</i>	

**Table 2**  
**Principles of Tests Employed in the BBL Crystal ANR ID System**

Panel Location	Test Feature	Code	Principle (Reference)
4A	Fluorescent negative control	FCT	Control to standardize fluorescent substrate results.
2A	L-arginine-AMC	FAR	Enzymatic hydrolysis of the amide or glycosidic bond results in the release of a fluorescent coumarin derivative. <sup>19-21</sup>
1A	L-histidine-AMC	FHI	
4B	4MU- $\alpha$ -D-mannoside	FAM	
2B	L-serine-AMC	FSE	
1B	L-isoleucine-AMC	FIS	
4C	4MU- $\beta$ -D-mannoside	FBM	
2C	Glycine-AMC	FGL	
1C	L-alanine-AMC	FAL	
4D	4MU-N-acetyl- $\beta$ -D-galactosaminide	FGA	
2D	L-pyroglutamic acid-AMC	FPY	
1D	L-lysine-AMC	FLY	
4E	L-methionine-AMC	FME	
2E	4MU- $\beta$ -D-cellobiopyranoside	FCE	
1E	4MU- $\beta$ -D-xyloside	FXY	
4F	L-phenylalanine-AMC	FPH	
2F	L-leucine-AMC	FLE	
1F	Escosyl	FSC	Hydrolysis of the glycosidic bond results in the release of nonfluorescent esculetin. <sup>22</sup>
4G	Disaccharide	DIS	Utilization of carbohydrate results in lower pH and change in indicator (Phenol Red). <sup>1,2,11,12</sup>
2G	Furanose	FUR	
1G	Pyranose	PYO	
4H	p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactoside	AGA	Enzymatic hydrolysis of the colorless aryl substituted glycoside releases yellow p-nitrophenol. <sup>15-19</sup>
2H	p-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside	NPG	
1H	p-nitrophenyl-phosphate	PHO	
4I	p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucoside	AGL	
2I	p-nitrophenyl-N-acetyl-glucosaminide	NAG	
1I	L-proline-p-nitroanilide	PRO	Enzymatic hydrolysis of the colorless amide substrate releases yellow p-nitroaniline. <sup>15-19</sup>
4J	p-nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucoside	AFU	Enzymatic hydrolysis of the colorless aryl substituted glycoside releases yellow p-nitrophenol. <sup>15-19</sup>
2J	p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside	BGL	
1J	L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide	ALA	Enzymatic hydrolysis of the colorless amide substrate releases yellow p-nitroaniline. <sup>15-19</sup>

**REAGENTS**

The **BBL Crystal ANR ID** panel contains 29 enzymatic and biochemical substrates. Refer to table below for a list of active ingredients.

**Table 3**  
**Reagents used in the BBL Crystal ANR ID System**

Panel Location	Substrate	Code	Pos.	Neg.	Active Ingredients	Approx. Amt. (g/L)
4A	Fluorescent negative control	FCT	n/a	n/a	Fluorescent coumarin derivative	≤ 1
2A	L-arginine-AMC	FAR	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-arginine-AMC	≤ 1
1A	L-histidine-AMC	FHI	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-histidine-AMC	≤ 1
4B	4MU- $\alpha$ -D-mannoside	FAM	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	4MU- $\alpha$ -D-mannoside	≤ 1
2B	L-serine-AMC	FSE	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-serine-AMC	≤ 1
1B	L-isoleucine-AMC	FIS	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-isoleucine-AMC	≤ 1
4C	4MU- $\beta$ -D-mannoside	FBM	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	4MU- $\beta$ -D-mannoside	≤ 1

Panel Location	Substrate	Code	Pos.	Neg.	Active Ingredients	Approx. Amt. (g/L)
2C	Glycine-AMC	FGL	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	Glycine-AMC	≤ 1
1C	L-alanine-AMC	FAL	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-alanine-AMC	≤ 1
4D	4MU-N-acetyl-β-D-galactosaminide	FGA	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	4MU-N-acetyl-β-D-galactosaminide	≤ 1
2D	L-pyroglutamic acid-AMC	FPY	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-pyroglutamic acid-AMC	≤ 1
1D	L-lysine-AMC	FLY	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-lysine-AMC	≤ 1
4E	L-methionine-AMC	FME	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-methionine-AMC	≤ 1
2E	4MU-β-D-cellobiopyranoside	FCE	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	4MU-β-D-cellobiopyranoside	≤ 1
1E	4MU-β-D-xyloside	FXY	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	4MU-β-D-xyloside	≤ 1
4F	L-phenylalanine-AMC	FPH	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-phenylalanine-AMC	≤ 1
2F	L-leucine-AMC	FLE	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-leucine-AMC	≤ 1
1F	Escosyl*	FSC	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	Escosyl	≤ 1
4G	Disaccharide	DIS	Gold/Yellow	Orange/Red	Disaccharide	≤ 300
2G	Furanose	FUR	Gold/Yellow	Orange/Red	Furanose	≤ 300
1G	Pyranose	PYO	Gold/Yellow	Orange/Red	Pyranose	≤ 300
4H	p-n-p-α-D-galactoside	AGA	Yellow	Colorless	p-n-p-α-D-galactoside	≤ 7
2H	p-n-p-β-D-galactoside	NPG	Yellow	Colorless	p-n-p-β-D-galactoside	≤ 7
1H	p-n-p-phosphate	PHO	Yellow	Colorless	p-n-p-phosphate	≤ 7
4I	p-n-p-α-D-glucoside	AGL	Yellow	Colorless	p-n-p-α-D-glucoside	≤ 7
2I	p-n-p-N-acetyl-glucosaminide	NAG	Yellow	Colorless	p-n-p-N-acetyl-glucosaminide	≤ 7
1I	L-proline-p-nitroanilide	PRO	Yellow	Colorless	L-proline-p-nitroanilide	≤ 7
4J	p-n-p-α-L-fucoside	AFU	Yellow	Colorless	p-n-p-α-L-fucoside	≤ 7
2J	p-n-p-β-D-glucoside	BGL	Yellow	Colorless	p-n-p-β-D-glucoside	≤ 7
1J	L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide	ALA	Yellow	Colorless	L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide	≤ 7

\*The Escosyl substrate is fluorescent unhydrolyzed. Fluorescence will decrease when the enzyme is present.

### Precautions: *in vitro* Diagnostic

After review by the U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), and the Food and Drug Administration (FDA) under CLIA '88, this product has been identified as high complexity. The CDC Analyte Identifier Code is 0412; the CDC Test System Identifier Code is 07561.

After use, all infectious materials including plates, cotton swabs, inoculum tubes, filter papers used for indole tests and panels must be autoclaved prior to disposal or incinerated.

### STORAGE AND HANDLING/SHELF LIFE

**Lids:** Lids are individually packaged and must be stored unopened in a refrigerator at 2 – 8 °C. DO NOT FREEZE. Visually inspect the package for holes or cracks in the foil package. Do not use if the packaging appears to be damaged. Lids in the original packaging, if stored as recommended, will retain expected reactivity until the date of expiration.

**Bases:** Bases are packaged in two sets of ten, in **BBL Crystal** incubation trays. The bases are stacked facing down to minimize air contamination. Store in a dust free environment at 2 – 25 °C, until ready to use. Store unused bases in the tray, in plastic bag. Empty trays should be used to incubate panels.

**Inoculum Fluid:** **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid (IF) is packaged in two sets of ten tubes. Visually inspect the tubes for cracks, leaks, etc. Do not use if there appears to be a leak, tube or cap damage or visual evidence of contamination (i.e., haziness, turbidity). Store tubes at 2 – 25 °C. Expiration dating is shown on the tube label. Only **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H inoculum fluid should be used with **BBL Crystal** ANR panels.

On receipt, store the **BBL Crystal** ANR kit at 2 – 8 °C. Once opened, only the lids need to be stored at 2 – 8 °C. The remaining components of the kit may be stored at 2 – 25 °C. If the kit or any of the components are stored refrigerated, each should be brought to room temperature prior to use.

## SPECIMEN COLLECTION AND PROCESSING

**BBL Crystal** ID Systems are **not** for use directly with clinical specimens. Use isolates from a nonselective blood agar medium such as CDC Anaerobe Blood Agar, Brucella Blood Agar, Columbia Blood Agar, or Schaedler Blood Agar. The test isolate must be a pure culture, no more than 24 – 48 h old for most genera; for some slow growing cocci (up to 72 h) and *Actinomyces* species (72 – 96 h) older cultures may be acceptable. Only cotton-tipped applicator swabs should be used to prepare the inoculum suspension as some polyester swabs may cause problems with inoculation of the panels. (See "Limitations of The Procedure".) Once lids are removed from the sealed pouches, they must be used within 1 h to ensure adequate performance. The plastic cover should remain on the lid until used.

The incubator used should be humidified to prevent evaporation of fluid from the wells during incubation. The recommended humidity level is 40 – 60%. The usefulness of **BBL Crystal** ID Systems or any other diagnostic procedure performed on clinical specimens is directly influenced by the quality of the specimens themselves. It is strongly recommended that laboratories employ methods discussed in the *Manual of Clinical Microbiology* for specimen collection, transport and placement on primary isolation media.<sup>1</sup> Other recommended readings relevant to anaerobic specimen handling include *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*<sup>9</sup> and *Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology*.<sup>3</sup>

### TEST PROCEDURE

**Materials Provided:** **BBL Crystal** ANR ID Kit –

20 **BBL Crystal** Anaerobe ID Panel Lids,

20 **BBL Crystal** Bases,

20 **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid Tubes. Each tube has approximately 2.3 ± 0.15 mL of Inoculum Fluid containing: KCl 7.5 g, CaCl<sub>2</sub> 0.5 g, Tricine N-[2-Hydroxy-1, 1-bis (hydroxymethyl)methyl] glycine 0.895 g, purified water to 1000 mL.

2 incubation trays,

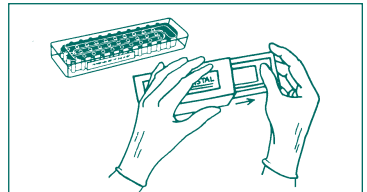
1 **BBL Crystal** ANR ID Report Pad.

**Materials Not Provided:** Sterile cotton swabs (*do not use polyester swabs*), incubator (35 – 37 °C non-CO<sub>2</sub> (40 – 60% humidity), McFarland No. 4 and No. 5 standards, **BBL Crystal**™ Panel Viewer, **BBL Crystal** ID System Electronic Codebook or **BBL Crystal** ANR Manual Codebook, **BBL** DMACA Indole Reagent Droppers, nonselective culture plate and catalase reagent.

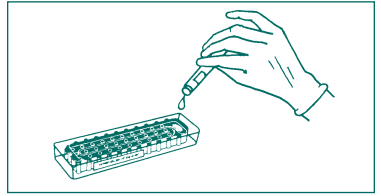
Also required are the necessary equipment and labware used for preparation, storage and handling of clinical specimens.

**Test Procedure:** **BBL Crystal** ANR ID System requires Gram stain, catalase and indole test results. Prior to panel set-up, catalase and indole tests should be performed. Perform indole test per instructions provided in the package insert. For catalase test a 15.0% solution of hydrogen peroxide with 1.0% Tween™ 80 added is recommended.<sup>9,24</sup>

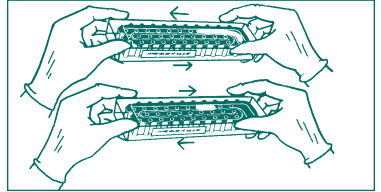
1. Remove lids from pouch. Discard desiccant. Once removed from the pouch, covered lids should be used within 1 h.  
Do not use the panel if there is no desiccant in the pouch.
2. Take an inoculum fluid tube and label with patient's specimen number. Using aseptic technique, with the tip of a sterile cotton swab (*do not use a polyester swab*) or a wooden applicator stick or disposable plastic loop, pick colonies of the same morphology from one of the recommended media (see section "Specimen Collection and Processing").
3. Suspend colonies in a tube of **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid.
4. Recap tube and vortex for approximately 10 – 15 sec. The turbidity should be equivalent to a McFarland No. 4 standard (not to exceed McFarland No. 5 standard). If the inoculum concentration is in excess of the recommended McFarland standard, one of the following steps is recommended:
  - a. With a fresh tube of inoculum fluid, prepare a new inoculum equivalent to a McFarland No. 4 standard.
  - b. If additional colonies are unavailable for preparation of a new inoculum, using aseptic techniques, dilute the inoculum by adding the minimum required volume (not to exceed 1.0 mL) of 0.85% sterile saline to bring down the turbidity equivalent to a McFarland No. 4. Remove the excess amount added to the tube with a sterile pipet so that the final volume of inoculum is approximately equivalent to that of the original volume in tube (2.3 ± 0.15 mL). Failure to do this will result in spilling of the inoculum over the black portion of the base rendering the panel unusable.
5. Take a base, and mark the patient's specimen number on the side wall.



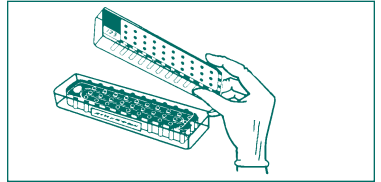
6. Pour entire contents of inoculum fluid into target area of the base.



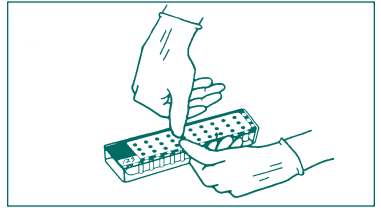
7. Hold base in both hands and roll inoculum gently along the tracks until all of the wells are filled. Roll *back* any excess fluid to the target area and place the base on a bench top. Due to the high cell concentrations used in **BBL Crystal ANR ID** panels, the inoculum should be slowly rolled across the tracks to ensure a proper fill of all wells. Make sure there is no excess fluid between the wells before the lid is aligned.



8. Align the lid so that the labeled end of the lid is on top of the target area of the base.

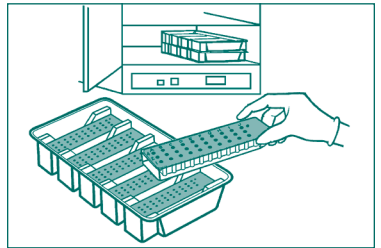


9. Push down until a slight resistance is felt. Place thumb on edge of lid towards middle of panel on each side and push down-wards simultaneously until the lid snaps into place (listen for two "clicks").



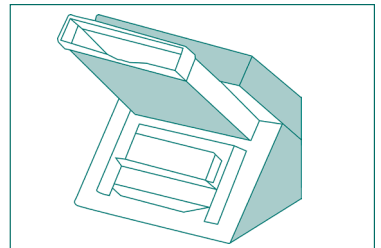
**Purity Plate:** Using a sterile loop, recover a small drop from the inoculum tube either before or after inoculating the base and inoculate an agar slant or plate (any nonselective medium) for purity check. Discard inoculum tube and cap in a biohazard disposal container. Incubate the slant or plate for 24 – 48 h at 35 – 37 °C under anaerobic conditions. The purity plate or slant may also be used for any supplementary tests or serology, if required.

**Incubation:** Place inoculated panels in incubation trays. Ten panels can fit in one tray (5 rows of 2 panels). All panels should be incubated **face down** (larger windows facing up; label facing down) in a non-CO<sub>2</sub> incubator with 40 – 60% **humidity**. Trays should not be stacked more than two high during incubation. The incubation time for panels is **4 h** at 35 – 37 °C. **NOTE:** The incubator door should not be opened repeatedly during the incubation period (preferably less than 3 times).



**Reading:** After the recommended period of incubation, remove the panels from the incubator. All panels should be read **face down** (larger windows up; label facing down) using the **BBL Crystal Panel Viewer**. Refer to the color reaction chart and/or Table 3 for an interpretation of the reactions. Use the **BBL Crystal ANR Report Pad** to record reactions.

- Read columns G thru J first, using the regular (white) light source.
- Read columns A thru F (fluorescent substrates) using the UV light source in the panel viewer. A fluorescent substrate well is considered positive *only if* the intensity of the fluorescence observed in the well is *greater* than the Negative Control well (A4).



**Calculation of BBL Crystal Profile Number:** Each test result (except 4A, which is used as a fluorescence negative control) scored positive is given a value of 4, 2, or 1, corresponding to the row where the test is located. A value of 0 (zero) is given to any negative result. The numbers (values) resulting from each positive reaction in each column are then added together. A 10-digit number is generated; this is the profile number.

Example:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	*	+	-	-	+	+	+	-	+	-
2	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
1	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
<b>Profile</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>0</b>

\*(4A) = fluorescent negative control

**Select the appropriate BBL Crystal Anaerobe database from the offered menu. The type of primary plate used to prepare the inoculum will determine the appropriate database. For use with Brucella or Columbia Blood Agar media, select alternate blood-agar database from the menu.**

The resulting profile number and off-line test results (Gram stain, catalase and indole) should be entered on a PC in which the **BBL Crystal** ID System Electronic Codebook has been installed, to obtain the identification. A manual codebook is also available. If a PC is not available contact BD Diagnostics Technical Services for assistance with the identification.

**User Quality Control:** Quality control testing is recommended for each lot of panels as follows –

1. Inoculate a panel with *Bacteroides fragilis* ATCC™ 25285 per recommended procedure (refer to “Test Procedure”).
2. Prior to incubation, let panel remain at room temperature for 1 min (not more than 2 min).
3. Read and record reactions with the aid of the panel viewer and color reaction chart.
4. If any of the wells, except 1F, are positive per color reaction chart (after 1 – 2 min), DO NOT USE PANELS from this lot. Contact BD Diagnostics Technical Services. (NOTE: Well 1F [Escosyl] should be positive upon rehydration.)
5. If all wells are negative, then incubate panel for 4 h at 35 – 37 °C.
6. Read panel with the panel viewer and color reaction chart; record reactions using the Report Pad.
7. Compare recorded reactions with those listed in Table 4. If discrepant results are obtained, confirm purity of quality control strain before contacting BD Diagnostics Technical Services.
8. The incubator door should not be opened repeatedly during the incubation period (preferably less than 3 times). Expected test results for additional quality control test strains are listed in Table 5.

#### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The **BBL Crystal** ANR ID System is designed for the taxa provided. Taxa other than those listed in Table 1 are not intended for use in this system.

All **BBL Crystal** Anaerobe ID databases were developed with **BBL** media. Reactivity of some substrates in rapid identification systems may be dependent upon the source media used in inoculum preparations. We recommend the use of the following **BBL** media for use with the **BBL Crystal** ANR ID System: CDC Anaerobe Blood Agar, Schaedler Agar with Vitamin K<sub>1</sub> and 5% Sheep Blood, Columbia Agar with 5% Sheep Blood and Brucella Blood Agar with Hemin and Vitamin K<sub>1</sub> (see “Availability”).

**BBL Crystal** Identification Systems use a modified microenvironment; therefore, expected values for its individual tests may differ from information previously established with conventional test reactions. The accuracy of the **BBL Crystal** ANR ID System is based on statistical use of specially designed tests and an exclusive database.

While **BBL Crystal** ANR ID System aids in microbial differentiation, it should be recognized that minor variations may exist in strains within species. Use of panels and interpretation of results require a competent microbiologist. The final identification of the isolate should take into consideration the source of the specimen, aerotolerance, cell morphology, colonial characteristics on various media as well as metabolic end products as determined by gas- liquid chromatography, when warranted.

**Table 4**  
**Quality Control Chart for BBL Crystal ANR ID System\***

Panel Location	Substrate	Code	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC™ 25285
4A	Fluorescent negative control	FCT	–
2A	L-arginine-AMC	FAR	V
1A	L-histidine-AMC	FHI	–
4B	4MU- $\alpha$ -D-mannoside	FAM	V <sup>1</sup>
2B	L-serine-AMC	FSE	–
1B	L-isoleucine-AMC	FIS	–
4C	4MU- $\beta$ -D-mannoside	FBM	+
2C	Glycine-AMC	FGL	–
1C	L-alanine-AMC	FAL	V
4D	4MU-N-acetyl- $\beta$ -D-galactosaminide	FGA	+
2D	L-pyroglutamic acid-AMC	FPY	V <sup>1,11</sup>
1D	L-lysine-AMC	FLY	V
4E	L-methionine-AMC	FME	V
2E	4MU- $\beta$ -D-cellobiopyranoside	FCE	+
1E	4MU- $\beta$ -D-xyloside	FXY	V <sup>1</sup>
4F	L-phenylalanine-AMC	FPH	V
2F	L-leucine-AMC	FLE	+
1F	Escosyl	FSC	– <sup>3,4,10</sup>
4G	Disaccharide	DIS	+
2G	Furanose	FUR	+
1G	Pyranose	PYO	+ <sup>1</sup>
4H	p-n-p- $\alpha$ -D-galactoside	AGA	+
2H	p-n-p- $\beta$ -D-galactoside	NPG	+
1H	p-n-p-phosphate	PHO	+
4I	p-n-p- $\alpha$ -D-glucoside	AGL	+
2I	p-n-p-N-acetyl-glucosaminide	NAG	+
1I	L-proline-p-nitroanilide	PRO	–
4J	p-n-p- $\alpha$ -L-fucoside	AFU	+
2J	p-n-p- $\beta$ -D-glucoside	BGL	+
1J	L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide	ALA	+

- 1 = Negative from **BBL** Schaedler      6 = Variable from **BBL** Brucella  
2 = Positive from **BBL** Schaedler      7 = Negative from **BBL** Columbia  
3 = Variable from **BBL** Schaedler      8 = Positive from **BBL** Columbia  
4 = Negative from **BBL** Brucella      9 = Variable from **BBL** Columbia  
5 = Positive from **BBL** Brucella

**Table 5**  
**Additional Quality Control Strains for BBL Crystal ANR ID System**

Panel Location	Substrate	Code	<i>Bacteroides distasonis</i> ATCC 8503	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> ATCC 29743	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 27725
4A	Fluorescent negative control	FCT	–	–	–	–
2A	L-arginine-AMC	FAR	+	+	+	– <sup>4,10</sup>
1A	L-histidine-AMC	FHI	V	+	+ <sup>3</sup>	–
4B	4MU- $\alpha$ -D-mannoside	FAM	+	–	–	–
2B	L-serine-AMC	FSE	–	–	+ <sup>3</sup>	–
1B	L-isoleucine-AMC	FIS	– <sup>4</sup>	–	+	–
4C	4MU- $\beta$ -D-mannoside	FBM	+ <sup>10</sup>	–	–	–
2C	Glycine-AMC	FGL	V <sup>1,12</sup>	–	V <sup>2</sup>	–
1C	L-alanine-AMC	FAL	+	V <sup>1</sup>	+	–
4D	4MU-N-acetyl- $\beta$ -D-galactosaminide	FGA	+	–	–	–
2D	L-pyroglutamic acid-AMC	FPY	V <sup>1,12</sup>	–	V <sup>11,24</sup>	+
1D	L-lysine-AMC	FLY	V <sup>2,12,15</sup>	+	+	–
4E	L-methionine-AMC	FME	+	+ <sup>4,10</sup>	+	V
2E	4MU- $\beta$ -D-cellobiopyranoside	FCE	V <sup>12</sup>	–	+	–
1E	4MU- $\beta$ -D-xyloside	FXY	+ <sup>10</sup>	–	–	–
4F	L-phenylalanine-AMC	FPH	V <sup>12</sup>	V	+	–
2F	L-leucine-AMC	FLE	+	+ <sup>10</sup>	+	V
1F	Escosyl	FSC	V	V <sup>2,15</sup>	– <sup>3,4,10</sup>	V <sup>15</sup>
4G	Disaccharide	DIS	+	–	+ <sup>3,10,24</sup>	–
2G	Furanose	FUR	+	–	+	V
1G	Pyranose	PYO	+	–	+ <sup>10</sup>	+
4H	p-n-p- $\alpha$ -D-galactoside	AGA	+	–	+ <sup>3,4,10</sup>	–
2H	p-n-p- $\beta$ -D-galactoside	NPG	+	–	+ <sup>3,4,10</sup>	–



Panel Location	Substrate	Code	<i>Bacteroides distasonis</i> ATCC 8503	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> ATCC 29743	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 27725
1H	p-n-p-phosphate	PHO	+	–	–	–
4I	p-n-p- $\alpha$ -D-glucoside	AGL	+	–	V <sup>1</sup>	–
2I	p-n-p-N-acetyl-glucosaminide	NAG	+	–	V <sup>12,15</sup>	–
1I	L-proline-p-nitroanilide	PRO	–	–	V	–
4J	p-n-p- $\alpha$ -L-fucoside	AFU	–	–	–	–
2J	p-n-p- $\beta$ -D-glucoside	BGL	+	–	+	–
1J	L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide	ALA	+	–	V	–

\*Results shown are expected when **BBL™** CDC Anaerobe Agar with 5% sheep blood is used.

Only cotton-tipped applicator swabs, or wooden applicator sticks, or disposable plastic loops should be used to prepare the inoculum suspension as some polyester swabs may cause the inoculum fluid to become viscous. This may result in insufficient inoculum fluid to fill the wells. Once lids are removed from the sealed pouches, they must be used within 1 h to ensure adequate performance. The plastic cover should remain on the lid until used.

The incubator where panels are placed should be humidified to prevent evaporation of inoculum fluid from the wells during incubation. The recommended humidity level is 40 – 60%.

The panels, after inoculation, should only be incubated **face down** (larger windows facing up; label facing down) to maximize the effectiveness of substrates.

Colonies should be taken from **nonselective** blood agar plates such as **BBL** CDC Anaerobe, Brucella, Columbia, and Schaedler (see "Availability").

If the **BBL Crystal** test profile yields a "No identification" result and culture purity has been confirmed, then it is likely that (i) the test isolate is producing *atypical BBL Crystal reactions* (which may also be caused by procedural errors), (ii) the test species is not part of the intended taxa or (iii) the system is unable to identify the test isolate with the required level of confidence. Conventional test methods are recommended when user error has been ruled out.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Reproducibility:** In an external study involving four clinical laboratories (total of five evaluations), the reproducibility of **BBL Crystal** ANR ID substrate (29) reactions was studied by replicate testing. The reproducibility of the individual substrate reactions ranged from 96.2% to 100%. The overall reproducibility of **BBL Crystal** ANR panel was determined to be 99.1%.<sup>25</sup>

**Accuracy of Identification:** The performance of **BBL Crystal** ANR ID System was compared to a currently available commercial system as well as to conventional reference identification methods based on VA Wadsworth Laboratory recommendations, using *clinical isolates and stock cultures*. A total of five studies were conducted in four independent laboratories. Fresh, routine isolates arriving in the clinical laboratory, as well as previously identified isolates of the clinical trial sites' choice were utilized to establish performance characteristics.

Out of 633 total isolates tested from the five studies, 588 (93%) were correctly identified (including isolates that required supplemental testing) by the **BBL Crystal** ANR Identification System. A total of 36 (6%) isolates were incorrectly identified, and a message of "No Identification" was obtained for 9 (1%) isolates.<sup>25</sup>

## AVAILABILITY

Cat. No.	Description	Cat. No.	Description
245010	<b>BBL Crystal™</b> Anaerobe ID Kit, containing 20 each: <b>BBL Crystal</b> Anaerobe ID Panel Lids, <b>BBL Crystal</b> Bases and <b>BBL Crystal</b> Anaerobe ID Inoculum Fluid.	221733	<b>BBL</b> CDC Anaerobe Blood Agar with 5% Sheep Blood, pkg of 20 plates.
245038	<b>BBL Crystal</b> ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid, ctn of 10.	221734	<b>BBL</b> CDC Anaerobe Blood Agar with 5% Sheep Blood, ctn of 100 plates.
245031	<b>BBL Crystal</b> Panel Viewer, Domestic model, 110 V, 60 Hz.	221539	<b>BBL</b> Schaedler Agar with Vitamin K <sub>1</sub> and 5% Sheep Blood, pkg of 20.
245032	<b>BBL Crystal</b> Panel Viewer, European model, 220 V, 50 Hz.	221540	<b>BBL</b> Schaedler Agar with Vitamin K <sub>1</sub> and 5% Sheep Blood, ctn of 100.
245033	<b>BBL Crystal</b> Panel Viewer, Japanese model, 100 V, 50/60 Hz.	221165	<b>BBL</b> Columbia Agar with 5% Sheep Blood, pkg of 20.
245034	<b>BBL Crystal</b> Panel Viewer Longwave UV Tube.	221263	<b>BBL</b> Columbia Agar with 5% Sheep Blood, ctn of 100.
245036	<b>BBL Crystal</b> Panel Viewer White Light Tube.	297848	<b>BBL</b> Brucella Blood Agar with Hemin and Vitamin K <sub>1</sub> , pkg of 20.
245011	<b>BBL Crystal</b> Identification Systems Anaerobe Manual Codebook.	297716	<b>BBL</b> Brucella Blood Agar with Hemin and Vitamin K <sub>1</sub> , ctn of 100.
		261187	<b>BBL</b> DMACA Indole Reagent Droppers, ctn of 50.
		212539	<b>BBL</b> Gram Stain Kit, pkg 4 x 250 mL bottles

## REFERENCES

1. Balows, A., W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy (ed.). 1991. Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Baron, E.J., and S.M. Finegold. 1990. Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 8th ed. The C.V. Mosby Company, St. Louis.
3. Engelkirk, P.G., J. Duben-Engelkirk, and V.R. Dowell, Jr. (ed.). 1992. Principles and practice of clinical anaerobic bacteriology. Star Publishing Company, Belmont, Calif.
4. Holdeman, L.V., E.P. Cato and W.E.C. Moore. 1977. Anaerobe laboratory manual, 4th edition. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
5. Holdeman, L.V., E.P. Cato and W.E.C. Moore. 1987. Anaerobe laboratory manual update. Supplement to the 4th edition. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
6. Holdeman, L.V., E.P. Cato and W.E.C. Moore. 1993. Anaerobe laboratory manual update. Supplement to the 4th edition. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
7. Mandell, G.L., R.G. Douglas, Jr. and J.E. Bennett. 1990. Principles and practice of infectious diseases, 3rd ed. Churchill Livingstone Inc., New York.
8. Rodloff, A.C., P.C. Appelbaum, and R.J. Zabransky. 1991. Cumitech 5A, Practical anaerobic bacteriology, Coordinating ed., A.C. Rodloff. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Summanen, P., E.J. Barron, D.M. Citron, C.A. Strong; H.M. Wexler, and S.M. Finegold. 1993. Wadsworth anaerobic bacteriology manual, 5th ed. Star Publishing Company, Belmont, Calif.
10. Bronfenbrenner, J., and M.J. Schlesinger. 1918. A rapid method for the identification of bacteria fermenting carbohydrates. Am. J. Public Health. 8:922-923.
11. Cowan, S.T., and K.J. Steel. 1974. Manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
12. Hartman, P.A. 1968. Miniaturized microbiological methods. Academic Press, New York.
13. Sanders, A.C., J.E. Faber, and T.M. Cook. 1957. A rapid method for the characterization of enteric pathogen using paper discs. Appl. Microbiol. 5:36-40.
14. Soto, O.B. 1949. Fermentation reactions with dried paper discs containing carbohydrate and indicator. Puerto Rican J. Public Health. Trop. Med. :96-100.
15. Edberg, S.C., and C.M. Kontnick. 1986. Comparison of  $\beta$ -glucuronidase-based substrate systems for identification of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 24:368-371.
16. Kämpfer, P., O. Rauhoff, and W. Dott. 1991. Glycosidase profiles of members of the family *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol. 29:2877-2879.
17. Kilian, M., and P. Bulow. 1976. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae 1: detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. 84:245-251.
18. Maddocks, J.L., and M. Greenan. 1975. Rapid method for identifying bacterial enzymes. J. Clin. Pathol. 28:686-687.
19. Manafi, M., W. Kneifel, and S. Bascomb. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiol. Rev. 55:335-348.
20. Mangels, J., I. Edvalson, and M. Cox. 1993. Rapid Identification of *Bacteroides fragilis* group organisms with the use of 4-methylumbelliferone derivative substrates. Clin. Infect. Dis. 16(54):5319-5321.
21. Moncla, B.J., P. Braham, L.K. Rabe, and S. L. Hiller. 1991. Rapid presumptive identification of black-pigmented gram-negative anaerobic bacteria by using 4-methylumbelliferone derivatives. J. Clin. Microbiol. 29:1955-1958.
22. Qadri, S.M., and S. Johnson. 1981. Rapid test for esculin hydrolysis by anaerobic bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 47:371-379.
23. Sneath, P.H.A. 1957. The application of computers to taxonomy. J. Gen. Microbiol. 17:201-221.
24. Hansen, S.L., and B.J. Stewart. 1978. Slide catalase. A reliable test for differentiation and presumptive identification of certain clinically significant anaerobes. Am. J. Clin. Microbiol. 13:444-448.
25. Data on file at BD Diagnostics.

Technical information: In the United States, contact BD Technical Service and Support at 800-638-8663 or [www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds).

---

---

# BD Systèmes d'identification BBL Crystal

## Trousse pour l'identification des bactéries anaérobies

COMPLEXITE CLIA : HAUTE  
CODES IDENTIFICATEURS DU CDC  
ANALYTE : 0412  
SYSTEME D'ANALYSE : 07561

Français

### APPLICATION

Le système **BBL Crystal** pour l'identification (ID) des bactéries anaérobies (ANR) est une méthode d'identification miniaturisée utilisant des substrats chromogènes, fluorogènes et conventionnels modifiés. Il a pour but d'identifier les bactéries anaérobies fréquemment isolées à partir d'échantillons cliniques.<sup>1-9</sup>

### RESUME ET EXPLICATION

L'emploi de microméthodes d'identification biochimique des microorganismes remonte à 1918.<sup>10</sup> Plusieurs publications font état de l'utilisation de disques de papier imprégnés de réactifs et de micro-tubes pour différencier les entérobactéries.<sup>10-14</sup> L'intérêt suscité par les systèmes d'identification miniaturisés a conduit à la commercialisation de plusieurs systèmes à la fin des années 60. Ces derniers avaient pour avantage d'être faciles à utiliser, de ne requérir qu'un espace de stockage restreint tout en offrant une durée de conservation prolongée et un contrôle de qualité standardisé.

En général, plusieurs des tests utilisés dans les systèmes **BBL Crystal** ID sont des modifications de méthodes classiques. Ils comprennent des tests de fermentation, d'oxydation, de dégradation et d'hydrolyse de différents substrats. De plus, des substrats sont couplés à un chromogène ou un fluorogène, comme dans le cas des panels **BBL Crystal** ANR ID, afin de détecter les enzymes utilisées par les microorganismes pour métaboliser ces substrats.<sup>12,15-22</sup>

La trousse **BBL Crystal** ANR ID est composée (i) de couvercles pour panels **BBL Crystal** ANR ID, (ii) de bases **BBL Crystal** et (iii) de tubes de solution **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID pour l'inoculum. Le couvercle contient 29 substrats déshydratés et un contrôle fluorescent situés à l'extrémité de pointes de plastique. La base comprend 30 puits réactionnels. L'inoculum à tester est préparé à l'aide de la solution pour l'inoculum et permet de remplir la totalité des 30 puits de la base. Lorsque le couvercle est aligné avec la base et correctement emboîté, l'inoculum à tester réhydrate les substrats secs et amorce les réactions propres aux différents tests.

Après une période d'incubation, les puits sont examinés afin de déceler des changements de coloration ou la présence d'une fluorescence résultant de l'activité métabolique des microorganismes. L'ensemble des résultats des 29 réactions est converti en un profil numérique de 10 chiffres servant de base à l'identification.<sup>23</sup> Les profils réactionnels biochimiques et enzymatiques pour les 29 substrats du système **BBL Crystal** ANR ID obtenus pour une large gamme de microorganismes sont stockés dans la base de données **BBL Crystal** ANR ID. L'identification repose sur la comparaison entre les profils réactionnels obtenus avec l'isolat et ceux contenus dans la base de données. La liste taxonomique complète contenue actuellement dans la base de données est donnée au tableau 1.

### PRINCIPES DE LA METHODE

Les panels **BBL Crystal** ANR ID contiennent 29 substrats biochimiques et enzymatiques déshydratés. Une suspension bactérienne contenue dans la solution pour l'inoculum est utilisée pour réhydrater les substrats. Les tests utilisés dans le système reposent sur l'utilisation et la dégradation microbienne de substrats spécifiques détectées par différents systèmes d'indicateurs. L'hydrolyse enzymatique des substrats fluorogènes contenant des dérivés coumariniques de 4-méthylumbelliféron (4MU) ou de 7-amino-4-méthylcoumarin (7-AMC), résulte en une augmentation de la fluorescence facilement détectée<sup>15-19</sup> à l'aide d'une lampe à UV.<sup>19-21</sup> L'hydrolyse des substrats chromogènes entraîne des changements de coloration pouvant être détectés à l'oeil nu. De plus, les systèmes **BBL Crystal** ID comportent d'autres tests permettant de détecter la capacité d'un organisme à hydrolyser, dégrader, réduire ou utiliser autrement un substrat.

Les réactions impliquées dans l'utilisation des différents substrats ainsi qu'une courte explication des principes sur lesquels repose le système figurent au tableau 2. La position dans les tableaux indique le rang et la colonne correspondant à l'emplacement des puits dans les panels (exemple : 1J correspond au rang 1 de la colonne J).

**Table 1**  
**Taxonomie dans le système BBL Crystal ANR ID**

<b>Bacilles Gram-négatifs</b>		
<b>Tolérant à la bile</b>	<b>Sensible à la bile,</b>	<b>Non-pigmenté,</b>
Groupe de <i>Bacteroides fragilis</i>	<b>non-pigmenté</b>	<b>incrustant</b>
<i>B. caccae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>B. distasonis</i> groupe <sup>10</sup>	<i>P. bivia</i>	<i>B. ureolyticus</i>
<i>B. eggerthii</i>	<i>P. buccae</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>P. buccalis</i>	<i>C. gracilis</i>
<i>B. ovatus</i>	<i>P. disiens</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>B. stercoris</i>	<i>P. oralis</i>	<i>F. gonidiaformans</i> <sup>1,11</sup>
<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>P. oris</i>	<i>F. mortiferum</i>
<i>B. uniformis</i>	<i>P. veroralis</i> <sup>11</sup>	<i>F. necrophorum</i>
<i>B. vulgatus</i>	<b>Non-pigmenté,</b>	<i>F. nucleatum</i>
<b>Autres:</b>	<b>non-incrustant</b>	<i>F. russii</i>
<i>B. splanchnicus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>F. varium</i>
<i>Porphyromonas levii</i> <sup>11</sup>	<i>B. capillosus</i>	<i>Leptotrichia</i>
<b>Sensible à la bile, pigmenté</b>	<i>Tissierella</i>	<i>L. buccalis</i>
<i>Capnocytophaga</i> espèce	<i>T. praeacuta</i>	
<b>Prevotella</b>	<b>Tolérant à la bile,</b>	
<i>P. corporis</i>	<b>non-pigmenté</b>	
<i>P. denticola</i>	<i>Bilophila</i>	
<i>P. intermedia</i>	<i>B. wadsworthia</i>	
<i>P. loescheii</i>	<i>Desulfomonas</i>	
<i>P. melaninogenica</i>	<i>D. pigra</i>	
<b>Porphyromonas</b>	<i>Desulfovibrio</i> espèce	
<i>P. asaccharolytica</i>	<i>Campylobacter</i>	
<i>P. endodontalis</i>	<i>C. curvus/rectus</i>	
<i>P. gingivalis</i>		

Légende : 1 = Taxon inclus seulement dans la base de données **BBL Crystal**, **BBL** Schaedler.

2 = Taxon inclus seulement dans la base de données **BBL Crystal**, **BBL** Schaedler et géloses au sang alternatives **BBL Crystal**.

3 = Inclut *B. distasonis* et *B. merdae*.

4 = Il existe pour ces taxons < 10 profils originaux **BBL Crystal** dans la base de données actuelle.

<b>Clostridia</b>	<b>Bacilles Gram-positifs Non-Sporulés</b>	<b>Cocci Gram-positifs</b>
<b>Clostridium</b>	<b>Actinomyces</b>	<b>Gemella</b>
<i>C. baratii</i>	<i>A. bovis</i>	<i>G. morbillorum</i>
<i>C. beijerinckii</i>	<i>A. israelii</i>	<b>Peptostreptococcus</b>
<i>C. bifermentans</i>	<i>A. meyeri</i>	<i>P. anaerobius</i>
<i>C. botulinum</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>P. asaccharolyticus</i>
<i>C. butyricum</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>P. indolicus</i>
<i>C. cadaveris</i>	<i>A. pyogenes</i>	<i>P. magnus</i>
<i>C. clostridioforme</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>P. micros</i>
<i>C. difficile</i>	Atopobium	<i>P. prevotii</i>
<i>C. glycolicum</i>	<i>A. minutum</i>	<i>P. tetradius</i>
<i>C. hastiforme</i>	<b>Bifidobacterium</b>	<b>Ruminococcus</b>
<i>C. histolyticum</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>R. productus</i> <sup>11</sup>
<i>C. innocuum</i>	<i>B. dentium</i>	<b>Staphylococcus</b>
<i>C. limosum</i>	<i>B. espèce</i>	<i>S. saccharolyticus</i>
<i>C. novyi</i> A	<b>Eubacterium</b>	<b>Streptococcus</b>
<i>C. paraputrificum</i> <sup>11</sup>	<i>E. aerofaciens</i>	<i>S. constellatus</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>E. lentum</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>C. putrificum</i> <sup>1</sup>	<i>E. limosum</i>	<b>Cocci Gram-négatifs</b>
<i>C. ramosum</i>	<b>Mobiluncus</b>	<i>Veillonella</i> espèce
<i>C. septicum</i>	<i>M. curtisii</i>	
<i>C. sordellii</i>	<i>M. mulieris</i>	
<i>C. sphenoides</i>	<i>M. espèce</i> <sup>2,11</sup>	
<i>C. sporogenes</i>	<b>Propionibacterium</b>	
<i>C. subterminale</i>	<i>P. acnes</i>	
<i>C. tertium</i>	<i>P. avidum</i>	
<i>C. tetani</i> <sup>4</sup>	<i>P. granulosum</i> <sup>4</sup>	
	<i>P. propionicus</i>	
	<b>Lactobacillus</b>	
	<i>L. acidophilus</i>	
	<i>L. casei</i>	
	<i>L. catenaformis</i>	
	<i>L. fermentum</i>	
	<i>L. jensenii</i>	
	<i>L. johnsonii</i>	
	<i>L. rhamnosus</i>	

**Tableau 2****Principes des tests employés dans le système BBL Crystal ANR ID**

Pos. sur panel	Caractéristiques du test	Code	Principe (référence)
4A	Contrôle négatif fluorescent	FCT	Contrôle pour standardiser les résultats des substrats fluorescents.
2A	L-arginine-AMC	FAR	L'hydrolyse enzymatique des liens amides ou glycosidiques libère un dérivé coumarinique fluorescent. <sup>19-21</sup>
1A	L-histidine-AMC	FHI	
4B	4MU- $\alpha$ -D-mannoside	FAM	
2B	L-sérine-AMC	FSE	
1B	L-isoleucine-AMC	FIS	
4C	4MU- $\beta$ -D-mannoside	FBM	
2C	Glycine-AMC	FGL	
1C	L-alanine-AMC	FAL	
4D	4MU-N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminide	FGA	
2D	Acide L-pyroglutamique-AMC	FPY	
1D	L-lysine-AMC	FLY	
4E	L-méthionine-AMC	FME	
2E	4MU- $\beta$ -D-cellobiopyranoside	FCE	
1E	4MU- $\beta$ -D-xyloside	FXY	
4F	L-phénylalanine-AMC	FPH	
2F	L-leucine-AMC	FLE	
1F	Escosyl	FSC	L'hydrolyse du lien glycosidique libère de l'esculétine non fluorescente. <sup>22</sup>
4G	Disaccharide	DIS	La métabolisation des carbohydrates entraîne une baisse du pH, ce qui fait virer l'indicateur coloré (rouge de phénol). <sup>1,2,11,12</sup>
2G	Furanose	FUR	
1G	Pyranose	PYO	
4H	p-nitrophényl- $\alpha$ -D-galactoside	AGA	L'hydrolyse enzymatique des substrats glycoside incolores, substitués par un radical aryl, libère du p-nitrophénol jaune. <sup>15-19</sup>
2H	p-nitrophényl- $\beta$ -D-galactoside	NPG	
1H	p-nitrophényl-phosphate	PHO	
4I	p-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucoside	AGL	
2I	p-nitrophényl-N-acétylglucosaminide	NAG	
1I	L-proline-p-nitroanilide	PRO	L'hydrolyse enzymatique du substrat amide incolore libère de la p-nitroaniline jaune. <sup>15-19</sup>
4J	p-nitrophényl- $\alpha$ -L-fucoside	AFU	L'hydrolyse enzymatique des substrats glycoside incolores, substitués par un radical aryl, libère du p-nitrophénol jaune. <sup>15-19</sup>
2J	p-nitrophényl- $\beta$ -D-glucoside	BGL	
1J	L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide	ALA	L'hydrolyse enzymatique du substrat amide incolore libère de la p-nitroaniline jaune. <sup>15-19</sup>

## REACTIFS

Le panel BBL Crystal ANR ID contient 29 substrats enzymatiques et biochimiques. Se référer au tableau ci-après pour une liste des ingrédients actifs.

**Tableau 3**

### Réactifs utilisés dans le système BBL Crystal ANR ID

Position sur le panel	Substrat	Code	Pos.	Nég.	Réactifs Ingrédients	Quantité approx. (g/L)
4A	Contrôle négatif fluorescent	FCT	nd	nd	Dérivé coumarinique fluorescent	≤ 1
2A	L-arginine-AMC	FAR	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	L-arginine-AMC	≤ 1
1A	L-histidine-AMC	FHI	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	L-histidine-AMC	≤ 1
4B	4MU-α-D-mannoside	FAM	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	4MU-α-D-mannoside	≤ 1
2B	L-sérine-AMC	FSE	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	L-sérine-AMC	≤ 1
1B	L-isoleucine-AMC	FIS	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	L-isoleucine-AMC	≤ 1
4C	4MU-β-D-mannoside	FBM	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	4MU-β-D-mannoside	≤ 1
2C	Glycine-AMC	FGL	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	glycine-AMC	≤ 1
1C	L-alanine-AMC	FAL	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	L-alanine-AMC	≤ 1
4D	4MU-N-acétyl-β-D-galactosaminide	FGA	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	4MU-N-acétyl-β-D-galactosaminide	≤ 1
2D	L-pyroglytamique-AMC	FPY	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	acide L-pyroglytamique-AMC	≤ 1
2D	L-pyroglytamique-AMC	FPY	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	acide L-pyroglytamique-AMC	≤ 1
1D	L-lysine-AMC	FLY	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	L-lysine-AMC	≤ 1
4E	L-méthionine-AMC	FME	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	L-méthionine-AMC	≤ 1
2E	4MU-β-D-cellobiopyranoside	FCE	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	4MU-β-D-cellobiopyranoside	≤ 1
1E	4MU-β-D-xyloside	FXY	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	4MU-β-D-xyloside	≤ 1
4F	L-phénylalanine-AMC	FPH	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	L-phénylalanine-AMC	≤ 1
2F	L-leucine-AMC	FLE	fluorescence bleue > puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FC	L-leucine-AMC	≤ 1
1F	Escosyl*	FSC	fluorescence bleue/verte > puits FCT	fluorescence bleue/verte ≤ puits FC	Escosyl	≤ 1
4G	Disaccharide	DIS	Or/Jaune	Orange/Rouge	Disaccharide	≤ 300
2G	Furanose	FUR	Or/Jaune	Orange/Rouge	Furanose	≤ 300
1G	Pyranose	PYO	Or/Jaune	Orange/Rouge	Pyranose	≤ 300
4H	p-n-p-α-D-galactoside	AGA	Jaun	Incolore	p-n-p-α-D-galactoside	≤ 7
2H	p-n-p-β-D-galactoside	NGP	Jaune	Incolore	p-n-p-β-D-galactoside	≤ 7
1H	p-n-p-phosphate	PHO	Jaune	Incolore	p-n-p-phosphate	≤ 7
4I	p-n-p-α-D-glucoside	AGL	Jaune	Incolore	p-n-p-α-D-glucoside	≤ 7
2I	p-n-p-N-acétyl-glucosaminide	NAG	Jaune	Incolore	p-n-p-N-acétyl-glucosaminide	≤ 7
1I	L-proline-p-nitroanilide	PRO	Jaune	Incolore	L-proline-p-nitroanilide	≤ 7
4J	p-n-p-α-L-fucoside	AFU	Jaune	Incolore	p-n-p-α-L-fucoside	≤ 7
2J	p-n-p-β-D-glucoside	BGL	Jaune	Incolore	p-n-p-β-D-glucoside	≤ 7
1J	L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide	ALA	Jaune	Incolore	L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide	≤ 7

\*Le substrat Escosyl non hydrolysé est fluorescent. La fluorescence décroît en présence de l'enzyme.

#### Précautions : diagnostic *in vitro*

Après une évaluation par les U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) et la U.S. Food and Drug Administration (FDA) selon CLIA '88, ce produit a été identifié comme de haute complexité. Le code identificateur "Analyte" des CDC (Analyte Identifier Code) est 0412 ; le code identificateur du système d'analyse des CDC (Test System Identifier Code) est 07561.

Après usage, tout le matériel contaminé incluant les géloses, les écouvillons, les tubes pour l'inoculum, les papiers filtres utilisés pour les tests d'indole et les panels doivent être autoclavés avant d'être éliminés ou incinérés.

## CONSERVATION ET MANIPULATION/DUREE DE CONSERVATION

**Couvercles** : les couvercles sont emballés individuellement. Ils doivent être conservés dans leur emballage fermé, dans un réfrigérateur entre 2 – 8 °C. NE PAS CONGELER. Avant utilisation, vérifier que l'emballage n'est ni percé ni déchiré. Ne pas utiliser si l'emballage semble endommagé. S'ils sont conservés dans leur emballage d'origine selon les consignes de conservation énumérées ci-dessus, les couvercles garderont toutes leurs propriétés réactionnelles jusqu'à la date de péremption.

**Bases** : les bases se présentent sous forme de deux paquets de dix, dans des plaques d'incubation **BBL Crystal**. Les bases sont empilées la face vers le bas afin de réduire les risques de contamination par l'air. Conserver à l'abri de la poussière, à une température entre 2 – 25 °C, jusqu'à leur utilisation. Conserver les bases inutilisées dans la plaque, dans une poche en plastique. Les plaques vides doivent être utilisées pour incuber les panels.

**Solution pour l'inoculum** : la solution **BBL Crystal ANR**, GP, RGP, N/H ID pour l'inoculum se présente sous forme de deux paquets de dix tubes. Vérifier visuellement l'absence de fissures, de fuites, etc. Ne pas utiliser en cas de fuite, de tube ou de bouchon endommagé ou de contamination visible à l'œil nu (c.-à-d. opacité, turbidité). Conserver les tubes à une température entre 2 – 25 °C. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du tube. La solution pour l'inoculum **BBL CRYSTAL ANR**, GP, RGP, N/H doit être utilisée seulement avec les panels **BBL Crystal ANR**.

Dès réception, conserver la trousse **BBL Crystal ANR** entre 2 – 8 °C. Une fois le carton ouvert, seuls les couvercles ont besoin d'être conservés entre 2 – 8 °C. Les autres composants de la trousse peuvent être conservés entre 2 – 25 °C. Si la trousse ou quelque composant de la trousse se maintient dans le réfrigérateur, il sera nécessaire de le ramener à température ambiante avant l'utilisation.

## PRELEVEMENT ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Les systèmes **BBL Crystal ID** ne sont pas conçus pour être utilisés directement avec des échantillons cliniques. Utiliser des isolats provenant de géloses au sang non sélectives telles que la gélose au sang pour anaérobies du CDC, la gélose au sang pour Brucelles, la gélose au sang Columbia ou la gélose au sang de Schaedler. Pour la plupart des genres bactériens, l'isolat testé doit être une culture pure de 24 – 48 h ; pour certains cocci à croissance lente (jusqu'à 72 h) et des espèces d'actinomycètes (72 – 96 h), des cultures plus vieilles peuvent être acceptables. Pour la préparation de la suspension de l'inoculum, n'utilisez que des écouvillons à embout de coton, certains écouvillons en polyester peuvent ne pas permettre une inoculation adéquate des panels. (Voir "Limites de la méthode".) Les couvercles, une fois retirés de leur sachet scellé, doivent être utilisés dans un délai d'une heure afin de s'assurer d'une performance adéquate. Le couvercle doit rester dans sa poche en plastique jusqu'à son utilisation.

L'incubateur utilisé doit être en atmosphère humide afin de prévenir une évaporation du liquide contenu dans les puits durant l'incubation. Le taux d'humidité recommandé se situe entre 40 – 60 %. L'utilité des systèmes **BBL Crystal ID** ou de toute autre méthode de diagnostic utilisée avec des échantillons cliniques dépend directement de la qualité des échantillons eux-mêmes. Il est fortement recommandé aux laboratoires d'utiliser les méthodes décrites dans le "*Manual of Clinical Microbiology*" pour le prélèvement des échantillons, leur transport et leur ensemencement sur des milieux d'isolement primaires.<sup>1</sup> D'autres lectures pertinentes quant à la manipulation d'échantillons contenant des bactéries anaérobies incluent "*Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*"<sup>9</sup> et "*Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology*".<sup>3</sup>

## METHODOLOGIE DU TEST

**Matériel fourni** : trousse **BBL Crystal ANR ID** –

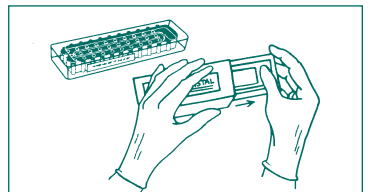
- 20 couvercles pour panels **BBL Crystal ANR ID**,
- 20 bases **BBL Crystal**,
- 20 tubes de solution **BBL Crystal ANR**, GP, RGP, N/H ID pour l'inoculum. Chaque tube contient approximativement 2,3 ± 0,15 mL de solution pour l'inoculum, laquelle est composée de : KCl 7,5 g, CaCl<sub>2</sub> 0,5 g, Tricine N-[2-Hydroxy-1,1-bis (hydroxy- méthyl)méthyl] glycine 0,895 g, eau purifiée qsp 1000 mL.
- 2 plaques d'incubation,
- 1 formulaire de résultats **BBL Crystal ANR ID**.

**Matériel non-fourni** : écouvillons stériles avec embout de coton (*ne pas utiliser d'écouvillons en polyester*), incubateur (35 – 37 °C) sans CO<sub>2</sub> (40 – 60 % d'humidité), degrés McFarland N° 4 et N° 5, visionneuse pour panels **BBL Crystal**, Livre électronique des codes pour les systèmes **BBL Crystal ID** ou Manuel des codes pour le système **BBL Crystal ANR**, compte-gouttes pour le réactif indole **BBL DMACA**, gélose non sélective et réactif pour le test de catalase.

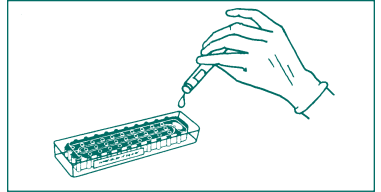
L'équipement et la verrerie de laboratoire utilisé pour la préparation, la conservation et la manipulation d'échantillons cliniques sont aussi requis.

**Mode opératoire du test** : le système **BBL Crystal ANR ID** requiert les résultats d'une coloration de Gram et de tests d'indole et de catalase. Avant d'utiliser le panel, les tests d'indole et de catalase doivent être faits. Effectuer le test d'indole selon les instructions insérées dans l'emballage des réactifs. Pour le test de catalase, une solution de peroxyde d'hydrogène à 15,0 % avec 1,0 % de Tween 80 est recommandée.<sup>9,24</sup>

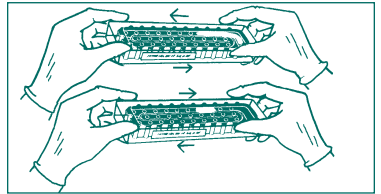
- Retirer le couvercle de son emballage. Éliminer le dessiccateur. Les couvercles avec protecteur doivent être utilisés dans l'heure qui suit l'ouverture de l'emballage. S'il n'y a pas de dessiccateur dans l'emballage, ne pas utiliser le panel.
- Prendre un tube de solution pour l'inoculum et reporter sur l'étiquette le numéro attribué à l'échantillon du patient. À partir d'une des géloses recommandées (voir "Prélèvement et traitement des échantillons"), prélever, en respectant les mesures d'asepsie, plusieurs colonies de morphologie identique en utilisant un écouvillon stérile avec embout de coton (*ne pas utiliser d'écouvillon en polyester*) ou un bâtonnet applicateur en bois ou une anse en plastique jetable.
- Suspendre les colonies dans un tube de solution pour l'inoculum **BBL Crystal ANR**, GP, RGP, N/H ID.



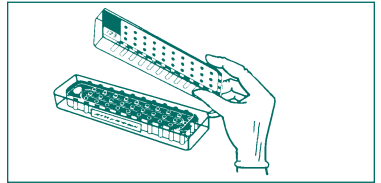
4. Reboucher le tube et agiter au vortex pendant 10 – 15 sec. La turbidité devrait être au moins équivalente au degré McFarland N° 4 et ne pas dépasser le degré N° 5. Si la concentration de l'inoculum dépasse le degré de McFarland recommandé, une des étapes suivantes est recommandée :
  - a. En utilisant un nouveau tube de solution pour l'inoculum, préparer un nouvel inoculum équivalent au degré McFarland N° 4.
  - b. Si on ne dispose pas d'autres colonies pour préparer un nouvel inoculum, diluer, en respectant les règles d'asepsie, l'inoculum avec le volume minimum nécessaire (ne pas dépasser 1,0 mL) de sérum physiologique 0,85 % afin de réduire la turbidité à un McFarland N° 4. Enlever l'excédent à l'aide d'une pipette stérile afin que le volume final de l'inoculum soit approximativement équivalent au volume initial du tube soit  $2,3 \pm 0,15$  mL. Si l'excédent n'est pas enlevé, l'inoculum se répandra sur la partie noire de la base rendant ainsi le panel inutilisable.
5. Prendre une base et reporter le numéro d'échantillon du patient sur la paroi latérale.
6. Verser la totalité de la solution de l'inoculum dans la zone cible de la base.



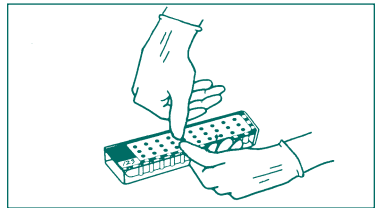
7. Prendre la base à deux mains et faire glisser doucement l'inoculum le long des conduits jusqu'à ce que tous les puits soient entièrement remplis. Faire *refluer* l'excédent vers la zone cible et placer la base sur la surface de travail. A cause de la forte concentration de cellules utilisée avec le panel **BBL Crystal ANR ID**, l'inoculum doit glisser très lentement le long des conduits afin de s'assurer qu'un remplissage adéquat des puits a eu lieu. S'assurer de l'absence d'excédent de liquide entre les puits avant d'aligner le couvercle.



8. Placer le couvercle de manière à ce que l'extrémité portant une étiquette recouvre la zone cible de la base.

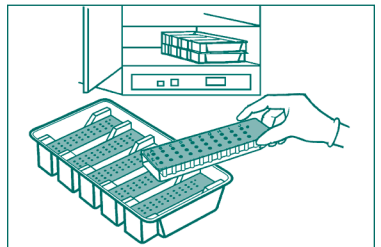


9. Appuyer jusqu'à ce qu'une légère résistance soit perçue. Placer les pouces de chaque côté du couvercle, près du bord du couvercle et à peu près au centre du panel, et appuyer simultanément avec les deux pouces jusqu'à ce que le couvercle soit parfaitement emboîté (on entend alors deux "déclics").



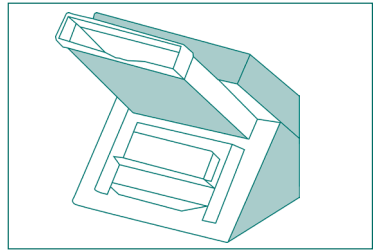
**Gélose de contrôle de pureté** : à l'aide d'une anse stérile, récupérer une goutte d'inoculum dans le tube avant ou après avoir inoculé la base et ensemercer une gélose en boîte ou en tube incliné (tout milieu non sélectif) pour vérifier la pureté de l'inoculum. Jeter le tube pour l'inoculum et son bouchon dans un récipient pour déchets à risque biologique. Incuber la boîte ou le tube pendant 24 – 48 h à une température de 35 – 37 °C dans des conditions d'anaérobiose. La gélose de contrôle de pureté peut également être utilisée pour effectuer des tests supplémentaires ou une épreuve sérologique, si nécessaire.

**Incubation** : placer les panels ensemençés dans les plaques d'incubation. Chaque plaque peut contenir dix panels (5 rangées de 2 panels). Tous les panels doivent être incubés **face vers le bas** (les fenêtres les plus larges étant placées face vers le haut, et l'étiquette, face vers le bas) dans un incubateur sans CO<sub>2</sub>, entre 40 – 60 % d'**humidité**. Ne pas empiler plus de deux plaques lors de l'incubation. Le temps d'incubation pour les panels est de **4 h** à une température entre 35 – 37 °C. **NOTA** : la porte de l'incubateur ne doit pas être ouverte de manière répétée durant la période d'incubation (de préférence moins de 3 fois).





**Lecture** : lorsque le temps d'incubation requis est atteint, retirer les panels de l'incubateur. Tous les panels doivent être lus **face vers le bas** (les fenêtres les plus larges étant placées face vers le haut, et l'étiquette, face vers le bas) à l'aide de la visionneuse pour panels **BBL Crystal**. Se référer à la grille d'interprétation des réactions colorées et/ou au tableau 3 pour l'interprétation des réactions. Utiliser le formulaire de résultat **BBL Crystal ANR** pour enregistrer les réactions.



- En premier, lire les colonnes G à J en se servant de la source de lumière régulière (lumière blanche).
- Lire les colonnes A à F (substrats fluorescents) en se servant de la source de lumière UV de la visionneuse pour panels. Un puits contenant un substrat fluorescent est considéré positif *seulement si* la fluorescence observée dans ce puits est *plus importante* que celle observée dans le puits de contrôle négatif (A4).

**Calcul du profil numérique BBL Crystal** : le résultat 4A qui est utilisé à titre de contrôle négatif pour la fluorescence est exclu du calcul. Chaque résultat de test interprété comme positif se voit attribuer une valeur de 4, 2 ou 1 en fonction du rang dans lequel le test était localisé. Chaque résultat de test interprété comme négatif se voit attribuer la valeur 0 (zéro). Les chiffres (valeurs) des tests positifs de chaque colonne sont additionnés. On obtient alors un nombre de 10 chiffres ; ce nombre est le profil numérique.

Exemple:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	*	+	-	-	+	+	+	-	+	-
2	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
1	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
Profil	1	6	3	2	5	6	4	3	7	0

\* (4A) = Contrôle négatif fluorescent

**A partir du menu offert, sélectionner la base de données BBL Crystal ANR appropriée. Le type de gélose primaire utilisée lors de la préparation de l'inoculum déterminera la base de données appropriée. Pour utilisation avec la gélose au sang pour Brucella ou la gélose au sang Columbia, sélectionner la base de données pour géloses au sang alternative dans le menu offert.**

Le profil numérique obtenu et les résultats des tests supplémentaires (coloration de Gram, test d'indole et de catalase) doivent être saisis sur un micro-ordinateur (PC) dans lequel le Livre électronique des codes pour les systèmes **BBL Crystal ID** a été installé. Un manuel des codes est également disponible. Si vous ne disposez pas d'un PC, contactez les services techniques de BD Diagnostics pour l'aide à l'identification.

**Contrôle de qualité réalisé par l'utilisateur** : les contrôles de qualité suivants sont recommandés pour chaque lot de panels –

- Ensemencer un panel avec la souche *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 selon les recommandations (voir "Mode opératoire du test").
- Avant d'incuber, laisser le panel à la température ambiante pendant 1 min (ne pas dépasser 2 min).
- Lire et enregistrer les réactions à l'aide de la visionneuse pour panels et de la grille d'interprétation des réactions colorées.
- Si un des puits est positif (à l'exception du puits 1F) selon la grille d'interprétation des réactions colorées (après 1 – 2 min), **NE PAS UTILISER LES PANELS** de ce lot. Contacter les services techniques de BD Diagnostics. (NOTA : le puits 1F [Escosyl] devrait être positif suite à la réhydratation.)
- Si tous les puits sont négatifs, incuber le panel pendant 4 h entre 35 – 37 °C.
- Lire le panel à l'aide de la visionneuse pour panels et de la grille d'interprétation des réactions colorées ; enregistrer les réactions en utilisant le formulaire de résultat.
- Comparer les réactions enregistrées avec celles données au tableau 4. En cas de résultats discordants, confirmer la pureté de la souche de contrôle de qualité avant de contacter les services techniques de BD Diagnostics.
- La porte de l'incubateur ne doit pas être ouverte de manière répétée durant la période d'incubation (de préférence moins de 3 fois).

Les résultats attendus pour chaque test effectué avec des souches supplémentaires de contrôle de qualité figurent au tableau 5.

#### LIMITES DE LA METHODE

Le système **BBL Crystal ANR ID** est conçu pour être utilisé avec des taxons prédéterminés. Les taxons autres que ceux énumérés dans le tableau 1 ne doivent pas être testés avec ce système.

Toutes les bases de données **BBL Crystal ANR ID** ont été développées en utilisant des milieux **BBL**. La réactivité de certains substrats dans des systèmes rapides d'identification peut dépendre du milieu de culture de base utilisé lors de la préparation de l'inoculum. Nous recommandons les milieux **BBL** énumérés ci-après pour utilisation avec le système **BBL Crystal ANR ID** : la gélose au sang pour anaérobies du CDC, la gélose Schaefer additionnée de vitamine K<sub>1</sub> et de 5 % de sang de mouton, la gélose Columbia avec 5 % de sang de mouton et la gélose au sang pour Brucella additionnée d'hémine et de vitamine K<sub>1</sub> (voir "Matériel disponible").

Les systèmes **BBL Crystal ID** font appel à un micro-environnement modifié ; c'est pourquoi les valeurs prévues pour les tests individuels peuvent différer des informations obtenues précédemment avec des tests conventionnels. L'exactitude du système **BBL Crystal ANR ID** repose sur l'analyse statistique de tests spécialement conçus et sur une base de données exclusive.

Bien que le système **BBL Crystal ANR ID** facilite la différenciation microbienne, il faut tenir compte que des souches d'une même espèce peuvent présenter des variations mineures. Un microbiologiste compétent doit utiliser les panels et interpréter les résultats. L'identification finale de l'isolat doit tenir compte de la provenance de l'échantillon, la tolérance de l'isolat à l'oxygène, la morphologie cellulaire, les caractéristiques des colonies sur divers milieux de culture ainsi que de l'identification des produits de dégradation par chromatographie gaz-liquide si nécessaire.

**Tableau 4**

**Tableau du contrôle de qualité pour le système BBL Crystal ANR ID\***

Position sur le panel	Substrat	Code	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285
4A	Contrôle négatif fluorescent	FCT	–
2A	L-arginine-AMC	FAR	V
1A	L-histidine-AMC	FHI	–
4B	4MU- $\alpha$ -D-mannoside	FAM	V <sup>1</sup>
2B	L-sérine-AMC	FSE	–
1B	L-isoleucine-AMC	FIS	–
4C	4MU- $\beta$ -D-mannoside	FBM	+
2C	Glycine-AMC	FGL	–
1C	L-alanine-AMC	FAL	V
4D	4MU-N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminide	FGA	+
2D	Acide L-pyroglytamique-AMC	FPY	V <sup>1,11</sup>
1D	L-lysine-AMC	FLY	V
4E	L-méthionine-AMC	FME	V
2E	4MU- $\beta$ -D-cellobiopyranoside	FCE	+
1E	4MU- $\beta$ -D-xyloside	FXY	V <sup>1</sup>
4F	L-phénylalanine-AMC	FPH	V
2F	L-leucine-AMC	FLE	+
1F	Escosyl	FSC	– <sup>3,4,10</sup>
4G	Disaccharide	DIS	+
2G	Furanose	FUR	+
1G	Pyranose	PYO	+ <sup>1</sup>
4H	p-n-p- $\alpha$ -D-galactoside	AGA	+
2H	p-n-p- $\beta$ -D-galactoside	NPG	+
1H	p-n-p-phosphate	PHO	+
4I	p-n-p- $\alpha$ -D-glucoside	AGL	+
2I	p-n-p-N-acétyl-glucosaminide	NAG	+
1I	L-proline-p-nitroanilide	PRO	–
4J	p-n-p- $\alpha$ -L-fucoside	AFU	+
2J	p-n-p- $\beta$ -D-glucoside	BGL	+
1J	L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide	ALA	+

1 = Négatif à partir de la gélose **BBL** Shaedler

2 = Positif à partir de la gélose **BBL** Shaedler

3 = Variable à partir de la gélose **BBL** Shaedler

4 = Négatif à partir de la gélose **BBL** Brucella

5 = Positif à partir de la gélose **BBL** Brucella

6 = Variable à partir de la gélose **BBL** Brucella

7 = Négatif à partir de la gélose **BBL** Columbia

8 = Positif à partir de la gélose **BBL** Columbia

9 = Variable à partir de la gélose **BBL** Columbia

**Tableau 5**

**Souches supplémentaires de contrôle de qualité pour le système BBL Crystal ANR ID**

Position sur le panel	Substrat	Code	<i>Bacteroides distasonis</i> ATCC 8503	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> ATCC 29743	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 27725
4A	Contrôle négatif fluorescent	FCT	–	–	–	–
2A	L-arginine-AMC	FAR	+	+	+	– <sup>4,10</sup>
1A	L-histidine-AMC	FHI	V	+	+ <sup>3</sup>	–
4B	4MU- $\alpha$ -D-mannoside	FAM	+	–	–	–
2B	L-sérine-AMC	FSE	–	–	+ <sup>3</sup>	–
1B	L-isoleucine-AMC	FIS	– <sup>4</sup>	–	+	–
4C	4MU- $\beta$ -D-mannoside	FBM	+ <sup>10</sup>	–	–	–
2C	Glycine-AMC	FGL	V <sup>1,12</sup>	V <sup>1</sup>	V <sup>2</sup>	–
1C	L-alanine-AMC	FAL	+	V <sup>1</sup>	+	–
4D	4MU-N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminide	FGA	+	–	–	–
2D	Acide L-pyroglytamique-AMC	FPY	V <sup>1,12</sup>	–	V <sup>11,24</sup>	+
1D	L-lysine-AMC	FLY	V <sup>2,12,15</sup>	+	+	–
4E	L-méthionine-AMC	FME	+	+ <sup>4,10</sup>	+	V
2E	4MU- $\beta$ -D-cellobiopyranoside	FCE	V <sup>12</sup>	–	+	–
1E	4MU- $\beta$ -D-xyloside	FXY	+ <sup>10</sup>	–	–	–
4F	L-phénylalanine-AMC	FPH	V <sup>12</sup>	V	+	–
2F	L-leucine-AMC	FLE	+	+ <sup>10</sup>	+	V
1F	Escosyl	FSC	V	V <sup>2,15</sup>	– <sup>3,4,10</sup>	V <sup>15</sup>

Position sur le panel	Substrat	Code	<i>Bacteroides distasonis</i> ATCC 8503	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> ATCC 29743	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 27725
4G	Disaccharide	DIS	+	–	+3,10,24	–
2G	Furanose	FUR	+	–	+	V
1G	Pyranose	PYO	+	–	+10	+
4H	p-n-p- $\alpha$ -D-galactoside	AGA	+	–	+3,4,10	–
2H	p-n-p- $\beta$ -D-galactoside	NPG	+	–	+3,4,10	–
1H	p-n-p-phosphate	PHO	+	–	–	–
4I	p-n-p- $\alpha$ -D-glucoside	AGL	+	–	V1	–
2I	p-n-p-N-acétyl-glucosaminide	NAG	+	–	V12,15	–
1I	L-proline-p-nitroanilide	PRO	–	–	V	–
4J	p-n-p- $\alpha$ -L-fucoside	AFU	–	–	–	–
2J	p-n-p- $\beta$ -D-glucoside	BGL	+	–	+	–
1J	L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide	ALA	+	–	V	–

\* Les résultats indiqués sont attendus lorsqu'une gélose **BBL CDC Anaerobe Blood** contenant 5 % de sang de mouton est utilisée.

Pour la préparation de la suspension de l'inoculum, n'utiliser que des écouvillons à embout de coton ou des bâtonnets applicateurs en bois ou des anses en plastique jetables, certains écouvillons en polyester pouvant rendre visqueuse la solution pour l'inoculum. Cette viscosité peut résulter en un volume insuffisant de solution pour remplir les puits. Les couvercles, une fois retirés de leur sachet scellé, doivent être utilisés dans un délai d'une heure afin de s'assurer d'une performance adéquate. Le couvercle doit rester dans sa poche en plastique jusqu'à son utilisation.

L'incubateur, où sont placés les panels, doit être en atmosphère humide afin de prévenir une évaporation de la solution de l'inoculum contenu dans les puits durant l'incubation. Le taux d'humidité recommandé se situe entre 40 – 60 %.

Les panels ensemencés doivent absolument être incubés **face vers le bas** (les fenêtres les plus larges étant placées face vers le haut, et l'étiquette, face vers le bas) afin de maximiser l'efficacité des substrats.

Les colonies doivent être prélevées à partir de géloses au sang **non sélectives** telles les géloses **BBL CDC Anaerobe, Brucella, Columbia et Schaedler** (voir "Matériel disponible").

Si le profil numérique **BBL Crystal** donne un résultat "Aucune identification" et que la pureté de la culture a été confirmée, il est alors probable que (i) l'isolat testé produit des **réactions BBL Crystal atypiques** (qui peuvent aussi être causées par des erreurs de procédure), (ii) l'espèce testée n'est pas incluse dans les taxons prédéterminés ou (iii) le système n'est pas capable d'identifier l'isolat testé avec le niveau de confiance requis. Des méthodes d'identification conventionnelles sont recommandées après qu'une erreur de l'utilisateur a été éliminée comme cause de ce résultat.

## CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

**Reproductibilité** : dans une étude externe impliquant quatre laboratoires cliniques, la reproductibilité des réactions des substrats (29) du système **BBL Crystal ANR ID** a été évaluée lors de tests répétés. La reproductibilité des réactions de chaque substrat se situait entre 96,2 et 100 %. La reproductibilité globale des panels **BBL Crystal ANR** a été déterminée comme étant 99,1 %.<sup>25</sup>

**Exactitude de l'identification** : la performance du système **BBL Crystal ANR ID** a été comparée à celle de systèmes d'identification actuellement disponibles sur le marché ainsi qu'à celle de méthodes d'identification conventionnelles de référence basées sur les recommandations du VA Wadsworth Laboratory à l'aide d'isolats cliniques et de cultures mères. Un total de cinq études ont été réalisées dans quatre laboratoires indépendants. Des isolats de routine parvenant au laboratoire clinique ainsi que des isolats préalablement identifiés (sélectionnés par les laboratoires participants) ont été utilisés pour établir les caractéristiques de performance.

Parmi les 633 isolats testés lors de cinq études, 588 (93 %) isolats ont été correctement identifiés (incluant les isolats ayant requis des tests supplémentaires) par le système **BBL Crystal ANR ID**. Un total de 36 (6 %) isolats ont été incorrectement identifiés et un message "Aucune identification" a été obtenu avec 9 (1 %) isolats.<sup>25</sup>

## MATÉRIEL DISPONIBLE

N° cat.	Description	N° cat.	Description
245010	Trousse <b>BBL Crystal ANR ID</b> , contenant 20 de chacun des éléments suivants : couvercles pour panels <b>BBL Crystal ANR ID</b> , bases <b>BBL Crystal</b> et tubes de solution <b>BBL Crystal ANR ID</b> pour l'inoculum.	245036	Tube d'éclairage à lumière blanche pour visionneuse pour panels <b>BBL Crystal</b> .
245038	Solution <b>BBL Crystal ANR</b> , GP, RGP, N/H ID pour l'inoculum, paquet de 10 tubes.	245011	Manuel des codes pour le système <b>BBL Crystal</b> d'identification des bactéries anaérobies.
245031	Visionneuse pour panels <b>BBL Crystal</b> modèle U.S.A., 110 V, 60 Hz.	221733	Gélose <b>BBL</b> au sang pour anaérobies du CDC avec 5 % de sang de mouton, coffret de 20 géloses.
245032	Visionneuse pour panels <b>BBL Crystal</b> modèle européen, 220 V, 50 Hz.	221734	Gélose <b>BBL</b> au sang pour anaérobies du CDC avec % de sang de mouton, coffret de 100 géloses.
245033	Visionneuse pour panels <b>BBL Crystal</b> modèle japonais, 100 V, 50/60 Hz.	221539	Gélose <b>BBL Schaedler</b> additionnée de vitamine K <sub>1</sub> et de 5 % de sang de mouton, coffret de 20 géloses.
245034	Tube d'éclairage UV à ondes longues pour visionneuse pour panels <b>BBL Crystal</b> .	221540	Gélose <b>BBL Schaedler</b> additionnée de vitamine K <sub>1</sub> et de 5 % de sang de mouton, coffret de 100 géloses.

221165	Gélose <b>BBL</b> Columbia avec 5 % de sang de mouton, coffret de 20 géloses.	297716	Gélose <b>BBL</b> au sang pour Brucelles additionnée d'hémine et de vitamine K <sub>1</sub> , coffret de 100 géloses.
221263	Gélose <b>BBL</b> Columbia avec 5 % de sang de mouton, coffret de 100 géloses.	261187	Compte-gouttes pour le réactif indole <b>BBL</b> DMACA, coffret de 50.
297848	Gélose <b>BBL</b> au sang pour Brucelles additionnée d'hémine et de vitamine K <sub>1</sub> , coffret de 20 géloses.	212539	Trousse de colorants de Gram <b>BBL</b> , coffret de 250 mL.

**BIBLIOGRAPHIE** : voir la rubrique "References" du texte anglais.

Service et assistance technique de BD Diagnostics : contacter votre représentant local de BD.

---



---

# **BD BBL Crystal Identifizierungssysteme**

## Testsystem zur Identifizierung von Anaerobiern

CLIA-KOMPLEXITÄT: HOCH  
 CDC-IDENTIFIZIERUNGSCODES  
 ANALYTE: 0412  
 TESTSYSTEM: 07561

Deutsch

### VERWENDUNGSZWECK

Das **BBL Crystal** Testsystem zur Identifizierung (ID) von Anaerobiern (ANR) ist eine miniaturisierte Identifizierungsmethode, die modifizierte konventionelle, fluorogene und chromogene Substrate verwendet. Es dient zur Identifizierung häufig isolierter anaerober Bakterien aus klinischen Proben.<sup>1-9</sup>

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Bereits im Jahr 1918 wurde über Mikromethoden zur biochemischen Identifizierung von Mikroorganismen berichtet.<sup>10</sup> Mehrere Veröffentlichungen berichteten über die Verwendung von reagenzien-impregnierten Papierplättchen und Mikroröhrchen zur Differenzierung von Enterobakterien.<sup>10-14</sup> Das Interesse an miniaturisierten Identifizierungssystemen führte zur Einführung mehrerer kommerzieller Systeme Ende der 60er Jahre; ihre Vorteile waren ihr geringer Platzbedarf, längere Haltbarkeit, standardisierte Qualitätskontrolle und einfache Handhabung.

Im allgemeinen sind viele der in den **BBL Crystal** ID-Systemen verwendeten Tests Modifizierungen klassischer Methoden. Darunter befinden sich Tests zum Nachweis von Gärung, Oxydation, Abbau und Hydrolyse verschiedener Substrate. Außerdem gibt es, wie im **BBL Crystal** ANR-ID-Panel, chromogen- und fluorogengebundene Substrate zum Nachweis von Enzymen, die von Mikroorganismen zur Metabolisierung verschiedener Substrate verwendet werden.<sup>12,15-22</sup>

Das **BBL Crystal** ANR-ID-Testsystem besteht aus (i) Deckeln für die **BBL Crystal** ANR-ID-Panels, (ii) **BBL Crystal** Untersätzen und (iii) Röhrchen mit **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H-ID-Inokulumsflüssigkeit (IF) für Anaerobier. Der Deckel enthält 29 dehydrierte Substrate und eine Fluoreszenzkontrolle auf den Spitzen von Plastikzapfen. Der Untersatz besitzt 30 Reaktionsvertiefungen. Das Test-Inokulum wird mit der Inokulumsflüssigkeit zubereitet und in alle 30 Vertiefungen des Untersatzes gefüllt. Wenn der Deckel mit dem Untersatz ausgerichtet und eingerastet wird, rehydriert das Test-Inokulum die getrockneten Substrate und leitet die Testreaktion ein.

Nach der Inkubationszeit werden die Vertiefungen auf Farbumschläge und Fluoreszenz untersucht, die durch metabolische Aktivität der Mikroorganismen entstehen. Das sich ergebende Muster der 29 Reaktionen wird in eine zehnziffrige Profilvernummer umgewandelt, die als Basis für die Identifizierung dient.<sup>23</sup> Biochemische und enzymatische Reaktionsmuster für die 29 **BBL Crystal** ANR-ID-Substrate für eine Vielzahl von Mikroorganismen sind in der **BBL Crystal** ANR-ID-Datenbank gespeichert. Die Identifizierung erfolgt durch eine Vergleichsanalyse vom Reaktionsmuster des Testisolats mit den in der Datenbank gespeicherten Reaktionsmustern. Eine vollständige Liste der Taxa, die in der derzeitigen Datenbank gespeichert sind, befindet sich in Tabelle 1.

### VERFAHRENSPRINZIP

Die **BBL Crystal** ANR-ID-Panels enthalten 29 getrocknete biochemische und enzymatische Substrate. Zur Rehydrierung der Substrate dient eine Bakteriensuspension in der Inokulumsflüssigkeit. Die im Identifizierungssystem verwendeten Tests basieren auf mikrobieller Nutzung und mikrobiellem Abbau spezifischer Substrate, die von verschiedenen Indikatorsystemen nachgewiesen werden. Enzymatische Hydrolyse von fluorogenen Substraten, die Cumarinderivate von 4-Methylumbelliferon (4MU) oder 7-Amino-4-Methylcumarin (7-AMC) enthalten, führen zu intensiverer Fluoreszenz, die visuell<sup>15-19</sup> leicht mit einer UV-Lampe nachgewiesen werden kann.<sup>19-21</sup> Bei Hydrolyse produzieren chromogene Substrate Farbumschläge, die visuell nachgewiesen werden können. Zusätzlich sind andere Tests vorhanden, die die Fähigkeit eines Organismus zur Hydrolyse, zum Abbau, zur Reduzierung oder zur anderen Nutzung eines Substrats im **BBL Crystal** ID-System.

Tabelle 2 enthält eine Beschreibung der von verschiedenen Substraten erzeugten Reaktionen sowie eine kurze Beschreibung der im System angewandten Prinzipien. "Panel-Position" in den genannten Tabellen gibt die Reihe und die Spalte der Vertiefung an (Beispiel: 1J bezieht sich auf Reihe 1 in Spalte J).

**Tabelle 1**  
**Im BBL Crystal ANR-ID-System gespeicherte Taxa**

<b>Gramnegative Bakterien</b>		
<b>Gallertolerant</b>	<b>Gallenempfindlich,</b>	<b>Nicht pigmentiert,</b>
<i>Bacteroides fragilis</i> Gruppe	<b>nicht pigmentiert</b>	<b>dellenbildend</b>
<i>B. caccae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>B. distasonis</i> Gruppe <sup>10</sup>	<i>P. bivia</i>	<i>B. ureolyticus</i>
<i>B. eggerthii</i>	<i>P. buccae</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>P. buccalis</i>	<i>C. gracilis</i>
<i>B. ovatus</i>	<i>P. disiens</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>B. stercoris</i>	<i>P. oralis</i>	<i>F. gonidiaformans</i> <sup>1,11</sup>
<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>P. oris</i>	<i>F. mortiferum</i>
<i>B. uniformis</i>	<i>P. veroralis</i> <sup>11</sup>	<i>F. necrophorum</i>
<i>B. vulgatus</i>	<b>Nicht pigmentiert, nicht</b>	<i>F. nucleatum</i>
<b>Anderer:</b>	<b>dellenbildend</b>	<i>F. russii</i>
<i>B. splanchnicus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>F. varium</i>
<i>Porphyromonas levii</i> <sup>11</sup>	<i>B. capillosus</i>	<i>Leptotrichia</i>
<b>Gallenempfindlich, pigmentiert</b>	<i>Tissierella</i>	<i>L. buccalis</i>
<i>Capnocytophaga</i> Spezies	<i>T. praeacuta</i>	
<b>Prevotella</b>	<b>Gallertolerant, nicht</b>	
<i>P. corporis</i>	<b>pigmentiert</b>	
<i>P. denticola</i>	<i>Bilophila</i>	
<i>P. intermedia</i>	<i>B. wadsworthia</i>	
<i>P. loescheii</i>	<i>Desulfomonas</i>	
<i>P. melaninogenica</i>	<i>D. pigra</i>	
<b>Porphyromonas</b>	<i>Desulfovibrio</i> Spezies	
<i>P. asaccharolytica</i>	<i>Campylobacter</i>	
<i>P. endodontalis</i>	<i>C. curvus/rectus</i>	
<i>P. gingivalis</i>		

Schlüssel: 1 = Taxon nur in **BBL Crystal**, **BBL** Schaedler-Datenbank.  
2 = Taxon nur in **BBL Crystal**, **BBL** Schaedler- und **BBL Crystal** alternativen Blutagar-Datenbanken.  
3 = Einschließlich *B. distasonis* und *B. merdae*.  
4 = Diese Taxa haben < 10 einzigartige **BBL Crystal** Profile in der aktuellen Datenbank.

<b>Clostridia</b>	<b>Nicht sporenbildende grampositive Bakterien</b>	<b>Grampositive Kokken</b>
<b>Clostridium</b>	<b>Actinomyces</b>	<b>Gemella</b>
<i>C. baratii</i>	<i>A. bovis</i>	<i>G. morbillorum</i>
<i>C. beijerinckii</i>	<i>A. israelii</i>	<b>Peptostreptococcus</b>
<i>C. bifermentans</i>	<i>A. meyeri</i>	<i>P. anaerobius</i>
<i>C. botulinum</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>P. asaccharolyticus</i>
<i>C. butyricum</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>P. indolicus</i>
<i>C. cadaveris</i>	<i>A. pyogenes</i>	<i>P. magnus</i>
<i>C. clostridioforme</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>P. micros</i>
<i>C. difficile</i>	<b>Atopobium</b>	<i>P. prevotii</i>
<i>C. glycolicum</i>	<i>A. minutum</i>	<i>P. tetradius</i>
<i>C. hastiforme</i>	<b>Bifidobacterium</b>	<b>Ruminococcus</b>
<i>C. histolyticum</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>R. productus</i> <sup>11</sup>
<i>C. innocuum</i>	<i>B. dentium</i>	<b>Staphylococcus</b>
<i>C. limosum</i>	<i>B.</i> Spezies	<i>S. saccharolyticus</i>
<i>C. novyi</i> A	<b>Eubacterium</b>	<b>Streptococcus</b>
<i>C. paraputrificum</i> <sup>11</sup>	<i>E. aerofaciens</i>	<i>S. constellatus</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>E. lentum</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>C. putrificum</i> <sup>1</sup>	<i>E. limosum</i>	<b>Gramnegative Kokken</b>
<i>C. ramosum</i>	<b>Mobiluncus</b>	<i>Veillonella</i> Spezies
<i>C. septicum</i>	<i>M. curtisii</i>	
<i>C. sordellii</i>	<i>M. mulieris</i>	
<i>C. sphenoides</i>	<i>M.</i> Spezies <sup>2,11</sup>	
<i>C. sporogenes</i>	<b>Propionibacterium</b>	
<i>C. subterminale</i>	<i>P. acnes</i>	
<i>C. tertium</i>	<i>P. avidum</i>	
<i>C. tetani</i> <sup>4</sup>	<i>P. granulosum</i> <sup>4</sup>	
	<i>P. propionicum</i>	
	<b>Lactobacillus</b>	
	<i>L. acidophilus</i>	
	<i>L. casei</i>	
	<i>L. catenaforme</i>	
	<i>L. fermentum</i>	
	<i>L. jensenii</i>	
	<i>L. johnsonii</i>	
	<i>L. rhamnosus</i>	

**Tabelle 2**  
**Im BBL Crystal ANR-ID-System angewandte Verfahrensprinzipien**

Panel-Position	Testsubstrat	Code	Prinzip (Literaturnachweis)
4A	Fluoreszierende negative Kontrolle	FCT	Kontrolle zur Standardisierung der fluoreszierenden Substratresultate.
2A	L-Arginin-AMC	FAR	Enzymatische Hydrolyse der Amid- oder Glykosidbindung setzt fluoreszierende Cumarinderivate frei. <sup>19-21</sup>
1A	L-Histidin-AMC	FHI	
4B	4MU- $\alpha$ -D-Mannosid	FAM	
2B	L-Serin-AMC	FSE	
1B	L-Isoleucin-AMC	FIS	
4C	4MU- $\beta$ -D-Mannosid	FBM	
2C	Glycin-AMC	FGL	
1C	L-Alanin-AMC	FAL	
4D	4MU-N-Azetyl- $\beta$ -D-Galaktosaminid	FGA	
2D	L-Pyroglytaminsäure-AMC	FPY	
1D	L-Lysin-AMC	FLY	
4E	L-Methionin-AMC	FME	
2E	4MU- $\beta$ -D-Cellobiopyranosid	FCE	
1E	4MU- $\beta$ -D-Xylosid	FXY	
4F	L-Phenylalanin-AMC	FPH	
2F	L-Leucin-AMC	FLE	
1F	Äskosyl	FSC	Hydrolyse der Glykosidbindung setzt nicht fluoreszierendes Äskuletin frei. <sup>22</sup>
4G	Disaccharid	DIS	Die Verwendung von Kohlenhydrat resultiert in niedrigerem pH-Wert und einem Indikatorschlag (Phenolrot). <sup>1,2,11,12</sup>
2G	Furanose	FUR	
1G	Pyranose	PYO	
4H	p-n-p- $\alpha$ -D-Galaktosid	AGA	Enzymatische Hydrolyse des farblosen arylsubstituierten Glykosids setzt gelbes p-Nitrophenol frei. <sup>15-19</sup>
2H	p-n-p- $\beta$ -D-Galaktosid	NPG	
1H	p-n-p-Phosphat	PHO	
4I	p-n-p- $\alpha$ -D-Glukosid	AGL	
2I	p-n-p-N-Azetyl-Glukosaminid	NAG	
1I	L-Prolin-p-Nitroanilid	PRO	Enzymatische Hydrolyse des farblosen Amidsubstrats setzt gelbes p-Nitroanilin frei. <sup>15-19</sup>
4J	p-n-p- $\alpha$ -L-Fukosid	AFU	Enzymatische Hydrolyse des farblosen arylsubstituierten Glykosids setzt gelbes p-Nitrophenol frei. <sup>15-19</sup>
2J	p-n-p- $\beta$ -D-Glukosid	BGL	
1J	L-Alanyl-L-Alanin-p-Nitroanilid	ALA	Enzymatische Hydrolyse des farblosen Amidsubstrats setzt gelbes p-Nitroanilin frei. <sup>15-19</sup>

## REAGENZIEN

Das **BBL Crystal ANR-ID-Panel** enthält 29 enzymatische und biochemische Substrate. Die reaktiven Bestandteile sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3**  
**Im BBL Crystal ANR ID-System verwendete Reagenzien**

Panel-Position	Substrat	Code	Pos.	Neg.	Reaktive Bestandteile	Ungef. Menge (g/L)
4A	Fluoreszierende negative Kontrolle	FCT	nicht zutreffend	nicht zutreffend	Fluoreszierendes Cumarinderivat	≤ 1
2A	L-Arginin-AMC	FAR	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	L-Arginin-AMC	≤ 1
1A	L-Histidin-AMC	FHI	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	L-Histidin-AMC	≤ 1
4B	4MU- $\alpha$ -D-Mannosid	FAM	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	4MU- $\alpha$ -D-Mannosid	≤ 1
2B	L-Serin-AMC	FSE	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	L-Serin-AMC	≤ 1
1B	L-Isoleucin-AMC	FIS	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	L-Isoleucin-AMC	≤ 1
4C	4MU- $\beta$ -D-Mannosid	FBM	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	4MU- $\beta$ -D-Mannosid	≤ 1
2C	Glycin-AMC	FGL	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	Glycin-AMC	≤ 1
1C	L-Alanin-AMC	FAL	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	L-Alanin-AMC	≤ 1
4D	4MU-N-Azetyl- $\beta$ -D-Galaktosaminid	FGA	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	4MU-N-Azetyl- $\beta$ -D-Galaktosaminid	≤ 1
2D	L-Pyroglytaminsäure-AMC	FPY	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	L-Pyroglytaminsäure-AMC	≤ 1

Panel-Position	Substrat	Code	Pos.	Neg.	Reaktive Bestandteile	Ungef. Menge (g/L)
1D	L-Lysin-AMC	FLY	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	L-Lysin-AMC	≤ 1
4E	L-Methionin-AMC	FME	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	L-Methionin-AMC	≤ 1
2E	4MU-β-D-Cellobiopyranosid	FCE	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	4MU-β-D-Cellobiopyranosid	≤ 1
1E	4MU-β-D-Xylosid	FXY	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	4MU-β-D-Xylosid	≤ 1
4F	L-Phenylalanin-AMC	FPH	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	L-Phenylalanin-AMC	≤ 1
2F	L-Leucin-AMC	FLE	blaue Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blaue Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	L-Leucin-AMC	≤ 1
1F	Äskosyl*	FSC	blau/grüne Fluoreszenz >FCT-Vertiefung	blau/grüne Fluoreszenz ≤ FCT-Vertiefung	Äskosyl	≤ 1
4G	Disaccharid	DIS	gold/gelb	orange/rot	Disaccharid	≤ 300
2G	Furanose	FUR	gold/gelb	orange/rot	Furanose	≤ 300
1G	Pyranose	PYO	gold/gelb	orange/rot	Pyranose	≤ 300
4H	p-n-p-α-D-Galaktosid	AGA	gelb	farblos	p-n-p-α-D-Galaktosid	≤ 7
2H	p-n-p-β-D-Galaktosid	NPG	gelb	farblos	p-n-p-β-D-Galaktosid	≤ 7
1H	p-n-p-Phosphat	PHO	gelb	farblos	p-n-p-Phosphat	≤ 7
4I	p-n-p-α-D-Glukosid	AGL	gelb	farblos	p-n-p-α-D-Glukosid	≤ 7
2I	p-n-p-N-Azetyl-Glukosaminid	NAG	gelb	farblos	p-n-p-N-Azetyl-Glukosaminid	≤ 7
1I	L-Prolin-p-Nitroanilid	PRO	gelb	farblos	L-Prolin-p-Nitroanilid	≤ 7
4J	p-n-p-α-L-Fukosid	AFU	gelb	farblos	p-n-p-α-L-Fukosid	≤ 7
2J	p-n-p-β-D-Glukosid	BGL	gelb	farblos	p-n-p-β-D-Glukosid	≤ 7
1J	L-Alanyl-L-Alanin-p-Nitroanilid	ALA	gelb	farblos	L-Alanyl-L-Alanin-p-Nitroanilid	≤ 7

\*Das Äskosylsubstrat ist in nicht hydrolysiertem Zustand fluoreszierend. Die Fluoreszenz nimmt bei Vorhandensein des Enzyms ab.

#### Sicherheitshinweise: In-Vitro-Diagnostik

Nach einer Prüfung seWitens der U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) und der U.S. Food and Drug Administration (FDA) gemäß CLIA '88 wurde dieses Produkt als ein Produkt hoher Komplexität identifiziert. Der CDC Analyte-Identifizierungscode (Analyte Identifier Code) ist 0412; der CDC Testsystem-Identifizierungscode (Test System Identifier Code) ist 07561.

Nach Verwendung müssen alle infektiösen Materialien einschließlich Platten, Wattetupfer, Inokulum-Röhrchen, für Indoltests verwendete Filterpapiere und Panels vor dem Verwerfen autoklaviert oder verascht werden.

#### AUFBEWAHRUNG UND HANDHABUNG/HALTBARKEIT

**Deckel:** Die Deckel sind individuell verpackt und müssen ungeöffnet bei 2 – 8 °C kühl aufbewahrt werden. NICHT EINFRIEREN. Die Packung visuell auf Löcher oder Risse der Folienverpackung überprüfen. Nicht verwenden, falls die Verpackung beschädigt ist. In der Originalpackung gemäß den Empfehlungen aufbewahrte Deckel bleiben bis zum Verfallsdatum reaktiv.

**Untersätze:** Die Untersätze sind in zwei Sätzen zu je zehn in **BBL Crystal** Inkubationsschalen verpackt. Die Untersätze sind mit dem Boden nach oben gestapelt, um Luftkontamination zu minimieren. Bis zur Durchführung des Tests in einer staubfreien Umgebung bei 2 – 25 °C aufbewahren. Die nicht verwendeten Untersätze in der Schale in einer Plastikhülle aufbewahren. Leere Schalen sind zum Inkubieren der Panels zu verwenden.

**Inokulaumsflüssigkeit:** **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H-ID-Inokulumsflüssigkeit (IF) ist in zwei Sätzen zu je zehn Röhrchen verpackt. Die Röhrchen visuell auf Sprünge, undichte Stellen, etc. untersuchen. Nicht verwenden, falls undichte Stellen, Beschädigung des Röhrchens oder der Kappe oder sichtbare Anzeichen von Kontamination (d.h. Schleier, Trübung) vorhanden sind. Die Röhrchen bei 2 – 25 °C aufbewahren. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des Röhrchens angegeben. Nur **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H-Inokulumsflüssigkeit sollte mit den **BBL Crystal** ANR-Panels verwendet werden.

**BBL Crystal** ANR-Kit nach Erhalt bei 2 – 8 °C aufbewahren. Nach dem Öffnen der Packung müssen nur die Deckel bei 2 – 8 °C aufbewahrt werden. Die übrigen Testkomponenten können bei 2 – 25 °C aufbewahrt werden. Werden das Kit oder dessen Bestandteile kühl aufbewahrt, dann müssen diese vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden.

#### PROBENTNAHME UND VERARBEITUNG

**BBL Crystal** ID-Systeme sind nicht zur direkten Verwendung mit klinischen Proben geeignet. Isolate müssen auf nicht-selektiven Blutagarmedien, wie z.B. CDC-Blutagar für Anaerobier, Brucella-Blutagar, Columbia-Blutagar oder Schaedler-Blutagar gewachsen sein. Das Testisolat muß für die meisten Arten eine höchstens 24 – 48 h alte Reinkultur sein. Für einige langsam wachsende Kokken (bis zu 72 h) und *Actinomyces*-Spezies (72 – 96 h) können auch ältere Kulturen verwendet werden. Zur Vorbereitung die Inokulumssuspension sollten ausschließlich Tupfer mit Baumwollspitze verwendet werden, da einige Polyester-Tupfer bei der Beimpfung der Panels Probleme verursachen können (s. "Verfahrensbeschränkungen"). Um exakte Ergebnisse zu erlangen, müssen die Deckel nach der Entnahme aus den verschlossenen Beuteln innerhalb 1 h verwendet werden. Der Plastikschutz sollte bis zur Verwendung auf dem Deckel bleiben.

Der verwendete Inkubator sollte feuchte Luft enthalten, um die Verdunstung von Flüssigkeit aus den Vertiefungen während der Inkubation zu vermeiden. Die empfohlene Luftfeuchtigkeit beträgt 40 – 60 %. Die Zweckdienlichkeit der **BBL Crystal** ID-Systeme oder jedes anderen diagnostischen Verfahrens, das auf klinische Proben angewendet wird, ist direkt von der Probenqualität selbst abhängig. Laboratorien wird nachdrücklich empfohlen, die im *Manual of Clinical Microbiology*

erörterten Methoden zur Probenentnahme, zum Transport und zur Beimpfung primärer Isolierungsmedien anzuwenden.<sup>1</sup> Empfehlenswert und für die Handhabung von anaeroben Proben relevant sind ebenfalls *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*<sup>9</sup> und *Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology*.<sup>3</sup>

## TESTVERFAHREN

**Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: BBL Crystal ANR-ID-Kit –**

20 Deckel für die **BBL Crystal** anaeroben ID-Panels,

20 **BBL Crystal** Untersätze,

20 Röhrgen mit **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H-ID-Inokulumflüssigkeit. Jedes Röhrgen enthält etwa  $2,3 \pm 0,15$  mL Inokulumflüssigkeit folgender Zusammensetzung: KCl 7,5 g, CaCl<sub>2</sub> 0,5 g, Tricin N-[2-Hydroxy-1, 1-bis (Hydroxymethyl)-Methyl] Glycin 0,895 g, destilliertes Wasser auf 1000 mL.

2 Inkubationsschalen,

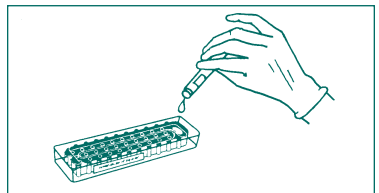
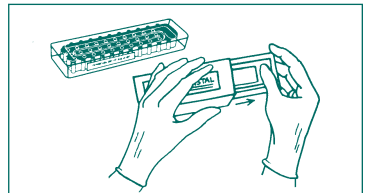
1 Berichtsbogen für das **BBL Crystal** ANR-System.

**Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** Sterile Baumwolltupfer (*keine Polyester tupfer verwenden*), Inkubator (35 – 37 °C), CO<sub>2</sub>-frei (40 – 60 % Luftfeuchtigkeit), McFarland Standard Nr. 4 und Nr. 5, **BBL Crystal** Panel-Betrachter, Elektronisches Codebuch für das **BBL Crystal** ID-System oder **BBL Crystal** ANR Manuelles Codebuch, Tropfpipetten für das **BBL** DMACA Indol-Reagenz, nicht-selektive Kulturplatte und Katalase-Reagenz.

Ferner werden die zur Vorbereitung, Lagerung und Verarbeitung der Blutproben verwendeten Geräte und Laborutensilien benötigt.

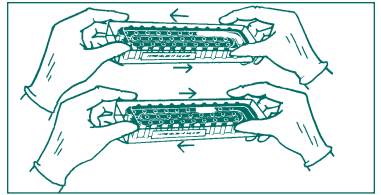
**Testverfahren:** Für das **BBL Crystal** ANR-ID-System werden die Ergebnisse von Gram-Färbungen, Katalase- und Indol-Tests benötigt. Vor dem Aufstellen des Panels sollten Katalase- und Indoltests durchgeführt werden. Indoltest gemäß den Anleitungen in der Packungsbeilage der Reagenzien durchführen. Für den Katalase-Test wird eine 15,0%ige Lösung von Wasserstoffperoxid mit beigefügtem 1,0%igem Tween 80 empfohlen.<sup>9,24</sup>

1. Deckel aus der Hülle nehmen. Trockenmittel verwerfen. Die geschützten Deckel sollten innerhalb einer 1 h Entnahme aus der Hülle verwendet werden. Panel nicht verwenden, wenn sich kein Trockenmittel in der Hülle befindet.
2. Ein Röhrgen mit Inokulumflüssigkeit mit der Nummer der Patientenprobe beschriften. Unter Anwendung aseptischer Arbeitsweise, mehrere morphologisch gleiche Kolonien mit der Spitze eines sterilen Baumwolltupfers (*keine Polyester- Tupfer verwenden*) oder einem hölzernen Applikatorstäbchen oder einer Einwegplastiköse von einem der empfohlenen Medien (siehe Abschnitt "Probenentnahme und Verarbeitung") entnehmen.
3. Kolonien in einem Röhrgen mit **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H-ID-Inokulumflüssigkeit suspendieren.
4. Röhrgen wieder verschließen und etwa 10 – 15 Sek. homogenisieren. Die Trübung sollte einem McFarland Standard Nr. 4 entsprechen (und einen McFarland Standard Nr. 5 nicht überschreiten). Falls die Inokulum-Konzentration während der Zubereitung den McFarland Standard überschreitet, wird eine der folgenden Maßnahmen empfohlen:
  - a. Mit einem frischen Röhrgen Inokulumflüssigkeit entsprechend dem McFarland Standard Nr. 4 ein neues Inokulum zubereiten.
  - b. Falls keine weiteren Kolonien für die Zubereitung eines neuen Inokulums zur Verfügung stehen, unter Anwendung aseptischer Arbeitsweise das Inokulum durch Zugabe des benötigten Mindestvolumens (höchstens 1,0 mL) von 0,85%iger steriler Salzlösung verdünnen, um die Trübung auf einen McFarland Nr. 4 entsprechenden Wert zu reduzieren. Die dem Röhrgen zugesetzte, zusätzliche Flüssigkeitsmenge mit einer sterilen Pipette entfernen, so daß das Endvolumen des Inokulums etwa dem Originalvolumen des Röhrgens ( $2,3 \pm 0,15$  mL) entspricht. Wird dieser Schritt unterlassen, fließt Inokulum über den schwarzen Teil des Untersatzes, wodurch das Panel unbrauchbar wird.
5. Einen Untersatz nehmen und die Nummer der Patientenprobe auf die Seitenwand schreiben.
6. Die gesamte Inokulumflüssigkeit in das dafür vorgesehene Reservoir des Untersatzes füllen.

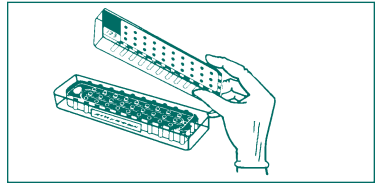




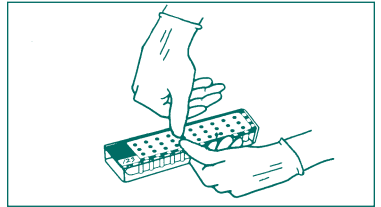
7. Untersatz mit beiden Händen halten und das Inokulum vorsichtig entlang der Laufspur fließen lassen, bis alle Vertiefungen gefüllt sind. Überschüssige Flüssigkeit *zurück* in das Reservoir fließen lassen und den Untersatz auf den Labortisch stellen. Aufgrund der hohen Zellkonzentrationen, die in den **BBL Crystal ANR-ID**-Panels verwendet werden, sollte das Inokulum langsam entlang der Laufspur fließen, damit auch alle Vertiefungen gefüllt werden. Sorgen Sie dafür, daß sich keine überschüssige Flüssigkeit zwischen den Vertiefungen befindet, bevor der Deckel ausgerichtet wird.



8. Den Deckel so ausrichten, daß sich die Etikettenseite des Deckels über dem Reservoir des Untersatzes befindet.

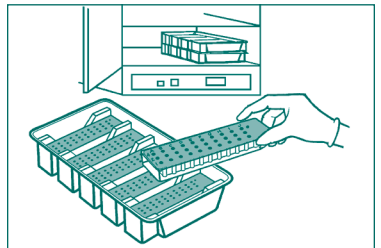


9. Niederdrücken, bis ein leichter Widerstand zu fühlen ist. Mit den Daumen auf beiden Seiten am Rand des Deckels etwa in der Panelmitte gleichzeitig niederdrücken, bis der Deckel einrastet (es sind zwei "Klicks" zu hören).



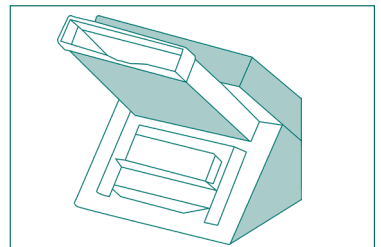
**Reinkultur:** Zur Durchführung einer Reinheitsprüfung entweder vor oder nach Beimpfen des Untersatzes mit einer sterilen Öse einen kleinen Tropfen vom Röhrchen mit dem Inokulum entnehmen und damit einen Schrägagar oder eine Agarplatte (jegliches nicht-selektive Medium) beimpfen. Das Röhrchen mit dem Inokulum einschließlich der Kappe in einen Behälter für biologisch gefährlichen Abfall werfen. Den Schrägagar oder die Agarplatte 24 – 48 h bei 35 – 37 °C unter anaeroben Bedingungen bebrüten. Die Agarplatte oder der Schrägagar können, falls erwünscht, ebenso für zusätzliche Tests oder für die Serologie verwendet werden.

**Inkubation:** Die beimpften Panels in Inkubationsschalen stellen. Zehn Panels passen in eine Schale (5 Reihen à 2 Panels). Alle Panels sollten **umgekehrt** (größere Fenster nach oben; Etikett nach unten) in einem CO<sub>2</sub>-freien Inkubator mit 40 – 60 % **Luftfeuchtigkeit** inkubiert werden. Zur Inkubation sollten nicht mehr als 2 Schalen aufeinander gestapelt werden. Die Inkubationszeit für Panels beträgt **4 h** bei 35 – 37 °C. **HINWEIS:** Der Inkubator sollte während der Inkubationszeit nicht wiederholt geöffnet werden (möglichst weniger als drei Mal).



**Ablesen:** Nach der empfohlenen Inkubationszeit die Panels aus dem Inkubator nehmen. Alle Panels sollten **umgekehrt** (größere Fenster nach oben; Etikett nach unten) mit Hilfe des **BBL Crystal Panel-Betrachters** abgelesen werden. Zur Interpretation der Reaktionen die Farbreaktionstabelle bzw. Tabelle 3 heranziehen und die Reaktionen auf dem **BBL Crystal ANR**- Berichtsbogen eintragen.

- Spalten G bis J zuerst mit der regulären (weißes Licht) Lampe ablesen.
- Spalten A bis F (fluoreszierende Substrate) mit der UV- Lampe im Panel-Betrachter ablesen. Eine Vertiefung mit fluoreszierendem Substrat gilt nur dann als positiv, wenn die Fluoreszenz in der Vertiefung stärker ist, als die in der Vertiefung mit der negativen Kontrolle (A4).



**Errechnen der BBL Crystal Profilnummer:** Jedem positiven Testergebnis (außer A4, der fluoreszierenden negativen Kontrolle) wird entsprechend der Reihe, in der sich der Test befindet, ein Wert von 4, 2 oder 1 zugeordnet. Jedes negative Ergebnis erhält einen Wert von 0 (Null). Die Zahlen (Werte) von jedem positiven Ergebnis in jeder Reihe werden dann addiert. Daraus ergibt sich eine zehnstellige Zahl: die Profilnummer.

Beispiel:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	*	+	-	-	+	+	+	-	+	-
2	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
1	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
<b>Profil</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>0</b>

\*(4A) = fluoreszierende negative Kontrolle

**Wählen Sie die entsprechende BBL Crystal ANR-Datenbank aus dem angebotenen Menü aus. Die Art der primären Platte, die zur Zubereitung des Inokulums verwendet wurde, bestimmt, welche die richtige Datenbank ist. Für die Verwendung mit Brucella- oder Columbia-Blutagarmedien sollte eine alternative Blutagar-Datenbank aus dem Menü ausgewählt werden.**

Um eine Identifizierung zu erhalten, müssen die entstandene Profilnummer und externe Testergebnisse (Gram-Färbung, Katalase und Indol) in einen Computer eingegeben werden, in dem das Elektronische Codebuch für das **BBL Crystal ID-System** installiert wurde. Ein manuelles Codebuch ist ebenfalls erhältlich. Falls kein Computer zur Verfügung steht, leistet der Technische Dienst von BD Diagnostics Hilfestellung bei der Identifizierung.

**Qualitätskontrolle durch den Anwender:** Folgende Qualitätskontrolle wird für jede Charge von Panels empfohlen:

- Gemäß empfohlenem Verfahren (s. "Testverfahren") ein Panel mit *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 beschicken.
- Vor der Inkubation das Panel 1 min (jedoch nicht mehr als 2 min) bei Raumtemperatur stehen lassen.
- Mit Hilfe des Panel-Betrachters und der Farbreaktionstabelle die Reaktionen ablesen und aufzeichnen.
- Falls laut Farbreaktionstabelle (nach 1 – 2 min) irgendwelche Vertiefungen, ausgenommen 1F, positiv sind, DAS PANEL dieser Charge NICHT VERWENDEN, sondern mit dem Technischen Dienst von BD Diagnostics in Verbindung treten. (HINWEIS: Vertiefung 1F [Äskosyl] sollte nach der Rehydratation positiv sein.)
- Wenn alle Vertiefungen negativ sind, das Panel 4 h bei 35 – 37 °C inkubieren.
- Panel mit dem Panel-Betrachter und der Farbreaktionstabelle ablesen; Reaktionen auf dem Berichtsbogen eintragen.
- Die aufgezeichneten Reaktionen mit den Reaktionen in Tabelle 4 vergleichen. Falls abweichende Resultate erzielt wurden, vor Kontaktaufnahme mit dem Technischen Dienst von BD Diagnostics die Reinheit des Qualitätskontrollstamms bestätigen.
- Der Inkubator sollte während der Inkubationszeit nicht wiederholt geöffnet werden (vorzugsweise weniger als 3 Mal). Erwartete Testergebnisse für zusätzliche Qualitätskontroll-Teststämme sind in Tabelle 5 aufgeführt.

#### VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Das **BBL Crystal ANR-ID-System** ist für die angegebenen Taxa vorgesehen. Mit diesem System sollten ausschließlich in Tabelle 1 aufgelistete Taxa verwendet werden.

Alle **BBL Crystal ANR-ID-Datenbanken** wurden mit **BBL Medien** entwickelt. Die Reaktivität einiger Substrate in Systemen zum Schnellnachweis kann vom Medium, welches ursprünglich bei der Zubereitung des Inokulums verwendet wurde, abhängen. Zur Verwendung mit dem **BBL Crystal ANR-ID-System** empfehlen wir die folgenden **BBL Medien**: CDC-Blutagar für Anaerobier, Schaedler-Ager mit Vitamin K<sub>1</sub> und 5 % Schafblut, Columbia-Agar mit 5 % Schafblut und Brucella-Agar mit Häm in und Vitamin K<sub>1</sub> (s. "Lieferbare Produkte").

**BBL Crystal** Identifizierungssysteme verwenden eine modifizierte Mikroumgebung; daher können die Erwartungswerte individueller Tests von zuvor mit konventionellen Testreaktionen nachgewiesenen Werten abweichen. Die Genauigkeit des **BBL Crystal ANR-ID-Systems** beruht auf der statistischen Verwendung speziell entworfener Tests und einer exklusiven Datenbank.

Auch wenn das **BBL Crystal ANR-ID-System** bei der Differenzierung von Mikroben hilfreich ist, sollte berücksichtigt werden, daß in Stämmen innerhalb der Spezies geringe Variationen auftreten können. Nur ein kompetenter Mikrobiologe sollte die Panels verwenden und die Ergebnisse interpretieren. Bei der entgültigen Identifizierung der Isolate sollten einige Faktoren in Betracht gezogen werden: die Herkunft der Probe, die Aerotoleranz, die Zellmorphologie, Kolonien-Charakteristika auf verschiedenen Medien sowie die durch Gas-Flüssigkeits-Chromatographie bestimmten metabolische Endprodukte.

Tabelle 4

Qualitätskontroll-Tabelle für das BBL Crystal ANR-ID-System\*

Panel-Position	Substrat	Code	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285
4A	Fluoreszierende negative Kontrolle	FCT	–
2A	L-Arginin-AMC	FAR	V
1A	L-Histidin-AMC	FHI	–
4B	4MU- $\alpha$ -D-Mannosid	FAM	V <sup>1</sup>
2B	L-Serin-AMC	FSE	–
1B	L-Isoleucin-AMC	FIS	–
4C	4MU- $\beta$ -D-Mannosid	FBM	+
2C	Glycin-AMC	FGL	–
1C	L-Alanin-AMC	FAL	V
4D	4MU-N-Azetyl- $\beta$ -D-Galaktosaminid	FGA	+
2D	L-Pyroglytaminsäure-AMC	FPY	V <sup>1,11</sup>
1D	L-Lysin-AMC	FLY	V
4E	L-Methionin-AMC	FME	V
2E	4MU- $\beta$ -D-Cellobiopyranosid	FCE	+
1E	4MU- $\beta$ -D-Xylosid	FXY	V <sup>1</sup>
4F	L-Phenylalanin-AMC	FPH	V
2F	L-Leucin-AMC	FLE	–
1F	Äskosyl	FSC	– <sup>3,4,10</sup>
4G	Disacch Disaccharid aride	DIS	+
2G	Furanose	FUR	+
1G	Pyranose	PYO	+ <sup>1</sup>
4H	p-n-p- $\alpha$ -D-Galaktosid	AGA	+
2H	p-n-p- $\beta$ -D-Galaktosid	NPG	+
1H	p-n-p-Phosphat	PHO	+
4I	p-n-p- $\alpha$ -D-Glukosid	AGL	+
2I	p-n-p-N-Azetyl-Glukosaminid	NAG	+
1I	L-Prolin-p-Nitroanilid	PRO	–
4J	p-n-p- $\alpha$ -L-Fukosid	AFU	+
2J	p-n-p- $\beta$ -D-Glukosid	BGL	+
1J	L-Alanyl-L-Alanin-p-Nitroanilid	ALA	+

1 = negativ auf **BBL** Schaedler4 = negativ auf **BBL** Brucella7 = negativ auf **BBL** Columbia2 = positiv auf **BBL** Schaedler5 = positiv auf **BBL** Brucella8 = positiv auf **BBL** Columbia3 = variabel auf **BBL** Schaedler6 = variabel auf **BBL** Brucella9 = variabel auf **BBL** Columbia

Tabelle 5

Zusätzliche Qualitätskontroll-Stämme für das BBL Crystal ANR-ID-System

Panel-Position	Substrat	Code	<i>Bacteroides distasonis</i> ATCC 8503	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> ATCC 29743	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 27725
4A	Fluoreszierende negative Kontrolle	FCT	–	–	–	–
2A	L-Arginin-AMC	FAR	+	+	+	– <sup>4,10</sup>
1A	L-Histidin-AMC	FHI	V	+	+ <sup>3</sup>	–
4B	4MU- $\alpha$ -D-Mannosid	FAM	+	–	–	–
2B	L-Serin-AMC	FSE	–	–	+ <sup>3</sup>	–
1B	L-Isoleucin-AMC	FIS	– <sup>4</sup>	–	+	–
4C	4MU- $\beta$ -D-Mannosid	FBM	+ <sup>10</sup>	–	–	–
2C	Glycin-AMC	FGL	V <sup>1,12</sup>	V <sup>1</sup>	V <sup>2</sup>	–
1C	L-Alanin-AMC	FAL	+	V <sup>1</sup>	+	–
4D	4MU-N-acetyl- $\beta$ -D-4MU-N-Azetyl- $\beta$ -D-Galaktosaminid	FGA	+	–	–	–
2D	L-Pyroglytaminsäure-AMC	FPY	V <sup>1,12</sup>	–	V <sup>11,24</sup>	+
1D	L-Lysin-AMC	FLY	V <sup>2,12,15</sup>	+	+	–
4E	L-Methionin-AMC	FME	+	+ <sup>4,10</sup>	+	V
2E	4MU- $\beta$ -D-Cellobiopyranosid	FCE	V <sup>12</sup>	–	+	–
1E	4MU- $\beta$ -D-Xylosid	FXY	+ <sup>10</sup>	–	–	–
4F	L-Phenylalanin-AMC	FPH	V <sup>12</sup>	V	+	–
2F	L-Leucin-AMC	FLE	+	+ <sup>10</sup>	+	V
1F	Äskosyl	FSC	V	V <sup>2,15</sup>	– <sup>3,4,10</sup>	V <sup>15</sup>
4G	Disaccharid	DIS	+	–	+ <sup>3,10,24</sup>	–
2G	Furanose	FUR	+	–	+	V
1G	Pyranose	PYO	+	–	+ <sup>10</sup>	+
4H	p-n-p- $\alpha$ -D-Galaktosid	AGA	+	–	+ <sup>3,4,10</sup>	–
2H	p-n-p- $\beta$ -D-Galaktosid	NPG	+	–	+ <sup>3,4,10</sup>	–
1H	p-n-p-Phosphat	PHO	+	–	–	–
4I	p-n-p- $\alpha$ -D-Glukosid	AGL	+	–	V <sup>1</sup>	–

Panel-Position	Substrat	Code	<i>Bacteroides distasonis</i> ATCC 8503	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> ATCC 29743	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 27725
2I	p-n-p-N-Azetyl- Glukosaminid	NAG	+	–	√ <sup>12,15</sup>	–
1I	L-Prolin-p-Nitroanilid	PRO	–	–	√	–
4J	p-n-p-α-L-Fukosid	AFU	–	–	–	–
2J	p-n-p-β-D-Glukosid	BGL	+	–	+	–
1J	L-Alanyl-L-Alanin-p-Nitroanilid	ALA	+	–	√	–

\* Die angeführten Resultate sind bei Verwendung des BBL CDC-Agars für Anaerobier mit 5 % Schafblut zu erwarten.

Zur Vorbereitung der Inokulumssuspension sollten ausschließlich Tupfer mit Baumwollspitze oder hölzerne Applikator- stäbchen oder eine Einwegplastiköse verwendet werden, da einige Polyestertupfer die Inokulumssäure zähflüssig machen können. Dies wiederum kann dazu führen, daß nicht genügend Inokulum vorhanden ist, um die Vertiefungen zu füllen. Um exakte Ergebnisse zu erlangen, müssen die Deckel nach der Entnahme aus den verschlossenen Beuteln innerhalb 1 h verwendet werden. Der Plastikschutz sollte bis zur Verwendung auf dem Deckel bleiben.

Der verwendete Inkubator, in den die Panels gesetzt werden, sollte feuchte Luft enthalten, um die Verdunstung von Inokulum- flüssigkeit aus den Vertiefungen während der Inkubation zu vermeiden. Die empfohlene Luftfeuchtigkeit beträgt 40 – 60 %.

Die Panels sollten nach der Beimpfung nur **umgekehrt** inkubiert werden (die größeren Fenster nach oben; das Etikett nach unten zeigend) um die Wirksamkeit der Substrate zu maximieren.

Kolonien sollten auf **nicht-selektiven** Blutagarplatten wie z.B. **BBL CDC** für Anaerobier, *Brucella*, *Columbia* und *Schaedler* gewachsen sein (s. "Lieferbare Produkte").

Wenn das **BBL Crystal** Testprofil das Ergebnis "Keine Identifizierung" liefert und die Reinheit der Kultur bestätigt wurde, dann besteht die Wahrscheinlichkeit, daß (i) das Testisolat *atypische BBL Crystal Reaktionen* erzeugt (deren Ursache auch falsche Verfahrensweisen sein können), (ii) die Test-Spezies nicht Teil der festgelegten Taxa ist oder (iii) daß das Testsystem das Testisolat nicht mit der erforderlichen Verlässlichkeit identifizieren kann. Wenn Fehler seitens des Anwenders ausgeschlossen wurden, wird die Verwendung von konventionellen Methoden empfohlen.

## LEISTUNGSMERKMALE

**Reproduzierbarkeit:** In einer externen Studie an 4 klinischen Labors (insgesamt fünf Bewertungen) wurde die Reproduzierbarkeit der Reaktionen der **BBL Crystal** ANR-ID-Substrate (29) in Wiederholungstests untersucht. Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Substrate betrug zwischen 96,2 und 100 %. Insgesamt lag die Reproduzierbarkeit des **BBL Crystal** ANR-Panels bei 99,1 %.<sup>25</sup>

**Genauigkeit der Identifizierung:** Die Leistung des **BBL Crystal** ANR-ID-Systems wurde mit derzeit im Handel erhältlichen Systemen verglichen sowie mit herkömmlichen Referenzidentifizierungsmethoden, die sich auf die Empfehlungen von VA Wadsworth Laboratory stützen, verglichen unter *Verwendung klinischer Isolate und Stammkulturen*. Insgesamt wurden fünf Studien an vier unabhängigen Laboratorien durchgeführt. Zur Erstellung der Leistungsmerkmale wurden sowohl frische, im klinischen Labor routinemäßig ankommende Isolate als auch zuvor identifizierte, von dem Testlabor ausgewählte Isolate verwendet.

Von den 633 Isolaten, die in den fünf Studien untersucht wurden, lieferte das **BBL Crystal** ANR-Identifizierungssystem 588 (93 %) richtige Ergebnisse (einschließlich Isolate, die zusätzliche Tests benötigten). 36 (6 %) der Isolate wurden nicht richtig identifiziert, und bei 9 (1 %) der Isolate erschien die Meldung "Keine Identifizierung".<sup>25</sup>

## LIEFERBARE PRODUKTE

Best.-Nr.	Beschreibung	Best.-Nr.	Beschreibung
245010	<b>BBL Crystal</b> Testsystem zur Identifizierung von Anaerobiern, mit je 20: <b>BBL Crystal</b> Dekkeln für die ANR-ID-Panels, <b>BBL Crystal</b> Untersätzen und Röhren mit <b>BBL Crystal</b> ID-Inokulumssäure für Anaerobier.	221733	<b>BBL CDC</b> -Blutagar für Anaerobier mit 5 % Schafblut, Packung mit 20 Platten.
245038	<b>BBL Crystal</b> ANR, GP, RGP, N/H-ID-Inokulumssäure, Karton mit 10.	221734	<b>BBL CDC</b> -Blutagar für Anaerobier mit 5 % Schafblut, Karton mit 100 Platten.
245031	<b>BBL Crystal</b> Panel-Betrachter, USA-Modell, 110 V, 60 Hz.	221539	<b>BBL</b> <i>Schaedler</i> -Agar mit Vitamin K <sub>1</sub> und 5 % Schafblut, Packung mit 20.
245032	<b>BBL Crystal</b> Panel-Betrachter, Europäisches Modell, 220 V, 50 Hz.	221540	<b>BBL</b> <i>Schaedler</i> -Agar mit Vitamin K <sub>1</sub> und 5 % Schafblut, Karton mit 100.
245033	<b>BBL Crystal</b> Panel-Betrachter, Japanisches Modell, 100 V, 50/60 Hz.	221165	<b>BBL</b> <i>Columbia</i> -Agar mit 5 % Schafblut, Packung mit 20.
245034	Langwellen-UV-Leuchtröhre für den <b>BBL Crystal</b> Panel-Betrachter.	221263	<b>BBL</b> <i>Columbia</i> -Agar mit 5 % Schafblut, Karton mit 100.
245036	Weißlicht-Leuchtröhre für den <b>BBL Crystal</b> Panel-Betrachter.	297848	<b>BBL</b> <i>Brucella</i> -Blutagar mit Häm in und Vitamin K <sub>1</sub> , Packung mit 20.
245011	Manuelles Codebuch für <b>BBL Crystal</b> Identifizierungssysteme von Anaerobiern.	297716	<b>BBL</b> <i>Brucella</i> -Blutagar mit Häm in und Vitamin K <sub>1</sub> , Karton mit 100.
		261187	Tropfpipetten für das <b>BBL</b> DMACA-Indol-Reagenz, Karton mit 50.
		212539	<b>BBL</b> Gram-Färbungs-Kit, Packung mit 4 x 250-ml Flaschen.

**LITERATURNACHWEIS:** S. "References" im englischen Text.

BD Diagnostics Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung.

---

---

 **BD Sistemi d'identificazione BBL Crystal**  
**Kit per l'identificazione degli anaerobi**

Italiano

**USO PREVISTO**

Il sistema **BBL Crystal** d'identificazione (ID) degli anaerobi (ANR) è un metodo d'identificazione miniaturizzato che utilizza substrati convenzionali fluorogenici e cromogenici modificati. Il suo uso è previsto per l'identificazione di batteri anaerobi frequentemente isolati da campioni clinici.<sup>1-9</sup>

**SOMMARIO E SPIEGAZIONI**

I micrometodi per l'identificazione biochimica di microrganismi risalgono al 1918.<sup>10</sup> Molte pubblicazioni hanno fatto riferimento all'uso dei metodi dei dischi di carta impregnati di reagenti e della micro-provetta per la differenziazione degli enterobatteri.<sup>10-14</sup> L'interesse per i sistemi d'identificazione miniaturizzati ha portato all'introduzione di diversi sistemi per uso commerciale verso la fine degli anni sessanta. Essi si dimostrarono invero estremamente convenienti grazie al limitato spazio richiesto per l'immagazzinaggio e la lunga durata di conservazione, nonché per la standardizzazione del controllo di qualità ed il loro facile impiego.

In genere, molti dei test impiegati dai sistemi **BBL Crystal** ID non sono altro che modifiche di sistemi classici, e comprendono test di fermentazione, ossidazione, degradazione ed idrolisi di vari substrati. In aggiunta a ciò, il collegamento di alcuni substrati a cromogeni e fluorogeni, come nel caso del pannello **BBL Crystal** ANR ID, consente la rivelazione di enzimi utilizzati dai microbi per la metabolizzazione di vari substrati.<sup>12,15-22</sup>

Il kit **BBL Crystal** ANR ID comprende (i) coperchi per pannelli **BBL Crystal** ANR ID (ii) basi **BBL Crystal** e (iii) provette **BBL Crystal** ANR, GP, RPG, N/H ID di fluido d'inoculo (FI). Il coperchio contiene 29 substrati disidratati ed un controllo di fluorescenza posti sulle estremità di denti di plastica. La base è dotata di 30 pozzetti di reazione. L'inoculo del test viene preparato con il fluido d'inoculo e viene impiegato per il riempimento di tutti e 30 i pozzetti. Quando il coperchio è allineato alla base e scatta in posizione, l'inoculo del test reidrata i substrati dando inizio alle reazioni per il test.

In seguito ad un periodo di incubazione, i pozzetti vengono esaminati per rilevare eventuali cambiamenti di colore o presenza di fluorescenza, che sono indice di attività metaboliche dei microrganismi. Lo schema risultante dalle 29 reazioni viene poi convertito in un numero di profilo a dieci cifre, che costituisce la base sulla quale poter procedere poi all'identificazione.<sup>23</sup> Gli schemi delle reazioni biochimiche ed enzimatiche per i 29 substrati del sistema **BBL Crystal** ANR ID per un'ampia varietà di microrganismi sono memorizzati nella banca dati **BBL Crystal** ANR ID. L'identificazione deriva appunto dall'analisi comparativa del pattern di reazioni dell'isolato testato con quelle contenute nella banca dati. Si fornisce un elenco completo di unità tassonomiche comprendente la banca dati attuale nella Tabella 1.

**PRINCIPI DELLA PROCEDURA**

I pannelli **BBL Crystal** ANR ID contengono 29 substrati biochimici ed enzimatici disidratati. Per la reidratazione dei substrati viene utilizzata la sospensione batterica nel fluido d'inoculo. I test utilizzati dal sistema si basano sull'utilizzazione e la degradazione microbica di substrati specifici rivelati da vari sistemi indicatori. L'idrolisi enzimatica di substrati fluorogenici contenenti derivati di cumarina di 4-metil-umbelliferone (4MU) o 7-ammino-4-metilcumarina (7-AMC), dà luogo ad uno sviluppo di fluorescenza facilmente visibile ad occhio nudo<sup>15-19</sup> con una lampada a UV.<sup>19-21</sup> I substrati cromogenici sottoposti ad idrolisi producono cambiamenti di colore visibili ad occhio nudo. Inoltre, vi sono altri test che rivelano la capacità di un organismo di idrolizzare, degradare, ridurre o utilizzare in altro modo un substrato del sistema **BBL Crystal** ID.

Le reazioni impiegate da vari substrati ed una breve spiegazione dei principi utilizzati dal sistema di identificazione sono descritte alla Tabella 2. La posizione del pannello sulle tabelle riportate indica la fila e la colonna in cui si trova il pozzetto (ad esempio: 1J si riferisce alla fila 1 nella colonna J).

**Tabella 1**

**Unità tassonomiche nel sistema BBL Crystal ANR ID**

<b>Bacilli gram-negativi</b>		
<b>Tolleranti alla bile</b>	<b>Sensibili alla bile, non pigmentati</b>	<b>Non pigmentati, deprimitabili</b>
<i>Bacteroides fragilis</i> Gruppo	<i>Prevotella</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>B. caccae</i>	<i>P. bivia</i>	<i>B. ureolyticus</i>
Gruppo <i>B. distasonis</i> <sup>10</sup>	<i>P. buccae</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>B. eggerthii</i>	<i>P. buccalis</i>	<i>C. gracilis</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>P. disiens</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>B. ovatus</i>	<i>P. oralis</i>	<i>F. gonidiaformans</i> <sup>1-11</sup>
<i>B. stercoris</i>	<i>P. oris</i>	<i>F. mortiferum</i>
<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>P. veroralis</i> <sup>11</sup>	<i>F. necrophorum</i>
<i>B. uniformis</i>	<b>Non pigmentati, non deprimitabili</b>	<i>F. nucleatum</i>
<i>B. vulgatus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>F. russii</i>
<b>Altri:</b>	<i>B. capillosus</i>	<i>F. varium</i>
<i>B. splanchnicus</i>	<i>Tissierella</i>	<i>Leptotrichia</i>
<i>Porphyromonas levii</i> <sup>11</sup>	<i>T. praeacuta</i>	<i>L. buccalis</i>
<b>Sensibili alla bile, pigmentati</b>	<b>Tolleranti alla bile, non pigmentati</b>	
Specie <i>Capnocytophaga</i>	<i>Bilophila</i>	
<b>Prevotella</b>	<i>B. wadsworthia</i>	
<i>P. corporis</i>	<i>Desulfomonas</i>	
<i>P. denticola</i>	<i>D. pigra</i>	
<i>P. intermedia</i>	Specie <i>Desulfovibrio</i>	
<i>P. loescheii</i>	<i>Campylobacter</i>	
<i>P. melaninogenica</i>	<i>C. curvus/rectus</i>	
<b>Porphyromonas</b>		
<i>P. asaccharolytica</i>		
<i>P. endodontalis</i>		
<i>P. gingivalis</i>		

Chiave: 1 = Gruppo tassonomico solamente nella banca dati **BBL Crystal**, **BBL** Schaedler.

2 = Gruppo tassonomico solamente nella banca dati alternativa per agar sangue **BBL Crystal**, **BBL** Schaedler e **BBL Crystal**.

3 = Comprende *B. distasonis* e *B. merdae*.

4 = Questi gruppi tassonomici hanno <10 profili **BBL Crystal** di carattere unico, nella banca dati attuale.

<b>Clostridia</b>	<b>Nicht sporenbildende grampositive Bakterien</b>	<b>Grampositive Kokken</b>
<b>Clostridium</b>	<b>Actinomyces</b>	<b>Gemella</b>
<i>C. baratii</i>	<i>A. bovis</i>	<i>G. morbillorum</i>
<i>C. beijerinckii</i>	<i>A. israelii</i>	<b>Peptostreptococcus</b>
<i>C. bifermentans</i>	<i>A. meyeri</i>	<i>P. anaerobius</i>
<i>C. botulinum</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>P. asaccharolyticus</i>
<i>C. butyricum</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>P. indolicus</i>
<i>C. cadaveris</i>	<i>A. pyogenes</i>	<i>P. magnus</i>
<i>C. clostridioforme</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>P. micros</i>
<i>C. difficile</i>	<b>Atopobium</b>	<i>P. prevotii</i>
<i>C. glycolicum</i>	<i>A. minutum</i>	<i>P. tetradius</i>
<i>C. hastiforme</i>	<b>Bifidobacterium</b>	<b>Ruminococcus</b>
<i>C. histolyticum</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>R. productus</i> <sup>11</sup>
<i>C. innocuum</i>	<i>B. dentium</i>	<b>Staphylococcus</b>
<i>C. limosum</i>	<i>B. Spezies</i>	<i>S. saccharolyticus</i>
<i>C. novyi A</i>	<b>Eubacterium</b>	<b>Streptococcus</b>
<i>C. paraputrificum</i> <sup>11</sup>	<i>E. aerofaciens</i>	<i>S. constellatus</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>E. lentum</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>C. putrificum</i> <sup>1</sup>	<i>E. limosum</i>	<b>Cocchi gram-negativi</b>
<i>C. ramosum</i>	<b>Mobiluncus</b>	Specie <i>Veillonella</i>
<i>C. septicum</i>	<i>M. curtisii</i>	
<i>C. sordellii</i>	<i>M. mulieris</i>	
<i>C. sphenoides</i>	<i>M. species</i> <sup>2,11</sup>	
<i>C. sporogenes</i>	<b>Propionibacterium</b>	
<i>C. subterminale</i>	<i>P. acnes</i>	
<i>C. tertium</i>	<i>P. avidum</i>	
<i>C. tetani</i> <sup>4</sup>	<i>P. granulorum</i> <sup>4</sup>	
	<i>P. propionicum</i>	
	<b>Lactobacillus</b>	
	<i>L. acidophilus</i>	
	<i>L. casei</i>	
	<i>L. catenaforme</i>	
	<i>L. fermentum</i>	
	<i>L. jensenii</i>	
	<i>L. johnsonii</i>	
	<i>L. rhamnosus</i>	

**Tabella 2**
**Principi dei test utilizzati dal sistema BBL Crystal ANR ID**

Posizione nel pannello	Caratteristica del test	Codice	Principio(riferimento)
4A	Controllo negativo di fluorescenza	FCT	Controllo per standardizzare i risultati del substrato fluorescente.
2A	L-arginina-AMC	FAR	L'idrolisi enzimatica del legame ammidico o glicosidico risulta nel rilascio di un derivato fluorescente della cumarina. <sup>19-21</sup>
1A	L-istidina-AMC	FHI	
4B	4MU- $\alpha$ -D-mannoside	FAM	
2B	L-serina-AMC	FSE	
1B	L-isoleucina-AMC	FIS	
4C	4MU- $\beta$ -D-mannoside	FBM	
2C	Glicina-AMC	FGL	
1C	L-alanina-AMC	FAL	
4D	4MU-N-acetil- $\beta$ -D-galattosaminide	FGA	
2D	L-acido piroglutamico-AMC	FPY	
1D	L-lisina-AMC	FLY	
4E	L-metionina-AMC	FME	
2E	4MU- $\beta$ -D-cellobiopiranoside	FCE	
1E	4MU- $\beta$ -D-xiloside	FXY	
4F	L-fenilalanina-AMC	FPH	
2F	L-leucina-AMC	FLE	
1F	Escosil	FSC	L'idrolisi del legame glicosidico risulta nel rilascio di esculetina non fluorescente. <sup>22</sup>
4G	Disaccaride	DIS	L'utilizzazione del carboidrato risulta in un pH inferiore ed in un cambiamento dell'indicatore (rosso di fenolo). <sup>1,2,11,12</sup>
2G	Furanosio	FUR	
1G	Piranosio	PYO	
4H	p-n-p- $\alpha$ -D-galattoside	AGA	L'idrolisi enzimatica del glicoside incolore sostituito dall'arile rilascia p-nitrofenolo di colore giallo. <sup>15-19</sup>
2H	p-n-p- $\beta$ -D-galattoside	NPG	
1H	p-n-p-fosfato	PHO	
4I	p-n-p- $\alpha$ -D-glicoside	AGL	
2I	p-n-p-N-acetil-glucosaminide	NAG	
1I	L-prolina-p-nitroanilide	PRO	L'idrolisi enzimatica del substrato ammidico incolore rilascia p-nitroanilina di colore giallo. <sup>15-19</sup>
4J	p-n-p- $\alpha$ -L-fucoside	AFU	L'idrolisi enzimatica del glicoside incolore sostituito dall'arile rilascia p-nitrofenolo di colore giallo. <sup>15-19</sup>
2J	p-n-p- $\beta$ -D-glicoside	BGL	
1J	L-alanile-L-alanina-p-nitroanilide	ALA	L'idrolisi enzimatica del substrato ammidico incolore rilascia p-nitroanilina di colore giallo. <sup>15-19</sup>

## REAGENTI

Il pannello **BBL Crystal ANR ID** contiene 29 substrati enzimatici e biochimici. Far riferimento alla Tabella qui sotto per l'elenco degli ingredienti attivi.

**Tabella 3**

### Reagenti utilizzati nel sistema BBL Crystal ANR ID

Posizione nel pannello	Substrato	Codice	Pos.	Neg.	Ingredienti attivi	Quantità approssimativa (g/L)
4A	Controllo negativo fluorescente	FCT	n/a	n/a	Derivato di cumarina fluorescente	≤ 1
2A	L-arginina-AMC	FAR	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	L-arginina-AMC	≤ 1
1A	L-istidina-AMC	FHI	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	L-istidina-AMC	≤ 1
4B	4MU-α-D-mannoside	FAM	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	4MU-α-D-mannoside	≤ 1
2B	L-serina-AMC	FSE	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	L-serina-AMC	≤ 1
1B	L-isoleucina-AMC	FIS	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	L-isoleucina-AMC	≤ 1
4C	4MU-β-D-mannoside	FBM	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	4MU-β-D-mannoside	≤ 1
2C	Glicina-AMC	FGL	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	Glicina-AMC	≤ 1
1C	L-alanina-AMC	FAL	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	L-alanina-AMC	≤ 1
4D	4MU-N-acetil-β-D-galattosaminide	FGA	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	4MU-N-acetil-β-D-galattosaminide	≤ 1
2D	L-acido piroglutamico-AMC	FPY	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	L-acido piroglutamico-AMC	≤ 1
1D	L-isina-AMC	FLY	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	L-isina-AMC	≤ 1
4E	L-metionina-AMC	FME	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	L-metionina-AMC	≤ 1
2E	4MU-β-D-cellobiopiranoside	FCE	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	4MU-β-D-cellobiopiranoside	≤ 1
1E	4MU-β-xiloside	FXY	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	4MU-β-xiloside	≤ 1
4F	L-fenilalanina-AMC	FPH	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	L-fenilalanina-AMC	≤ 1
2F	L-leucina-AMC	FLE	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu	L-leucina-AMC	≤ 1
1F	Escosil*	FSC	Pozzetto >FCT a fluorescenza blu/verde	Pozzetto ≤ FCT a fluorescenza blu/verde	Escosil	≤ 1
4G	Disaccaride	DIS	Oro/giallo	Arancio/rosso	Disaccaride	≤ 300
2G	Furanosio	FUR	Oro/giallo	Arancio/rosso	Furanosio	≤ 300
1G	Piranosvio	PYO	Oro/giallo	Arancio/rosso	Piranosvio	≤ 300
4H	p-n-p-α-D-galattoside	AGA	Giallo	Incolore	p-n-p-α-D-galattoside	≤ 7
2H	p-n-p-β-D-galattoside	NPG	Giallo	Incolore	p-n-p-β-D-galattoside	≤ 7
1H	p-n-p-fosfato	PHO	Giallo	Incolore	p-n-p-fosfato	≤ 7
4I	p-n-p-α-D-glicoside	AGL	Giallo	Incolore	p-n-p-α-D-glicoside	≤ 7
2I	p-n-p-N-acetilglucosaminide	NAG	Giallo	Incolore	p-n-p-N-acetilglucosaminide	≤ 7
1I	L-prolina-p-nitroanilide	PRO	Giallo	Incolore	L-prolina-p-nitroanilide	≤ 7
4J	p-n-p-α-L-fucoside	AFU	Giallo	Incolore	p-n-p-α-L-fucoside	≤ 7
2J	p-n-p-β-D-glicoside	BGL	Giallo	Incolore	p-n-p-β-D-glicoside	≤ 7
1J	L-alanile-L-alanina-p-nitroanilide	ALA	Giallo	Incolore	L-alanile-L-alanina-p-nitroanilide	≤ 7

\*Non idrolizzato il substrato Escosil è fluorescente. La fluorescenza diminuirà quando è presente l'enzima.



## Precauzioni: Diagnostico *in vitro*

Dopo l'uso, tutti i materiali infettivi comprese le piastre, i tamponi di cotone, le provette dell'inoculo, i filtri di carta utilizzati per i test dell'indolo e i pannelli vanno sterilizzati in autoclave prima della loro eliminazione o incenerimento.

## CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE/DURATA DI CONSERVAZIONE

**Coperchi:** I coperchi sono imballati individualmente e vanno conservati, nel loro imballaggio intatto, in frigorifero ad una temperatura di 2 – 8 °C. **NON CONGELARE.** Ispezionare visivamente l'imballaggio per controllare che la confezione in carta laminata non presenti fori o crepe. Non utilizzare qualora l'imballaggio dovesse apparire danneggiato. I coperchi, nel loro imballaggio originale, manterranno la reattività prevista fino alla data di scadenza se conservati secondo le indicazioni.

**Basi:** Le basi sono imballate in due set da dieci in un vassoio di incubazione **BBL Crystal**. Le basi sono sovrapposte con la parte superiore rivolta verso il basso, in modo da minimizzare la contaminazione dall'aria. Conservare in ambiente privo di polvere ad una temperatura di 2 – 25 °C, fino al momento dell'uso. Le basi non utilizzate vanno conservate nei vassoi, dentro un sacchetto di plastica. I vassoi vuoti vanno utilizzati per l'incubazione dei pannelli.

**Fluido d'inoculo:** Il fluido d'inoculo (FI) **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID** è imballato in due set di dieci provette. Ispezionare visivamente le provette per controllare che non presentino crepe, perdite, ecc. Non utilizzare in presenza di perdite, danni alla provetta o al coperchio o contaminazione visibile ad occhio nudo (ad es. nebulosità, torbidità). Conservare le provette ad una temperatura di 2 – 25 °C. La data di scadenza è stampata sull'etichetta della provetta. Solo il fluido d'inoculo **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H** deve essere usato con i pannelli **BBL Crystal ANR**.

Al ricevimento, conservare il kit **BBL Crystal ANR** ad una temperatura di 2 – 8 °C. Una volta aperto l'imballaggio, soltanto i coperchi vanno conservati a 2 – 8 °C. Il resto dei componenti del kit può essere conservato a 2 – 25 °C. Il kit o alcuni suoi componenti devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso, se conservati in frigorifero.

## RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Per i sistemi **BBL Crystal ID non** è previsto l'uso diretto dei campioni clinici. Usare isolati provenienti da piastre con agar sangue non selettivo come l'agar sangue anaerobio CDC, l'agar sangue Brucella, l'agar sangue Columbia, o l'agar sangue Schaedler. L'isolato deve derivare da una coltura pura che non abbia più di 24 – 48 h di vita per quasi tutti i generi; per alcuni cocchi a lenta crescita (fino a 72 h) e le specie *Actinomyces* (72 – 96 h) colture più vecchie sono accettabili. Per preparare le sospensioni dell'inoculo occorre utilizzare esclusivamente tamponi con punta in cotone, in quanto quelli realizzati in poliestere potrebbero creare problemi per l'inoculo nei pannelli. (Vedere "Limitazioni della Procedura"). Una volta rimossi dai sacchetti sigillati, i coperchi devono essere usati entro 1 h per assicurare una performance adeguata. Tenere la copertina antipolvere sul coperchio fino al momento dell'uso.

L'incubatore deve essere umidificato per evitare l'evaporazione del fluido dai pozzetti durante l'incubazione. Il livello di umidità raccomandato è del 40 – 60%. L'utilità dei sistemi **BBL Crystal ID** o di qualunque altra procedura diagnostica effettuata su campioni clinici dipende dalla qualità dei campioni stessi. Ai laboratori si raccomanda particolarmente di seguire metodi trattati nel *Manual of Clinical Microbiology* per la raccolta, il trasporto e la semina dei campioni su terreni di coltura per l'isolamento primario.<sup>1</sup> Altre letture raccomandate sulla manipolazione dei campioni includono *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*<sup>9</sup> e *Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology*.<sup>3</sup>

## PROCEDURA DEL TEST

**Materiali forniti:** kit **BBL Crystal ANR ID** –

20 coperchi per pannelli **BBL Crystal ANR ID**,

20 basi **BBL Crystal**,

20 provette di fluido **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID**. Ogni provetta contiene circa 2,3 ± 0,15 mL di fluido d'inoculo contenente: KCl 7,5 g, CaCl<sub>2</sub> 0,5 g, Tricina N-[2-idrossi-1, 1-bis (idrossimetil)metil] glicina 0,895 g, acqua depurata fino a 1000 mL.

2 vassoi per incubazione,

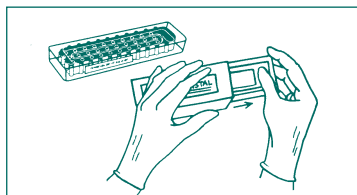
1 blocchetto per referti **BBL Crystal ANR ID**.

**Materiali non forniti:** tamponi sterili con punta in cotone (*non usare tamponi in poliestere*), incubatore (35 – 37 °C) senza CO<sub>2</sub> (umidità al 40 – 60%), standard McFarland N° 4 e N° 5, visore per pannelli **BBL Crystal**, Libro elettronico dei codici per i sistemi **BBL Crystal ID** o Manuale dei codici **BBL Crystal ANR**, contagocce **BBL DMACA** per reagenti dell'indolo, piastra per coltura non selettiva, reagente della catalasi.

Sono inoltre richiesti i necessari strumenti di laboratorio usati per la preparazione, conservazione e manipolazione di campioni clinici.

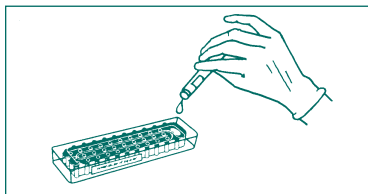
**Procedura del test:** Per il sistema **BBL Crystal ANR ID** sono necessari i risultati dei test di colorazione di Gram, della catalasi e dell'indolo. Prima della preparazione dei pannelli occorre effettuare i test catalasi e indolo. Il test dell'indolo va effettuato secondo le istruzioni fornite dal foglietto illustrativo che accompagna i reagenti. Per il test della catalasi si raccomanda una soluzione al 15,0% di perossido di idrogeno arricchito con Tween 80 all'1,0%.<sup>9,24</sup>

1. Rimuovere i coperchi dal sacchetto. Eliminare l'essiccante. Una volta rimossi dal sacchetto, i coperchi, protetti dalla copertina antipolvere, vanno adoperati nel giro di 1 h. Non usare il pannello se non c'è essiccante nel sacchetto.
2. Prelevare una provetta di fluido d'inoculo e contrassegnarla con il numero di campione del paziente. Usando una tecnica asettica, con la punta di un tampone sterile in cotone (*non usare tamponi in poliestere*) o di un applicatore in legno o un'ansa monouso in plastica, prelevare colonie della stessa morfologia da uno dei terreni raccomandati (vedere la sezione "Raccolta e trattamento dei campioni").
3. Sospendere le colonie in una provetta di fluido d'inoculo **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID**.

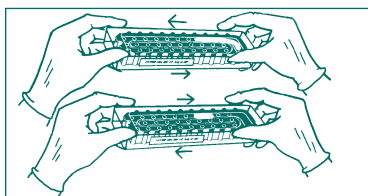


4. Richiudere con l'apposito coperchio e vortexare per circa 10 – 15 sec. La torbidità dovrebbe equivalere allo standard McFarland N° 4 (senza però superare lo standard McFarland N° 5). Qualora la concentrazione d'inoculo dovesse superare quello standard McFarland, si raccomanda di seguire una delle seguenti operazioni:
  - a. Usando una provetta nuova di fluido d'inoculo, preparare un nuovo inoculo equivalente ad uno standard McFarland N° 4.
  - b. Laddove non siano disponibili colonie supplementari per la preparazione di un nuovo inoculo, con l'impiego delle tecniche asettiche diluire l'inoculo aggiungendo il minimo volume richiesto (non superando però 1,0 mL) di soluzione salina sterile allo 0,85%, in modo da ridurre la torbidità equivalente ad un McFarland N° 4. Rimuovere la quantità in eccesso aggiunta alla provetta con una pipetta sterile, facendo in modo che il volume finale dell'inoculo equivalga approssimativamente al volume originale nella provetta ( $2,3 \pm 0,15$  mL). La mancata effettuazione di tali operazioni comporterà la fuoriuscita dell'inoculo sulla porzione nera della base, rendendo il pannello inutilizzabile.
5. Prelevare una base e annotare il numero di campione del paziente sulla parete laterale.

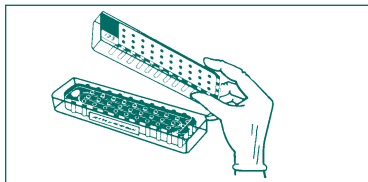
6. Versare tutto il contenuto del fluido d'inoculo nell'area segnata della base.



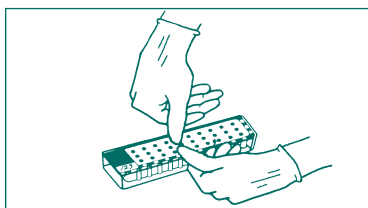
7. Tenere ferma la base con entrambe le mani e far avanzare delicatamente l'inoculo lungo i canali fino al riempimento di tutti i pozzetti. Far *ritornare* all'area segnata il fluido eccedente e collocare la base sopra un ripiano. Data l'elevata concentrazione cellulare usata nei pannelli del sistema **BBL Crystal ANR ID**, l'inoculo dev'essere fatto scorrere lentamente sui canali per garantire che tutti i pozzetti vengano riempiti correttamente. Verificare che non vi sia fluido nello spazio fra i pozzetti prima di allineare il coperchio.



8. Allineare il coperchio in modo tale che l'estremità etichettata si trovi sopra l'area segnata della base.

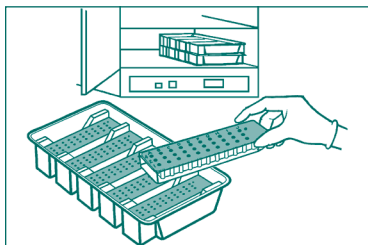


9. Premere verso il basso fino a quando non si avverta una lieve resistenza. Mettere i pollici sul bordo del coperchio, al centro del pannello e premere dai due lati verso il basso simultaneamente fino a quando il coperchio non scatti in posizione (si devono udire due "clic").

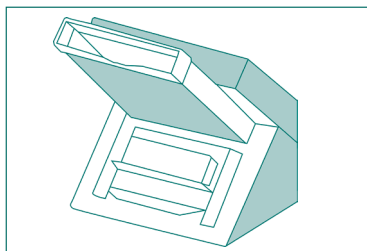


**Piastra per il controllo della purezza:** Usando un'ansa sterile, prelevare una piccola goccia dalla provetta dell'inoculo prima o dopo l'inoculo del pannello, ed inoculare una provetta a becco di clarino o una piastra di agar (qualunque terreno non selettivo) per il controllo della purezza. Eliminare provetta e coperchio dell'inoculo in un contenitore per rifiuti a rischio biologico. Incubare la provetta o la piastra per 24 – 48 h a una temperatura di 35 – 37 °C in condizioni anaerobiche. La piastra o la provetta per il controllo della purezza possono essere impiegati anche per qualunque test sierologico supplementare, ove necessario.

**Incubazione:** Collocare i pannelli inoculati nei vassoi per incubazione. Dieci pannelli possono essere contenuti in un vassoio (5 file di 2 pannelli). Tutti i pannelli vanno incubati **capovolti** (le finestre più ampie rivolte verso l'alto; l'etichetta rivolta verso il basso) in incubatore senza CO<sub>2</sub> con **umidità** pari al 40 – 60%. Durante l'incubazione, occorre evitare di sovrapporre più di 2 vassoi. Per i pannelli il tempo di incubazione è di **4 h** ad una temperatura di 35 – 37 °C. **NOTA:** Durante il periodo d'incubazione non si dovrebbe aprire ripetutamente l'incubatore (preferibilmente meno di 3 volte).



**Letture:** trascorso il periodo di incubazione raccomandato, rimuovere i pannelli dall'incubatore. Tutti i pannelli vanno letti **capovolti** (le finestre più ampie rivolte verso l'alto; l'etichetta rivolta verso il basso) usando il visore per pannelli **BBL Crystal**. Per l'interpretazione delle reazioni far riferimento alla tavola sinottica dei colori delle reazioni e/o alla Tabella 3. Registrare le reazioni nel blocchetto per referti **BBL Crystal ANR**.



- Leggere le colonne da G a J, usando la lampada regolare (bianca).
- Leggere le colonne da A a F (substrati fluorescenti) usando la lampada a UV nel visore per pannelli. Un pozzetto di substrato fluorescente viene considerato positivo *solamente* se l'intensità della fluorescenza osservata nello stesso *supera* quella del pozzetto di controllo negativo (A4).

**Calcolo del numero di profilo BBL Crystal:** Ad ogni risultato di test (tranne 4A, che viene usato come un controllo negativo di fluorescenza) classificato positivo, viene attribuito un valore 4, 2, o 1, corrispondente alla fila nella quale il test si trova. Ai risultati negativi viene attribuito invece un valore 0 (zero). I numeri che risultano da ogni positiva reazione in ciascuna colonna vengono poi sommati tra loro dando luogo ad un numero a 10 cifre: questo numero è appunto il numero di profilo.

Esempio	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	*	+	-	-	+	+	+	-	+	-
2	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
1	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
<b>Profilo</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>0</b>

\*(4A) = controllo negativo di fluorescenza

**Selezionare l'appropriato database BBL Crystal ANR dal menu offerto. Il tipo di piastra usato per preparare l'inoculo determinerà il database appropriato. Se si utilizzano i terreni Brucella o agar sangue Columbia, selezionare dal menu il data base alternativo per agar sangue.**

Il risultante numero di profilo ed i risultati dei test non in linea (colorazione di Gram, catalasi ed indolo) vanno digitati su un PC, sul quale è stato installato il Libro elettronico dei codici per i sistemi **BBL Crystal ID**, per ottenere l'identificazione. È disponibile anche un manuale dei codici. Se non si ha a disposizione un PC, rivolgersi al Servizio Tecnico della BD Diagnostics, per assistenza circa l'identificazione.

**Controllo di qualità per l'analista:** Si raccomanda l'effettuazione del controllo di qualità di ciascun lotto di pannelli come segue –

- Inoculare un pannello con *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 secondo la procedura raccomandata (fare riferimento a "Procedura del test").
- Prima dell'incubazione, lasciare il pannello a temperatura ambiente per 1 min (non oltre 2 min).
- Leggere e registrare le reazioni con l'aiuto del visore per pannelli e della tavola sinottica dei colori delle reazioni.
- Se uno qualunque dei pozzetti, tranne 1F, è positivo in base alla tavola sinottica dei colori delle reazioni (dopo 1 – 2 min), **NON USARE I PANNELLI** di questo lotto. Rivolgersi al Servizio Tecnico della BD Diagnostics. (NOTA: Il pozzetto 1F [Ecosoil] dovrebbe risultare positivo dopo la reidratazione.)
- Se tutti i pozzetti risultano negativi, incubare il pannello per 4 h a 35 – 37 °C.
- Leggere il pannello con il visore per pannelli e la tavola sinottica dei colori delle reazioni; registrare le reazioni nel blocchetto per referti.
- Comparare le reazioni registrate a quelle elencate alla Tabella 4. Se si ottengono risultati divergenti, confermare la purezza del ceppo per il controllo di qualità, prima di rivolgersi al Servizio Tecnico della BD Diagnostics.
- Durante il periodo d'incubazione non si dovrebbe aprire ripetutamente l'incubatore (preferibilmente meno di 3 volte). I risultati dei test previsti per ceppi supplementari di controllo di qualità sono elencati nella Tabella 5.

#### LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il sistema **BBL Crystal ANR ID** è stato creato per le unità tassonomiche fornite. Unità tassonomiche diverse da quelle elencate alla Tabella 1 non vanno testate con questo sistema.

Tutti i database **BBL Crystal ANR ID** sono stati sviluppati con terreni **BBL**. La reattività di alcuni substrati nei sistemi a rapida identificazione può dipendere dai terreni usati nelle preparazioni dell'inoculo. Raccomandiamo l'uso dei seguenti terreni **BBL** con il sistema **BBL Crystal ANR ID**: agar sangue anaerobio CDC, agar Schaedler con vitamina K<sub>1</sub> e sangue di montone al 5%, agar Columbia con sangue di montone al 5% e agar sangue Brucella con emina e vitamina K<sub>1</sub> (vedere "Disponibilità").

I sistemi di identificazione **BBL Crystal** si servono di un microambiente modificato, per cui i valori previsti per i test individuali potrebbero essere diversi dalle informazioni precedentemente stabilite con reazioni a test convenzionali. L'accuratezza del sistema **BBL Crystal ANR ID** si fonda sull'uso statistico di test creati in maniera speciale e su un database esclusivo.

Sebbene il sistema **BBL Crystal ANR ID** aiuti nella differenziazione microbica, si deve riconoscere che minori variazioni possono essere presenti nei ceppi di una specie. L'uso di pannelli e l'interpretazione dei risultati richiede un microbiologo competente. L'identificazione finale dell'isolato deve tener conto dell'origine del campione, l'aerotolleranza, la morfologia della cellula, le caratteristiche delle colonie sui vari terreni, così come i prodotti metabolici finali come determinato mediante gas-cromatografia liquida, laddove sia necessario.

Tabella 4

Tavola del controllo di qualità per il sistema BBL Crystal ANR ID\*

Posizione nel pannello	Substrato	Codice	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285
4A	Controllo negativo fluorescente	FCT	–
2A	L-arginina-AMC	FAR	V
1A	L-istidina-AMC	FHI	–
4B	4MU- $\alpha$ -D-mannoside	FAM	V <sup>1</sup>
2B	L-serina-AMC	FSE	–
1B	L-isoleucina-AMC	FIS	–
4C	4MU- $\beta$ -D-mannoside	FBM	+
2C	Glicina-AMC	FGL	–
1C	L-alanina-AMC	FAL	V
4D	4MU-N-acetil- $\beta$ -D-galattosaminide	FGA	+
2D	L-acido piroglutamico-AMC	FPY	V <sup>1,11</sup>
1D	L-lisina-AMC	FLY	V
4E	L-metionina-AMC	FME	V
2E	4MU- $\beta$ -D-cellobiopiranoside	FCE	+
1E	4MU- $\beta$ -D-xilosid	FXY	V <sup>1</sup>
4F	L-fenilalanina-AM	FPH	V
2F	L-leucina-AMC	FLE	+
1F	Escosil	FSC	– <sup>3,4,10</sup>
4G	Disaccaride	DIS	+
2G	Furanosio	FUR	+
1G	Piranosvio	PYO	+ <sup>1</sup>
4H	p-n-p- $\alpha$ -D-galattoside	AGA	+
2H	p-n-p- $\beta$ -D-galattoside	NPG	+
1H	p-n-p-fosfato	PHO	+
4I	p-n-p- $\alpha$ -D-glicoside	AGL	+
2I	p-n-p-N-acetil-glucosaminide	NAG	+
1I	L-prolina-p-nitroanilide	PRO	–
4J	p-n-p- $\alpha$ -L-Fucoside	AFU	+
2J	p-n-p- $\beta$ -D-glicoside	BGL	+
1J	L-alanile-L-alanina-p-nitroanilide	ALA	+

1 = Negativo su **BBL** Schaedler4 = Negativo su **BBL** Bucella7 = Negativo su **BBL** Columbia2 = Positivo su **BBL** Schaedler5 = Positivo su **BBL** Bucella8 = Positivo su **BBL** Columbia3 = Variabile su **BBL** Schaedler6 = Variabile su **BBL** Bucella9 = Variabile su **BBL** Columbia

Tabella 5

Ceppi supplementari di controllo di qualità per il sistema BBL Crystal A NR ID

Posizione nel pannello	Substrato	Codice	<i>Bacteroides distasonis</i> ATCC 8503	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> ATCC 29743	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 27725
4A	Controllo negativo fluorescente	FCT	–	–	–	–
2A	L-arginina-AMC	FAR	+	+	+	– <sup>4,10</sup>
1A	L-istidina-AMC	FHI	V	+	+ <sup>3</sup>	–
4B	4MU- $\alpha$ -D-mannoside	FAM	+	–	–	–
2B	L-serina-AMC	FSE	–	–	+ <sup>3</sup>	–
1B	L-isoleucina-AMC	FIS	– <sup>4</sup>	–	+	–
4C	4MU- $\beta$ -D-mannoside	FBM	+ <sup>10</sup>	–	–	–
2C	Glicina-AMC	FGL	V <sup>1,12</sup>	V <sup>1</sup>	V <sup>2</sup>	–
1C	L-alanina-AMC	FAL	+	V <sup>1</sup>	+	–
4D	4MU-N-acetil- $\beta$ -D-galattosaminide	FGA	+	–	–	–
2D	L-acido piroglutamico-AMC	FPY	V <sup>1,12</sup>	–	V <sup>11,24</sup>	+
1D	L-lisina-AMC	FLY	V <sup>2,12,15</sup>	+	+	–
4E	L-metionina-AMC	FME	+	+ <sup>4,10</sup>	+	V
2E	4MU- $\beta$ -D-cellobiopiranoside	FCE	V <sup>12</sup>	–	+	–
1E	4MU- $\beta$ -D-xiloside	FXY	+ <sup>10</sup>	–	–	–
4F	L-fenilalanina-AMC	FPH	V <sup>12</sup>	V	+	–
2F	L-leucina-AMC	FLE	+	+ <sup>10</sup>	+	V
1F	Escosil	FSC	V	V <sup>2,15</sup>	– <sup>3,4,10</sup>	V <sup>15</sup>
4G	Disaccaride	DIS	+	–	+ <sup>3,10,24</sup>	–
2G	Furanosio	FUR	+	–	+	V
1G	Piranosvio	PYO	+	–	+ <sup>10</sup>	+
4H	p-n-p- $\alpha$ -D-galattoside	AGA	+	–	+ <sup>3,4,10</sup>	–
2H	p-n-p- $\beta$ -D-galattoside	NPG	+	–	+ <sup>3,4,10</sup>	–
1H	p-n-p-fosfato	PHO	+	–	–	–
4I	p-n-p- $\alpha$ -D-glicoside	AGL	+	–	V <sup>1</sup>	–

Posizione nel pannello	Substrato	Codice	<i>Bacteroides distasonis</i> ATCC 8503	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> ATCC 29743	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 27725
2I	p-n-p-N-acetil- glucosaminide	NAG	+	–	V <sup>12,15</sup>	–
1I	L-prolina-p-nitroanilide	PRO	–	–	V	–
4J	p-n-p-α-L-fucoside	AFU	–	–	–	–
2J	p-n-p-β-D-glicoside	BGL	+	–	+	–
1J	L-alanile-L-alanina-p-nitroanilide	ALA	+	–	V	–

\*I risultati mostrati sono previsti quando viene usato l'agar anaerobio **BBL CDC** con 5% di sangue di montone.

Per preparare la sospensione dell'inoculo occorre utilizzare esclusivamente tamponi applicatori con punta in cotone, o bastoncini di legno o anse monouso di plastica, in quanto alcuni tamponi in poliestere possono far diventare viscoso il fluido di inoculo. Ciò potrebbe a sua volta dar luogo ad un inoculo di quantità insufficiente per riempire i pozzetti. Una volta rimossi dai sacchetti sigillati, i coperchi devono essere usati entro 1 h per assicurare una performance adeguata. Tenere la copertina antipolvere sul coperchio fino al momento dell'uso.

L'incubatore in cui vengono messi i pannelli va umidificato per evitare l'evaporazione del fluido d'inoculo dai pozzetti durante l'incubazione. Il livello di umidità raccomandato è del 40 – 60%.

Dopo l'inoculo, i pannelli vanno incubati sempre **capovolti** (le finestre più ampie verso l'alto; l'etichetta rivolta verso il basso) in modo da massimizzare l'efficacia dei substrati.

Le colonie devono provenire da piastre **non selettive** di agar sangue come il **BBL CDC** anaerobio, Brucella, Columbia e Schaedler (vedere "Disponibilità").

Se il profilo del test **BBL Crystal** dà un risultato di "Nessuna identificazione" e la purezza della coltura è stata confermata, è probabile che (i) l'isolato del test stia producendo **reazioni BBL Crystal atipiche** (che possono anche essere causate da errori di metodologia), (ii) la specie del test non fa parte delle unità tassonomiche previste o (iii) il sistema non è in grado d'identificare l'isolato del test con il livello di sicurezza necessario. Se si escludono possibili errori da parte dell'utente, ripetere il test usando i metodi tradizionali.

## CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

**Riproducibilità:** La riproducibilità delle reazioni dei substrati **BBL Crystal ANR ID** (29) è stata studiata mediante analisi ripetute in uno studio esterno condotto in quattro (4) laboratori clinici (per un totale di cinque valutazioni). La riproducibilità di reazioni di substrati individuali è risultata essere compresa nella gamma da 96,2% a 100%. La riproducibilità globale del pannello **BBL Crystal ANR** è risultata essere il 99,1%.<sup>25</sup>

**Grado di accuratezza dell'identificazione:** La performance del sistema **BBL Crystal ANR ID** è stata paragonata a quella dei sistemi di identificazione attualmente in commercio e a metodi di identificazione di riferimento tradizionali basati sulle raccomandazioni del VA Wadsworth Laboratory usando isolati clinici e colture in stock. Sono state condotte cinque analisi in quattro laboratori indipendenti. Per stabilire le caratteristiche di performance sono stati impiegati sia gli isolati di routine pervenuti nel laboratorio clinico, sia gli isolati precedentemente identificati scelti dalle sedi della prova clinica.

Dei 633 isolati testati nei cinque studi, il sistema **BBL Crystal ANR ID** ne ha identificati in maniera esatta 588 (93%), compresi gli isolati che hanno richiesto analisi supplementari per la loro risoluzione. 36 isolati (6%) non sono stati identificati correttamente ed un messaggio di "Nessuna identificazione" è stato ottenuto per 9 isolati (1%).<sup>25</sup>

## DISPONIBILITÀ

N° di cat.	Descrizione	N° di cat.	Descrizione
245010	Kit <b>BBL Crystal ANR ID</b> , contenente 20 unità di ciascuno degli elementi seguenti: coperchi per pannelli del sistema <b>BBL Crystal ANR ID</b> , basi <b>BBL Crystal</b> e fluido di inoculo <b>BBL Crystal ANR ID</b> .	221733	Agar sangue <b>BBL CDC</b> anaerobio con sangue di montone al 5%, conf. da 20.
245038	Fluido d'inoculo <b>BBL Crystal ANR</b> , GP, RGP, N/H ID, conf. da 10.	221734	Agar sangue <b>BBL CDC</b> anaerobio con sangue di montone al 5%, conf. da 100.
245031	Visore per pannelli <b>BBL Crystal</b> , modello per gli U.S.A., 110 V, 60 Hz.	221539	Agar <b>BBL Schaedler</b> con vitamina K <sub>1</sub> e sangue di montone al 5%, conf. da 20.
245032	Visore per pannelli <b>BBL Crystal</b> , modello per l'Europa, 220 V, 50 Hz.	221540	Agar <b>BBL Schaedler</b> con vitamina K <sub>1</sub> e sangue di montone al 5%, conf. da 100.
245033	Visore per pannelli <b>BBL Crystal</b> , modello per il Giappone, 100 V, 50/60 Hz.	221165	Agar <b>BBL Columbia</b> con sangue di montone al 5%, conf. da 20.
245034	Tubo UV del visore per pannelli <b>BBL Crystal</b> .	221263	Agar <b>BBL Columbia</b> con sangue di montone al 5%, conf. da 100.
245036	Tubo del visore per pannelli <b>BBL Crystal</b> .	297848	Agar sangue <b>BBL Brucella</b> con emina e vitamina K <sub>1</sub> , conf. da 20.
245011	Manuale dei codici per il sistema <b>BBL Crystal</b> d'identificazione degli anaerobi.	297716	Agar sangue <b>BBL Brucella</b> con emina e vitamina K <sub>1</sub> , conf. da 100.
		261187	Contagocce <b>BBL DMACA</b> per reagenti dell'indolo.
		212539	Kit <b>BBL</b> di colorazione di Gram, conf. da 4 flaconi x 250 mL.

**BIBLIOGRAFIA:** Vedere "References" nel testo inglese.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD.

---

---

# BD Sistemas de Identificação BBL Crystal

## Anaerobe ID Kit

Português

### UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O Sistema de Identificação (ID) de Anaeróbios (ANR) **BBL Crystal** consiste num método de identificação miniaturizado que utiliza substratos convencionais, fluorogénicos e cromogénicos modificados. Destina-se à identificação de bactérias anaeróbias isoladas frequentemente.<sup>1-9</sup>

### SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

Os primeiros relatos da utilização de micrométodos para identificação bioquímica de microrganismos datam de 1918.<sup>10</sup> Várias publicações participaram a utilização de discos de papel impregnados com reagentes e de métodos utilizando micro-tubos na diferenciação de bactérias entéricas.<sup>10-14</sup> O interesse nos sistemas de identificação miniaturizados levou à introdução de vários sistemas no mercado, no início dos anos sessenta, cujas vantagens residiam na necessidade de um reduzido espaço de armazenamento, maior prazo de validade, controlo de qualidade padronizado e facilidade de utilização.

De uma forma geral, muitos dos testes usados nos Sistemas de ID **BBL Crystal** consistem em modificações de métodos clássicos. Neles se incluem testes para a fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos. Paralelamente, existem substratos ligados a cromogénios e fluorogénios, como sucede no painel **BBL Crystal** para ID de ANR, que se destinam à detecção de enzimas utilizados pelos microrganismos para metabolizar vários substratos.<sup>12,15-22</sup>

O **BBL Crystal** ANR ID kit (Conjunto **BBL Crystal** para ID de ANR) é constituído por (i) tampas dos painéis para ID de ANR **BBL Crystal**, (ii) bases **BBL Crystal** e (iii) tubos com Líquido de Inóculo **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid (IF). A tampa contém 29 substratos desidratados e um controlo da fluorescência em pontas de dentes de plástico. A base é dotada de 30 poços de reacção. O inóculo de teste é preparado com o líquido de inóculo e é usado para encher todos os 30 poços da base. Quando a tampa é alinhada com a base e encaixada, o inóculo de teste rehidrata os substratos secos e inicia as reacções do teste.

Após um período de incubação, os poços são analisados relativamente à existência de alterações de cor ou à presença de fluorescência, consequência das actividades metabólicas dos microrganismos. O padrão das 29 reacções obtido é convertido num número de perfil com dez dígitos, que é usado como base de identificação.<sup>23</sup> A base de dados **BBL Crystal** ANR ID contém padrões de reacções enzimáticas e bioquímicas dos 29 substratos **BBL Crystal** ANR ID correspondentes a uma ampla variedade de microrganismos. A identificação faz-se a partir de uma análise comparativa entre o padrão da reacção do isolado testado e os padrões presentes na base de dados. No Quadro 1 facultar-se uma lista completa dos grupos que constituem a base de dados actual.

### PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Os painéis **BBL Crystal** ANR ID têm 29 substratos bioquímicos e enzimáticos secos. Utiliza-se uma suspensão bacteriana presente no líquido de inóculo para rehidratar os substratos. Os testes usados no sistema baseiam-se na utilização e degradação de substratos específicos pelos microrganismos, detectadas por vários sistemas indicadores. A hidrólise enzimática de substratos fluorogénicos contendo os derivados cumarínicos 4-metilumbeliferona (4MU) ou 7-amino-4- metilcumarina (7-AMC), provoca um aumento da fluorescência, facilmente detectável por meios visuais<sup>15-19</sup> utilizando uma fonte de luz UV.<sup>19-21</sup> Após hidrólise, os substratos cromogénicos provocam alterações de cor que podem ser detectadas visualmente. Paralelamente, existem testes que detectam a capacidade que determinado microrganismo apresenta para hidrolisar, degradar, reduzir ou utilizar de outra forma um substrato dos Sistemas de ID **BBL Crystal**.

No Quadro 2 descrevem-se as reacções utilizadas pelos vários substratos e uma explicação resumida dos princípios utilizados no sistema. A localização do painel nos quadros referidos indica a fila e coluna em que se localiza o poço (por exemplo: 1J refere-se à Fila 1 na Coluna J).

**Quadro 1**

**Grupos taxonómicos no Sistema BBL Crystal ANR ID**

<b>Bacilos Gram-Negativos</b>		
<b>Tolerantes à Bilis</b>	<b>Sensíveis à Bilis</b>	<b>Não Pigmentados,</b>
Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	<b>Não Pigmentados</b>	<b>Crepitantes</b>
<i>B. caccae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Bacteroides</i>
Grupo <i>B. distasonis</i> <sup>10</sup>	<i>P. bivia</i>	<i>B. ureolyticus</i>
<i>B. eggerthii</i>	<i>P. buccae</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>P. buccalis</i>	<i>C. gracilis</i>
<i>B. ovatus</i>	<i>P. disiens</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>B. stercoris</i>	<i>P. oralis</i>	<i>F. gonidiaformans</i> <sup>1,11</sup>
<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>P. oris</i>	<i>F. mortiferum</i>
<i>B. uniformis</i>	<i>P. veroralis</i> <sup>11</sup>	<i>F. necrophorum</i>
<i>B. vulgatus</i>	<b>Não Pigmentados,</b>	<i>F. nucleatum</i>
<b>Outro:</b>	<b>Não Crepitantes</b>	<i>F. russii</i>
<i>B. splanchnicus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>F. varium</i>
<i>Porphyromonas levii</i> <sup>11</sup>	<i>B. capillosus</i>	<i>Leptotrichia</i>
<b>Sensíveis à Bilis Pigmentados</b>	<i>Tissierella</i>	<i>L. buccalis</i>
<i>Capnocytophaga</i> spp.	<i>T. praeacuta</i>	
<b>Prevotella</b>	<b>Tolerantes à Bilis</b>	
<i>P. corporis</i>	<b>Não Pigmentados</b>	
<i>P. denticola</i>	<i>Bilophila</i>	
<i>P. intermedia</i>	<i>B. wadsworthia</i>	
<i>P. loescheii</i>	<i>Desulfomonas</i>	
<i>P. melaninogenica</i>	<i>D. pigra</i>	
<b>Porphyromonas</b>	<i>Desulfovibrio</i> spp.	
<i>P. asaccharolytica</i>	<i>Campylobacter</i>	
<i>P. endodontalis</i>	<i>C. curvus/rectus</i>	
<i>P. gingivalis</i>		

Chave: 1 = Grupo taxonómico apenas na base de dados Schaedler **BBL, BBL Crystal**.

2 = Grupos taxonómicos apenas na base de dados Schaedler **BBL, BBL Crystal** e base de dados alternativa de Agar de Sangue **BBL Crystal**.

3 = Inclui *B. distasonis* e *B. merdae*.

4 = Estes grupos taxonómicos apresentam < 10 perfis únicos **BBL Crystal** na base de dados actual.

<b>Clostridia</b>	<b>Bacilos Gram-Positivos Não Formadores de Esporos</b>	<b>Cocos Gram-Positivos</b>
<b>Clostridium</b>	<b>Actinomyces</b>	<b>Gemella</b>
<i>C. baratii</i>	<i>A. bovis</i>	<i>G. morbillorum</i>
<i>C. beijerinckii</i>	<i>A. israelii</i>	<b>Peptostreptococcus</b>
<i>C. bifermentans</i>	<i>A. meyeri</i>	<i>P. anaerobius</i>
<i>C. botulinum</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>P. asaccharolyticus</i>
<i>C. butyricum</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>P. indolicus</i>
<i>C. cadaveris</i>	<i>A. pyogenes</i>	<i>P. magnus</i>
<i>C. clostridioforme</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>P. micros</i>
<i>C. difficile</i>	<b>Atopobium</b>	<i>P. prevotii</i>
<i>C. glycolicum</i>	<i>A. minutum</i>	<i>P. tetradius</i>
<i>C. hastiforme</i>	<b>Bifidobacterium</b>	<b>Ruminococcus</b>
<i>C. histolyticum</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>R. productus</i> <sup>11</sup>
<i>C. innocuum</i>	<i>B. dentium</i>	<b>Staphylococcus</b>
<i>C. limosum</i>	Espécies de <i>B.</i>	<i>S. saccharolyticus</i>
<i>C. novyi</i> A	<b>Eubacterium</b>	<b>Streptococcus</b>
<i>C. paraputrificum</i> <sup>11</sup>	<i>E. aerofaciens</i>	<i>S. constellatus</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>E. lentum</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>C. putrificum</i> <sup>1</sup>	<i>E. limosum</i>	<b>Cocos Gram-Negativos</b>
<i>C. ramosum</i>	<b>Mobiluncus</b>	Espécies de <i>Veillonella</i>
<i>C. septicum</i>	<i>M. curtisii</i>	
<i>C. sordellii</i>	<i>M. mulieris</i>	
<i>C. sphenoides</i>	Espécies de <i>M.</i> <sup>2,11</sup>	
<i>C. sporogenes</i>	<b>Propionibacterium</b>	
<i>C. subterminale</i>	<i>P. acnes</i>	
<i>C. tertium</i>	<i>P. avidum</i>	
<i>C. tetani</i> <sup>4</sup>	<i>P. granulosum</i> <sup>4</sup>	
	<i>P. propionicus</i>	
	<b>Lactobacillus</b>	
	<i>L. acidophilus</i>	
	<i>L. casei</i>	
	<i>L. catenaformis</i>	
	<i>L. fermentum</i>	
	<i>L. jensenii</i>	
	<i>L. johnsonii</i>	
	<i>L. rhamnosus</i>	

**Quadro 2****Princípios dos Testes Usados no Sistema BBL Crystal ANR ID**

Localização no Painel	Característica do Teste	Código	Princípio (Referência)
4A	Controlo negativo da fluorescência	FCT	Controlo para padronização dos resultados de substrato com fluorescência
2A	L-arginina-AMC	FAR	A hidrólise enzimática da ligação amida ou glicosídica provoca a libertação de um derivado da cumarina fluorescente. <sup>19-21</sup>
1A	L-histidina-AMC	FHI	
4B	4MU- $\alpha$ -D-manósido	FAM	
2B	L-serina-AMC	FSE	
1B	L-isoleucina-AMC	FIS	
4C	4MU- $\beta$ -D-manósido	FBM	
2C	Glicina-AMC	FGL	
1C	L-alanina-AMC	FAL	
4D	4MU-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida	FGA	
2D	L-ácido piroglutâmico-AMC	FPY	
1D	L-lisina-AMC	FLY	
4E	L-metionina-AMC	FME	
2E	4MU- $\beta$ -D-celobiopiranosido	FCE	
1E	4MU- $\beta$ -D-xilósido	FXY	
4F	L-fenilalanina-AMC	FPH	
2F	L-leucina-AMC	FLE	
1F	Escosil	FSC	A hidrólise da ligação glicosídica provoca a libertação de esculetina não fluorescente. <sup>22</sup>
4G	Dissacárido	DIS	A utilização dos hidratos de carbono origina a diminuição do pH e a alteração do indicador (Vermelho de fenol). <sup>1,2,11,12</sup>
2G	Furanose	FUR	
1G	Piranosose	PYO	
4H	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactósido	AGA	A hidrólise enzimática do glicosídeo substituído por aril incolor liberta a p-nitrofenol amarelo. <sup>15-19</sup>
2H	p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido	NPG	
1H	p-nitrofenil-fosfato	PHO	
4I	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucósido	AGL	
2I	p-nitrofenil-N-acetil glucosaminida	NAG	
1I	L-prolina-p-nitroanilido	PRO	A hidrólise enzimática do substrato amida incolor liberta a p-nitroanilina de cor amarela. <sup>15-19</sup>
4J	p-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucósido	AFU	A hidrólise enzimática do glicosídeo substituído por aril incolor liberta a p-nitrofenol amarelo. <sup>15-19</sup>
2J	p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucósido	BGL	
1J	L-alanil-L-alanina-p-nitroanilido	ALA	A hidrólise enzimática do substrato amida incolor liberta a p-nitroanilina de cor amarela. <sup>15-19</sup>



## REAGENTES

O painel **BBL Crystal ANR** ID contém 29 substratos enzimáticos e bioquímicos. Consultar o quadro seguinte para uma lista dos princípios activos.

### Quadro 3

#### Reagentes usados no Sistema BBL Crystal ANR ID

Localização no Painel	Tampão	Código.	Pos	Neg	Princípios activos	Qtd. Aprox. (g/L)
4A	Controlo negativo da fluorescência	FCT	n/a	n/a	Derivado da cumarina fluorescente	≤1
2A	L-arginina-AMC	FAR	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	L-arginina-AMC	≤1
1A	L-histidina-AMC	FHI	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	L-histidina-AMC	≤1
4B	4MU-α-D-manósido	FAM	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	4MU-α-D-manósido	≤1
2B	L-serina-AMC	FSE	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	L-serina-AMC	≤1
1B	L-isoleucina-AMC	FIS	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	L-isoleucina-AMC	≤1
4C	4MU-β-D-manósido	FBM	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	4MU-β-D-manósido	≤1
2C	Glicina-AMC	FGL	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	Glicina-AMC	≤1
1C	L-alanina-AMC	FAL	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	L-alanina-AMC	≤1
4D	4MU-N-acetil-β-D-galactosaminida	FGA	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	4MU-N-acetil-β-D-galactosaminida	≤1
2D	L-ácido piroglutâmico-AMC	FPY	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	L-ácido piroglutâmico-AMC	≤1
1D	L-lisina-AMC	FLY	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	L-lisina-AMC	≤1
4E	L-metionina-AMC	FME	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	L-metionina-AMC	≤1
2E	4MU-β-D-celobiopiranósido	FCE	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	4MU-β-D-celobiopiranósido	≤1
1E	4MU-β-D-xilósido	FXY	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	4MU-β-D-xilósido	≤1
4F	L-fenilalanina-AMC	FPH	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	L-fenilalanina-AMC	≤1
2F	L-leucina-AMC	FLE	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul >poço FCT	L-leucina-AMC	≤1
1F	Escosil*	FSC	fluorescência azul/verde >poço FCT	fluorescência azul/verde >poço FCT	Escosil	≤1
4G	Dissacárido	DIS	Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	Dissacárido	≤300
2G	Furanose	FUR	Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	Furanose	≤300
1G	Piranose	PYO	Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	Piranose	≤300
4H	p-n-p-α-D-galactósido	AGA	Amarelo	Incolor	p-n-p-α-D-galactósido	≤7
2H	p-n-p-β-D-galactósido	NPG	Amarelo	Incolor	p-n-p-β-D-galactósido	≤7
1H	p-n-p-fosfato	PHO	Amarelo	Incolor	p-n-p-fosfato	≤7
4I	p-n-p-α-D-glucósido	AGL	Amarelo	Incolor	p-n-p-α-D-glucósido	≤7
2I	p-n-p-N-acetil-glucosaminida	NAG	Amarelo	Incolor	p-n-p-N-acetil-glucosaminida	≤7
1I	L-prolina-p-nitroanilido	PRO	Amarelo	Incolor	L-prolina-p-nitroanilido	≤7
4J	p-n-p-α-L-fucósido	AFU	Amarelo	Incolor	p-n-p-α-L-fucósido	≤7
2J	p-n-p-β-D-glucósido	BGL	Amarelo	Incolor	p-n-p-β-D-glucósido	≤7
1J	L-alanil-L-alanina-p-nitroanilido	ALA	Amarelo	Incolor	L-alanil-L-alanina-p-nitroanilido	≤7

\*O substrato Escosil é fluorescente quando não hidrolizado. A fluorescência diminui quando está presente o enzima.

#### Precauções: Diagnóstico *in vitro*

Após a utilização, todos os materiais infecciosos incluindo as placas, zaragoas de algodão, tubos de inóculo, papéis de filtro utilizados para os testes da oxidase ou indol e os painéis **BBL Crystal** devem ser esterilizados em autoclave, antes de serem eliminados ou incinerados.

## ARMAZENAMENTO E MANIPULAÇÃO/PRAZO DE VALIDADE

**Tampas:** As tampas são embaladas individualmente e devem ser armazenadas sem abrir no frigorífico, entre 2 e 8 °C. NÃO CONGELAR. Inspeccionar visualmente a embalagem relativamente à existência de buracos ou fissuras na folha de alumínio. Não utilizar se a embalagem se parecer danificada. Na embalagem original, as tampas, caso sejam armazenadas conforme recomendado, irão manter a sua reactividade esperada até ao final do prazo de validade.

**Bases:** As bases são embaladas em dois conjuntos de dez, em tabuleiros de incubação **BBL Crystal**. As bases são empilhadas viradas para baixo, com o objectivo de minimizar a contaminação pelo ar. Armazenar num ambiente isento de pó, entre 2 e 25 °C, até estarem prontas a usar. Armazenar as bases não usadas no tabuleiro, num saco de plástico. Deverão utilizar-se tabuleiros vazios para incubar os painéis.

**Líquido de Inóculo:** O Líquido de Inóculo **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid (IF)** é embalado em dois conjuntos de dez tubos. Inspeccionar visualmente os tubos relativamente à existência de fissuras, fugas, etc. Não utilizar caso pareçam existir fugas, danos no tubo ou tampa ou sinais visuais de contaminação (ou seja, nebulosidade, turvação). Armazenar os tubos entre 2 e 25 °C. O prazo de validade está impresso no rótulo do tubo. Apenas o Líquido de Inóculo **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H** só deverá ser usado com os painéis **BBL Crystal ANR**.

Após a sua recepção, armazenar o conjunto **BBL Crystal ANR** entre 2 e 8 °C. Depois de aberto, as tampas são as únicas que necessitam de ser armazenadas entre 2 e 8 °C. Os restantes constituintes do conjunto podem ser armazenados entre 2 e 25 °C. Se o conjunto ou qualquer dos constituintes para armazenado no frigorífico, deverá ser trazido à temperatura ambiente antes de se proceder à sua utilização.

## COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Os Sistemas **BBL Crystal ID** não se destinam a uso directo com amostras clínicas. Utilizar isolados de meios de agar de sangue não selectivo tais como CDC Anaerobe Blood Agar (Agar de Sangue para Anaeróbios do CDC), Brucella Blood Agar (Agar de Sangue para Brucella), Agar de Sangue Columbia (Columbia Blood Agar) ou Agar de Sangue Schaedler (Schaedler Blood Agar). O isolado de teste deve consistir numa cultura pura, com menos de 24 a 48 h de idade para a maioria dos géneros; para alguns cocos de crescimento lento (até 72 h) e para a espécie *Actinomyces* (72–96 h), são aceitáveis culturas com mais tempo. Na preparação da suspensão do inóculo deverão utilizar-se apenas zaragatoas com aplicador dotado de uma ponta de algodão, dado que algumas zaragatoas de poliéster podem trazer problemas com a inoculação dos painéis. (Consulte "Limitações do Procedimento".) Após remoção das tampas dos sacos selados, estas devem ser usadas dentro de 1 h, para se garantir um desempenho adequado. A cobertura de plástico deverá permanecer na tampa até esta ser usada.

A incubadora usada deverá estar humedecida para impedir a evaporação de líquido dos poços durante a incubação. O nível de humidade recomendado é de 40 a 60%. A utilidade dos Sistemas **BBL Crystal ID** ou de qualquer outro procedimento de diagnóstico efectuado com amostras clínicas é directamente influenciada pela qualidade das próprias amostras. Recomenda-se altamente que os laboratórios utilizem os métodos discutidos no *Manual of Clinical Microbiology* para colheita, transporte e colocação de amostras no meio de isolamento primário.<sup>1</sup> Outras obras recomendadas e relevantes para a manipulação de amostras incluem o *Anaerobic Bacteriology Manual* de Wadsworth<sup>9</sup> e *Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology*.<sup>3</sup>

## PROCEDIMENTO DE TESTE

**Material Fornecido: BBL Crystal ANR ID Kit –**

20 Tampas dos painéis **BBL Crystal** para ID de Anaeróbios,

20 Bases **BBL Crystal**,

20 Tubos com Líquido de Inóculo **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid (IF)**. Cada tubo possui aproximadamente 2,3 ± 0,15 mL de Líquido para Inóculo contendo: KCl 7,5 g, CaCl<sub>2</sub> 0,5 g, Tricina N-[2-hidroxi-1, 1-bis (hidroximetil)metil] glicina 0,895 g, água purificada até 1000 mL.

2 tabuleiros de incubação,

1 Caderno de Relatório **BBL Crystal ANR ID**.

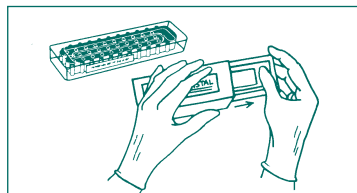
**Necessário mas Material Não Fornecido:** Zaragatoas de algodão esterilizadas (não usar zaragatoas de poliéster), incubadora (35 a 37 °C) sem CO<sub>2</sub> (40 a 60% de humidade), padrões de McFarland No. 4 e No. 5, **BBL Crystal Panel Viewer** (Leitor do Painel **BBL Crystal**), **BBL Crystal ANR ID System Electronic Codebook** (Livro de Codificação Electrónico do sistema de ID **BBL Crystal**) ou **BBL Crystal ANR Manual Codebook** (Manual de Codificação de ANR **BBL Crystal**), **BBL DMACA Indole Reagent Droppers** (Distribuidores de Reagente Indol DMACA), placa de cultura não selectiva e reagente catalase.

Também é necessário o equipamento e material de laboratório usados para preparação, armazenamento e manipulação de amostras clínicas.

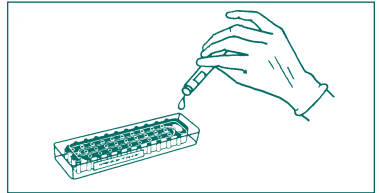
**Procedimento de Análise:** O Sistema **BBL Crystal ANR ID** necessita de resultados do teste de indol, catalase e coloração Gram. Antes da instalação do painel, deverão realizar-se os testes de indol e catalase. Efectuar os testes de indol em conformidade com as instruções do folheto informativo. Para o teste da catalase, recomenda-se a adição de uma solução de peróxido de hidrogénio a 15,0% com Tween 80 a 1,0%.<sup>9,24</sup>

1. Retirar as tampas do saco. Descartar o exsiccante. Após remoção das tampas dos sacos, estas devem ser usadas dentro de 1 h. Não usar o painel caso não exista exsiccante no saco.

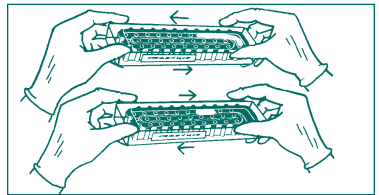
2. Retirar um tubo para líquido de inóculo e rotular com o número da amostra do doente. Utilizando uma técnica asséptica, com a ponta de uma zaragatoa de algodão esterilizada (não usar uma zaragatoa de poliéster), com uma aplicadora de madeira ou com uma ansa de plástico descartável, escolher colónias com morfologia idêntica a partir de um dos meios recomendados (ver a secção "Colheita e Processamento das Amostras").



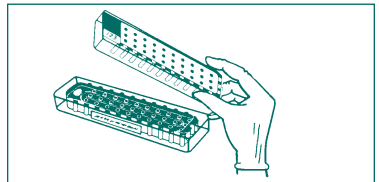
3. Suspender as colónias no tubo com Líquido de Inóculo **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID**.
4. Voltar a tapar o tubo e levar ao misturador automático durante cerca de 10 a 15 segundos. A turvação deverá ser pelo menos equivalente a um padrão de McFarland No. 4 (sem ultrapassar um padrão de McFarland No. 5). Caso a concentração do inóculo seja superior à do padrão de McFarland recomendado, aconselha-se que se cumpra um dos passos que se seguem:
  - a. Com um tubo de líquido de inóculo fresco, preparar um novo inóculo, equivalente a um padrão de McFarland No. 4.
  - b. Caso não estejam disponíveis mais colónias para preparação de um novo inóculo, usar uma técnica asséptica e diluir o inóculo adicionando o volume mínimo exigido (não ultrapassar 1,0 mL) de solução salina estéril a 0,85% para tornar a turvação equivalente a um Padrão de McFarland No. 4. Retirar a quantidade em excesso adicionada ao tubo com uma pipeta esterilizada, de forma a que o volume final do inóculo seja aproximadamente equivalente ao volume original do tubo ( $2,3 \pm 0,15$  mL). A não realização deste procedimento irá provocar um derramamento do inóculo acima da zona negra da base, inutilizando o painel.
5. Pegar numa base e marcar o número da amostra do doente na sua face lateral.
6. Colocar a totalidade do conteúdo do líquido de inóculo na área alvo da base.



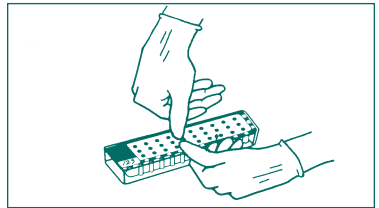
7. Segurar na base suavemente com as mãos e fazer circular suavemente o inóculo ao longo das faixas, até que todos os poços fiquem cheios. Fazer *circular* qualquer líquido em excesso de volta para a área alvo e colocar a base em cima da bancada. Dada as elevadas concentrações de células utilizadas nos painéis **BBL Crystal ANR ID**, o inóculo deverá ser suavemente circulado ao longo das faixas para garantir um enchimento adequado de todos os poços. Certificar-se de que não existe excesso de líquido entre os poços antes de se alinhar a tampa.



8. Alinhar a tampa de forma a que a extremidade marcada da tampa fique por cima da área alvo da base.

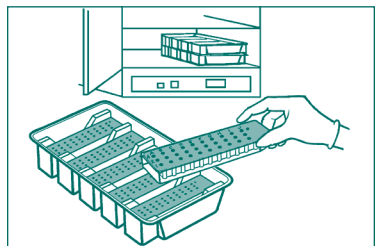


9. Empurrar até sentir uma ligeira resistência. Colocar um polegar de cada lado, na margem da tampa e no sentido da zona média do painel, empurrando simultaneamente para baixo até sentir que a tampa encaixa (deverão ouvir-se dois cliques).



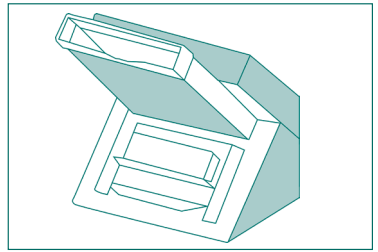
**Placa de Pureza:** Utilizando uma ansa esterilizada, recuperar uma pequena gota do tubo do inóculo antes ou depois de inocular a base, e inocular uma placa de agar ou um tubo de ágar inclinado (qualquer meio não selectivo) para confirmação da pureza. Descartar o tubo de inóculo e a tampa num recipiente de descarte de detritos com potencial risco biológico. Incubar a placa ou o tubo de ágar inclinado durante 24–48 h a 35–37 °C em condições anaeróbias. A placa de pureza ou o tubo de ágar inclinado também podem ser usados para qualquer teste adicional ou serologia, caso se mostre necessário.

**Incubação:** Colocar os painéis inoculados em tabuleiros de incubação. Dez painéis podem ajustar-se num tabuleiro (5 filas de 2 painéis). Todos os painéis deverão ser incubados **virados para baixo** (com as janelas maiores viradas para cima; rótulo virado para baixo), numa incubadora sem CO<sub>2</sub> e com 40 a 60% de **humidade**. Os tabuleiros não deverão ser empilhados em grupos superiores a dois durante a incubação. O tempo de incubação para os painéis é de **4 h** a 35–37 °C. **NOTA:** A porta da incubadora não deverá ser aberta e fechada repetidamente (de preferência menos de 3 vezes) durante o período de incubação.



**Leitura:** Depois do período recomendado de incubação, retirar os painéis da incubadora. Todos os painéis deverão ser lidos **virados para baixo** (com as janelas maiores para cima; rótulo virado para baixo) usando o **BBL Crystal Panel Viewer**. Consultar o quadro da cor da reacção e/ou o Quadro 3 para uma interpretação das reacções. Usar o Caderno de Relatório **BBL Crystal ANR** para registar as reacções.

- Ler primeiro as colunas G a J, usando a fonte de luz regular (branca).
- Ler as colunas A a F (substratos fluorescentes) usando a fonte de luz UV no leitor do painel. Um poço de substrato fluorescente só é considerado positivo quando a intensidade da fluorescência observada nesse poço é superior à do poço do Controlo Negativo (4A).



**Cálculo do Número de Perfil BBL Crystal:** A cada resultado de teste (à excepção do 4A, que é usado como controlo negativo da fluorescência) com uma pontuação positiva é atribuído um valor de 4, 2 ou 1, correspondente à fila em que se localiza o teste. Atribui-se um valor de 0 (zero) a qualquer resultado negativo. De seguida, somam-se os números (valores) resultantes de cada reacção positiva em cada coluna. Produz-se um número com 10 dígitos; este é o número de perfil.

Exemplo:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	*	+	-	-	+	+	+	-	+	-
2	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
1	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
<b>Perfil</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>0</b>

\*(4A) = controlo negativo da fluorescência

**Seleccionar a base de dados de Anaeróbios BBL Crystal adequada do menu disponibilizado. O tipo de placa primária usada para preparar o inóculo vai determinar a base de dados adequada. Para uso com meios Brucella ou Columbia Blood Agar, seleccionar a base de dados de agar de sangue alternativa do menu.**

O número de perfil resultante e os resultados do teste externos (coloração Gram, catalase e indol), deverão ser introduzidos num computador pessoal (PC) que tenha instalado o **BBL Crystal ID System Electronic Codebook**, para se obter a identificação. Também se encontra disponível um livro de codificação manual. Caso não exista um PC disponível, contactar o Serviço de Assistência Técnica da BD Diagnostics para auxílio na identificação.

**Controlo de Qualidade do Utilizador:** Recomendam-se testes de controlo de qualidade para todos os lotes de painéis, da seguinte forma –

- Inocular um painel com *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 em conformidade com o procedimento recomendado (ver "Procedimento de Teste").
- Antes da incubação, deixar o painel permanecer à temperatura ambiente durante 1 min (durante menos de 2 min).
- Ler e registar as reacções com o auxílio do leitor do painel e do quadro de cor da reacção.
- Se qualquer dos poços, à excepção do 1F, se mostrar positivo de acordo com o quadro da cor da reacção (decorridos 1 a 2 min), NÃO USAR OS PAINÉIS deste lote. Contactar o Serviço de Assistência Técnica da BD Diagnostics. (NOTA: O poço 1F [Escosil] deverá ser positivo após rehidratação.)
- Se todos os poços se mostrarem negativos, incubar o painel durante 4 h entre 35 e 37 °C.
- Ler o painel com o leitor do painel e com o quadro da cor da reacção; registar as reacções no Caderno de Relatório.
- Comparar as reacções registadas com as enumeradas no Quadro 4. Se forem obtidos resultados discrepantes, confirmar a pureza da estirpe de controlo de qualidade antes de contactar o Serviço de Assistência Técnica da BD Diagnostics.
- A porta da incubadora não deverá ser aberta e fechada repetidamente (de preferência menos de 3 vezes) durante o período de incubação.

No Quadro 5 mostram-se os resultados esperados do teste para estirpes de controlo de qualidade adicionais.

#### LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O Sistema **BBL Crystal ANR ID** foi concebido para os grupos taxonómicos fornecidos. Grupos diferentes dos enumerados no Quadro 1 não se destinam a ser utilizados neste sistema.

Todas as bases de dados para ID de Anaeróbios **BBL Crystal** foram desenvolvidas com meios **BBL**. A reactividade de alguns substratos em sistemas de identificação rápida poderá depender dos meios originais usados na preparação do inóculo. Recomendamos a utilização dos seguintes meios para uso com o Sistema **BBL Crystal ANR ID**: CDC Anaerobe Blood Agar, Schaedler Agar with Vitamin K<sub>1</sub> and 5% Sheep Blood (Agar de Schaedler com Vitamina K<sub>1</sub> e 5% de Sangue de Ovelha), Columbia Agar with 5% Sheep Blood (Agar Columbia com 5% de Sangue de Ovelha) e Brucella Blood Agar with Hemin and Vitamin K<sub>1</sub> (Agar de Sangue para Brucella com Hemin e Vitamina K<sub>1</sub>) (ver "Disponibilidade").

Os Sistemas de Identificação **BBL Crystal** utilizam um micro-ambiente modificado; assim, os valores esperados para cada um dos testes podem diferir das informações anteriormente estabelecidas com as reacções de teste convencionais. A precisão do Sistema **BBL Crystal ANR ID** baseia-se no uso estatístico de testes especialmente concebidos e numa base de dados exclusiva.

Embora o Sistema **BBL Crystal ANR ID** ajude na diferenciação de microrganismos, convém reconhecer que poderão existir pequenas variações entre estirpes de uma mesma espécie. A utilização dos painéis e a interpretação dos resultados requer um microbiologista competente. A identificação final do isolado deverá tomar em consideração a origem da amostra, tolerância ao ar, morfologia celular, características das colónias em vários meios e os produtos de degradação metabólica conforme determinados por cromatografia de gás-líquido, sempre que se considerar necessário.

#### Quadro 4

#### Quadro de Controle de Qualidade para o Sistema BBL Crystal ANR ID\*

Localização no Painel	Tampão	Código	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285
4A	Controle negativo da fluorescência	FCT	–
2A	L-arginina-AMC	FAR	V
1A	L-histidina-AMC	FHI	–
4B	4MU- $\alpha$ -D-manósido	FAM	V <sup>1</sup>
2B	L-serina-AMC	FSE	–
1B	L-isoleucina-AMC	FIS	–
4C	4MU- $\beta$ -D-manósido	FBM	+
2C	Glicina-AMC	FGL	–
1C	L-alanina-AMC	FAL	V
4D	4MU-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida	FGA	+
2D	L-ácido piroglutâmico-AMC	FPY	V <sup>1,11</sup>
1D	L-lisina-AMC	FLY	V
4E	L-metionina-AMC	FME	V
2E	4MU- $\beta$ -D-celobiopiranósido	FCE	+
1E	4MU- $\beta$ -D-xilósido	FXY	V <sup>1</sup>
4F	L-fenilalanina-AMC	FPH	V
2F	L-leucina-AMC	FLE	+
1F	Escosil	FSC	– <sup>3,4,10</sup>
4G	Dissacárido	DIS	+
2G	Furanose	FUR	+
1G	Piranose	PYO	+ <sup>1</sup>
4H	p-n-p- $\alpha$ -D-galactósido	AGA	+
2H	p-n-p- $\beta$ -D-galactósido	NPG	+
1H	p-n-p-fosfato	PHO	+
4I	p-n-p- $\alpha$ -D-glucósido	AGL	+
2I	p-n-p-N-acetil-glucosaminida	NAG	+
1I	L-prolina-p-nitroanilido	PRO	–
4J	p-n-p- $\alpha$ -L-fucósido	AFU	+
2J	p-n-p- $\beta$ -D-glucósido	BGL	+
1J	L-alanil-L-alanina-p-nitroanilido	ALA	+

1 = Negativo do **BBL** Schaedler

2 = Positivo do **BBL** Schaedler

3 = Variável do **BBL** Schaedler

4 = Negativo do **BBL** Brucella

5 = Positivo do **BBL** Brucella

6 = Variável do **BBL** Brucella

7 = Negativo do **BBL** Columbia

8 = Positivo do **BBL** Columbia

9 = Variável do **BBL** Columbia

**Quadro 5**

**Estirpes de Controlo de Qualidade Adicionais para o Sistema BBL Crystal ANR ID**

Localização no Painel	Tampão	Código	<i>Bacteroides distasonis</i> ATCC 8503	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> ATCC 29743	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 27725
4A	Controlo negativo da fluorescência	FCT	–	–	–	–
2A	L-arginina-AMC	FAR	+	+	+	– 4,10
1A	L-histidina-AMC	FHI	V	+	+3	–
4B	4MU-α-D-manósido	FAM	+	–	–	–
2B	L-serina-AMC	FSE	–	–	+3	–
1B	L-isoleucina-AMC	FIS	– 4	–	+	–
4C	4MU-β-D-manósido	FBM	+10	–	–	–
2C	Glicina-AMC	FGL	V <sup>1,12</sup>	V <sup>1</sup>	V <sup>2</sup>	–
1C	L-alanina-AMC	FAL	+	V <sup>1</sup>	+	–
4D	4MU-N-acetil-β-D-galactosaminida	FGA	+	–	–	–
2D	L-ácido piroglutâmico-AMC	FPY	V <sup>1,12</sup>	–	V <sup>11,24</sup>	+
1D	L-lisina-AMC	FLY	V <sup>2,12,15</sup>	+	+	–
4E	L-metionina-AMC	FME	+	+4,10	+	V
2E	4MU-β-D-celobipiranósido	FCE	V <sup>12</sup>	–	+	–
1E	4MU-β-D-xilósido	FXY	+10	–	–	–
4F	L-fenilalanina-AMC	FPH	V <sup>12</sup>	V	+	–
2F	L-leucina-AMC	FLE	+	+10	+	V
1F	Escosil	FSC	V	V <sup>2,15</sup>	–3,4,10	V <sup>15</sup>
4G	Dissacárido	DIS	+	–	+3,10,24	–
2G	Furanose	FUR	+	–	+	V
1G	Piranoose	PYO	+	–	+10	+
4H	p-n-p-α-D-galactósido	AGA	+	–	+3,4,10	–
2H	p-n-p-β-D-galactósido	NGP	+	–	+3,4,10	–
1H	p-n-p-fosfato	PHO	+	–	–	–
4I	p-n-p-α-D-glucósido	AGL	+	–	V <sup>1</sup>	–
2I	p-n-p-N-acetil-glucosaminida	NAG	+	–	V <sup>12,15</sup>	–
1I	L-prolina-p-nitroanilido	PRO	–	–	V	–
4J	p-n-p-α-L-fucósido	AFU	–	–	–	–
2J	p-n-p-β-D-glucósido	BGL	+	–	+	–
1J	L-alanil-L-alanina-p-nitroanilido	ALA	+	–	V	–

\*Os resultados apresentados estão previstos quando se usa **BBL** CDC Anaerobe Agar with 5% sheep blood (Agar para Anaeróbios do CDC com 5% de sangue de ovelha **BBL**).

Na preparação da suspensão do inóculo deverão utilizar-se apenas zaragatoas com aplicador dotado de uma ponta de algodão, hastes com aplicador de madeira ou ansas de plástico descartáveis, dado que algumas zaragatoas de poliéster podem fazer com que o líquido de inóculo se torne viscoso. Tal poderá originar uma quantidade de líquido de inóculo insuficiente para encher os poços. Após remoção das tampas dos sacos selados, estas devem ser usadas dentro de 1 h, para se garantir um desempenho adequado. A cobertura de plástico deverá permanecer na tampa até esta ser usada.

A incubadora onde se colocam os painéis deverá estar humedecida para impedir a evaporação do líquido de inóculo dos poços durante a incubação. O nível de humidade recomendado é de 40 a 60%.

Após a inoculação, os painéis deverão ser incubados **virados para baixo** (com as janelas maiores viradas para cima; rótulo virado para baixo), para maximizar a eficácia dos substratos.

As colónias deverão ser colhidas de placas de agar de sangue **não selectivas** tal como as **BBL** CDC Anaerobe, Brucella, Columbia, and Schaedler (Anaeróbios do CDC **BBL**, para Brucella, Columbia e Schaedler) (ver “Disponibilidade”).

Se o perfil de teste **BBL Crystal** produzir um resultado “Não identificado” e se a pureza da cultura foi confirmada, é provável que (i) o isolado de teste esteja a *produzir reações atípicas BBL Crystal* (que também podem ser originadas por erros cometidos durante o procedimento), (ii) a espécie em teste não faça parte dos grupos contemplados ou (iii) o sistema seja incapaz de identificar o isolado de teste com o nível de confiança exigido. Caso se exclua a existência de erros cometidos pelo utilizador, recomenda-se a utilização de métodos de teste convencionais.

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

**Reprodutibilidade:** Num estudo externo envolvendo quatro laboratórios clínicos, (num total de cinco avaliações), procedeu-se ao estudo da reprodutibilidade das reacções do substrato **BBL Crystal ANR ID (29)** recorrendo a um teste de réplicas. A reprodutibilidade das reacções de substrato individuais variou entre 96,2% e 100%. A reprodutibilidade global do painel de **BBL Crystal ANR** foi determinada como sendo de 99,1%.<sup>25</sup>

**Precisão de Identificação:** Procedeu-se à comparação entre o desempenho do Sistema **BBL Crystal ANR ID** e o de sistemas actualmente disponíveis no mercado, bem como o de métodos de identificação de referência, com base em recomendações Laboratoriais de VA Wadsworth e utilizando isolados clínicos e culturas. Efectuou-se um total de cinco estudos em quatro laboratórios independentes. Utilizaram-se isolados frescos de rotina que chegaram ao laboratório clínico, bem como isolados previamente identificados, à escolha dos locais de ensaio clínico, com o objectivo de estabelecer as características de desempenho.

De um total de 633 isolados que foram testados nos cinco estudos, 588 (93%) foram correctamente identificados (incluindo isolados exigindo testes suplementares) mediante a utilização do Sistema de Identificação de ANR **BBL Crystal**. Um total de 36 (6%) isolados foram incorrectamente identificados, tendo-se obtido uma mensagem de "Não Identificado" em 9 (1%) isolados.<sup>25</sup>

## DISPONIBILIDADE

N.º de Cat.	Descrição	N.º de Cat.	Descrição
245010	<b>BBL Crystal</b> Anaerobe ID Kit, contendo 20 de cada: <b>BBL Crystal</b> Anaerobe ID Panel Lids, <b>BBL Crystal</b> Bases e <b>BBL Crystal</b> Anaerobe ID Inoculum Fluid.	221734	<b>BBL</b> CDC Anaerobe Blood Agar with 5% Sheep Blood, caixa de 100 placas.
245038	<b>BBL Crystal</b> ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid, caixa de 10.	221539	<b>BBL</b> Schaedler Agar with Vitamin K <sub>1</sub> and 5% Sheep Blood, embalagem de 20.
245031	<b>BBL Crystal</b> Panel Viewer, Modelo doméstico, 110 V, 60 Hz.	221540	<b>BBL</b> Schaedler Agar with Vitamin K <sub>1</sub> and 5% Sheep Blood, caixa de 100.
245032	<b>BBL Crystal</b> Panel Viewer, Modelo europeu, 220 V, 50 Hz.	221165	<b>BBL</b> Columbia Agar with 5% Sheep Blood, embalagem de 20.
245033	<b>BBL Crystal</b> Panel Viewer, Modelo japonês, 100 V, 50/60 Hz.	221263	<b>BBL</b> Columbia Agar with 5% Sheep Blood, caixa de 100.
245034	<b>BBL Crystal</b> Panel Viewer ongwave UV Tube.	297848	<b>BBL</b> Brucella Blood Agar with Hemin and Vitamin K <sub>1</sub> , embalagem de 20.
245036	<b>BBL Crystal</b> Panel Viewer White Light Tube.	297716	<b>BBL</b> Brucella Blood Agar with Hemin and Vitamin K <sub>1</sub> , caixa de 100.
245011	<b>BBL Crystal</b> Identification Systems Anaerobe Manual Codebook.	261187	<b>BBL</b> DMACA Indole Reagent Droppers, caixa de 50.
221733	<b>BBL</b> CDC Anaerobe Blood Agar with 5% Sheep Blood, embalagem de 20 placas.	212539	<b>BBL</b> Gram Stain Kit, embalagem de 4 frascos de 250 mL cada.

**BIBLIOGRAFIA :** Consulte "References" no texto em Inglês.

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

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.  
Importado e Distribuído no Brasil por:  
Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda  
Rua Cyro Correia Pereira 550, Curitiba – Paraná-Brasil  
CNPJ 21.551.379/0013-31  
Serviço de Suporte Técnico (11) 5185-9961  
Registro ANVISA nº 10033430207  
Centro de Relacionamento com o Cliente: 0800 0555654

# BD Sistemas de Identificación BBL Crystal

## Equipo para la identificación de anaerobios

Español

### USO PREVISTO

El sistema **BBL Crystal** para la identificación (ID) de anaerobios (ANR) es un método de identificación en miniatura que utiliza substratos convencionales, fluorogénicos y cromogénicos modificados. Se ha diseñado para la identificación de bacterias anaerobias aisladas frecuentemente de muestras clínicas.<sup>1-9</sup>

### RESUMEN Y EXPLICACION

Ya en 1918 había informes sobre métodos micrométricos para la identificación bioquímica de microorganismos.<sup>10</sup> Varias publicaciones han incluido estudios sobre el uso de discos de papel impregnados de reactivos y métodos con microtubos para diferenciar las bacterias entéricas.<sup>10-14</sup> El interés en diseñar sistemas de identificación en miniatura llevó a la introducción de varios sistemas comerciales en los últimos años de la década de 1960, con las ventajas de menor espacio necesario para el almace- namiento, extensión de la fecha de caducidad, control de calidad uniforme y facilidad de uso.

En general, varios de los procedimientos de análisis usados en los sistemas **BBL Crystal** ID son modificaciones de métodos clásicos, incluyendo pruebas para la fermentación, la oxidación, la degradación y la hidrólisis de varios substratos. Además, hay substratos ligados a cromógenos y fluorógenos, como en el panel **BBL Crystal** ANR ID, para la detección de enzimas que son utilizadas por los microbios para metabolizar varios substratos.<sup>12,15-22</sup>

El sistema **BBL Crystal** ANR ID incluye (i) tapas **BBL Crystal** ANR ID, (ii) bases **BBL Crystal** y (iii) tubos **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID de fluido de inóculo (IF)ID . La tapa contiene 29 substratos deshidratados y un control fluorescente en las puntas de púas de plástico. La base tiene 30 pocillos para las reacciones. El inóculo de la prueba se prepara con el fluido de inóculo y se utiliza para llenar los 30 pocillos en la base. Cuando la tapa se alinea con la base, y luego se cierra, el inóculo de la prueba rehidrata los substratos secos e inicia las reacciones de las pruebas.

Después de un período de incubación, se examinan los pocillos para determinar cambios de color o presencia de fluorescencia que resultan de las actividades metabólicas de los microorganismos. La serie de colores resultante de las 29 reacciones se convierte en un número de perfil de diez dígitos que se utiliza como la base de identificación.<sup>23</sup> Las series de reacciones bioquímicas y enzimáticas de los 29 substratos **BBL Crystal** ANR ID para una gran variedad de microorganismos están almacenados en la base de datos **BBL Crystal** ANR ID. La identificación se deriva de un análisis comparativo entre las series de reacciones del aislado de la prueba y las de la base de datos. La Tabla 1 muestra la lista de grupos taxonómicos que comprende la base de datos actual.

### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los paneles del sistema **BBL Crystal** ANR ID contienen 29 substratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados. Para rehidratar los substratos se utiliza una suspensión de bacterias en el fluido de inóculo. Las pruebas usadas en el sistema se basan en la utilización y degradación microbiana de substratos específicos detectados por varios sistemas indicadores. La hidrólisis enzimática de los substratos fluorogénicos que contienen derivados cumarínicos del 4-metil-umbeliferona (4MU) o del 7-amino-4-metilcumarín (7-AMC) resulta en un aumento de la fluorescencia que se detecta fácilmente a simple vista<sup>15-19</sup> con una lámpara de luz ultravioleta.<sup>19-21</sup> Los substratos cromogénicos, después de sufrir hidrólisis, producen cambios de color que pueden detectarse visualmente. Además, hay pruebas que detectan la capacidad de un organismo de hidrolizar, degradar, reducir o de alguna forma utilizar un substrato en el sistema **BBL Crystal** ID.

Las reacciones de varios de los substratos y una breve explicación de los principios usados en el sistema se describen en la Tabla 2. El lugar del panel en dichas tablas indica el renglón y la columna donde se encuentra el pocillo (por ejemplo: 1J indica el renglón 1 en la columna J).



**Tabla1**  
**Grupos taxonómicos en el sistema BBL Crystal ANR ID**

<b>Bacilos Gram negativos</b>		
<b>Tolerantes a la bilis</b>	<b>No pigmentados, sensibles a la bilis</b>	<b>No pigmentados, con depresiones</b>
Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>B. caccae</i>	<i>P. bivia</i>	<i>B. ureolyticus</i>
Grupo <i>B. distasonis</i> <sup>10</sup>	<i>P. buccae</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>B. eggerthii</i>	<i>P. buccalis</i>	<i>C. gracilis</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>P. disiens</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>B. ovatus</i>	<i>P. oralis</i>	<i>F. gonidiaformans</i> <sup>1,11</sup>
<i>B. stercoris</i>	<i>P. oris</i>	<i>F. mortiferum</i>
<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>P. veroralis</i> <sup>11</sup>	<i>F. necrophorum</i>
<i>B. uniformis</i>		<i>F. nucleatum</i>
<i>B. vulgatus</i>	<b>No pigmentados, sin depresiones</b>	<i>F. russii</i>
<b>Otros:</b>	<i>Bacteroides</i>	<i>F. varium</i>
<i>B. splanchnicus</i>	<i>B. capillosus</i>	<i>C. leptotrichia</i>
<i>Porphyromonas levii</i> <sup>11</sup>	<i>Tissierella</i>	<i>L. buccalis</i>
<b>Pigmentados, sensibles a la bilis</b>	<i>T. praeacuta</i>	
Especies <i>Capnocytophaga</i>	<b>No pigmentados, tolerantes a la bilis</b>	
<b>Prevotella</b>	<i>Bilophila</i>	
<i>P. corporis</i>	<i>B. wadsworthia</i>	
<i>P. denticola</i>	<i>Desulfomonas</i>	
<i>P. intermedia</i>	<i>D. pigra</i>	
<i>P. loescheii</i>	Especie <i>Desulfovibrio</i>	
<i>P. melaninogenica</i>	<i>Campylobacter</i>	
<b>Porphyromonas</b>	<i>C. curvus/rectus</i>	
<i>P. asaccharolytica</i>		
<i>P. endodontalis</i>		
<i>P. gingivalis</i>		

Referencia: 1 = Grupo taxonómico en la base de datos **BBL Crystal**, **BBL** Schaedler solamente.

2 = Grupo taxonómico en la base de datos **BBL Crystal**, **BBL** Schaedler y agar de sangre alternado **BBL Crystal** solamente.

3 = Incluye *B. distasonis* y *B. merdae*.

4 = Estos grupos taxonómicos tienen <10 perfiles **BBL Crystal** únicos en su género en la base de datos actual.

<b>Clostridia</b>	<b>Bacilos Gram positivos no formadores de esporas</b>	<b>Cocos Gram positivos</b>
<b>Clostridium</b>	<b>Actinomyces</b>	<b>Gemella</b>
<i>C. baratii</i>	<i>A. bovis</i>	<i>G. morbillorum</i>
<i>C. beijerinckii</i>	<i>A. israelii</i>	<b>Peptostreptococcus</b>
<i>C. bifermentans</i>	<i>A. meyeri</i>	<i>P. anaerobius</i>
<i>C. botulinum</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>P. asaccharolyticus</i>
<i>C. butyricum</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>P. indolicus</i>
<i>C. cadaveris</i>	<i>A. pyogenes</i>	<i>P. magnus</i>
<i>C. clostridioforme</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>P. micros</i>
<i>C. difficile</i>	<b>Atopobium</b>	<i>P. prevotii</i>
<i>C. glycolicum</i>	<i>A. minutum</i>	<i>P. tetradius</i>
<i>C. hastiforme</i>	<b>Bifidobacterium</b>	<b>Ruminococcus</b>
<i>C. histolyticum</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>R. productus</i> <sup>11</sup>
<i>C. innocuum</i>	<i>B. dentium</i>	<b>Staphylococcus</b>
<i>C. limosum</i>	<i>B. Spezies</i>	<i>S. saccharolyticus</i>
<i>C. novyi A</i>	<b>Eubacterium</b>	<b>Streptococcus</b>
<i>C. paraputrificum</i> <sup>11</sup>	<i>E. aerofaciens</i>	<i>S. constellatus</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>E. lentum</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>C. putrificum</i> <sup>1</sup>	<i>E. limosum</i>	<b>Cocos Gram negativos</b>
<i>C. ramosum</i>	<b>Mobiluncus</b>	Especies <i>Veillonella</i>
<i>C. septicum</i>	<i>M. curtisii</i>	
<i>C. sordellii</i>	<i>M. mulieris</i>	
<i>C. sphenoides</i>	<i>M. Especies</i> <sup>2,11</sup>	
<i>C. sporogenes</i>	<b>Propionibacterium</b>	
<i>C. subterminale</i>	<i>P. acnes</i>	
<i>C. tertium</i>	<i>P. avidum</i>	
<i>C. tetani</i> <sup>4</sup>	<i>P. granulosum</i> <sup>4</sup>	
	<i>P. propionicum</i>	
	<b>Lactobacillus</b>	
	<i>L. acidophilus</i>	
	<i>L. casei</i>	
	<i>L. catenaforme</i>	
	<i>L. fermentum</i>	
	<i>L. jensenii</i>	
	<i>L. johnsonii</i>	
	<i>L. rhamnosus</i>	

**Tabla 2**

**Principios de las pruebas usadas en el sistema BBL Crystal ANR ID**

Posición en el panel	Característica de la prueba	Código	Principio (Referencia)
4A	Control fluorescente negativo	FCT	Control para estandarizar los resultados del sustrato fluorescente.
2A	L-arginina-AMC	FAR	La hidrólisis enzimática de la amida o del enlace glucosídico resulta en la producción de un derivado cumarínico fluorescente. <sup>19-21</sup>
1A	L-histidina-AMC	FHI	
4B	4MU- $\alpha$ -D-manósido	FAM	
2B	L-serina-AMC	FSE	
1B	L-isoleucina-AMC	FIS	
4C	4MU- $\beta$ -D-manósido	FBM	
2C	Glicina-AMC	FGL	
1C	L-alanina-AMC	FAL	
4D	4MU-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida	FGA	
2D	L-ácido piroglutámico-AMC	FPY	
1D	L-lisina-AMC	FLY	
4E	L-metionina-AMC	FME	
2E	4MU- $\beta$ -D-celobiopiranosido	FCE	
1E	4MU- $\beta$ -D-xilosida	FXY	
4F	L-fenilalanina-AMC	FPH	
2F	L-leucina-AMC	FLE	
1F	Escosilo	FSC	La hidrólisis del enlace glucosídico resulta en la producción de una esculetina no fluorescente. <sup>22</sup>
4G	Disacárido	DIS	La utilización de carbohidratos resulta en una caída del pH y un cambio en el indicador (rojo de fenol). <sup>1,2,11,12</sup>
2G	Furanosa	FUR	
1G	Píranosa	PYO	
4H	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactósido	AGA	La hidrólisis enzimática del glucósido arilo sustituido incoloro resulta en un p-nitrofenol amarillo. <sup>15-19</sup>
2H	p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido	NPG	
1H	p-nitrofenil-fosfato	PHO	
4I	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucósido	AGL	
2I	p-nitrofenil-N-acetil-glucosaminida	NAG	
1I	L-prolina-p-nitroanilida	PRO	La hidrólisis enzimática de un sustrato amida incoloro resulta en una p-nitroanilina amarilla. <sup>15-19</sup>
4J	p-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucósido	AFU	La hidrólisis enzimática de un glucósido arilo sustituido incoloro resulta en un p-nitrofenol amarillo. <sup>15-19</sup>
2J	p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucósido	BGL	
1J	L-alanil-L-alanina-p-nitroanilida	ALA	La hidrólisis enzimática de un sustrato amida incoloro resulta en una p-nitroanilina amarilla. <sup>15-19</sup>

## REACTIVOS

El panel **BBL Crystal ANR ID** contiene 29 substratos enzimáticos y bioquímicos. Vea la tabla a continuación para la lista de los ingredientes activos.

**Tabla 3**

### Reactivos usados en el sistema BBL Crystal ANR ID

Posición en el panel	Substrato	Código	Pos.	Neg.	Ingredientes activos	Cantidad aprox. (g/L)
4A	Control fluorescent e negativo	FCT	n/a	n/a	Derivado cumarínico fluorescente	≤ 1
2A	L-arginina-AMC	FAR	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	L-arginina-AMC	≤ 1
1A	L-histidina-AMC	FHI	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	L-histidina-AMC	≤ 1
4B	4MU-α-D-manósido	FAM	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	4MU-α-D-manósido	≤ 1
2B	L-serina-AMC	FSE	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	L-serina-AMC	≤ 1
1B	L-isoleucina-AMC	FIS	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	L-isoleucina-AMC	≤ 1
4C	4MU-β-D-manósido	FBM	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	4MU-β-D-manósido	≤ 1
2C	Glicina-AMC	FGL	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	Glicina-AMC	≤ 1
1C	L-alanina-AMC	FAL	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	L-alanina-AMC	≤ 1
4D	4MU-N-acetil-β-D-galactosaminida	FGA	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	4MU-N-acetil-β-D-galactosaminida	≤ 1
2D	L-ácido piroglutámico-AMC	FPY	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	L-ácido piroglutámico-AMC	≤ 1
1D	L-lisina-AMC	FLY	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	L-lisina-AMC	≤ 1
4E	L-metionina-AMC	FME	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	L-metionina-AMC	≤ 1
2E	4MU-β-D-celobipiranosido	FCE	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	4MU-β-D-celobipiranosido	≤ 1
1E	4MU-β-D-xilosida	FXY	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	4MU-β-D-xilosida	≤ 1
4F	L-fenilalanina-AMC	FPH	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	L-fenilalanina-AMC	≤ 1
2F	L-leucina-AMC	FLE	Fluorescencia azul > Pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ Pocillo FCT	L-leucina-AMC	≤ 1
1F	Escosil*	FSC	Fluorescencia azul/verde > Pocillo FCT	Fluorescencia azul/verde ≤ Pocillo FCT	Escosil	≤ 1
4G	Disacárido	DIS	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	Disacárido	≤ 300
2G	Furanosa	FUR	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	Furanosa	≤ 300
1G	Piranososa	PYO	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	Piranososa	≤ 300
4H	p-nitrofenil-α-D-galactósido	AGA	Amarillo	Incoloro	p-nitrofenil-α-D-galactósido	≤ 7
2H	p-nitrofenil-β-D-galactósido	NPG	Amarillo	Incoloro	p-nitrofenil-β-D-galactósido	≤ 7
1H	p-nitrofenil-fosfato	PHO	Amarillo	Incoloro	p-nitrofenil-fosfato	≤ 7
4I	p-nitrofenil-α-D-glucósido	AGL	Amarillo	Incoloro	p-nitrofenil-α-D-glucósido	≤ 7
2I	p-nitrofenil-N-acetil-glucosaminida	NAG	Amarillo	Incoloro	p-nitrofenil-N-acetil-glucosaminida	≤ 7
1I	L-prolina-p-nitroanilida	PRO	Amarillo	Incoloro	L-prolina-p-nitroanilida	≤ 7
4J	p-nitrofenil-α-L-fucósido	AFU	Amarillo	Incoloro	p-nitrofenil-α-L-fucósido	≤ 7
2J	p-nitrofenil-β-D-glucósido	BGL	Amarillo	Incoloro	p-nitrofenil-β-D-glucósido	≤ 7
1J	L-alanil-L-alanina-p-nitroanilida	ALA	Amarillo	Incoloro	L-alanil-L-alanina-p-nitroanilida	≤ 7

\*El substrato escosil es fluorescente en la forma no hidrolizada. Cuando la enzima está presente se observa una reducción en la fluorescencia

### Precauciones: **DIAGNÓSTICO** *in vitro*

Después de usarse, todos los materiales infecciosos incluyendo las placas, las torundas de algodón, los tubos de inóculo, los papeles de filtro usados en las pruebas de indol y los paneles deben esterilizarse en autoclave antes de desecharse o incinerarse.

### ALMACENAMIENTO Y MANEJO/VIDA UTIL

**Tapas:** Las tapas están envueltas individualmente y deben almacenarse cerradas en un refrigerador entre 2 – 8 °C. **NO DEBEN CONGELARSE.** Inspeccione en forma visual el paquete para detectar agujeros o roturas en la envoltura de papel de aluminio. No deben usarse si la envoltura parece estar dañada. Las tapas conservarán la reactividad esperada hasta la fecha de caducidad si se almacenan en el paquete original de acuerdo con las recomendaciones.

**Bases:** Las bases están envasadas en dos grupos de diez en las bandejas de incubación **BBL Crystal**. Las bases están apiladas boca abajo para reducir al mínimo la posibilidad de contaminación por el aire. Almacene en un ligar libre de polvo entre 2 – 25 °C hasta el momento de usarse. Almacene las bases sin usar en la bandeja, en una bolsa de plástico. Las bandejas vacías deben usarse para incubar los paneles.

**Fluido de inóculo:** El fluido de inóculo (FI) del sistema **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID** está envasado en dos grupos de diez tubos cada uno. Inspecciones visualmente los tubos para detectar roturas, fugas, etc. No deben usarse si se encuentran fugas, daños en los tubos o las tapas o si hay indicios evidentes de contaminación (por ejemplo, fluido brumoso o turbio). Almacene los tubos entre 2 – 25 °C. La fecha de caducidad está en la etiqueta del tubo. Solamente el fluido de inóculo **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID** puede usarse con los paneles del sistema **BBL Crystal ANR**.

Al recibirse, el sistema **BBL Crystal ANR** debe almacenarse entre 2 – 8 °C. Una vez abierto, solamente deben almacenarse las tapas entre 2 – 8 °C. El resto de los componentes del sistema pueden almacenarse entre 2 – 25 °C. Si se ha almacenado el sistema o cualquiera de sus componentes en un refrigerador, espere a que estén a temperatura ambiente antes de usarlos.

### RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Los sistemas **BBL Crystal ID** **no** deben utilizarse directamente con muestras clínicas. Utilice aislados de un medio no selectivo de agar de sangre como el agar de sangre para anaerobios CDC, agar de sangre Brucella, agar de sangre Columbia o agar de sangre Schaedler. El aislado para la prueba debe ser un cultivo puro de no más de 24 – 48 h para la mayoría de los géneros; cultivos prolongados son aceptables para algunos cocos de crecimiento lento (hasta 72 h) y especies de *Actinomyces* (72 – 96 h). Solamente deben usarse torundas con puntas de algodón para preparar la suspensión de inóculo, ya que las torundas de poliéster pueden causar problemas en la inoculación de los paneles. (Ver "Limitaciones del procedimiento"). Las tapas deben utilizarse dentro de 1 h una vez retiradas de los envoltorios sellados con el fin de asegurar un rendimiento apropiado. La cubierta de plástico debe permanecer en la tapa hasta que se vaya a utilizar.

La incubadora utilizada debe ser humidificada para impedir la evaporación del fluido de los pocillos durante la incubación. La humedad relativa recomendada es del 40 – 60%. La utilidad de los sistemas **BBL Crystal ID** o cualquier otro procedimiento de diagnóstico a usarse con una muestra clínica está directamente afectado por la calidad de las mismas muestras. Se recomienda firmemente que los laboratorios utilicen los métodos discutidos en el *Manual of Clinical Microbiology* para recoger las muestras, transportarlas y sembrarlas en medios de aislamiento primario.<sup>1</sup> Otras lecturas recomendadas referentes al manejo de muestras de anaerobios incluyen *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*<sup>2</sup> y *Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology*.<sup>3</sup>

### PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

**Materiales suministrados:** Equipo **BBL Crystal ANR ID** –

20 tapas del panel **BBL Crystal ANR ID**,

20 bases **BBL Crystal**,

20 tubos **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID** de fluido de inóculo. Cada tubo contiene aproximadamente 2,3 ± 0,15 mL de fluido de inóculo con la siguiente fórmula: KCl 7,5 g, CaCl<sub>2</sub> 0,5 g, Tricina N-[2-hidroxi-1, 1-bis (hidroximetil)metil] glicina 0,895 g, agua purificada a 1000 mL.

2 bandejas de incubación,

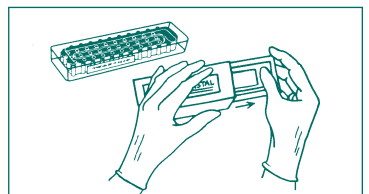
1 bloc de informes **BBL Crystal ANR ID**.

**Materiales no suministrados:** Torundas estériles de algodón (*no use torundas de poliéster*), incubadora (35 – 37° C) sin CO<sub>2</sub> (40 – 60% de humedad relativa), patrones McFarland N° 4 y N° 5, visor para paneles **BBL Crystal**, Libro electrónico de códigos para los sistemas **BBL Crystal ID** o Libro de códigos manual **BBL Crystal ANR**, cuentagotas del reactivo de indol **BBL DMACA**, placas de cultivo no selectivo y reactivo de la catalasa.

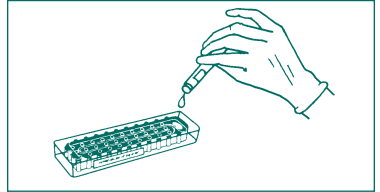
También son necesarios el equipo y material de laboratorio utilizado en la preparación, almacenamiento y manipulación de las muestras clínicas.

**Procedimiento de la prueba:** El sistema **BBL Crystal ANR ID** requiere los resultados de la tinción Gram y de las pruebas de la catalasa y del indol. Antes de preparar los paneles, deberán hacerse las pruebas de la catalasa y del indol. La prueba del indol debe hacerse de acuerdo con las instrucciones suministradas en el prospecto del paquete. Para la prueba de la catalasa, se recomienda usar una solución al 15,0% de peróxido de hidrógeno con Tween 80 al 1,0%.<sup>9,24</sup>

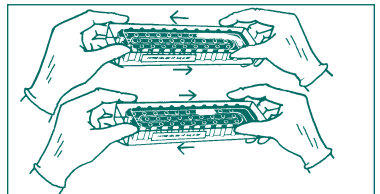
1. Saque las tapas de la envoltura. Deseche el desecante. Una vez sacadas de la envoltura, las tapas cubiertas deben usarse dentro de 1 h. No utilizar el panel si no hay desecante en la envoltura.
2. Tome un tubo de fluido de inóculo y anote el número de la muestra del paciente en la etiqueta. Usando una técnica aseptica, levante con la punta de una torunda de algodón estéril (*no use torundas de poliéster*) o con un palillo de madera o un asa plástica desechable varias colonias de la misma morfología de uno de los medios recomendados (vea la sección "Recogida y tratamiento de las muestras").



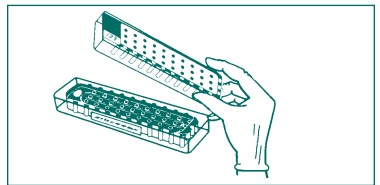
3. Ponga las colonias en suspensión en un tubo **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID** de fluido de inóculo.
4. Vuelva a tapar el tubo y agite en un vórtex por 10 a 15 seg. La turbidez deberá ser equivalente a un patrón McFarland N° 4 (sin superar el patrón McFarland N° 5). Si la concentración del inóculo es mayor que el patrón McFarland recomendado, se recomienda seguir uno de los siguientes pasos:
  - a. Con un tubo de fluido de inóculo nuevo, prepare un nuevo inóculo equivalente a un patrón McFarland N° 4.
  - b. Si no hay más colonias disponibles para preparar un inóculo nuevo, utilizando técnicas asépticas diluya el inóculo agregando el mínimo volumen necesario (sin exceder 1,0 mL) de solución salina al 0,85% para reducir la turbidez a la del patrón McFarland N° 4. Utilizando una pipeta estéril, quite el volumen de inóculo sobrante que se ha agregado de modo que el volumen final sea aproximadamente igual al volumen original en el tubo ( $2,3 \text{ mL} \pm 0,15 \text{ mL}$ ). De no hacer esto, el inóculo se derramará por la parte negra de la base, haciendo inutilizable el panel.
5. Tome una base y anote el número del paciente en el costado.
6. Vierta todo el contenido del fluido de inóculo en el área demarcada de la base.



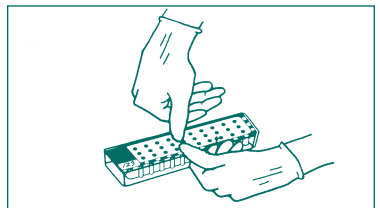
7. Tome la base con ambas manos, balanceándola suavemente hasta que los pocillos se llenen con el inóculo. Balancee la base *nuevamente* para escurrir el exceso de líquido de vuelta al área demarcada, y ponga la base sobre la mesa. Debido a las altas concentraciones de células en los paneles **BBL Crystal ANR ID**, se deberá balancear lentamente el inóculo a lo largo de las bases para asegurarse el relleno completo de los pocillos. Asegúrese de que no hay exceso de líquido entre los pocillos antes de colocar la tapa.



8. Alinee la tapa de modo que el extremo donde se encuentra la inscripción esté sobre el área demarcada de la base.

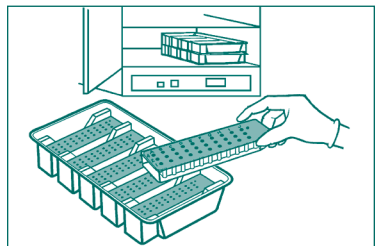


9. Presione hacia abajo hasta sentir una leve resistencia. Ponga los pulgares a cada lado del borde de la tapa en el medio del panel y presione hacia abajo simultáneamente hasta que la tapa se asiente en su lugar (se escucharán dos "golpecitos").

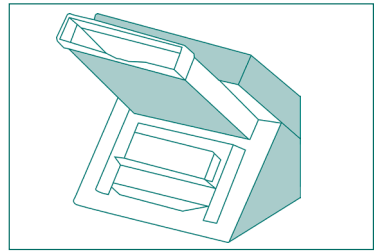


**Prueba de cultivo puro:** Para determinar la pureza del cultivo, extraiga una pequeña gota del tubo de inóculo con un alambre estéril, antes o después de inocular la base, e inóculen un tubo de agar inclinado o una placa (cualquier medio de cultivo no selectivo). Deseche el tubo del inóculo con su tapón en el recipiente para desechos biopeligrosos. Incube el tubo de agar inclinado o placa durante 24 – 48 h a una temperatura de 35 – 37 °C bajo condiciones anaerobias. Este cultivo también puede utilizarse para cualquier prueba suplementaria o en serología, si fuese necesario.

**Incubación:** Ponga los paneles inoculados en bandejas de incubación. Se pueden poner diez paneles en una bandeja (5 filas de 2 paneles). Todos los paneles deben incubarse **boca abajo** (ventana grande hacia arriba; etiqueta hacia abajo) en una incubadora sin CO<sub>2</sub> con 40 – 60% de **humedad relativa**. No deben apilarse más de dos bandejas durante la incubación. El tiempo de incubación para los paneles es de **4 h** a una temperatura de 35 – 37 °C. **NOTA:** la incubadora no debe abrirse continuamente durante el período de incubación (es preferible que se abra menos de 3 veces).



**Lectura:** Después del período de incubación recomendado, saque los paneles de la incubadora. Todos los paneles deben leerse **boca abajo** (ventana grande hacia arriba; etiqueta hacia abajo) usando el visor para paneles **BBL Crystal**. Consulte la plantilla de reacciones de color y/o la Tabla 3 para la interpretación de las reacciones. Use el bloc de informes **BBL Crystal ANR** para anotar las reacciones.



- Primero, lea las columnas G a J, usando la luz blanca.
- Lea las columnas A a F (substratos fluorescentes) usando la luz UV en la caja de iluminación. Un pocillo con substrato fluorescente se considera positivo *únicamente* si la intensidad de la fluorescencia observada en el pocillo es *mayor* que la del pocillo de control negativo (A4).

**Cálculo del número de perfil BBL Crystal:** Cada reacción positiva (excepto 4A, que se utiliza como control negativo de fluorescencia) recibe un valor de 4, 2 ó 1, correspondiente a la fila donde se encuentre la reacción. Cada resultado negativo recibe un valor de 0 (cero). Los números (valores) resultantes de cada reacción positiva en cada columna se suman. Se obtiene de esta manera un número de 10 dígitos; éste es el número de perfil **BBL Crystal**.

Ejemplo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	*	+	-	-	+	+	+	-	+	-
2	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
1	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
Perfil	1	6	3	2	5	6	4	3	7	0

\*(4A) = Control negativo de fluorescencia

**Elija la base de datos BBL Crystal ANR apropiada de entre las distintas posibilidades. El tipo de placa primaria utilizada para preparar el inóculo determinará la base de datos apropiada para cada caso. Para el uso con los medios de agar de sangre Brucella o agar de sangre Columbia, seleccione la base de datos alternativa del menú.**

El número de perfil resultante y los resultados de las pruebas independientes (tinción Gram, prueba de la catalasa y prueba del indol) deben tabularse en un PC con el Libro electrónico de códigos para los sistemas **BBL Crystal ID** instalado para obtener la identificación. También se dispone de un manual de códigos. Si no se dispone de un PC, póngase en contacto con el Servicio Técnico de BD Diagnostics para obtener ayuda con la identificación.

**Control de calidad por parte del usuario:** Se recomiendan pruebas de control de calidad para cada lote de paneles según las siguientes instrucciones –

- Inocule un panel con *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 según las recomendaciones previas (consulte la sección "Procedimiento de la prueba").
- Antes de la incubación, deje el panel a temperatura ambiente durante 1 min (no más de 2 min).
- Lea y anote las reacciones con ayuda de la caja de iluminación y la plantilla de reacciones de color.
- Si de acuerdo con la plantilla de color, cualquiera de los pocillos, excepto el pocillo 1F, fuera positivo (después de 1 – 2 min), NO USAR LOS PANELES de ese lote. Póngase en contacto con el Servicio Técnico de BD Diagnostics. (NOTA: El pocillo 1F [escosilo] deberá ser positivo una vez rehidratado).
- Si todos los pocillos son negativos, incube el panel durante 4 h entre 35 – 37 °C.
- Lea el panel con ayuda de la caja de iluminación y la plantilla de color; anote las reacciones utilizando el bloc de informes.
- Compare los resultados anotados con los de la Tabla 4. Si hay discrepancias en los resultados obtenidos, compruebe la pureza de la cepa del control de calidad antes de ponerse en contacto con el Servicio Técnico de BD Diagnostics.
- La puerta de la incubadora no debe abrirse repetidamente durante el período de incubación (preferiblemente menos de 3 veces). Los resultados esperados de la prueba para cepas de pruebas de control de calidad adicionales aparecen en la Tabla 5.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El sistema **BBL Crystal ANR ID** ha sido diseñado para los grupos taxonómicos suministrados. Los grupos taxonómicos que no aparecen indicados en la Tabla 1 no deben utilizarse con este sistema.

Todas las bases de datos de los sistemas **BBL Crystal ANR ID** se crearon con medios **BBL**. La reactividad de algunos substratos en sistemas de identificación rápida puede depender de los medios suministrados para las preparaciones de los inóculos. Recomendamos el uso de los siguientes medios **BBL** para ser utilizados con el sistema **BBL Crystal ANR ID**: Agar de sangre para anaerobios CDC, agar Schaedler con vitamina K<sub>1</sub> y 5% de sangre de oveja, agar Columbia con 5% de sangre de oveja y agar de sangre Brucella con hemina y vitamina K<sub>1</sub> (vea "Disponibilidad").

Los sistemas de identificación **BBL Crystal** utilizan micromedios modificados; por lo tanto, los resultados esperados de pruebas individuales pueden ser distintos de los datos previamente establecidos en reacciones de pruebas convencionales. La precisión del sistema **BBL Crystal ANR ID** se basa en la interpretación estadística de pruebas específicamente diseñadas y una base de datos exclusiva.

**Tabla 4**

**Plantilla del control de calidad para el sistema BBL Crystal ANR ID\***

Posición en el panel	Substrato	Código	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285
4A	Control fluorescente negativo	FCT	–
2A	L-arginina-AMC	FAR	V
1A	L-histidina-AMC	FHI	–
4B	4MU- $\alpha$ -D-manósido	FAM	V <sup>1</sup>
2B	L-serina-AMC	FSE	–
1B	L-isoleucina-AMC	FIS	–
4C	4MU- $\beta$ -D-manósido	FBM	+
2C	Glicina-AMC	FGL	–
1C	L-alanina-AMC	FAL	V
4D	4MU-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida	FGA	+
2D	L-ácido piroglutámico-AMC	FPY	V <sup>1,11</sup>
1D	L-lisina-AMC	FLY	V
4E	L-metionina-AMC	FME	V
2E	4MU- $\beta$ -D-celobiopiranosido	FCE	+
1E	4MU- $\beta$ -D-xilosida	FXY	V <sup>1</sup>
4F	L-fenilalanina-AMC	FPH	V
2F	L-leucina-AMC	FLE	+
1F	Escosilo	FSC	– <sup>3,4,10</sup>
4G	Disacárido	DIS	+
2G	Furanosa	FUR	+
1G	Piranososa	PYO	+ <sup>1</sup>
4H	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactósido	AGA	+
2H	p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido	NPG	+
1H	p-nitrofenil-fosfato	PHO	+
4I	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucósido	AGL	+
2I	p-nitrofenil-N-acetil-glucosaminida	NAG	+
1I	L-prolina-p-nitroanílida	PRO	–
4J	p-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucósido	AFU	+
2J	p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucósido	BGL	+
1J	L-alanil-L-alanina-p-nitroanílida	ALA	+

- 1 = Negativo en medio **BBL** Schaedler    6 = Variable en medio **BBL** Brucella  
 2 = Positivo en medio **BBL** Schaedler    7 = Negativo en medio **BBL** Columbia  
 3 = Variable en medio **BBL** Schaedler    8 = Positivo en medio **BBL** Columbia  
 4 = Negativo en medio **BBL** Brucella    9 = Variable en medio **BBL** Columbia  
 5 = Positivo en medio **BBL** Brucella

Tabla 5

## Cepas adicionales de control de calidad para el sistema BBL Crystal ANR ID

Posición en el panel	Substrato	Código	<i>Bacteroides distasonis</i> ATCC 8503	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> ATCC 29743	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 27725
4A	Control fluorescente negativo	FCT	—	—	—	—
2A	L-arginina-AMC	FAR	+	+	+	— 4,10
1A	L-histidina-AMC	FHI	V	+	+ <sup>3</sup>	—
4B	4MU- $\alpha$ -D-manósido	FAM	+	—	—	—
2B	L-serina-AMC	FSE	—	—	+ <sup>3</sup>	—
1B	L-isoleucina-AMC	FIS	— <sup>4</sup>	—	+	—
4C	4MU- $\beta$ -D-manósido	FBM	+ <sup>10</sup>	—	—	—
2C	Glicina-AMC	FGL	V <sup>1,12</sup>	V <sup>1</sup>	V <sup>2</sup>	—
1C	L-alanina-AMC	FAL	+	V <sup>1</sup>	+	—
4D	4MU-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida	FGA	+	—	—	—
2D	L-ácido piroglutámico-AMC	FPY	V <sup>1,12</sup>	—	V <sup>11,24</sup>	+
1D	L-lisina-AMC	FLY	V <sup>2,12,15</sup>	+	+	—
4E	L-metionina-AMC	FME	+	+ <sup>4,10</sup>	+	V
2E	4MU- $\beta$ -D-celobiopiranosido	FCE	V <sup>12</sup>	—	+	—
1E	4MU- $\beta$ -D-xilosida	FXY	+ <sup>10</sup>	—	—	—
4F	L-fenilalanina-AMC	FPH	V <sup>12</sup>	V	+	—
2F	L-leucina-AMC	FLE	+	+ <sup>10</sup>	+	V
1F	Escosilo	FSC	V	V <sup>2,15</sup>	— <sup>3,4,10</sup>	V <sup>15</sup>
4G	Disacárido	DIS	+	—	+ <sup>3,10,24</sup>	—
2G	Furanosa	FUR	+	—	+	V
1G	Piranososa	PYO	+	—	+ <sup>10</sup>	+
4H	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactósido	AGA	+	—	+ <sup>3,4,10</sup>	—
2H	p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido	NPG	+	—	+ <sup>3,4,10</sup>	—
1H	p-nitrofenil-fosfato	PHO	+	—	—	—
4I	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucósido	AGL	+	—	V <sup>1</sup>	—
2I	p-nitrofenil-N-acetil-glucosaminida	NAG	+	—	V <sup>12,15</sup>	—
1I	L-prolina-p-nitroanilida	PRO	—	—	V	—
4J	p-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucósido	AFU	—	—	—	—
2J	p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucósido	BGL	+	—	+	—
1J	L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilida	ALA	+	—	V	—

\*Los resultados mostrados son los esperados cuando se utiliza el medio de agar para anaerobios **BBL CDC** con 5% de sangre de oveja.

Mientras que el sistema **BBL Crystal ANR ID** ayuda en la identificación microbiana, es necesario admitir que pueden existir pequeñas variaciones en cepas de la misma especie. El uso de los paneles y la interpretación de los resultados requiere un microbiólogo competente. El origen de la muestra, tolerancia a la presencia de oxígeno, morfología celular, características de las colonias en varios medios al igual que los productos metabólicos determinados mediante cromatografía de gases deben tenerse en cuenta para la identificación final de cada aislado.

Sólo se deben utilizar torundas con puntas de algodón, palillos de madera o asas plásticas desechables en la preparación de la suspensión de inóculo ya que algunas torundas de poliéster pueden ocasionar que el fluido de inóculo se tome viscoso. Esto puede dar como resultado un volumen insuficiente de fluido de inóculo para llenar los pocillos. Las tapas deben utilizarse dentro de 1 h una vez retiradas de los envoltorios sellados con el fin de asegurar un rendimiento apropiado. La cubierta de plástico debe permanecer en la tapa hasta que se vaya a utilizar.

La incubadora donde se colocan los paneles debe ser humidificada para impedir la evaporación de fluido de inóculo de los pocillos durante el período de incubación. La humedad relativa recomendada es del 40 – 60%.

Los paneles solamente deben incubarse **boca abajo** después de la inoculación (ventana grande hacia arriba; etiqueta hacia abajo) para promover la eficacia de los substratos.

Las colonias deben tomarse de placas **no selectivas** de agar de sangre, como las placas **BBL CDC** para anaerobios, Brucella, Columbia y Shaeidler (vea "Disponibilidad").

Si el perfil de la prueba **BBL Crystal** da un resultado "Sin identificación" y se ha confirmado la pureza del cultivo, entonces es probable que (i) el aislado para la prueba produce *reacciones atípicas BBL Crystal* (que también pueden ser ocasionadas por errores del procedimiento), (ii) la especie de la prueba no forma parte de los grupos taxonómicos previstos o (iii) el sistema no es capaz de identificar el aislado para la prueba con el nivel de confianza requerido. Los métodos convencionales del análisis son recomendados cuando se ha descartado el error del usuario.



## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

**Reproducibilidad:** En un estudio externo realizado en cuatro laboratorios clínicos (cinco evaluaciones en total), se analizó la reproducibilidad de (29) reacciones de los substratos del sistema **BBL Crystal ANR ID** mediante pruebas múltiples. La reproducibilidad de las reacciones de los substratos individuales varió entre 96,2 y 100%. Se determinó que la reproducibilidad general del panel **BBL Crystal ANR** era del 99,1%.<sup>25</sup>

**Exactitud de la identificación:** Se comparó el rendimiento del sistema **BBL Crystal ANR ID** con sistema actualmente disponibles en el comercio al igual que con métodos de identificación convencionales de referencia basándose en las recomendaciones de VA Wadsworth Laboratory utilizando aislados clínicos y cultivos madre. Un total de cinco estudios se llevó a cabo en cuatro laboratorios independientes. A fin de determinar las características de rendimiento, se utilizaron aislados frescos de rutina enviados al laboratorio clínico, así como aislados identificados anteriormente provenientes de los laboratorios clínicos participantes.

El sistema **BBL Crystal ANR ID** identificó correctamente 588 (93%) de los 633 aislados totales analizados en los cinco estudios (incluyendo los aislados que requirieron análisis adicional). Un total de 36 aislados (6%) fue identificado incorrectamente y se obtuvo un mensaje "Sin identificación" para 9 aislados (1%).<sup>25</sup>

## DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción	Nº de cat.	Descripción
245010	Sistema <b>BBL Crystal ANR ID</b> , con 20 tapas <b>BBL Crystal ANR ID</b> , 20 bases <b>BBL Crystal</b> y 20 tubos con fluido de inóculo <b>BBL Crystal ANR ID</b> .	221733	Agar de sangre <b>BBL CDC</b> para anaerobios con 5% de sangre de oveja, paquete de 20 placas.
245038	Fluido de inóculo <b>BBL Crystal ANR</b> , GP, RGP, N/H ID, caja de 10.	221734	Agar de sangre <b>BBL CDC</b> para anaerobios con 5% de sangre de oveja, caja de 100 placas.
245031	Visor para paneles <b>BBL Crystal</b> , modelo USA, 110V, 60 Hz.	221539	Agar Schaedler <b>BBL</b> con vitamina K <sub>1</sub> y 5% de sangre de oveja, paquete de 20.
245032	Visor para paneles <b>BBL Crystal</b> , modelo europeo, 220V, 50 Hz.	221540	Agar Schaedler <b>BBL</b> con vitamina K <sub>1</sub> y 5% de sangre de oveja, caja de 100.
245033	Visor para paneles <b>BBL Crystal</b> , modelo japonés, 100 V, 50/60 Hz.	221165	Agar Columbia <b>BBL</b> con 5% de sangre de oveja, paquete de 20.
245034	Fuente de luz ultravioleta de onda larga para el visor para paneles <b>BBL Crystal</b> .	221263	Agar Columbia <b>BBL</b> con 5% de sangre de oveja, caja de 100.
245036	Fuente de luz blanca para el visor para paneles <b>BBL Crystal</b> .	297848	Agar de sangre Brucella <b>BBL</b> con hemina y vitamina K <sub>1</sub> , paquete de 20.
245011	Manual de códigos para el sistema <b>BBL Crystal</b> de identificación de anaerobios.	297716	Agar de sangre Brucella <b>BBL</b> con hemina y vitamina K <sub>1</sub> , caja de 100.
		261187	Cuentagotas para el reactivo del indol <b>BBL DMACA</b> , caja de 50.
		212539	Equipo de tinción Gram <b>BBL</b> , paquete de 4

**BIBLIOGRAFIA:** Vea "Referencias" en el texto en inglés.

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


 Manufacturer / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas / Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare / Производител / Producător / Üretici / Proizvođač / Производител / Аткарушы

 Use by / Spotřebujzte do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naukokite ikä / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Pouzítte do / Usar antes de / Använd före / Исполняйте до / A se utiliza până la / Son kullanna tarihi / Upotrebiti do / Исползовать до / дейн пайдаланура / Uprotrebiti do / YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) / RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutning af måned) / JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) / AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp) / VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) / AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) / JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) / EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) / ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja) / AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) / MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mensesio pabaiga) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av måneden) / RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) / AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) / RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) / aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden) / ГГГГ-MM-ДД / ГГГГ-MM (MM = края на месеца) / AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii) / YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu) / GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca) / ГГГГ-MM-ДД / ГГГГ-MM (MM = конец месяца) / ЖЖЖЖ-AA-KK / ЖЖЖЖ-AA (AA = айдың соңы) / GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)


**REF** Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalogové číslo / Número de catálogo / Каталоген номер / Număr de catalog / Katalog numerasi / Kataloški broj / Номер по каталогу / Каталог нөмірі

**EC REP** Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatuud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Ιγλιотισα атстовас Европос Бендрийоје / Autoriseret representant i EU / Autorizowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Reprezentante autorizado en la Uniaão Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Reprezentante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Оторизирани представител в EU / Repräsentant autorizat în Uniunea Europeană / Авторизованого Представител в Европској Заједници / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / Autorizuirani predstavnik u EU

**IVD** In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostiska meditsiiniparatuur / Lääkinällinen in vitro -diagnostiikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική συσκευή / In vitro diagnostikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro / In vitro diagnostikos prietais / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicínsk anordning för in vitro-diagnostik / Медицинский уред за диагностика ин витро / Aparatură medicală de diagnosticare in vitro / In Vitro Diagnostic Tibbi Cihaz / Medicínski uređaj za in vitro dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики ин витро / Жасанды жагдайда жүргізетін медициналық диагностика аспабы / Medicínska pomagala za In Vitro Dijagnostiku

 Temperature limitation / Temperaturbegrensning / Temperaturerlimit / Temperaturi piirang / Lämpötilarajotus / Température limite / Zulässiger Temperaturbereich / Οριο θερμοκρασίας / Hömörsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrensning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenje teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegränsning / Температурни ограничения / Limitare de temperatură / Sicaklık sinirlaması / Ograničenje temperature / Ограничение температуры / Температураны шектеу / Dozvoljena temperatura

**LOT** Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch code (Lot) / Chargennummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargebezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-kode (Serie) / Kod partii (seria) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti) / Код (Партида) / Număr lot (Lotul) / Parti Kodu (Lot) / Kod serije / Код партии (lot) / Топтама коды / Lot (kod)

 Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeada kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen / Направете справка в инструкциите за употреба / Consultați instrucțiunile de utilizare / Kullanna Talimallari'na başvurun / Pogledajte uprštvo za upotrebu / См. руководство по эксплуатации / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Koristi upute za upotrebu





Becton, Dickinson and Company  
7 Loveton Circle  
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited  
Pottery Road, Dun Laoghaire  
Co. Dublin, Ireland

Tween is a trademark of ICI Americas, Inc.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo, BBL and BBL Crystal are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2014 BD