

Part Number:	8809691JAA	BALTSO00191 Version 13.0 Template 4 Inserts	
Category and Description:	Package Insert, BD BBL™ Crystal™ <i>Neisseria/Haemophilus</i>	Rev from: 02	Rev to: 03
		Job Number:	781-18

Catalog Number: 245130

Blank (Sheet) Size: Length: 11" Width: 8.5"

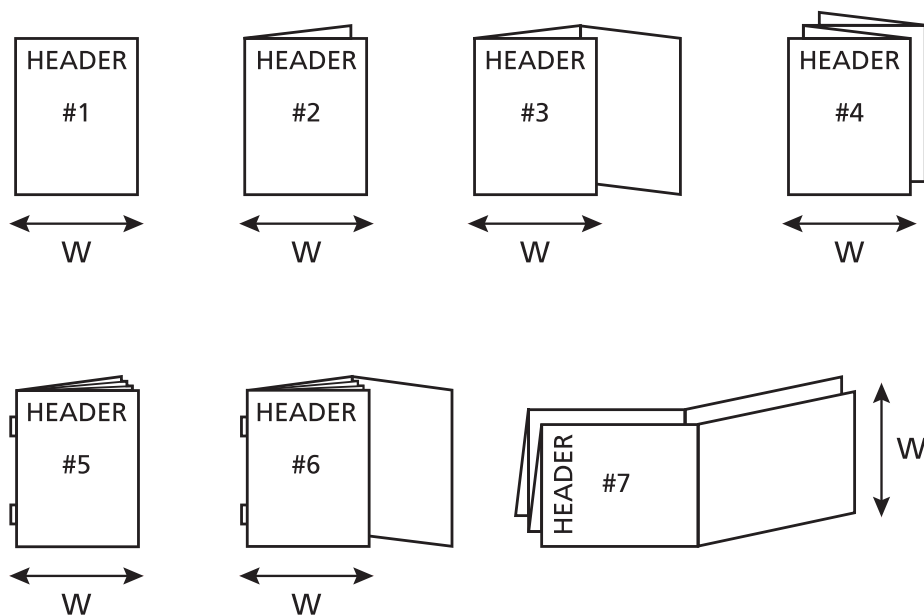
Number of Pages: 56 Number of Sheets: 14

Page Size: Length: 8.5" Width: 5.5" Final Folded Size: 8.5" X 5.5"

Ink Colors: Number of Colors: 1 PMS #: Standard Black

Printed Two Sides: Yes: ☒ No: ☐

Style (see illustrations below): # 5



Vendor Printed: ☒

Online / In House Printed: ☐

Web Printed: ☐

See Specification control no. BALT8809691 for material information.



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

Company confidential. This document is the property of Becton, Dickinson and Company and is not to be used outside the company without written permission. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level.

Revised By: **REVISED BY**
By Nancy Carlsen at 5:12 pm, Mar 13, 2019

Proofing Approved By: **PROOFING APPROVED BY**
By Natalie Morio at 12:46 pm, Mar 14, 2019

Third Eye By: **THIRD EYE BY**
By Terrence Means at 3:12 pm, Mar 14, 2019

BD BBL™ Crystal™ Identification Systems **Neisseria/Haemophilus ID Kit**

R_x Only  

8809691JAA(03)
2019-03

English: pages 1 – 9 Italiano: pagine 27 – 35
Français : pages 10 – 18 Português: páginas 35 – 42
Deutsch: Seiten 18 – 26 Español: páginas 43 – 52

CLIA COMPLEXITY: HIGH
CDC IDENTIFIER CODES
ANALYTE: 0412
TEST SYSTEM: 07807

Contact your local BD representative for instructions. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Pokyny 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 yhteys 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. / Lai saņemtu norādījumus, sazinieties ar vietējo BD pārstāvi. / 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 przedstawicielstwem BD. / Contacte o representante 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 **BD BBL™ Crystal™ Neisseria/Haemophilus (N/H)** Identification (ID) system is a miniaturized identification method employing modified conventional, fluorogenic and chromogenic substrates. It is intended for the identification of frequently isolated *Neisseria* and *Haemophilus* as well as several other fastidious bacteria.^{1,2,6,15,18}

SUMMARY AND EXPLANATION

Micromethods for the biochemical identification of microorganisms were reported as early as 1918.³ Several publications reported on the use of the reagent-impregnated paper discs and micro-tube methods for differentiating enteric bacteria.^{3,4,8,19,21} 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 **BD 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 **BD BBL Crystal N/H** ID panel, to detect enzymes that microbes use to metabolize various substrates.^{5,6,8–10,13–17}

The **BD BBL Crystal** N/H ID kit is comprised of (i) **BD BBL Crystal** N/H ID panel lids, (ii) **BD BBL Crystal** bases and (iii) **BD 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.²⁰ Biochemical and enzymatic reaction patterns for the 29 **BD BBL Crystal** N/H ID substrates for a wide variety of microorganisms are stored in the **BD BBL Crystal** N/H 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 **BD BBL Crystal** N/H 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 with a UV light source.^{13,14,16,17} 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 **BD 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 BD BBL Crystal N/H ID System
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>Cardiobacterium hominis</i> ¹
<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>
<i>Haemophilus aphrophilus/ paraphrophilus</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i> ¹
<i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i> ¹
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Haemophilus segnis</i> ¹
<i>Kingella denitrificans</i>
<i>Kingella kingae</i>
<i>Kingella</i> species (includes <i>K. denitrificans</i> and <i>K. kingae</i>)
<i>Moraxella atlantae</i>
<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>
<i>Moraxella lacunata</i> ¹
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>
<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Moraxella phenylpyruvica</i> ¹
<i>Moraxella</i> species (includes <i>M. atlantae</i> , <i>M. lacunata</i> , <i>M. nonliquefaciens</i> , <i>M. osloensis</i> and <i>M. phenylpyruvica</i>)
<i>Neisseria cinerea</i> ¹
<i>Neisseria elongata</i> (includes <i>N. elongata</i> ssp <i>elongata</i> , <i>N. elongata</i> ssp <i>glycolytica</i> and <i>N. elongata</i> ssp <i>nitroreducens</i>)
<i>Neisseria flavescens</i> ¹
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Neisseria sicca</i>
<i>Neisseria subflava</i> (includes <i>N. subflava</i> biovar <i>flava</i> , <i>N. subflava</i> biovar <i>perflava</i> and <i>N. subflava</i> biovar <i>subflava</i>)
<i>Neisseria weaverii</i> ¹
<i>Oligella</i> species (includes <i>O. urethralis</i> and <i>O. ureolytica</i>)
<i>Oligella ureolytica</i> ¹
<i>Oligella urethralis</i>
<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Suttonella indologenes</i>

Key: 1 = These taxa have <10 unique **BD BBL Crystal** profiles in the current database.

TABLE 2
Principles of Tests Employed in the BD BBL Crystal N/H ID System

Panel Location	Test Feature	Code	Principle (Reference)
4A	Fluorescent negative control	FCT	Control to standardize fluorescent substrate results. Enzymatic hydrolysis of the amide or glycosidic bond results in the release of a fluorescent coumarin derivative. ^{5,9,13,14,16,17}
2A	4MU-phosphate	FHO	
1A	L-proline-AMC	FPR	
4B	L-serine-AMC	FSE	
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	
1B	L-tryptophan-AMC	FTR	
4C	L-phenylalanine-AMC	FPH	
2C	N-succinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	
4D	L-glutamic acid-AMC	FTA	
2D	L-arginine-AMC	FAR	
1D	Ornithine-AMC	FOR	
4E	Glycine-AMC	FGL	
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	
1E	4MU-β-D-galactoside	FBG	
4F	Saccharose	SAC	Utilization of carbohydrate results in lower pH and change in indicator (Phenol red). ^{1-4,8,18}
2F	Maltotriose	MTT	
1F	Carubinose	CAR	
4G	Pyranose	PYO	
2G	Maltobiose	MTB	
1G	Disaccharide	DIS	

Panel Location	Test Feature	Code	Principle (Reference)
4H	Riberol	RBL	
2H	Levulose	LEV	
1H	p-nitrophenyl-phosphorylcholine	PHC	Enzymatic hydrolysis of the colorless aryl substituted glycoside releases yellow p-nitrophenol. ^{5,10,14}
4I	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	GGL	Enzymatic hydrolysis of the colorless amide substrate releases yellow p-nitroaniline. ^{5,10,14}
2I	p-nitrophenyl-phosphate	PHO	Enzymatic hydrolysis of the colorless aryl substituted glycoside releases yellow p-nitrophenol. ^{5,10,14}
1I	o-nitrophenyl-β-D-galactoside (ONPG)	OPG	
4J	Urea	URE	Hydrolysis of urea and the resulting ammonia change the pH indicator color (Bromthymol blue). ^{2,7,12}
2J	Resazurin	REZ	Reduction of resazurin to resorufin results in a color change. ⁶
1J	Ornithine	ORN	Utilization of ornithine results in pH rise and change in the color of the indicator (Bromcresol purple). ²

REAGENTS

The **BD BBL Crystal N/H ID** panel contains 29 enzymatic and biochemical substrates. Refer to Table 3 for a list of active ingredients.

TABLE 3
Reagents used in the BD BBL Crystal N/H 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	4MU-phosphate	FHO	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	4MU-phosphate	≤ 1
1A	L-proline-AMC	FPR	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-proline-AMC	≤ 1
4B	L-serine-AMC	FSE	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-serine-AMC	≤ 1
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	LYS-ALA-AMC	≤ 1
1B	L-tryptophan-AMC	FTR	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-tryptophan-AMC	≤ 1
4C	L-phenylalanine-AMC	FPH	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-phenylalanine-AMC	≤ 1
2C	N-succinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	N-succinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	≤ 1
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	ALA-ALA-PHE-AMC	≤ 1
4D	L-glutamic acid-AMC	FTA	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-glutamic acid-AMC	≤ 1
2D	L-arginine-AMC	FAR	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	L-arginine-AMC	≤ 1
1D	Ornithine-AMC	FOR	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	Ornithine-AMC	≤ 1
4E	Glycine-AMC	FGL	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	Glycine-AMC	≤ 1
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	GLY-PRO-AMC	≤ 1
1E	4MU-β-D-galactoside	FBG	blue fluorescence >FCT well	blue fluorescence ≤ FCT well	4MU-β-D-galactoside	≤ 1
4F	Saccharose	SAC	Gold/Yellow	Orange/Red	Saccharose	≤ 300
2F	Maltotriose	MTT	Gold/Yellow	Orange/Red	Maltotriose	≤ 300
1F	Carubinose	CAR	Gold/Yellow	Orange/Red	Carubinose	≤ 300
4G	Pyranose	PYO	Gold/Yellow	Orange/Red	Pyranose	≤ 300
2G	Maltobiose	MTB	Gold/Yellow	Orange/Red	Maltobiose	≤ 300
1G	Disaccharide	DIS	Gold/Yellow	Orange/Red	Disaccharide	≤ 300
4H	Riberol	RBL	Gold/Yellow	Orange/Red	Riberol	≤ 300
2H	Levulose	LEV	Gold/Yellow	Orange/Red	Levulose	≤ 300
1H	p-n-p-phosphorylcholine	PHC	Yellow	Colorless	p-n-p-phosphorylcholine	≤ 10
4I	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	GGL	Yellow	Colorless	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	≤ 10
2I	p-n-p-phosphate	PHO	Yellow	Colorless	p-n-p-phosphate	≤ 10
1I	ONPG	OPG	Yellow	Colorless	ONPG	≤ 10

Panel Location	Substrate	Code	Pos.	Neg.	Active Ingredients	Approx. Amt. (g/L)
4J	Urea	URE	Aqua/Blue	Yellow/Green	Urea	≤ 50
2J	Resazurin	REZ	Pink	Blue/Purple	Resazurin	≤ 1
1J	Ornithine	ORN	Purple	Yellow/Gray	Ornithine	≤ 200

Precautions: *in vitro* Diagnostic

After review by the 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 07807.

After use, all infectious materials including plates, cotton swabs, inoculum fluid tubes, and panels must be autoclaved prior to disposal or incineration.

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 **BD BBL Crystal** incubation trays. The bases are stacked facing down to minimize air contamination. Store in a dust-free environment at 2–30 °C, until ready to use. Store unused bases in the tray, in plastic bag. Empty trays should be used to incubate inoculated panels.

Inoculum Fluid: **BD 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 **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H Inoculum Fluid should be used with **BD BBL Crystal** N/H ID panels.

On receipt, store the **BD BBL Crystal** N/H ID 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

BD BBL Crystal ID Systems are **not** for use directly with clinical specimens. Use isolates from media such as Chocolate Agar, **BD Trypticase™** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA), Columbia Agar with 5% Sheep Blood (Columbia) and Nutrient Agar. Use of selective media such as Martin-Lewis Agar, Thayer-Martin Modified (MTM) Agar, New York City (NYC) Medium Modified, V Agar (for *G. vaginalis*), and **BD GC-Lect™** Agar is also acceptable. Media containing esculin should not be used. The test isolate must be a pure culture, no more than 18–24 h old for most genera; for some slow growing organisms up to 48 h 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 **BD 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 inoculation onto primary isolation media.^{1,17}

TEST PROCEDURE

Materials Provided: **BD BBL Crystal** N/H ID Kit –

20 **BD BBL Crystal** N/H ID Panel Lids,

20 **BD BBL Crystal** Bases,

20 **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID IF Tubes. Each tube has approximately 2.3 ± 0.15 mL of Inoculum Fluid containing: KCl 7.5 g, CaCl₂ 0.5 g, Tricine N-[2-Hydroxy-1, 1-bis (hydroxymethyl)methyl] glycine 0.895 g, purified water to 1000 mL.

2 incubation trays,

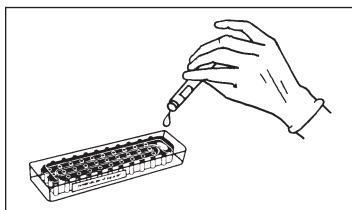
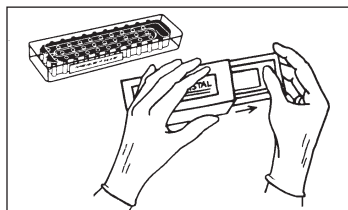
1 **BD BBL Crystal** N/H ID Report Pad.

Materials Not Provided: Sterile cotton swabs (*do not use polyester swabs*), incubator (35–37 °C) non-CO₂ (40–60% humidity), McFarland No. 3 standard, **BD BBL Crystal** Panel Viewer, **BD BBL Crystal** ID System Electronic Codebook or **BD BBL Crystal** N/H Manual Codebook, and appropriate culture media.

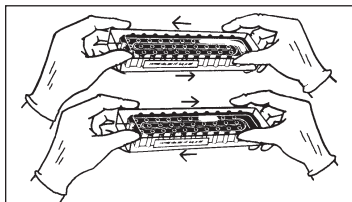
Also required are the necessary equipment and labware used for preparation, storage and handling of clinical specimens.

Test Procedure: **BD BBL Crystal** N/H ID System requires a Gram stain.

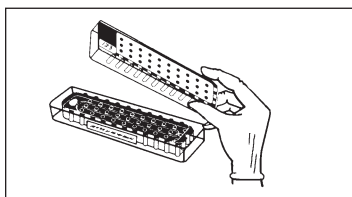
1. Remove lids from pouch. Discard desiccant. Once removed from the pouch, covered lids should be used within 1 h. Do not use the panel if there is no desiccant in the pouch.
2. Take an inoculum fluid tube and label with patient's specimen number. Using aseptic technique, with the tip of a sterile cotton 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 **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid.
4. Recap tube and vortex for approximately 10–15 s. The turbidity should be equivalent to a McFarland No. 3 standard. If the inoculum suspension concentration is in excess of the recommended McFarland standard, one of the following steps is recommended:
 - a. Use a fresh tube of inoculum fluid to prepare a new inoculum suspension equivalent to a McFarland No. 3 standard.
 - b. If additional colonies are unavailable for preparation of a new inoculum suspension, using aseptic techniques, dilute the inoculum by adding the minimum required volume (not to exceed 1.0 mL) of 0.85% sterile saline or inoculum fluid to bring down the turbidity equivalent to a McFarland No. 3 standard. Remove the excess amount added to the tube with a sterile pipet so that the final volume of inoculum fluid is approximately equivalent to that of the original volume in the tube (2.3 ± 0.15 mL). Failure to make this adjustment in volume will result in spilling of the inoculum suspension 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 the inoculum fluid tube 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 **BD BBL Crystal** N/H ID panels, the inoculum should be carefully rolled across the tracks to ensure a proper fill of all wells. Make sure there is no excess fluid between the wells, or coming out of the target area towards 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 downwards simultaneously until the lid snaps into place (listen for two "clicks").

Purity Plate: Using a sterile loop, recover a small drop from the inoculum fluid tube either before or after inoculating the base and inoculate an agar slant or plate (any appropriate medium) for purity check. Discard inoculum fluid tube and cap in a biohazard disposal container. Incubate the slant or plate for 24–48 h at 35–37 °C under appropriate 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-CO₂ 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). Panels should be read within 30 min after removing from incubator.

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 **BD BBL Crystal Panel Viewer**. Refer to the color reaction chart and/or Table 3 for an interpretation of the reactions. Use the results pad to record reactions.

- a. Read columns F thru J first, using the regular (white) light source.
- b. Read columns A thru E (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 (4A).

Calculation of BD 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 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	+	—	+	—	+	—	—	+	+	—
Profile	1	6	3	2	5	6	4	3	7	0

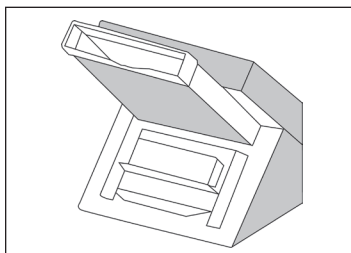
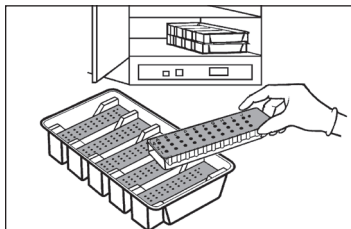
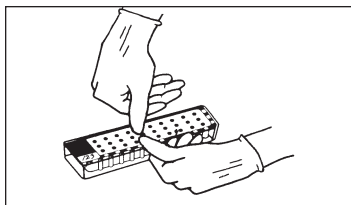
* (4A) = fluorescent negative control

The resulting profile number and cell morphology, if known, should be entered on a PC in which the **BD 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 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 *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* ATCC® 25240 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 1J) are positive per color reaction chart (after 1–2 min), **DO NOT USE PANELS** from this lot. Contact BD Technical Services.
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 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 **BD BBL Crystal** N/H ID System is designed for the taxa provided. Taxa other than those listed in Table 1 are not intended for use in this system.

An additional confirmatory test is required for reporting an isolate identified in the system as *Neisseria gonorrhoeae* as follows: (1) when positive results are obtained from persons at low risk, (2) when positive results are obtained from patients with sociologic or medicolegal implications.¹¹

The **BD BBL Crystal** N/H ID database was developed with **BBL™** brand media. Reactivity of some substrates in miniaturized identification systems may be dependent upon the source media used in inoculum preparations. We recommend the use of the following media for use with the **BD BBL Crystal** N/H ID System: Chocolate, TSA II, Columbia and Nutrient. Use of selective media, such as Martin-Lewis, MTM, NYC Medium, V and **BD GC-Lect** is also acceptable. Media containing esculin should not be used.

BD 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 **BD BBL Crystal** N/H ID System is based on statistical use of specially designed tests and an exclusive database.

While **BD BBL Crystal** N/H 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.

Only cotton-tipped applicator swabs 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 Chocolate, TSA, Columbia or Nutrient plates. Use of selective media such as Martin-Lewis, MTM, NYC Medium, V and **BD GC-Lect** is also acceptable.

If the **BD 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 BD 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.

TABLE 4
Quality Control Chart for **BD BBL™ Crystal™** N/H ID System After 4 Hours Incubation from Chocolate Agar

Panel Location	Substrate	Code	<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i> ATCC 25240
4A	Fluorescent negative control	FCT	–
2A	4MU-phosphate	FHO	–
1A	L-proline-AMC	FPR	–
4B	L-serine-AMC	FSE	+
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	V
1B	L-tryptophan-AMC	FTR	V
4C	L-phenylalanine-AMC	FPH	+
2C	N-succinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	+
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	+
4D	L-glutamic acid-AMC	FTA	–
2D	L-arginine-AMC	FAR	V
1D	Ornithine-AMC	FOR	V
4E	Glycine-AMC	FGL	+
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	–
1E	4MU-β-D-galactoside	FBG	–
4F	Saccharose	SAC	–
2F	Maltotriose	MTT	–
1F	Carubiose	CAR	–
4G	Pyranose	PYO	–
2G	Maltobiose	MTB	–
1G	Disaccharide	DIS	–
4H	Riberol	RBL	–
2H	Levulose	LEV	–
1H	p-n-p-phosphorylcholine	PHC	–
4I	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	GGL	–
2I	p-n-p-phosphate	PHO	–
1I	ONPG	OPG	–
4J	Urea	URE	–
2J	Resazurin	REZ	+
1J	Ornithine	ORN	V

TABLE 5

Additional Quality Control Strains for BD BBL Crystal N/H ID System After 4 Hours Incubation from Chocolate Agar

Panel Location	Substrate	Code	<i>Haemophilus aphrophilus</i> ATCC 19415	<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 49142	<i>Kingella denitrificans</i> ATCC 33394	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 35056
4A	Fluorescent negative control	FCT	—	—	—	—
2A	4MU-phosphate	FHO	+	—	—	+
1A	L-proline-AMC	FPR	—	+	+	—
4B	L-serine-AMC	FSE	V	+	+	V
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	—	V	V	V
1B	L-tryptophan-AMC	FTR	V	+	+	V
4C	L-phenylalanine-AMC	FPH	+	+	+	V
2C	N-succinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	—	—	—	—
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	V	+	V	V
4D	L-glutamic acid-AMC	FTA	+	—	—	—
2D	L-arginine-AMC	FAR	V	+	V	+
1D	Ornithine-AMC	FOR	—	+	V	—
4E	Glycine-AMC	FGL	+	+	+	+
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	—	V	+	—
1E	4MU-β-D-galactoside	FBG	+	+	—	—
4F	Saccharose	SAC	+	—	—	—
2F	Maltotriose	MTT	+	—	—	—
1F	Carubiose	CAR	V	—	—	—
4G	Pyranose	PYO	+	V	—	V
2G	Maltobiose	MTB	+	V	—	—
1G	Disaccharide	DIS	+	—	—	—
4H	Riberol	RBL	V	—	—	—
2H	Levulose	LEV	+	—	—	—
1H	p-n-p-phosphorylcholine	PHC	V	—	—	+
4I	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	GGL	+	—	—	—
2I	p-n-p-phosphate	PHO	+	—	—	+
1I	ONPG	OPG	+	+	—	—
4J	Urea	URE	—	—	—	+
2J	Resazurin	REZ	V	—	V	—
1J	Ornithine	ORN	V	V	V	+

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Reproducibility: In an external study involving three clinical laboratories, (total of three evaluations), the reproducibility of **BD BBL Crystal** N/H ID substrates' (29) reactions was studied by replicate testing. The reproducibility of the individual substrate reactions ranged from 85.7% to 100%. The overall reproducibility of **BD BBL Crystal** N/H ID panel was determined to be 95.9%.²²

Accuracy of Identification: The performance of **BD BBL Crystal** N/H ID System was compared to a currently available commercial system using **clinical isolates and stock cultures**. A total of three studies were conducted in three 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 513 total isolates tested from the three studies using the **BD BBL Crystal** N/H Identification System 459 (89.5%) were correctly identified without the use of supplemental tests, and 480 (93.6%) were correctly identified when supplemental tests were included. A total of 26 (5.1%) isolates were incorrectly identified, and a message of "No Identification" was obtained for 7 (1.4%) isolates.²²

AVAILABILITY

Cat. No.	Description	Cat. No.	Description
245130	BD BBL™ Crystal™ N/H <i>Neisseria/ Haemophilus</i> ID System, 1 Kit.	245036	BD BBL™ Crystal™ Panel Viewer, White Light Tube.
245038	BD BBL™ Crystal™ ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid.	245035	BD BBL™ Crystal™ Identification Systems <i>Neisseria/ Haemophilus</i> Manual Codebook.
245031	BD BBL™ Crystal™ Panel Viewer, Domestic model, 110 V, 60 Hz.	221169	BD BBL™ Chocolate II Agar (GC II Agar with Hemoglobin and BD IsoVitaleX™), pkg. of 20.
245032	BD BBL™ Crystal™ Panel Viewer, European model, 220 V, 50 Hz.	221267	BD BBL™ Chocolate II Agar (GC II Agar with Hemoglobin and BD IsoVitaleX™), ctn. of 100.
245033	BD BBL™ Crystal™ Panel Viewer, Japanese model, 100 V, 50/60 Hz.	221165	BD BBL™ Columbia Agar with 5% Sheep Blood, pkg. of 20.
245034	BD BBL™ Crystal™ Panel Viewer, Longwave UV Tube.	221263	BD BBL™ Columbia Agar with 5% Sheep Blood, ctn. of 100.

Cat. No.	Description	Cat. No.	Description
221557	BD BBL™ Martin-Lewis Agar, pkg. of 20.	221239	BD Trypticase™ Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II), pkg. of 20.
221558	BD BBL™ Martin-Lewis Agar, ctn. of 100.	221261	BD Trypticase™ Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II), ctn. of 100.
297173	BD BBL™ New York City (NYC) Medium Modified, pkg. of 20.	221874	BD BBL™ V Agar (for <i>G. vaginalis</i>), pkg. of 10.
297801	BD BBL™ Nutrient Agar, pkg. of 10.	221875	BD BBL™ V Agar (for <i>G. vaginalis</i>), pkg. of 100.
221567	BD BBL™ Thayer-Martin, Modified (MTM II) Agar, pkg. of 20.	297715	BD GC-Lect™ Agar, pkg. of 20.
221568	BD BBL™ Thayer-Martin, Modified (MTM II) Agar, ctn. of 100.	297928	BD GC-Lect™ Agar, ctn. of 100.
		212539	BD BBL™ Gram Stain Kit, pkg. of 4 x 250 mL bottles.

REFERENCES

- 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.
- Baron, E.J., L.R. Peterson and S.M. Finegold. 1994. Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
- Bronfenbrenner, J., and M.J. Schlesinger. 1918. A rapid method for the identification of bacteria fermenting carbohydrates. Am. J. Public Health. 8:922–923.
- Cowan, S.T., and K.J. Steel. 1974. Manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Edberg, S.C., and C.M. Konnick. 1986. Comparison of β -glucuronidase-based substrate systems for identification of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 24:368–371.
- Enriquez, L.A., and N.E. Hodinka. 1983. The development of a test system for the rapid differentiation of *Neisseria* and *Haemophilus*. J. Clin. Microbiol. 18:1032–1039.
- Ferguson, W.W., and A.E. Hook. 1943. Urease activity of *Proteus* and *Salmonella* organisms. J. Lab. Clin. Med. 28:1715–1720.
- Hartman, P.A. 1968. Miniaturized microbiological methods. Academic Press, New York.
- Kamper, P., O. Rauhoff, and W. Dott. 1991. Glycosidase profiles of members of the family *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol. 29:2877–2879.
- Killian, M., and P. Bulow. 1976. Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae* 1: detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. 84:245–251.
- Knapp, J.S., and R.J. Rice. 1995. *Neisseria* and *Branhamella*, p. 324–340. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- MacFaddin, J.F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Maddocks, J.L., and M. Greenan. 1975. Rapid method for identifying bacterial enzymes. J. Clin. Pathol. 28:686–687.
- Manafi, M., W. Kneifel, and S. Bascomb. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiol. Rev. 55:335–348.
- 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.
- 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.
- 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.
- Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.). 1995. Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 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.
- Sneath, P.H.A. 1957. The application of computers to taxonomy. J. Gen. Microbiol. 17:201–221.
- Soto, O.B. 1949. Fermentation reactions with dried paper discs containing carbohydrate and indicator. Puerto Rican J. Public Health. Trop. Med. 25:96–100.
- Data on file at BD Diagnostics.

Technical Information: In the United States contact BD Technical Service and Support at 1.800.638.8663 or www.bd.com.

BD Systèmes d'identification BBL Crystal

Trousse pour l'identification des bactéries *Neisseria*/*Haemophilus*

COMPLEXITE CLIA : HAUTE

Français

CODES IDENTIFICATEURS DU CDC

ANALYTE : 0412

SYSTEME D'ANALYSE : 07807

APPLICATION

Le système **BD BBL Crystal** pour l'identification (ID) des bactéries *Neisseria*/*Haemophilus* (N/H) est une méthode d'identification miniaturisée utilisant des substrats chromogènes, fluorogènes et conventionnels modifiés. Il a pour but d'identifier les bactéries *Neisseria* et *Haemophilus* fréquemment isolées, et plusieurs autres bactéries exigeantes, à partir d'échantillons cliniques.^{1,2,6,15,18}

RESUME ET EXPLICATION

L'emploi de microméthodes d'identification biochimique des microorganismes remonte à 1918.³ Plusieurs publications font état de l'utilisation de disques de papier imprégnés de réactifs et de microtubes pour différencier les entérobactéries.^{3,4,8,19,21} 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 **BD 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 **BD BBL Crystal** N/H ID, afin de détecter les enzymes utilisées par les microorganismes pour métaboliser ces substrats.^{5,6,8-10,13-17}

La trousse **BD BBL Crystal** N/H ID est composée (i) de couvercles pour panels **BD BBL Crystal** N/H ID, (ii) de bases **BD BBL Crystal** et (iii) de tubes de solution **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID pour l'inoculum (IF). 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.²⁰ Les profils réactionnels biochimiques et enzymatiques pour les 29 substrats du système **BD BBL Crystal** N/H ID obtenus pour une large gamme de microorganismes sont stockés dans la base de données **BD BBL Crystal** N/H 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 **BD BBL Crystal** N/H 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 détectés par différents systèmes d'indicateurs. L'hydrolyse enzymatique des substrats fluorogènes contenant des dérivés coumariniques de 4-méthylumbelliféron (4MU) ou de 7-amino-4-méthylcoumarine (7-AMC), résulte en une augmentation de la fluorescence facilement détectée à l'aide d'une lampe à UV.^{13,14,16,17} L'hydrolyse des substrats chromogènes entraîne des changements de coloration pouvant être détectés à l'oeil nu. De plus, les systèmes **BD 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).

TABLEAU 1

Taxonomie dans le système BD BBL Crystal N/H ID
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>Cardiobacterium hominis</i> ¹
<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>
<i>Haemophilus aphrophilus/ paraphrophilus</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i> ¹
<i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i> ¹
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Haemophilus segnis</i> ¹
<i>Kingella denitrificans</i>
<i>Kingella kingae</i>
<i>Kingella</i> espèce (inclut <i>K. denitrificans</i> et <i>K. kingae</i>)
<i>Moraxella atlantae</i>
<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>
<i>Moraxella lacunata</i> ¹
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>
<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Moraxella phenylpyruvica</i> ¹
<i>Moraxella</i> espèce (inclut <i>M. atlantae</i> , <i>M. lacunata</i> , <i>M. nonliquefaciens</i> , <i>M. osloensis</i> et <i>M. phenylpyruvica</i>)
<i>Neisseria cinerea</i> ¹
<i>Neisseria elongata</i> (inclut <i>N. elongata</i> ssp. <i>elongata</i> , <i>N. elongata</i> ssp. <i>glycolytica</i> et <i>N. elongata</i> ssp. <i>nitroreducens</i>)
<i>Neisseria flavescens</i> ¹
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Neisseria sicca</i>
<i>Neisseria subflava</i> (inclut <i>N. subflava</i> biovariant <i>flava</i> , <i>N. subflava</i> biovariant <i>perflava</i> et <i>N. subflava</i> biovariant <i>subflava</i>)
<i>Neisseria weaveri</i> ¹
<i>Oligella</i> espèce (inclut <i>O. urethralis</i> et <i>O. ureolytica</i>)
<i>Oligella ureolytica</i> ¹
<i>Oligella urethralis</i>
<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Suttonella indologenes</i>

1 = Ces taxa ont <10 profils **BD BBL Crystal** spécifiques dans la base de données actuelle.

TABLEAU 2

Pos. sur panel	Caractéristiques du test	Code	Principe (référence)
4A	Contrôle négatif fluorescent	FCT	Contrôle pour standardiser les résultats des substrats fluorescents. L'hydrolyse enzymatique des liens amides ou glycosidiques libère un dérivé coumarinique fluorescent. ^{5,9,13,14,16,17}
2A	4MU-phosphate	FHO	
1A	L-proline-AMC	FPR	
4B	L-sérine-AMC	FSE	
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	
1B	L-tryptophane-AMC	FTR	
4C	L-phénylalanine-AMC	FPH	
2C	N-succinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	
4D	Acide L-glutamique-AMC	FTA	
2D	L-arginine-AMC	FAR	
1D	Ornithine-AMC	FOR	
4E	Glycine-AMC	FGL	
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	
1E	4MU-β-D-galactoside	FBG	
4F	Saccharose	SAC	La métabolisation des carbohydrates entraîne une baisse du pH, ce qui fait virer l'indicateur coloré (rouge de phénol). ^{1-4,8,18}
2F	Maltotriose	MTT	
1F	Carubinose	CAR	
4G	Pyranose	PYO	
2G	Maltobiose	MTB	
1G	Disaccharide	DIS	
4H	Ribérol	RBL	
2H	Levulose	LEV	

Pos. sur panel	Caractéristiques du test	Code	Principe (référence)
1H	p-nitrophényl-phosphorylcholine	PHC	L'hydrolyse enzymatique du substrat glycoside incolore, substitué par un radical aryl, libère du p-nitrophénol jaune. ^{5,10,14}
4I	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	GGL	L'hydrolyse enzymatique du substrat amide incolore libère de la p-nitroaniline jaune. ^{5,10,14}
2I	p-nitrophényl-phosphate	PHO	L'hydrolyse enzymatique du substrat glycoside incolore, substitué par un radical aryl, libère du p-nitrophénol jaune. ^{5,10,14}
1I	o-nitrophényl-β-D-galactoside (ONPG)	OPG	
4J	Urée	URE	L'ammoniac qui résulte de l'hydrolyse de l'urée fait virer l'indicateur coloré de pH (bleu de bromothymol). ^{2,7,12}
2J	Résazurine	REZ	La réduction à résorufine de la résazurine entraîne un changement de couleur. ⁶
1J	Ornithine	ORN	La métabolisation de l'ornithine entraîne une hausse du pH, ce qui fait virer l'indicateur coloré (pourpre de bromocrésol). ²

REACTIFS

Le panel **BD BBL Crystal** N/H ID contient 29 substrats enzymatiques et biochimiques. Se référer au tableau 3 pour une liste des ingrédients actifs.

TABEAU 3

Réactifs utilisés dans le système BD BBL Crystal N/H ID

Pos. sur panel	Substrat	Code	Pos.	Nég.	Réactifs	Quantité approx. (g/L)
4A	Contrôle négatif fluorescent	FCT	n/d	n/d	Dérivé coumarinique fluorescent	≤ 1
2A	4MU-phosphate	FHO	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	4MU-phosphate	≤ 1
1A	L-proline-AMC	FPR	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	L-proline-AMC	≤ 1
4B	L-sérine-AMC	FSE	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	L-sérine-AMC	≤ 1
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	LYS-ALA-AMC	≤ 1
1B	L-tryptophane-AMC	FTR	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	L-tryptophane-AMC	≤ 1
4C	L-phénylalanine-AMC	FPH	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	L-phénylalanine-AMC	≤ 1
2C	N-succinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	N-succinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	≤ 1
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	ALA-ALA-PHE-AMC	≤ 1
4D	Acide L-glutamique-AMC	FTA	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	Acide L-glutamique-AMC	≤ 1
2D	L-arginine-AMC	FAR	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	L-arginine-AMC	≤ 1
1D	Ornithine-AMC	FOR	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	Ornithine-AMC	≤ 1
4E	Glycine-AMC	FGL	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	Glycine-AMC	≤ 1
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	GLY-PRO-AMC	≤ 1
1E	4MU-β-D-galactoside	FBG	fluorescence bleue >puits FCT	fluorescence bleue ≤ puits FCT	4MU-β-D-galactoside	≤ 1
4F	Saccharose	SAC	Or/Jaune	Orange/Rouge	Saccharose	≤ 300
2F	Maltotriose	MTT	Or/Jaune	Orange/Rouge	Maltotriose	≤ 300
1F	Carubiose	CAR	Or/Jaune	Orange/Rouge	Carubiose	≤ 300
4G	Pyranose	PYO	Or/Jaune	Orange/Rouge	Pyranose	≤ 300
2G	Maltobiose	MTB	Or/Jaune	Orange/Rouge	Maltobiose	≤ 300
1G	Disaccharide	DIS	Or/Jaune	Orange/Rouge	Disaccharide	≤ 300
4H	Ribérol	RBL	Or/Jaune	Orange/Rouge	Ribérol	≤ 300
2H	Levulose	LEV	Or/Jaune	Orange/Rouge	Levulose	≤ 300
1H	p-nitrophényl-phosphorylcholine	PHC	Jaune	Incolore	p-nitrophényl-phosphorylcholine	≤ 10
4I	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	GGL	Jaune	Incolore	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	≤ 10
2I	p-nitrophényl-phosphate	PHO	Jaune	Incolore	p-nitrophényl-phosphate	≤ 10
1I	ONPG	OPG	Jaune	Incolore	ONPG	≤ 10
4J	Urée	URE	Bleue-vert/Bleue	Jaune/Vert	Urée	≤ 50
2J	Résazurine	REZ	Rose	Bleue/Violet	Résazurine	≤ 1
1J	Ornithine	ORN	Violet	Jaune/Gris	Ornithine	≤ 200

Précautions : diagnostic *in vitro*

Après une évaluation par les U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) selon CLIA '88, ce produit a été identifié comme d'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 07807.

Après usage, tout le matériel contaminé incluant les géloses, les écouvillons, les tubes pour la solution d'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 à une température de 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 **BD 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 de 2–30 °C, jusqu'à leur utilisation. Conserver les bases inutilisées dans la plaque, dans un sac plastique. Les plaques vides doivent être utilisées pour incuber les panels inoculés.

Solution pour l'inoculum : la solution **BD BBL Crystal** anr, gp, rgp, n/h ID pour l'inoculum (IF) 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 de 2–25 °C. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du tube. Seule la solution **BD BBL Crystal** anr, gp, rgp, n/h pour l'inoculum doit être utilisée avec les panels **BD BBL Crystal** N/H ID.

Dès réception, conserver la trousse **BD BBL Crystal** N/H ID à une température de 2–8 °C. Une fois le carton ouvert, seuls les couvercles ont besoin d'être conservés à 2–8 °C. Les autres composants de la trousse pourront être conservés à 2–25 °C. Si la trousse ou un composant quelconque de la trousse se conserve au réfrigérateur, il sera nécessaire de le ramener à température ambiante avant utilisation.

PRELEVEMENT ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Les systèmes **BD BBL Crystal** ID ne sont pas conçus pour être utilisés directement avec des échantillons cliniques. Utiliser des isolats provenant de milieux tels que la gélose au chocolat, la gélose de Soja **BD Trypticase** avec 5 % de sang de mouton (TSA), la gélose Columbia avec 5 % de sang de mouton (Columbia), et la gélose nutritive. L'utilisation de milieux sélectifs tels que la gélose Martin-Lewis, la gélose Thayer-Martin modifiée (MTM), le milieu modifié New York City (NYC), la gélose V (pour *G. vaginalis*) et la gélose **BD GC-Lect** est acceptable. Les milieux contenant l'esculine ne doivent pas être utilisés. Pour la plupart des genres bactériens, l'isolat testé doit être une culture pure de 18–24 h ; pour certains organismes à croissance lente, des cultures de 48 h peuvent être acceptables. Pour la préparation de la suspension de l'inoculum, n'utiliser 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. Les couvercles doivent rester dans leur sac plastique jusqu'à 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 est de 40–60 %. L'utilité des systèmes **BD 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.^{1,17}

METHODOLOGIE DU TEST

Matériel fourni : trousse **BD BBL Crystal** N/H ID –

20 couvercles pour panels **BD BBL Crystal** N/H ID,

20 bases **BD BBL Crystal**,

20 tubes de solution **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID pour l'inoculum (IF). Chaque tube contient approximativement $2,3 \pm 0,15$ mL de solution pour l'inoculum, laquelle est composée de : KCl 7,5 g, CaCl_2 0,5 g, Tricine N-[2-Hydroxy-1, 1-bis (hydroxyméthyl)méthyl] glycine 0,895 g, eau purifiée qsp 1000 mL.

2 plaques d'incubation,

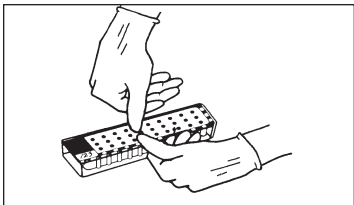
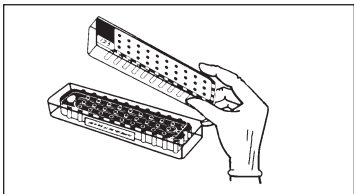
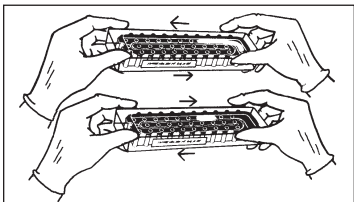
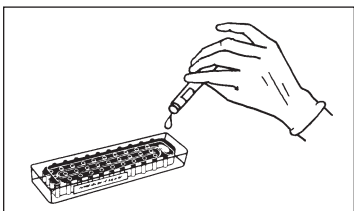
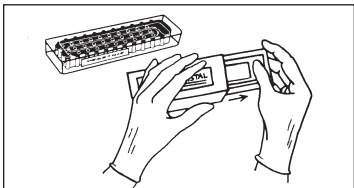
1 formulaire de résultat **BD BBL Crystal** N/H ID.

Matériel non-fourni : écouvillons stériles avec embout de coton (*ne pas utiliser d'écouvillons en polyester*), incubateur (35–37 °C) sans CO_2 (40–60 % d'humidité), degré McFarland N° 3, visionneuse pour panels **BD BBL Crystal**, livre électronique des codes pour les systèmes **BD BBL Crystal** ID ou manuel des codes **BD BBL Crystal** N/H et les milieux de culture appropriés.

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

Mode opératoire du test : le système **BD BBL Crystal** N/H ID requiert une coloration de Gram.

1. Retirer le couvercle de son emballage. Eliminer 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.
2. Prendre un tube de solution pour l'inoculum et reporter sur l'étiquette le numéro attribué à l'échantillon du patient. A 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.
3. Suspendre les colonies dans un tube de solution pour l'inoculum **BD BBL Crystal** anr, gp, rgp, n/h ID.
4. Reboucher le tube et agiter au vortex pendant 10–15 s La turbidité devrait être au moins équivalente au degré McFarland N° 3. Si la concentration de la suspension de l'inoculum dépasse le degré de McFarland recommandé, une des étapes suivantes est recommandée :
 - a. Utiliser un nouveau tube de solution pour l'inoculum pour préparer une nouvelle suspension d'inoculum équivalent au degré McFarland N° 3.
 - b. Si on ne dispose pas d'autres colonies pour préparer une nouvelle suspension d'inoculum, diluer, en respectant les règles d'asepsie, l'inoculum avec le volume minimum nécessaire (ne pas dépasser 1,0 mL) de sérum physiologique stérile à 0,85 % ou de solution pour l'inoculum afin de réduire la turbidité au degré McFarland N° 3. Enlever l'excédent à l'aide d'une pipette stérile afin que le volume final de la solution pour l'inoculum soit approximativement équivalent au volume initial du tube ($2,3 \pm 0,15$ mL). Si le volume n'est pas ajusté de cette façon, la suspension de 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 le contenu du tube de 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 **BD BBL Crystal** N/H ID, il est nécessaire de faire glisser l'inoculum avec précaution le long des conduits afin de s'assurer qu'un remplissage adéquat des puits a eu lieu. Avant d'aligner le couvercle, s'assurer de l'absence d'excédent de liquide entre les puits ou en provenance de la zone cible en direction des puits.
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 de solution d'inoculum dans le tube avant ou après avoir inoculé la base et ensemencer une gélose en boîte ou en tube incliné (tout milieu approprié) pour vérifier la pureté de l'inoculum. Jeter le tube pour la solution d'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 appropriées. 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 ensemencés 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 CO₂, à 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 de 35–37 °C. **NOTE** : La porte de l'incubateur ne doit pas être ouverte de manière répétée durant la période d'incubation (de préférence moins de 3 fois). Retirer les panels de l'incubateur, effectuer la lecture dans un délai de 30 min.

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 **BD 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 pour enregistrer les réactions.

- En premier, lire les colonnes F à J en se servant de la source de lumière régulière (lumière blanche).
- Lire les colonnes A à E (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 (4A).

Calcul du profil numérique BD 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 valeurs des tests positifs de chaque colonne sont additionnées. On obtient alors un nombre de 10 chiffres ; ce nombre est le profil numérique.

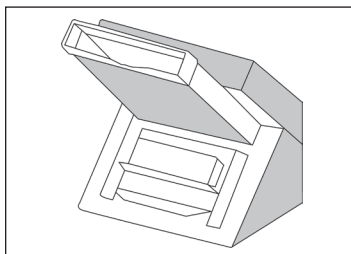
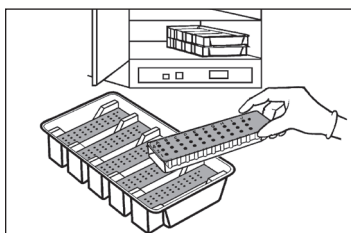
Exemple :	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	*	+	–	–	+	+	+	–	+	–
2	–	+	+	+	–	+	–	+	+	–
1	+	–	+	–	+	–	–	+	+	–
Profil	1	6	3	2	5	6	4	3	7	0

* (4A) = Contrôle négatif fluorescent

Le profil numérique obtenu, et la morphologie cellulaire si celle-ci est connue, doivent être saisis sur un micro-ordinateur (PC) dans lequel le logiciel du livre électronique des codes pour les systèmes **BD 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 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 *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* ATCC 25240 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 1J) 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.
- Si tous les puits sont négatifs, incuber le panel pendant 4 h à une température de 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.



8. 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 **BD BBL Crystal** N/H 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.

Un test additionnel de confirmation est requis pour un compte rendu d'un isolat identifié dans le système comme *Neisseria gonorrhoeae*, de la façon suivante : (1) quand les résultats positifs sont obtenus de personnes exposées à un risque faible, (2) quand les résultats positifs sont obtenus de patients avec des conséquences sociologiques ou médico-légales.¹¹

La base de données **BD BBL Crystal** N/H ID a été développée en utilisant des milieux de marque **BBL**. La réactivité de certains substrats dans des systèmes d'identification miniaturisés peut dépendre du milieu de culture de base utilisé lors de la préparation de l'inoculum. Nous recommandons les milieux énumérés ci-après pour utilisation avec le système **BD BBL Crystal** N/H ID : chocolat, TSA II, Columbia et nutritive. L'utilisation de géloses sélectives telles Martin-Lewis, MTM, le milieu NYC, V, et **BD GC-Lect** est acceptable. Les milieux contenant de l'esculine ne doivent pas être utilisés.

Les systèmes d'identification **BD BBL Crystal** 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 **BD BBL Crystal** N/H ID repose sur l'analyse statistique de tests spécialement conçus et sur une base de données exclusive.

Bien que le système **BD BBL Crystal** N/H 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.

Pour la préparation de la suspension de l'inoculum, n'utiliser que des écouvillons à embout de coton, certains écouvillons en polyester peuvent 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. Les couvercles doivent rester dans leur poche en plastique jusqu'à leur utilisation.

L'incubateur dans lequel se trouvent les panels doit être en atmosphère humide afin de prévenir une évaporation de la solution d'inoculum contenue dans les puits durant l'incubation. Le taux d'humidité recommandé est de 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 des géloses chocolat, TSA, Columbia, ou nutritive. L'utilisation de milieux sélectifs tels que Martin-Lewis, MTM, le milieu NYC, V et **BD GC-Lect** est acceptable.

Si le profil numérique **BD 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 BD 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 ait été éliminée comme cause de ce résultat.

TABLEAU 4

Tableau de contrôle de qualité du système **BD BBL Crystal** N/H ID Après 4 heures d'incubation à partir de la gélose chocolat

Pos. sur panel	Substrat	Code	<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i> ATCC 25240
4A	Contrôle négatif fluorescent	FCT	–
2A	4MU-phosphate	FHO	–
1A	L-proline-AMC	FPR	–
4B	L-sérine-AMC	FSE	+
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	V
1B	L-tryptophane-AMC	FTR	V
4C	L-phénylalanine-AMC	FPH	+
2C	N-succinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	+
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	+
4D	Acide L-glutamique-AMC	FTA	–
2D	L-arginine-AMC	FAR	V
1D	Ornithine-AMC	FOR	V
4E	Glycine-AMC	FGL	+
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	–
1E	4MU-β-D-galactoside	FBG	–
4F	Saccharose	SAC	–
2F	Maltotriose	MTT	–
1F	Carubiose	CAR	–

Pos. sur panel	Substrat	Code	<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i> ATCC 25240
4G	Pyranose	PYO	–
2G	Maltobiose	MTB	–
1G	Disaccharide	DIS	–
4H	Ribérol	RBL	–
2H	Levulose	LEV	–
1H	p-nitrophényl-phosphorylcholine	PHC	–
4I	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	GGL	–
2I	p-nitrophényl-phosphate	PHO	–
1I	ONPG	OPG	–
4J	Urée	URE	–
2J	Résazurine	REZ	+
1J	Ornithine	ORN	V

TABLEAU 5

Tableau supplémentaire de contrôle de qualité pour le système BD BBL Crystal N/H ID Après 4 heures d'incubation à partir de la gélose chocolat

Pos. sur panel	Substrat	Code	<i>Haemophilus aphrophilus</i> ATCC 19415	<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 49142	<i>Kingella denitrificans</i> ATCC 33394	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 35056
4A	Contrôle négatif fluorescent	FCT	–	–	–	–
2A	4MU-phosphate	FHO	+	–	–	+
1A	L-proline-AMC	FPR	–	+	+	–
4B	L-sérine-AMC	FSE	V	+	+	V
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	–	V	V	V
1B	L-tryptophane-AMC	FTR	V	+	+	V
4C	L-phénylalanine-AMC	FPH	+	+	+	V
2C	N-succinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	–	–	–	–
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	V	+	V	V
4D	Acide L-glutamique-AMC	FTA	+	–	–	–
2D	L-arginine-AMC	FAR	V	+	V	+
1D	Ornithine-AMC	FOR	–	+	V	–
4E	Glycine-AMC	FGL	+	+	+	+
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	–	V	+	–
1E	4MU-β-D-galactoside	FBG	+	+	–	–
4F	Saccharose	SAC	+	–	–	–
2F	Maltotriose	MTT	+	–	–	–
1F	Carubiose	CAR	V	–	–	–
4G	Pyranose	PYO	+	V	–	V
2G	Maltobiose	MTB	+	V	–	–
1G	Disaccharide	DIS	+	–	–	–
4H	Ribérol	RBL	V	–	–	–
2H	Levulose	LEV	+	–	–	–
1H	p-nitrophényl-phosphorylcholine	PHC	V	–	–	+
4I	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	GGL	+	–	–	–
2I	p-nitrophényl-phosphate	PHO	+	–	–	+
1I	ONPG	OPG	+	+	–	–
4J	Urée	URE	–	–	–	+
2J	Résazurine	REZ	V	–	V	–
1J	Ornithine	ORN	V	V	V	+

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Reproductibilité : dans une étude externe impliquant trois laboratoires cliniques (un total de trois évaluations), la reproductibilité des réactions des substrats (29) du système **BD BBL Crystal N/H ID** a été évaluée lors de tests répétés. La reproductibilité des réactions de chaque substrat se situait entre 85,7 % et 100 %. La reproductibilité globale des panels **BD BBL Crystal N/H ID** a été déterminée comme étant 95,9 %.²²

Exactitude de l'identification : la performance du système **BD BBL Crystal N/H ID** a été comparée à celle de systèmes d'identification actuellement disponibles sur le marché à l'aide d'**isolats cliniques et de cultures mères**. Un total de trois études a été réalisé dans trois 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 513 isolats testés au cours des trois études par le système d'identification **BD BBL Crystal N/H**, 459 (89,5 %) isolats ont été correctement identifiés sans nécessiter de tests supplémentaires, et 480 (93,6 %) l'ont été lorsque des tests supplémentaires étaient compris. Un total de 26 (5,1 %) isolats ont été incorrectement identifiés et un message "Aucune identification" a été obtenu pour 7 (1,4 %) isolats.²²

MATERIEL DISPONIBLE

N° cat.	Description	N° cat.	Description
245130	BD BBL Crystal N/H <i>Neisseria/Haemophilus</i> ID System, 1 trousse.	221557	Gélose Martin-Lewis BD BBL , coffret de 20 géloses.
245038	BD BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid (solution pour l'inoculum).	221558	Gélose Martin-Lewis BD BBL , carton de 100 géloses.
245031	Visionneuse pour panels BD BBL Crystal , modèle U.S.A., 110 V, 60 Hz.	297173	Milieu New York City (NYC) BD BBL modifié, coffret de 20.
245032	Visionneuse pour panels BD BBL Crystal , modèle européen, 220 V, 50 Hz.	297801	Gélose nutritive BD BBL , coffret de 10.
245033	Visionneuse pour panels BD BBL Crystal , modèle japonais, 100 V, 50/60 Hz.	221567	Gélose Thayer-Martin BD BBL modifiée (MTM II), coffret de 20.
245034	Tube d'éclairage UV à ondes longues pour visionneuse pour panels BD BBL Crystal .	221568	Gélose Thayer-Martin BD BBL modifiée (MTM II), carton de 100.
245036	Tube d'éclairage à lumière blanche pour visionneuse pour panels BD BBL Crystal .	221239	Gélose de soja BD Trypticase avec 5 % de sang de mouton (TSA II), coffret de 20.
245035	Manuel des codes pour le système BD BBL Crystal d'identification des bactéries <i>Neisseria/Haemophilus</i> .	221261	Gélose de soja BD Trypticase avec 5 % de sang de mouton (TSA II), carton de 100.
221169	Gélose chocolat II BD BBL (Gélose GC II avec Hémoglobine et BD IsoVitaleX), coffret de 20.	221874	Gélose V BD BBL (pour <i>G. vaginalis</i>), coffret de 10.
221267	Gélose chocolat II BD BBL (Gélose GC II avec Hémoglobine et BD IsoVitaleX), carton de 100.	221875	Gélose V BD BBL (pour <i>G. vaginalis</i>), coffret de 100.
221165	Gélose Columbia BD BBL avec 5 % de sang de mouton, coffret de 20 géloses.	297715	Gélose BD GC-Lect , coffret de 20.
221263	Gélose Columbia BD BBL avec 5 % de sang de mouton, carton de 100 géloses.	297928	Gélose BD GC-Lect , carton de 100.
		212539	Trousse de colorants de Gram BD BBL , coffret de 4 flacons de 250 mL.

RÉFÉRENCES : voir la rubrique « References » du texte anglais.

Service et assistance technique : contacter votre représentant local de BD ou consulter le site www.bd.com.

BD BBL Crystal Identifizierungssysteme

Testsystem zur Identifizierung von *Neisseria/Haemophilus*

CLIA-KOMPLEXITÄT: HOCH

Deutsch

CDC-IDENTIFIZIERUNGSCODES

ANALYTE: 0412

TESTSYSTEM: 07807

VERWENDUNGSZWECK

Das **BD BBL Crystal** Testsystem zur Identifizierung (ID) von *Neisseria/Haemophilus* (N/H) ist eine miniaturisierte Identifizierungsmethode, die modifizierte konventionelle, fluorogene und chromogene Substrate verwendet. Es dient zur Identifizierung häufig isolierter *Neisseria* und *Haemophilus*- sowie einiger anderer anspruchsvoller Bakterien aus klinischen Proben.^{1,2,6,15,18}

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Bereits im Jahr 1918 wurde über Mikromethoden zur biochemischen Identifizierung von Mikroorganismen berichtet.³ Mehrere Veröffentlichungen berichteten über die Verwendung von Reagenzien-impregnierten Papierplättchen und Mikroröhrchen zur Differenzierung von Enterobakterien.^{3,4,8,19,21} 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 **BD 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 **BD BBL Crystal** N/H-ID-Panel, chromogen- und fluorogengebundene Substrate zum Nachweis von Enzymen, die von Mikroorganismen zur Metabolisierung verschiedener Substrate verwendet werden.^{5,6,8-10,13-17}

Der **BD BBL Crystal** N/H-ID-Testkit besteht aus (i) Deckeln für die **BD BBL Crystal** N/H-ID-Panels, (ii) **BD BBL Crystal** Untersätzen und (iii) Röhren mit **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID-Inokulumslüssigkeit (IF). 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 Inokulumslüssigkeit 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 Profinummer umgewandelt, die als Basis für die Identifizierung dient.²⁰ Biochemische und enzymatische Reaktionsmuster für die 29 **BD BBL Crystal** N/H-ID-Substrate für eine Vielzahl von Mikroorganismen sind in der **BD BBL Crystal** N/H-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 **BD BBL Crystal** N/H-ID-Panels enthalten 29 getrocknete biochemische und enzymatische Substrate. Zur Rehydrierung der Substrate dient eine Bakteriensuspension in der Inokulumslüssigkeit. 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-Methylum-Belliferon (4MU) oder 7-Amino-4-Methylcumarin (7-AMC) enthalten, führen zu intensiverer Fluoreszenz, die visuell leicht mit einer UV-Lampe nachgewiesen werden kann.^{13,14,16,17} 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 in den **BD BBL Crystal** ID-Systemen.

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 BD BBL Crystal N/H-ID-System gespeicherte Taxa
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>Cardiobacterium hominis</i> ¹
<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>
<i>Haemophilus aphrophilus</i> / <i>paraphrophilus</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i> ¹
<i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i> ¹
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Haemophilus segnis</i> ¹
<i>Kingella denitrificans</i>
<i>Kingella kingae</i>
<i>Kingella</i> Spezies (einschließlich <i>K. denitrificans</i> und <i>K. kingae</i>)
<i>Moraxella atlantae</i>
<i>Moraxella</i> (<i>Branhamella</i>) <i>catarrhalis</i>
<i>Moraxella lacunata</i> ¹
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>
<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Moraxella phenylpyruvica</i> ¹
<i>Moraxella</i> Spezies (einschließlich <i>M. atlantae</i> , <i>M. lacunata</i> , <i>M. nonliquefaciens</i> , <i>M. osloensis</i> , <i>M. phenylpyruvica</i>)
<i>Neisseria cinerea</i> ¹
<i>Neisseria elongata</i> (einschließlich <i>N. elongata</i> Subspezies <i>elongata</i> , <i>N. elongata</i> Subspezies <i>glycolytica</i> und <i>N. elongata</i> Subspezies <i>nitroreducens</i>)
<i>Neisseria flavescens</i> ¹
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Neisseria sicca</i>
<i>Neisseria subflava</i> (einschließlich <i>N. subflava</i> Biovarianten <i>flava</i> , <i>N. subflava</i> biovar <i>perflava</i> und <i>N. subflava</i> biovar <i>subflava</i>)
<i>Neisseria weaverii</i> ¹
<i>Oligella</i> Spezies (einschließlich <i>O. urethralis</i> und <i>O. ureolytica</i>)
<i>Oligella ureolytica</i> ¹
<i>Oligella urethralis</i>
<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Suttonella indologenes</i>

1 = Diese Taxa haben <10 einzigartige **BD BBL Crystal** Profile in der gegenwärtigen Datenbank.

TABELLE 2
Im BD BBL Crystal N/H-ID-System angewandte Verfahrensprinzipien

Panel-Position	Testsubstrat	Code	Prinzip (Literaturnachweis)
4A	Fluoreszierende negative Kontrolle	FCT	Kontrolle zur Standardisierung der fluoreszierenden Substratergebnisse.
2A	4MU-Phosphat	FHO	Enzymatische Hydrolyse der Amid- oder Glykosidbindung setzt fluoreszierende Cumarinderivate frei. ^{5,9,13,14,16,17}
1A	L-Prolin-AMC	FPR	
4B	L-Serin-AMC	FSE	
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	
1B	L-Tryptophan-AMC	FTR	
4C	L-Phenylalanin-AMC	FPH	
2C	N-Sukzinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	
4D	L-Glutaminsäure-AMC	FTA	
2D	L-Arginin-AMC	FAR	
1D	Ornithin-AMC	FOR	
4E	Glyzin-AMC	FGL	
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	
1E	4MU-β-D-Galaktosid	FBG	
4F	Saccharose	SAC	Die Verwendung von Kohlenhydrat resultiert in niedrigerem pH-Wert und einem Indikatorumschlag (Phenolrot). ^{1-4,8,18}
2F	Maltotriose	MTT	
1F	Karubiose	CAR	
4G	Pyranose	PYO	
2G	Maltobiose	MTB	
1G	Disaccharid	DIS	
4H	Riberol	RBL	
2H	Lävulose	LEV	
1H	p-Nitrophenyl-Phosphorylcholin	PHC	Enzymatische Hydrolyse des farblosen arylsubstituierten Glykosids setzt gelbes p-Nitrophenol frei. ^{5,10,14}
4I	γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilid	GGL	Enzymatische Hydrolyse des farblosen Amidssubstrats setzt gelbes p-Nitroanilin frei. ^{5,10,14}
2I	p-Nitrophenyl-Phosphat	PHO	Enzymatische Hydrolyse des farblosen arylsubstituierten Glykosids setzt gelbes p-Nitrophenol frei. ^{5,10,14}
1I	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktosid (ONPG)	OPG	Hydrolyse des Harnstoffs und der sich daraus bildende Ammoniak verursachen einen Farbumschlag des pH-Indikators (bromthymolblau). ^{2,7,12}
4J	Harnstoff	URE	
2J	Resazurin	REZ	
1J	Ornithin	ORN	
			Die Reduktion auf Resorufin von Resazurin ruft einen Farbumschlag des Indikators hervor. ⁵
			Die Verwendung von Ornithin führt zu höherem pH-Wert und einem Farbumschlag des Indikators (bromkresolviolett). ²

REAGENZIEN

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

TABELLE 3
Im BD BBL Crystal N/H 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	4MU-Phosphat	FHO	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	4MU-Phosphat	≤ 1
1A	L-Prolin-AMC	FPR	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	L-Prolin-AMC	≤ 1
4B	L-Serin-AMC	FSE	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	L-Serin-AMC	≤ 1
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	LYS-ALA-AMC	≤ 1
1B	L-Tryptophan-AMC	FTR	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	L-Tryptophan-AMC	≤ 1
4C	L-Phenylalanin-AMC	FPH	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	L-Phenylalanin-AMC	≤ 1

Panel-Position	Substrat	Code	Pos.	Neg.	Reaktive Bestandteile	Ungef. Menge (g/L)
2C	N-Sukzinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	N-Sukzinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	≤ 1
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	ALA-ALA-PHE-AMC	≤ 1
4D	L-Glutaminsäure-AMC	FTA	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	L-Glutaminsäure-AMC	≤ 1
2D	L-Arginin-AMC	FAR	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	L-Arginin-AMC	≤ 1
1D	Ornithin-AMC	FOR	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	Ornithin-AMC	≤ 1
4E	Glyzin-AMC	FGL	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	Glyzin-AMC	≤ 1
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	GLY-PRO-AMC	≤ 1
1E	4MU-β-D-Galaktosid	FBG	blaue Fluoreszenz >FCT Vertiefung	blue Fluoreszenz ≤ FCT Vertiefung	4MU-β-D-Galaktosid	≤ 1
4F	Saccharose	SAC	gold/gelb	orange/rot	Saccharose	≤ 300
2F	Maltotriose	MTT	gold/gelb	orange/rot	Maltotriose	≤ 300
1F	Karubiose	CAR	gold/gelb	orange/rot	Karubiose	≤ 300
4G	Pyranose	PYO	gold/gelb	orange/rot	Pyranose	≤ 300
2G	Maltobiose	MTB	gold/gelb	orange/rot	Maltobiose	≤ 300
1G	Disaccharid	DIS	gold/gelb	orange/rot	Disaccharid	≤ 300
4H	Riberol	RBL	gold/gelb	orange/rot	Riberol	≤ 300
2H	Lävulose	LEV	gold/gelb	orange/rot	Lävulose	≤ 300
1H	p-n-p-Phosphorylcholin	PHC	gelb	farblos	p-n-p-Phosphorylcholin	≤ 10
4I	γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilide	GGL	gelb	farblos	γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilide	≤ 10
2I	p-n-p-Phosphat	PHO	gelb	farblos	p-n-p-Phosphat	≤ 10
1I	ONPG	OPG	gelb	farblos	ONPG	≤ 10
4J	Harnstoff	URE	aquamarin/blau	gelb/grün	Harnstoff	≤ 50
2J	Resazurin	REZ	rosa	blau/lila	Resazurin	≤ 1
1J	Ornithin	ORN	lila	gelb/grau	Ornithin	≤ 200

Sicherheitshinweise: In-Vitro-Diagnostik

Nach einer Prüfung seitens 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 07807.

Nach Verwendung müssen alle infektiösen Materialien einschließlich Platten, Wattetupfern, Inokulumsflüssigkeit-Röhrchen und Panels vor dem Verwerfen oder Verbrennen autoklaviert 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 **BD 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 2–30 °C aufbewahren. Die nicht verwendeten, sich in der Schale befindenden Untersätze in der Plastikhülle aufbewahren. Leere Schalen sind zum Inkubieren der inokulierten Panels zu verwenden.

Inokulumsflüssigkeit: **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID-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. Es sollte ausschließlich **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H Inokulumsflüssigkeit mit den **BD BBL Crystal** N/H-ID-Panels verwendet werden.

BD BBL Crystal N/H-ID-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 Komponenten des Kits können bei 2–25 °C aufbewahrt werden. Falls der Kit oder eine der Komponenten im Kühlschrank aufbewahrt wird, sollten sie vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

PROBENENTNAHME UND VERARBEITUNG

BD BBL Crystal ID-Systeme sind **nicht** zur direkten Verwendung mit klinischen Proben geeignet. Isolate müssen auf Medien wie z.B. Schokoladenagar, **BD Trypticase**-Soja-Agar mit 5 % Schafblut (TSA), Columbia-Agar mit 5 % Schafblut (Columbia) und Nährstoff-Agar gewachsen sein. Selektive Medien wie z.B. Martin-Lewis Agar, Modifizierter Thayer-Martin Agar (MTM), Modifiziertes New York City Medium (NYC), V-Agar (für *G. vaginalis*) und **BD GC-Lect** Agar können auch verwendet werden. Medien, die Eskulin enthalten, sind nicht zu verwenden. Das Testisolat muß für die meisten Arten eine höchstens 18–24 h alte Reinkultur sein; für einige langsam wachsende Organismen können auch bis zu 48 h alte Kulturen verwendet werden. Zur Vorbereitung der Inokulumssuspension sollten ausschließlich Applikatoren mit Baumwollspitze verwendet werden, da einige Polyesterstopfen 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 **BD 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.^{1,17}

TESTVERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: **BD BBL Crystal** N/H-ID-Kit –

20 Deckel für die **BD BBL Crystal** N/H-ID-Panels,

20 **BD BBL Crystal** Untersätze,

20 Röhrchen mit **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID-IF. Jedes Röhrchen enthält etwa $2,3 \pm 0,15$ mL Inokulumsflüssigkeit folgender Zusammensetzung: KCl 7,5 g, CaCl_2 0,5 g, Tricin N-[2-Hydroxy-1, 1-bis (Hydroxymethyl)-Methyl] Glycin 0,895 g, destilliertes Wasser auf 1000 mL.

2 Inkubationsschalen,

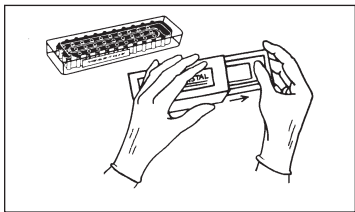
1 Berichtsbogen für das **BD BBL Crystal** N/H-ID-System.

Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial: Sterile Baumwollstopfer (*keine Polyesterstopfer verwenden*), Inkubator ($35\text{--}37^\circ\text{C}$), CO_2 -frei (40–60 % Luftfeuchtigkeit), McFarland Standard Nr. 3, **BD BBL Crystal** Panel-Betrachter, Elektronisches Codebuch für das **BD BBL Crystal** ID-System oder **BD BBL Crystal** N/H Manuelles Codebuch, und geeignete Kulturmedien.

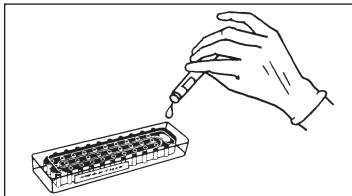
Ferner werden die zur Vorbereitung, Lagerung und Verarbeitung der Blutproben verwendeten Geräte und Laborutensilien benötigt.

Testverfahren: Für das **BD BBL Crystal** N/H-ID-System wird das Ergebnis einer Gram-Färbung benötigt.

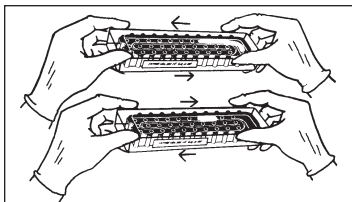
1. Deckel aus der Hülle nehmen. Trockenmittel werfen. Die geschützten Deckel sollten innerhalb 1 h nach Entnahme aus der Hülle verwendet werden. Panel nicht verwenden, wenn sich kein Trockenmittel in der Hülle befindet.
2. Ein Röhrchen mit Inokulumsflüssigkeit mit der Nummer der Patientenprobe beschriften. Unter Anwendung aseptischer Arbeitsweise, mehrere morphologisch gleiche Kolonien mit der Spitze eines sterilen Baumwollstopfers (*keine Polyester-Stopfer verwenden*), einem hölzernen Applikatorstäbchen oder einer Einwegplastiköse von einem der empfohlenen Medien (siehe Abschnitt "Probenentnahme und Verarbeitung") entnehmen.
3. Kolonien in einem Röhrchen mit **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID-Inokulumsflüssigkeit suspendieren.
4. Röhrchen wieder verschließen und etwa 10–15 S homogenisieren. Die Trübung sollte einem McFarland Standard Nr. 3 entsprechen. Falls die Konzentration der Inokulumssuspension während der Zubereitung den McFarland Standard überschreitet, wird eine der folgenden Maßnahmen empfohlen:
 - a. Mittels eines frischen Röhrchens Inokulumsflüssigkeit eine neue Inokulumssuspension entsprechend dem McFarland Standard Nr. 3 zubereiten.
 - b. Falls keine weiteren Kolonien für die Zubereitung einer neuen Inokulumssuspension zur Verfügung stehen, unter Anwendung aseptischer Arbeitsweise das Inokulum durch Zugabe des benötigten Mindestvolumens (höchstens 1,0 mL) von 0,85%iger steriler Salzlösung oder Inokulumflüssigkeit verdünnen, um die Trübung auf einen McFarland Standard Nr. 3 entsprechenden Wert zu reduzieren. Die dem Röhrchen zugesetzte, zusätzliche Flüssigkeitsmenge mit einer sterilen Pipette entfernen, so daß das Endvolumen der Inokulumsflüssigkeit etwa dem Originalvolumen des Röhrchens ($2,3 \pm 0,15$ mL) entspricht. Wird das Volumen auf diese Weise nicht reduziert, fließt die Inokulumssuspension über den schwarzen Teil des Untersatzes, wodurch das Panel unbrauchbar wird.



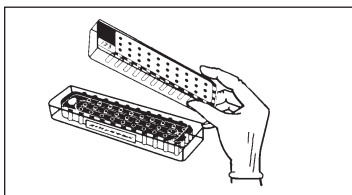
5. Einen Untersatz nehmen und die Nummer der Patientenprobe auf die Seitenwand schreiben.
6. Den ganzen Inhalt des Inokulumsflüssigkeit-Röhrchens in das dafür vorgesehene Reservoir des Untersatzes füllen.



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 **BD BBL Crystal N/H-ID**-Panels verwendet werden, ist das Inokulum mit Vorsicht entlang der Laufspur fließen zu lassen, damit auch alle Vertiefungen gefüllt werden. Sorgen Sie dafür, daß sich keine überschüssige Flüssigkeit zwischen den Vertiefungen befindet oder keine aus dem Reservoir des Untersatzes in Richtung Vertiefungen fließt, bevor der Deckel ausgerichtet wird.

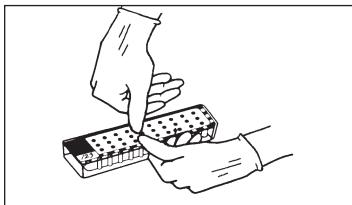


8. Den Deckel so ausrichten, daß sich die Etikettenseite des Deckels über dem Reservoir des Untersatzes befindet.

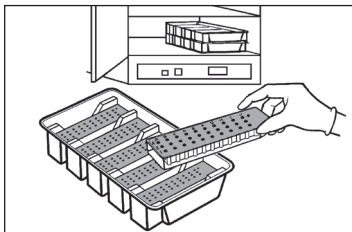


9. Niederdrücken, bis ein leichter Widerstand zu fühlen ist. Mit den Daumen auf beiden Seiten am Rand des Deckels etwa in der Panel-Mitte gleichzeitig niederdrücken, bis der Deckel einrastet (es sind zwei "Klicks" zu hören).

Reinkultur: Zur Durchführung einer Reinheitsprüfung entweder vor oder nach Beimpfen des Untersatzes mit einer sterilen Öse einen kleinen Tropfen vom Inokulumsflüssigkeit-Röhrchen mit dem Inokulum entnehmen und damit einen Schrägagar oder eine Agarplatte (jegliches geeignete Medium) beimpfen. Das Inokulumsflüssigkeit-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 geeigneten Bedingungen bebrüten. Die Agarplatte oder der Schrägagar können, falls erwünscht, ebenso für zusätzliche Tests oder für die Serologie verwendet werden.

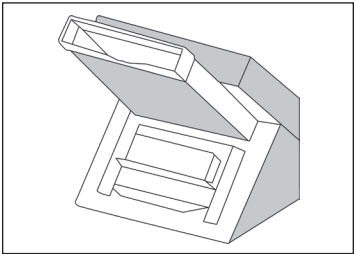


Inkubation: Die beimpften Panels in Inkubationsschalen stellen. Zehn Panels passen in eine Schale (5 Reihen à 2 Panels). Alle Panels sollten **umgekehrt** (größere Fenster nach oben; Etikett nach unten) in einem CO₂-freien Inkubator mit 40–60 % **Luftfeuchtigkeit** inkubiert werden. Zur Inkubation sollten 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 3 Mal). Die Panels sollten nach Herausnahme aus dem Inkubator innerhalb von 30 min abgelesen werden.



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 **BD BBL Crystal** Panel-Betrachters abgelesen werden. Zur Interpretation der Reaktionen die Farbreaktionstabelle bzw. Tabelle 3 heranziehen und die Reaktionen auf dem Berichtsbogen eintragen.

- a. Spalten F bis J zuerst mit der regulären (weißes Licht) Lampe ablesen.
- b. Spalten A bis E (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 (4A).



Errechnen der BD BBL Crystal Profilnummer: Jedem positiven Testergebnis (außer 4A, 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 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	+	–	+	–	+	–	–	+	+	–
Profil	1	6	3	2	5	6	4	3	7	0

* (4A) = fluoreszierende negative Kontrolle

Um eine Identifizierung zu erhalten, muß die entstandene Profilnummer, und die Zellmorphologie, wenn bekannt, in einen Computer eingegeben werden, in dem das Elektronische Codebuch für das **BD BBL Crystal** ID-System installiert wurde. Ein manuelles Codebuch ist ebenfalls erhältlich. Falls kein Computer zur Verfügung steht, leistet der Technische Kundendienst von BD Hilfestellung bei der Identifizierung.

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

- 1. Gemäß empfohlenem Verfahren (s. "Testverfahren") ein Panel mit *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* ATCC 25240 beschicken.
 - 2. Vor der Inkubation das Panel 1 min (jedoch nicht mehr als 2 min) bei Raumtemperatur stehen lassen.
 - 3. Mit Hilfe des Panel-Betrachters und der Farbreaktionstabelle die Reaktionen ablesen und aufzeichnen.
 - 4. Falls laut Farbreaktionstabelle (nach 1–2 min) irgendwelche Vertiefungen, ausgenommen 1J, positiv sind, DIE PANELS dieser Charge nicht verwenden, sondern mit dem Technischen Kundendienst von BD in Verbindung treten.
 - 5. Wenn alle Vertiefungen negativ sind, das Panel 4 h bei 35–37 °C inkubieren.
 - 6. Panel mit dem Panel-Betrachter und der Farbreaktionstabelle ablesen; Reaktionen auf dem Berichtsbogen eintragen.
 - 7. Die aufgezeichneten Reaktionen mit den Reaktionen in Tabelle 4 vergleichen. Falls abweichende Resultate erzielt wurden, vor Kontaktaufnahme mit dem Technischen Kundendienst von BD die Reinheit des Qualitätskontrollstamms bestätigen.
 - 8. 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 **BD BBL Crystal** N/H-ID-System ist für die angegebenen Taxa vorgesehen. Mit diesem System sollten ausschließlich in Tabelle 1 aufgelistete Taxa verwendet werden.

Ein zusätzlicher Bestätigungstest ist zum Berichten eines im System als *Neisseria gonorrhoeae* identifizierten Isolats unter folgenden Bedingungen erforderlich: (1) wenn positive Ergebnisse von Patienten niedrigen Risikos erhalten werden, (2) wenn positive Ergebnisse von Patienten erhalten werden, die damit soziologische oder gerichtsmedizinische Folgen nach sich ziehen.¹¹

Die **BD BBL Crystal** ID-Datenbank wurde mit Medien der Marke **BBL** entwickelt. Die Reaktivität einiger Substrate in miniaturisierten Nachweissystemen kann vom Medium, welches ursprünglich bei der Zubereitung des Inokulums verwendet wurde, abhängen. Zur Verwendung mit dem **BD BBL Crystal** N/H-ID-System empfehlen wir die folgenden Medien: Schokolade, TSA II, Columbia und Nährstoff. Selektive Medien wie z.B. Martin-Lewis, MTM, NYC Medium, V und **BD GC-Lect** können auch verwendet werden. Medien, die Eskulin enthalten, sind nicht zu verwenden.

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

Auch wenn das **BD BBL Crystal** N/H-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 endgültigen 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.

Zur Vorbereitung der Inokulumssuspension sollten ausschließlich Tupfer mit Baumwollspitze verwendet werden, da einige Polyester tupfer das Inokulum 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 Inkubator, in den die Panels gestellt werden, sollte feuchte Luft enthalten, um die Verdunstung von Inokulumflüssigkeit 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 Schokoladenagar, TSA, Columbia oder Nährstoff gewachsen sein. Selektive Medien wie z.B. Martin-Lewis, MTM, NYC Medium, V und **BD GC-Lect** können auch verwendet werden.

Wenn das **BD BBL Crystal** Testprofil das Ergebnis "Keine Identifizierung" liefert und die Reinheit der Kultur bestätigt wurde, dann besteht die Wahrscheinlichkeit, daß (i) das Testisolat *atypische BD 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.

TABELLE 4
Qualitätskontroll-Tabelle für das BD BBL Crystal N/H-ID-System Nach 4-stündiger Inkubation auf Schokoladenagar

Panel-Position	Substrat	Code	<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i> ATCC 25240
4A	Fluoreszierende negative Kontrolle	FCT	–
2A	4MU-Phosphat	FHO	–
1A	L-Prolin-AMC	FPR	–
4B	L-Serin-AMC	FSE	+
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	v
1B	L-Tryptophan-AMC	FTR	v
4C	L-Phenylalanin-AMC	FPH	+
2C	N-Sukzinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	+
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	+
4D	L-Glutaminsäure-AMC	FTA	–
2D	L-Arginin-AMC	FAR	v
1D	Ornithin-AMC	FOR	v
4E	Glyzin-AMC	FGL	+
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	–
1E	4MU-β-D-Galaktosid	FBG	–
4F	Saccharose	SAC	–
2F	Maltotriose	MTT	–
1F	Karubiose	CAR	–
4G	Pyranose	PYO	–
2G	Maltobiose	MTB	–
1G	Disaccharid	DIS	–
4H	Riberol	RBL	–
2H	Lävulose	LEV	–
1H	p-n-p-Phosphorylcholin	PHC	–
4I	γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilid	GGL	–
2I	p-n-p-Phosphat	PHO	–
1I	ONPG	OPG	–
4J	Harnstoff	URE	–
2J	Resazurin	REZ	+
1J	Ornithin	ORN	v

TABELLE 5
Zusätzliche Qualitätskontroll-Stämme für das BD BBL Crystal N/H-ID-System Nach 4-stündiger Inkubation auf Schokoladenagar

Panel-Position	Substrat	Code	<i>Haemophilus aphrophilus</i> ATCC 19415	<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 49142	<i>Kingella denitrificans</i> ATCC 33394	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 35056
4A	Fluoreszierende negative Kontrolle	FCT	—	—	—	—
2A	4MU-Phosphat	FHO	+	—	—	+
1A	L-Prolin-AMC	FPR	—	+	+	—
4B	L-Serin-AMC	FSE	v	+	+	v
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	—	v	v	v
1B	L-Tryptophan-AMC	FTR	v	+	+	v
4C	L-Phenylalanin-AMC	FPH	+	+	+	v
2C	N-Sukzinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	—	—	—	—
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	v	+	v	v
4D	L-Glutaminsäure-AMC	FTA	+	—	—	—
2D	L-Arginin-AMC	FAR	v	+	v	+
1D	Ornithin-AMC	FOR	—	+	v	—
4E	Glyzin-AMC	FGL	+	+	+	+
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	—	v	+	—
1E	4MU-β-D-Galaktosid	FBG	+	+	—	—
4F	Saccharose	SAC	+	—	—	—
2F	Maltotriose	MTT	+	—	—	—
1F	Karubinose	CAR	v	—	—	—
4G	Pyranose	PYO	+	v	—	v
2G	Maltobiose	MTB	+	v	—	—
1G	Disaccharid	DIS	+	—	—	—
4H	Ribitol	RBL	v	—	—	—
2H	Lävulose	LEV	+	—	—	—
1H	p-n-p-Phosphorylcholin	PHC	v	—	—	+
4I	γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilid	GGL	+	—	—	—
2I	p-n-p-Phosphat	PHO	+	—	—	+
1I	ONPG	OPG	+	+	—	—
4J	Harnstoff	URE	—	—	—	+
2J	Resazurin	REZ	v	—	v	—
1J	Ornithin	ORN	v	v	v	+

LEISTUNGSMERKMALE

Reproduzierbarkeit: In einer externen Studie an drei klinischen Labors (Summe aus drei Auswertungen) wurde die Reproduzierbarkeit der Reaktionen der **BD BBL Crystal N/H-ID-Substrate** (29) in Wiederholungstests untersucht. Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Substrate betrug zwischen 85,7 % und 100 %. Insgesamt lag die Reproduzierbarkeit des **BD BBL Crystal N/H-ID-Panels** bei 95,9 %.²²

Genauigkeit der Identifizierung: Die Leistung des **BD BBL Crystal N/H-ID-Systems** wurde unter **Verwendung klinischer Isolate und Stammkulturen** mit einem derzeit im Handel erhältlichen System verglichen. Insgesamt wurden drei Studien an drei 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 insgesamt 513 Isolaten, die in den drei Studien unter Verwendung des **BD BBL Crystal N/H-Identifizierungssystems** getestet wurden, wurden 459 (89,5 %) ohne Verwendung zusätzlicher Tests richtig identifiziert und 480 (93,6 %) unter Verwendung zusätzlicher Tests richtig identifiziert. Insgesamt 26 (5,1 %) Isolate wurden nicht richtig identifiziert und bei 7 (1,4 %) Isolaten erschien die Meldung "Keine Identifizierung".²²

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.-Nr.Beschreibung	Best.-Nr.Beschreibung
245130 BD BBL Crystal N/H Neisseria/Haemophilus ID System, 1 Kit.	245034 Langwellen-UV-Leuchtröhre für den BD BBL Crystal Panel-Betrachter.
245038 BD BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid (ID-Inokulumflüssigkeit).	245036 Weißlicht-Leuchtröhre für den BD BBL Crystal Panel-Betrachter.
245031 BD BBL Crystal Panel-Betrachter, USA-Modell, 110 V, 60 Hz.	245035 Manuelles Codebuch für das BD BBL Crystal Identifizierungssystem für <i>Neisseria/Haemophilus</i> .
245032 BD BBL Crystal Panel-Betrachter, Europäisches Modell, 220 V, 50 Hz.	221169 BD BBL Schokoladenagar II (GC II Agar mit Hämoglobin und BD IsoVitaleX), Packung mit 20.
245033 BD BBL Crystal Panel-Betrachter, Japanisches Modell, 100 V, 50/60 Hz.	221267 BD BBL Schokoladenagar II (GC II Agar mit Hämoglobin und BD IsoVitaleX), Karton mit 100.

Best.-Nr.Beschreibung

- 221165 **BD BBL** Columbia-Agar mit 5 % Schafblut, Packung mit 20.
221263 **BD BBL** Columbia-Agar mit 5 % Schafblut, Karton mit 100.
221557 **BD BBL** Martin-Lewis Agar, Packung mit 20.
221558 **BD BBL** Martin-Lewis Agar, Karton mit 100.
297173 **BD BBL** New York City (NYC) Medium, modificato, Packung mit 20.
297801 **BD BBL** Nährstoff-Agar, Packung mit 10.
221567 **BD BBL** Thayer-Martin Agar, modificato (MTM II), Packung mit 20.

Best.-Nr.Beschreibung

- 221568 **BD BBL** Thayer-Martin Agar, modificato (MTM II), Karton mit 100.
221239 **BD Trypticase**-Soja-Agar mit 5 % Schafblut (TSA II), Packung mit 20.
221261 **BD Trypticase**-Soja-Agar mit 5 % Schafblut (TSA II), Karton mit 100.
221874 **BD BBL** V-Agar (für *G.vaginalis*), Packung mit 10.
221875 **BD BBL** V-Agar (für *G.vaginalis*), Packung mit 100.
297715 **BD GC-Lect** Agar, Packung mit 20.
297928 **BD GC-Lect** Agar, Karton mit 100.
212539 **BD BBL** Gram-Färbungs-Kit, Packung mit 4 x 250-mL Flaschen.

LITERATUR: S. „References“ im englischen Text.

Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung in Verbindung oder besuchen Sie www.bd.com.

BD Sistemi d'identificazione BBL Crystal **Kit per l'identificazione di *Neisseria*/*Haemophilus***

CLIA COMPLEXITY: ALTO

Italiano

I CODICI DI IDENTIFICAZIONE

DELL'ANALIZZATORE CDC È 0412

SISTEMA DI TEST: 07807

USO PREVISTO

Il sistema **BD BBL Crystal** d'identificazione (ID) di *Neisseria*/*Haemophilus* (N/H) è un metodo d'identificazione miniaturizzato che utilizza substrati convenzionali fluorogenici e cromogenici modificati. Il suo uso è previsto per l'identificazione dei batteri *Neisseria* e *Haemophilus* come pure di altri batteri esigenti frequentemente isolati da campioni clinici.^{1,2,6,15,18}

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

I micrometodi per l'identificazione biochimica di microrganismi risalgono al 1918.³ 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.^{3,4,8,19,21} 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 estremamente convenienti grazie al limitato spazio richiesto e la lunga durata di conservazione, nonché per la standardizzazione del controllo di qualità e il loro facile impiego.

In genere, molti dei test impiegati dai sistemi **BD 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, come nel caso del pannello **BD BBL Crystal** N/H ID, consente la rivelazione di enzimi utilizzati dai microbi per la metabolizzazione di vari substrati.^{5,6,8-10,13-17}

Il kit **BD BBL Crystal** N/H ID comprende (i) coperchi per pannelli **BD BBL Crystal** N/H ID, (ii) basi **BD BBL Crystal** e (iii) provette **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID di fluido d'inoculo (FI). Il coperchio contiene 29 substrati disidratati ed un controllo di fluorescenza posti sulle estremità di puntali 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 al pannello, esso scatta in posizione e l'inoculo del test reidrata i substrati dando inizio alle reazioni del 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.²⁰ Gli schemi delle reazioni biochimiche ed enzimatiche per i 29 substrati del sistema **BD BBL Crystal** N/H ID per un'ampia varietà di microrganismi sono memorizzati nel 'database' **BD BBL Crystal** N/H ID. L'identificazione deriva appunto dall'analisi comparativa del pattern di reazioni dell'isolato testato con quelle contenute nel 'database'. Si fornisce un elenco completo di unità tassonomiche comprendente il 'database' attuale in Tabella 1.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

I pannelli **BD BBL Crystal** N/H 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 dei substrati fluorogenici, contenenti derivati cumarinici del 4-metil-umbelliferone (4MU) o del 7-amino-4-metilcumarina (7-AMC), dà luogo ad uno sviluppo di fluorescenza facilmente visibile ad occhio nudo con una lampada a UV.^{13,14,16,17} 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 dei sistemi **BD BBL Crystal** ID.

Le reazioni impiegate da vari substrati e una breve spiegazione dei principi utilizzati dal sistema di identificazione sono descritte nella 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 BD BBL Crystal N/H ID	
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	
<i>Cardiobacterium hominis</i> ¹	
<i>Eikenella corrodens</i>	
<i>Gardnerella vaginalis</i>	
<i>Haemophilus aphrophilus/ paraphrophilus</i>	
<i>Haemophilus ducreyi</i>	
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i> ¹	
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	
<i>Haemophilus influenzae</i>	
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i> ¹	
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	
<i>Haemophilus segnis</i> ¹	
<i>Kingella denitrificans</i>	
<i>Kingella kingae</i>	
<i>Kingella</i> specie (include <i>K. denitrificans</i> e <i>K. kingae</i>)	
<i>Moraxella atlantae</i>	
<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>	
<i>Moraxella lacunata</i> ¹	
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	
<i>Moraxella osloensis</i>	
<i>Moraxella phenylpyruvica</i> ¹	
<i>Moraxella</i> specie (include <i>M. atlantae</i> , <i>M. lacunata</i> , <i>M. nonliquefaciens</i> , <i>M. osloensis</i> e <i>M. phenylpyruvica</i>)	
<i>Neisseria cinerea</i> ¹	
<i>Neisseria elongata</i> (include <i>N. elongata</i> sottos. <i>elongata</i> , <i>N. elongata</i> sottos. <i>glycolytica</i> e <i>N. elongata</i> sottos. <i>nitroreducens</i>)	
<i>Neisseria flavescens</i> ¹	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
<i>Neisseria lactamica</i>	
<i>Neisseria meningitidis</i>	
<i>Neisseria mucosa</i>	
<i>Neisseria sicca</i>	
<i>Neisseria subflava</i> (include <i>N. subflava</i> biovar. <i>flava</i> , <i>N. subflava</i> biovar. <i>perflava</i> e <i>N. subflava</i> biovar. <i>subflava</i>)	
<i>Neisseria weaverii</i> ¹	
<i>Oligella</i> specie (include <i>O. urethralis</i> e <i>O. ureolytica</i>)	
<i>Oligella ureolytica</i> ¹	
<i>Oligella urethralis</i>	
<i>Pasteurella multocida</i>	
<i>Suttonella indologenes</i>	

1 = Queste unità tassonomiche hanno <10 profili **BD BBL Crystal** specifici nel 'database' attuale.

TABELLA 2

Principi dei test utilizzati dal sistema BD BBL Crystal N/H ID			
Posizione nel pannello	Caratteristica del test	Codice	Principio (riferimento)
4A	Controllo negativo fluorescente	FCT	Controllo per standardizzare i risultati del substrato fluorescente. L'idrolisi enzimatica del legame ammidico o glicosidico causa il rilascio di un derivato cumarinico fluorescente. ^{5,9,13,14,16,17}
2A	4MU-fosfato	FHO	
1A	L-prolina-AMC	FPR	
4B	L-serina-AMC	FSE	
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	
1B	L-triptofano-AMC	FTR	
4C	L-fenilalanina-AMC	FPH	
2C	N-succinil-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	
4D	L-acido glutamico-AMC	FTA	

Posizione nel pannello	Caratteristica del test	Codice	Principio (riferimento)
2D	L-arginina-AMC	FAR	
1D	Oritina-AMC	FOR	
4E	Glicina-AMC	FGL	
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	
1E	4MU-β-D-galattoside	FBG	
4F	Saccarosio	SAC	L'utilizzo del carboidrato fa abbassare il pH e cambiare colore all'indicatore (rosso fenolo). ^{1-4,8,18}
2F	Maltotriosio	MTT	
1F	Carubinoso	CAR	
4G	Piranosio	PYO	
2G	Maltobiosio	MTB	
1G	Disaccaride	DIS	
4H	Riberol	RBL	
2H	Levuloso	LEV	
1H	p-nitrofenil-fosforilcolina	PHC	L'idrolisi enzimatica del glicoside incolore sostituito dall'arile rilascia p-nitrofenolo di colore giallo. ^{5,10,14}
4I	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	GGL	L'idrolisi enzimatica del substrato ammidico incolore rilascia p-nitroanilina di colore giallo. ^{5,10,14}
2I	p-nitrofenil-fosfato	PHO	L'idrolisi enzimatica del glicoside incolore sostituito dall'arile rilascia p-nitrofenolo di colore giallo. ^{5,10,14}
1I	o-nitrofenil-β-D-galattoside (ONPG)	OPG	
4J	Urea	URE	L'idrolisi dell'urea e l'ammoniaca risultante fanno cambiare colore all'indicatore del pH (blu di bromotimolo). ^{2,7,12}
2J	Resazurina	REZ	La riduzione della resazurina alla resorufina provoca cambiamento di colore. ⁶
1J	Oritina	ORN	L'utilizzo di oritina fa alzare il pH e cambiare colore all'indicatore (porpora di bromocresolo). ²

REAGENTI

Il pannello **BD BBL Crystal N/H ID** contiene 29 substrati enzimatici e biochimici. Far riferimento alla Tabella 3 per l'elenco degli ingredienti attivi.

TABELLA 3

Reagenti utilizzati nel sistema BD BBL Crystal N/H ID

Posizione nel pannello	Substrato	Codice	Pos.	Neg.	Ingredienti attivi	Quantità approssimativa (g/L)
4A	Controllo negativo fluorescente	FCT	n/a	n/a	Derivato cumarinico fluorescente	≤ 1
2A	4MU-fosfato	FHO	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	4MU-fosfato	≤ 1
1A	L-prolina-AMC	FPR	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	L-prolina-AMC	≤ 1
4B	L-serina-AMC	FSE	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	L-serina-AMC	≤ 1
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	LYS-ALA-AMC	≤ 1
1B	L-triptofano-AMC	FTR	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	L-triptofano-AMC	≤ 1
4C	L-fenilalanina-AMC	FPH	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	L-fenilalanina-AMC	≤ 1
2C	N-succinil-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	N-succinil-ALA-PRO-ALA-AMC	≤ 1
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	ALA-ALA-PHE-AMC	≤ 1
4D	L-acido glutamico-AMC	FTA	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	L-acido glutamico-AMC	≤ 1
2D	L-arginina-AMC	FAR	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	L-arginina-AMC	≤ 1
1D	Oritina-AMC	FOR	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	Oritina-AMC	≤ 1
4E	Glicina-AMC	FGL	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	Glicina-AMC	≤ 1
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	GLY-PRO-AMC	≤ 1
1E	4MU-β-D-galattoside	FBG	fluorescenza blu >pozzetto FCT	fluorescenza blu ≤ pozzetto FCT	4MU-β-D-galattoside	≤ 1

Posizione nel pannello	Substrato	Codice	Pos.	Neg.	Ingredienti attivi	Quantità approssimativa (g/L)
4F	Saccarosio	SAC	Giallo/oro	Arancio/rosso	Saccarosio	≤ 300
2F	Maltotriosio	MTT	Giallo/oro	Arancio/rosso	Maltotriosio	≤ 300
1F	Carubinoso	CAR	Giallo/oro	Arancio/rosso	Carubinoso	≤ 300
4G	Piranosio	PYO	Giallo/oro	Arancio/rosso	Piranosio	≤ 300
2G	Maltobiosio	MTB	Giallo/oro	Arancio/rosso	Maltobiosio	≤ 300
1G	Disaccaride	DIS	Giallo/oro	Arancio/rosso	Disaccaride	≤ 300
4H	Riberol	RBL	Giallo/oro	Arancio/rosso	Riberol	≤ 300
2H	Levuloso	LEV	Giallo/oro	Arancio/rosso	Levuloso	≤ 300
1H	p-nitrofenil-fosforilcolina	PHC	Giallo	Incolore	p-nitrofenil-fosforilcolina	≤ 10
4I	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	GGL	Giallo	Incolore	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	≤ 10
2I	p-nitrofenil-fosfato	PHO	Giallo	Incolore	p-nitrofenil-fosfato	≤ 10
1I	ONPG	OPG	Giallo	Incolore	ONPG	≤ 10
4J	Urea	URE	Verde acqua/blu	Giallo/verde	Urea	≤ 50
2J	Resazurina	REZ	Rosa	Blu/porpora	Resazurina	≤ 1
1J	Omitina	ORN	Porpora	Giallo/grigio	Omitina	≤ 200

Precauzioni: Diagnostica *in vitro*

In seguito alla valutazione compiuta dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e dall'U.S. Food and Drug Administration (FDA) ai sensi delle norme CLIA '88, la complessità di questo prodotto è stata definita alta. I codici di identificazione dell'analizzatore CDC è 0412; il codice CDC di identificazione di test è 07807.

Dopo l'uso, tutti i materiali infetti comprese le piastre, i tamponi di cotone, le provette del fluido per l'inoculo 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 foil 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 **BD 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 2–30 °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 inoculati.

Fluido d'inoculo: Il fluido d'inoculo (FI) **BD 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 a una temperatura di 2–25 °C. La data di scadenza è stampata sull'etichetta della provetta. Solo il fluido d'inoculo **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H deve essere usato con i pannelli **BD BBL Crystal** N/H ID.

Al ricevimento, conservare il kit **BD BBL Crystal** N/H ID a 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 **BD BBL Crystal** ID **non** è previsto l'uso diretto dei campioni clinici. Usare isolati provenienti da un terreno quale l'agar Cioccolato, l'agar soia **BD Trypticase** con sangue di montone al 5% (TSA), l'agar Columbia con sangue di montone al 5% (Columbia) e l'agar Nutritivo. Sono accettabili anche terreni selettivi come l'agar Martin-Lewis, l'agar Thayer-Martin modificato (MTM), il terreno New York City (NYC) modificato, l'agar V (per *G. vaginalis*) e l'agar **BD GC-Lect**. Non vanno usati i terreni contenenti esculina. L'isolato deve derivare da una coltura pura che non abbia più di 18–24 h di vita per quasi tutti i generi; solo per alcuni organismi a sviluppo lento si possono accettare colture fino a 48 h di vita. Per preparare la sospensione 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 impedire l'evaporazione del fluido dai pozzetti durante l'incubazione. Il livello di umidità raccomandato è del 40–60%. L'utilità dei sistemi **BD 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 i 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.^{1,17}

PROCEDURA DEL TEST

Materiali forniti: kit **BD BBL Crystal** N/H ID –

20 coperchi per pannelli **BD BBL Crystal** N/H ID,

20 basi **BD BBL Crystal**,

20 provette di fluido d'inoculo **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID. Ogni provetta contiene circa $2,3 \pm 0,15$ mL di fluido d'inoculo con la seguente formula: KCl 7,5 g, CaCl_2 0,5 g, Tricina N-[2-idrossi-1, 1-bis (idrossimetil)metil] glicina 0,895 g, acqua purificata fino a 1000 mL.

2 vassoi per incubazione,

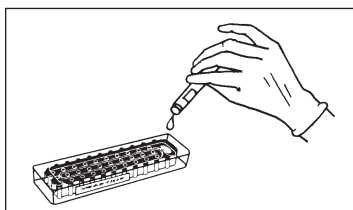
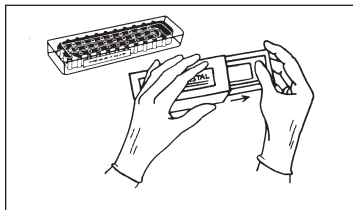
1 blocchetto per referti **BD BBL Crystal** N/H ID.

Materiali non forniti: tamponi sterili con punta in cotone (*non usare tamponi in poliestere*), incubatore ($35-37^\circ\text{C}$) senza CO_2 (umidità al 40–60%), standard McFarland N° 3, visore per pannelli **BD BBL Crystal**, Libro elettronico dei codici per i sistemi **BD BBL Crystal** ID o Manuale dei codici **BD BBL Crystal** N/H e terreni di coltura idonei.

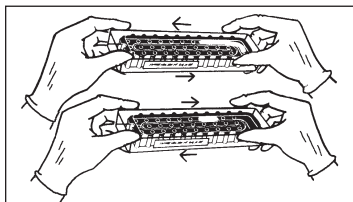
Sono inoltre richiesti gli strumenti di laboratorio necessari per la preparazione, conservazione e manipolazione di campioni clinici.

Procedura del test: Il sistema **BD BBL Crystal** N/H ID richiede una colorazione di Gram.

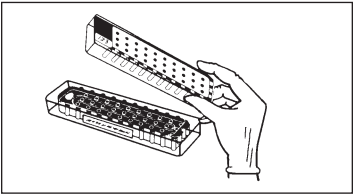
1. Rimuovere i coperchi dal sacchetto. Eliminare l'essiccante. Una volta rimossi dal sacchetto, i coperchi, protetti dalla copertina antipolvere, vanno adoperati nel giro di 1 h. Non usare il pannello se non c'è l'essiccante nel sacchetto.
2. Prelevare una provetta di fluido d'inoculo e contrassegnarla 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 **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID.
4. Richiudere con l'apposito coperchio e vortexare per circa 10–15 s. La torbidità dovrebbe equivalere ad uno standard McFarland N° 3. Qualora la concentrazione della sospensione d'inoculo dovesse superare quello standard McFarland, si raccomanda di seguire una delle seguenti operazioni:
 - a. Usare una provetta nuova di fluido d'inoculo per preparare una nuova sospensione d'inoculo equivalente allo standard McFarland N° 3.
 - b. Se non sono disponibili altre colonie per la preparazione di una nuova sospensione d'inoculo, con l'impiego di tecniche sterili diluire l'inoculo aggiungendo il minimo volume richiesto (non superando però 1,0 mL) di soluzione salina sterile allo 0,85%, o di fluido d'inoculo, in modo da ridurre la torbidità a un livello equivalente allo standard McFarland N° 3. Rimuovere la quantità in eccesso aggiunta alla provetta con una pipetta sterile, facendo in modo che il volume finale del fluido d'inoculo equivalga approssimativamente al volume originale della provetta ($2,3 \pm 0,15$ mL). La mancata effettuazione di tale aggiustamento del volume comporterà la fuoriuscita della sospensione d'inoculo sulla porzione nera della base, rendendo il pannello inutilizzabile.
5. Prelevare una base e annotare il numero di campione del paziente nella parete laterale.
6. Versare nell'area segnata della base tutto il fluido d'inoculo contenuto nella provetta.



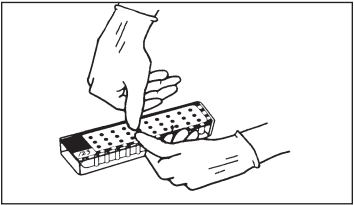
7. Tenere ferma la base con entrambe le mani e far avanzare delicatamente l'inoculo lungo i canali fino al riempimento di tutti i pozzetti. Far ritornare all'area segnata il fluido eccedente e collocare la base sopra un ripiano. Data l'elevata concentrazione cellulare usata nei pannelli del sistema **BD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



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

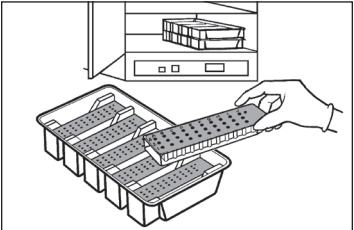


9. Premere verso il basso fino a quando non si avverta una lieve resistenza. Mettere i pollici sul bordo del coperchio, al centro del pannello e premere dai due lati verso il basso simultaneamente fino a quando il coperchio non scatti in posizione (si devono udire due "clac").

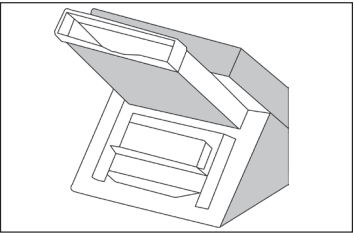


Piastra per il controllo della purezza: Usando un'ansa sterile, prelevare una piccola goccia dalla provetta di fluido d'inoculo prima o dopo l'inoculo del pannello, e inoculare una provetta a becco di clarino o una piastra di agar (qualunque terreno adatto) per il controllo della purezza. Eliminare la provetta del fluido d'inoculo e il coperchio 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 idonee. La piastra o la provetta a becco di clarino per il controllo della purezza possono essere impiegate 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 CO₂ con **umidità** pari al 40–60%. Durante l'incubazione, occorre evitare di sovrapporre più di due 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). Dopo aver tolto i pannelli dall'incubatore, effettuare la lettura entro 30 min.



Lettura: 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 **BD BBL Crystal**. Per l'interpretazione delle reazioni far riferimento alla tavola sinottica dei colori delle reazioni e/o alla Tabella 3. Registrare le reazioni annotandole sul blocchetto per referti.



a. Leggere le colonne da F a J, usando la lampada regolare (bianca).

b. Leggere le colonne da A a E (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 (4A).

Calcolo del numero di profilo BD 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 valori che risultano da ogni reazione positiva 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	+	–	+	–	+	–	–	+	+	–
Profilo	1	6	3	2	5	6	4	3	7	0

*(4A) = controllo negativo di fluorescenza

Il numero di profilo risultante e la morfologia delle cellule, se conosciuta, vanno digitati su un PC, sul quale è stato installato il Libro elettronico dei codici per i sistemi **BD 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, 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 –

1. Inoculare un pannello con *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* ATCC 25240 secondo la procedura raccomandata (fare riferimento a "Procedura del test").
2. Prima dell'incubazione, lasciare il pannello a temperatura ambiente per 1 min (non oltre 2 min).
3. Leggere e registrare le reazioni con l'aiuto del visore per pannelli e della tavola sinottica dei colori delle reazioni.
4. Se uno qualunque dei pozzetti (tranne 1J) 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.
5. Se tutti i pozzetti risultano negativi, incubare il pannello per 4 h a 35–37 °C.
6. Leggere il pannello con il visore per pannelli e la tavola sinottica dei colori delle reazioni; registrare le reazioni nel blocchetto per referti.
7. 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.
8. 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 alla Tabella 5.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

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

Prima di poter definire come *Neisseria gonorrhoeae* un isolato identificato come tale con questo sistema, si richiede un ulteriore test di conferma nei casi seguenti : (1) quando si ottengono risultati positivi da soggetti a basso rischio, (2) quando i risultati positivi provengono da pazienti con implicazioni di tipo sociologico o medico-legale.¹¹

Il 'database' **BD BBL Crystal** N/H ID è stato sviluppato con i terreni di marca **BBL**. La reattività di alcuni substrati nei sistemi d'identificazione miniaturizzati può dipendere dai terreni usati nelle preparazioni dell'inoculo. Viene raccomandato l'uso dei seguenti terreni con il sistema **BD BBL Crystal** N/H ID: Cioccolato, TSA II, Columbia e Nutritivo. È accettabile anche l'uso di terreni selettivi come Martin-Lewis, MTM, il terreno NYC, V e **BD GC-Lect**. Non vanno usati i terreni contenenti esculina.

I sistemi d'identificazione **BD BBL Crystal** si servono di un microambiente modificato, per cui i valori previsti per i test individuali potrebbero essere diversi dalle informazioni precedentemente ottenute con reazioni in test convenzionali. L'accuratezza del sistema **BD BBL Crystal** N/H ID si fonda sull'uso statistico di test appositi creati su un 'database' esclusivo.

Sebbene il sistema **BD BBL Crystal** N/H ID sia di aiuto nella differenziazione microbica, si deve tener presente che possono esistere leggere variazioni tra i 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.

Per preparare la sospensione dell'inoculo occorre utilizzare esclusivamente tamponi applicatori con punta in cotone, in quanto quelli realizzati in poliestere potrebbero 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 si mettono i pannelli va umidificato per impedire 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 dovrebbero provenire da piastre di agar Cioccolato, TSA, Columbia o Nutritivo. È accettabile anche l'uso di terreni selettivi come Martin-Lewis, MTM, il terreno NYC, V e **BD GC-Lect**.

Se il profilo del test **BD 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 BD 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 grado di sicurezza necessario. Se si escludono possibili errori da parte dell'utilizzatore, ripetere il test usando i metodi tradizionali.

TABELLA 4
Prospetto del controllo qualità per il sistema BD BBL Crystal N/H ID dopo 4 ore d'incubazione su agar Cioccolato

Posizione nel pannello	Substrato	Codice	<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i> ATCC 25240
4A	Controllo negativo fluorescente	FCT	–
2A	4MU-fosfato	FHO	–
1A	L-prolina-AMC	FPR	–
4B	L-serina-AMC	FSE	+
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	V
1B	L-triptofano-AMC	FTR	V
4C	L-fenilalanina-AMC	FPH	+
2C	N-succinil-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	+
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	+
4D	L-acido glutamico-AMC	FTA	–
2D	L-arginina-AMC	FAR	V
1D	Omitina-AMC	FOR	V
4E	Glicina-AMC	FGL	+
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	–
1E	4MU-β-D-galattoside	FBG	–
4F	Saccarosio	SAC	–
2F	Maltotriosio	MTT	–
1F	Carubinoso	CAR	–
4G	Piranosio	PYO	–
2G	Maltobiosio	MTB	–
1G	Disaccaride	DIS	–
4H	Riberol	RBL	–
2H	Levuloso	LEV	–
1H	p-nitrofenil-fosforilcolina	PHC	–
4I	γ-L-glutamil-p-nitroanilide	GGL	–
2I	p-nitrofenil-fosfato	PHO	–
1I	ONPG	OPG	–
4J	Urea	URE	–
2J	Resazurina	REZ	+
1J	Omitina	ORN	V

TABELLA 5
Ceppi supplementari di controllo qualità per il sistema BD BBL Crystal N/H ID dopo 4 ore d'incubazione su agar Cioccolato

Posizione nel pannello	Substrato	Codice	<i>Haemophilus aphrophilus</i> ATCC 19415	<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 49142	<i>Kingella denitrificans</i> ATCC 33394	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 35056
4A	Controllo negativo fluorescente	FCT	–	–	–	–
2A	4MU-fosfato	FHO	+	–	–	+
1A	L-prolina-AMC	FPR	–	+	+	–
4B	L-serina-AMC	FSE	V	+	+	V
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	–	V	V	V
1B	L-triptofano-AMC	FTR	V	+	+	V
4C	L-fenilalanina-AMC	FPH	+	+	+	V
2C	N-succinil-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	–	–	–	–
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	V	+	V	V
4D	L-acido glutamico-AMC	FTA	+	–	–	–
2D	L-arginina-AMC	FAR	V	+	V	+
1D	Omitina-AMC	FOR	–	+	V	–
4E	Glicina-AMC	FGL	+	+	+	+
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	–	V	+	–
1E	4MU-β-D-galattoside	FBG	+	+	–	–
4F	Saccarosio	SAC	+	–	–	–
2F	Maltotriosio	MTT	+	–	–	–
1F	Carubinoso	CAR	V	–	–	–
4G	Piranosio	PYO	+	V	–	V
2G	Maltobiosio	MTB	+	V	–	–
1G	Disaccaride	DIS	+	–	–	–
4H	Riberol	RBL	V	–	–	–
2H	Levuloso	LEV	+	–	–	–
1H	p-nitrofenil-fosforilcolina	PHC	V	–	–	+
4I	γ-L-glutamil-p-nitroanilide	GGL	+	–	–	–
2I	p-nitrofenil-fosfato	PHO	+	–	–	+
1I	ONPG	OPG	+	+	–	–
4J	Urea	URE	–	–	–	+
2J	Resazurina	REZ	V	–	V	–
1J	Omitina	ORN	V	V	V	+

CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

Riproducibilità: La riproducibilità delle reazioni dei substrati **BD BBL Crystal N/H ID** (29) è stata studiata mediante analisi ripetute in uno studio esterno condotto in tre laboratori clinici (tre valutazioni in totale). La riproducibilità delle reazioni dei substrati individuali è risultata in una gamma compresa tra 85,7% e 100%. La riproducibilità globale del pannello **BD BBL Crystal N/H ID** è risultata del 95,9%.²²

Grado di accuratezza dell'identificazione: La performance del sistema **BD BBL Crystal N/H ID** è stata paragonata a quella dei sistemi di identificazione attualmente in commercio usando **isolati clinici e colture in stock**. Sono state condotte tre analisi in tre laboratori indipendenti. Per stabilire le caratteristiche di performance sono stati impiegati sia gli isolati di routine pervenuti al laboratorio clinico, sia gli isolati precedentemente identificati scelti dalle sedi della prova clinica.

Dei 513 isolati testati nei tre studi con l'utilizzo del sistema d'identificazione **BD BBL Crystal N/H**, 459 (89,5%) sono stati identificati in maniera esatta senza bisogno di test supplementari, mentre 480 (93,6%) sono stati identificati correttamente dopo aver eseguito i test supplementari. 26 isolati (5,1%) non sono stati identificati correttamente e un messaggio di "Nessuna identificazione" è stato ottenuto per 7 isolati (1,4%).²²

DISPONIBILITÀ

N° di cat.	Descrizione	N° di cat.	Descrizione
245130	BD BBL Crystal N/H Neisseria/Haemophilus ID System, 1 kit.	221263	Agar Columbia BD BBL con sangue di montone al 5%, confezione da 100.
245038	BD BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid (fluido d'inoculo).	221557	Agar Martin-Lewis BD BBL , confezione da 20.
245031	Visore per pannelli BD BBL Crystal , modello per gli U.S.A., 110 V, 60 Hz.	221558	Agar Martin-Lewis BD BBL , confezione da 100.
245032	Visore per pannelli BD BBL Crystal , modello per l'Europa, 220 V, 50 Hz.	297173	Terreno New York City (NYC) BD BBL modificato, confezione da 20.
245033	Visore per pannelli BD BBL Crystal , modello per il Giappone, 100 V, 50/60 Hz.	297801	Agar Nutritivo BD BBL , confezione da 10.
245034	Tubo UV ad onde lunghe del visore per pannelli BD BBL Crystal .	221567	Agar Thayer-Martin modificato (MTM II) BD BBL , confezione da 20.
245036	Tubo a luce bianca del visore per pannelli BD BBL Crystal .	221568	Agar Thayer-Martin modificato (MTM II) BD BBL , confezione da 100.
245035	Manuale dei codici per i sistemi d'identificazione BD BBL Crystal Neisseria/Haemophilus .	221239	Agar soia BD Trypticase con sangue di montone al 5% (TSA II), confezione da 20.
221169	Agar Cioccolato II BD BBL (Agar GC II con emoglobina e BD IsoVitaleX), confezione da 20.	221261	Agar soia BD Trypticase con sangue di montone al 5% (TSA II), confezione da 100.
221267	Agar Cioccolato II BD BBL (Agar GC II con emoglobina e BD IsoVitaleX), confezione da 100.	221874	Agar V BD BBL (per <i>G. vaginalis</i>), confezione da 10.
221165	Agar Columbia BD BBL con sangue di montone al 5%, confezione da 20.	221875	Agar V BD BBL (per <i>G. vaginalis</i>), confezione da 100.
		297715	Agar BD GC-Lect , confezione da 20.
		297928	Agar BD GC-Lect , confezione da 100.
		212539	Kit BD BBL per colorazione di Gram, confezione di 4 flaconi da 250 mL l'uno.

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.

Assistenza e supporto tecnico: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito www.bd.com.

BD BBL Crystal Identification Systems **Neisseria/Haemophilus ID Kit**

CLIA COMPLEXITY: ALTO

Português

O CÓDIGO IDENTIFICADOR DA SUBSTÂNCIA

ANALISADA DO CDC É 0412

IDENTIFICADOR DO SISTEMA DE TESTE : 07807

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O Sistema de Identificação (ID) de *Neisseria/Haemophilus* (N/H) **BD BBL Crystal** consiste num método de identificação miniaturizado que utiliza substratos convencionais, fluorogénicos e cromogénicos modificados. Destina-se à identificação de *Neisseria* e *Haemophilus* isolados frequentemente, bem como de outras bactérias difíceis de identificar.^{1,2,6,15,18}

SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

Os primeiros relatos da utilização de micrométodos para identificação bioquímica de microrganismos datam de 1918.³ Várias publicações participaram a utilização de discos de papel impregnados com reagentes e de métodos utilizando micro-tubos na diferenciação de bactérias entéricas.^{3,4,8,19,21} 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 **BD 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 **BD BBL Crystal** para ID de N/H, que se destinam à detecção de enzimas utilizados pelos microrganismos para metabolizar vários substratos.^{5,6,8-10,13-17}

O **BD BBL Crystal** N/H ID kit (Conjunto **BD BBL Crystal** para ID de N/H) é constituído por (i) tampas dos painéis para ID de N/H **BD BBL Crystal**, (ii) bases **BD BBL Crystal** e (iii) tubos com Líquido de Inóculo **BD 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.²⁰ A base de dados **BD BBL Crystal** N/H ID contém padrões de reacções enzimáticas e bioquímicas dos 29 substratos **BD BBL Crystal** N/H 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 faculta-se uma lista completa dos grupos que constituem a base de dados actual.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Os painéis **BD BBL Crystal** N/H ID contém 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 utilizando uma fonte de luz UV.^{13,14,16,17} 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 **BD 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 no Sistema BD BBL Crystal N/H ID
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>Cardiobacterium hominis</i> ¹
<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>
<i>Haemophilus aphrophilus/ paraphrophilus</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i> ¹
<i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i> ¹
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Haemophilus segnis</i> ¹
<i>Kingella denitrificans</i>
<i>Kingella kingae</i>
Espécies de <i>Kingella</i> (inclui <i>K. denitrificans</i> e <i>K. kingae</i>)
<i>Moraxella atlantae</i>
<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>
<i>Moraxella lacunata</i> ¹
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>
<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Moraxella phenylpyruvica</i> ¹
Espécies de <i>Moraxella</i> (inclui <i>M. atlantae</i> , <i>M. lacunata</i> , <i>M. nonliquefaciens</i> , <i>M. osloensis</i> e <i>M. phenylpyruvica</i>)
<i>Neisseria cinerea</i> ¹

Grupos no Sistema BD BBL Crystal N/H ID

Neisseria elongata (inclui *N. elongata* ssp *elongata*, *N. elongata* ssp *glycolytica* e *N. elongata* ssp *nitroreducens*)

*Neisseria flavescens*¹

Neisseria gonorrhoeae

Neisseria lactamica

Neisseria meningitidis

Neisseria mucosa

Neisseria sicca

Neisseria subflava (inclui *N. subflava* biovar *flava*, *N. subflava* biovar *perflava* e *N. subflava* biovar *subflava*)

*Neisseria weaverii*¹

Espécies de *Oligella* (inclui *O. urethralis* e *O. ureolytica*)

*Oligella ureolytica*¹

Oligella urethralis

Pasteurella multocida

Suttonella indologenes

Chave: 1 = Estes grupos apresentam < 10 perfis únicos **BD BBL Crystal** na base de dados actual.

QUADRO 2

Princípios dos Testes Usados no Sistema BD BBL Crystal N/H 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	4MU-fosfato	FHO	A hidrólise enzimática da ligação amida ou glicosídica
1A	L-prolina-AMC	FPR	provoca a libertação de um derivado da cumarina
4B	L-serina-AMC	FSE	fluorescente. ^{5,9,13,14,16,17}
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	
1B	L-triptofano-AMC	FTR	
4C	L-fenilalanina-AMC	FPH	
2C	N-succinil-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	
4D	L-ácido glutâmico-AMC	FTA	
2D	L-arginina-AMC	FAR	
1D	Omitina-AMC	FOR	
4E	Glicina-AMC	FGL	
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	
1E	4MU-β-D-galactósido	FBG	
4F	Sacarose	SAC	A utilização dos hidratos de carbono origina a diminuição do pH e a alteração do indicador (Vermelho de fenol). ^{1-4,8,18}
2F	Maltotriose	MTT	
1F	Carubiose	CAR	
4G	Pirranose	PYO	
2G	Maltobiose	MTB	
1G	Dissacárido	DIS	A utilização dos hidratos de carbono origina a diminuição do pH e a alteração do indicador (Vermelho de fenol). ^{1-4,8,18}
4H	Ribitol	RBL	
2H	Levulose	LEV	
1H	p-nitrofenil-fosforilcolina	PHC	
4I	γ-L-glutamil-p-nitroanilido	GGL	
2I	p-nitrofenil-fosfato	PHO	A hidrólise enzimática do glicosídeo substituído por aril incolor liberta o p-nitrofenol amarelo. ^{5,10,14}
1I	o-nitrofenil-β-D-galactósido (ONPG)	OPG	
4J	Ureia	URE	
2J	Resazurina	REZ	
1J	Omitina	ORN	

REAGENTES

O painel **BD BBL Crystal** N/H ID contém 29 substratos enzimáticos e bioquímicos. Consultar o Quadro 3 para uma lista dos princípios activos.

QUADRO 3

Reagentes utilizados no Sistema BD BBL Crystal N/H 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	4MU-fosfato	FHO	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	4MU-fosfato	≤ 1
1A	L-prolina-AMC	FPR	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	L-prolina-AMC	≤ 1
4B	L-serina-AMC	FSE	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	L-serina-AMC	≤ 1
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	LYS-ALA-AMC	≤ 1
1B	L-triptofano-AMC	FTR	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	L-triptofano-AMC	≤ 1
4C	L-fenilalanina-AMC	FPH	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	L-fenilalanina-AMC	≤ 1
2C	N-succinil-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	N-succinil-ALA-PRO-ALA-AMC	≤ 1
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	ALA-ALA-PHE-AMC	≤ 1
4D	L-ácido glutâmico-AMC	FTA	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	L-ácido glutâmico-AMC	≤ 1
2D	L-arginina-AMC	FAR	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	L-arginina-AMC	≤ 1
1D	Omitina-AMC	FOR	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	Omitina-AMC	≤ 1
4E	Glicina-AMC	FGL	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	Glicina-AMC	≤ 1
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	GLY-PRO-AMC	≤ 1
1E	4MU-β-D-galactósido	FBG	fluorescência azul >poço FCT	fluorescência azul ≤ poço FCT	4MU-β-D-galactósido	≤ 1
4F	Sacarose	SAC	Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	Sacarose	≤ 300
2F	Maltotriose	MTT	Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	Maltotriose	≤ 300
1F	Carubiose	CAR	Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	Carubiose	≤ 300
4G	Piranoze	PYO	Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	Piranoze	≤ 300
2G	Maltobiose	MTB	Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	Maltobiose	≤ 300
1G	Dissacárido	DIS	Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	Dissacárido	≤ 300
4H	Riberol	RBL	Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	Riberol	≤ 300
2H	Levulose	LEV	Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	Levulose	≤ 300
1H	p-nitrofenil-fosforilcolina	PHC	Amarelo	Incolor	p-nitrofenil-fosforilcolina	≤ 10
4I	γ-L-glutamil-p-nitroanilido	GGL	Amarelo	Incolor	γ-L-glutamil-p-nitroanilido	≤ 10
2I	p-nitrofenil-fosfato	PHO	Amarelo	Incolor	p-nitrofenil-fosfato	≤ 10
1I	o-nitrofenil-β-D-galactósido (ONPG)	OPG	Amarelo	Incolor	o-nitrofenil-β-D-galactósido (ONPG)	≤ 10
4J	Ureia	URE	Aqua/Azul	Amarelo/Verde	Ureia	≤ 50
2J	Resazurina	REZ	Cor-de-rosa	Azul/Púrpura	Resazurina	≤ 1
1J	Omitina	ORN	Púrpura	Amarelo/Cinzento	Omitina	≤ 200

Precauções: Diagnóstico *in vitro*

Após revisão pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) dos EUA e pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA CLIA '88, este produto foi identificado como apresentando uma elevada complexidade. O Código Identificador da Substância Analisada do CDC é 0412; O Código Identificador do Sistema de Teste do CDC é 07807.

Depois de terem sido usados, todos os materiais infecciosos, incluindo as placas, zaragatoas de algodão, tubos com líquido de inóculo e painéis devem ser sujeitos ao autoclave antes de se proceder ao seu descarte ou incineração.

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 **BD 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 30 °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 inoculados.

Líquido de Inóculo: O Líquido de Inóculo **BD 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. O Líquido de Inóculo **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H só deverá ser usado com os painéis **BD BBL Crystal** N/H ID.

Após a sua recepção, armazenar o **BD BBL Crystal** N/H ID kit 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 for armazenado no frigorífico, deverá ser trazido à temperatura ambiente antes de se proceder à sua utilização.

COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Os Sistemas **BD BBL Crystal** ID não se destinam a uso directo com amostras clínicas. Utilizar isolados de meios tais como Agar de Chocolate, **BD Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (Agar de Soja **BD Trypticase** com 5% de Sangue de Ovelha) (TSA), Columbia Agar with 5% Sheep Blood (Agar Columbia com 5% de Sangue de Ovelha) (Columbia) e Agar de Nutrientes. A utilização de meios selectivos tais como Martin-Lewis Agar (Agar de Martin-Lewis), Thayer-Martin Modified (MTM) Agar (Agar de Thayer-Martin Modificado [MTM]), New York City (NYC) Medium Modified (Meio New York City [NYC] Modificado), V Agar (Agar V) (para *G. vaginalis*), e **BD GC-Lect** Agar (Agar **BD GC-Lect**) também é aceitável. Não se deverão usar meios contendo esculina. O isolado de teste deve consistir numa cultura pura, com menos de 18 a 24 h de idade para a maioria dos géneros; para alguns microrganismos de crescimento lento, poderá revelar-se aceitável um período de tempo de até 48 h. 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 **BD 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 inoculação de amostras no meio de isolamento primário.^{1,17}

PROCEDIMENTO DE TESTE

Material Fornecido: **BD BBL Crystal** N/H ID Kit –

20 Tampas dos painéis **BD BBL Crystal** N/H ID,

20 Bases **BD BBL Crystal**,

20 Tubos com Líquido de Inóculo **BD 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, CaCl₂ 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 **BD BBL Crystal** N/H ID.

Material Não Fornecido: Zaragatoas de algodão esterilizadas (*não usar zaragatoas de poliéster*), incubadora (35 a 37 °C) sem CO₂ (40 a 60% de humidade), padrão de McFarland No. 3, **BD BBL Crystal** Panel Viewer (Leitor do Painel **BD BBL Crystal**), **BD BBL Crystal** ID System Electronic Codebook (Livro de Codificação Electrónico do sistema de ID **BD BBL Crystal**) ou **BD BBL Crystal** N/H Manual Codebook (Manual de Codificação de N/H **BD BBL Crystal**) e meios de cultura adequados.

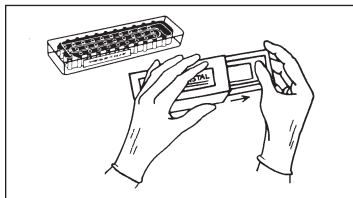
Também é necessário o equipamento e material de laboratório usados para preparação, armazenamento e manipulação de amostras clínicas.

Procedimento de Análise: O Sistema **BD BBL Crystal** N/H ID necessita de uma coloração de Gram.

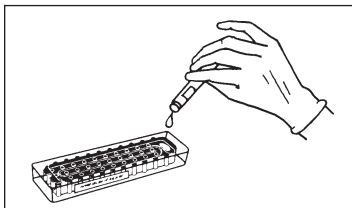
1. Retirar as tampas do saco. Descartar o exsiccante. Após remoção das tampas dos sacos, estas devem ser usadas dentro de 1 h. Não usar o painel caso não exista exsiccante no saco.

2. Retirar um tubo com inóculo de líquido 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").

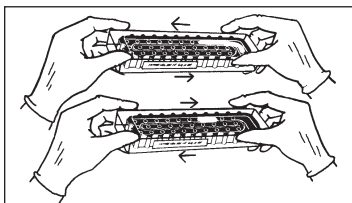
3. Suspender as colónias num tubo com Líquido de Inóculo **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID.



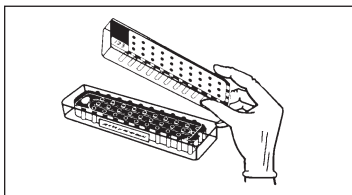
4. Voltar a tapar o tubo e levar ao misturador automático durante cerca de 10 a 15 s. A turvação deverá ser equivalente a um padrão de McFarland No. 3. Caso a concentração da suspensão do inóculo seja superior à do padrão de McFarland recomendado, aconselha-se que se cumpra um dos passos que se seguem:
 - a. Usar um tubo de líquido de inóculo fresco para preparar uma nova suspensão de inóculo, equivalente a um padrão de McFarland No. 3.
 - b. Caso não estejam disponíveis mais colónias para preparação de uma nova suspensão de 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% ou de líquido de inóculo para tornar a turvação equivalente a um Padrão de McFarland No. 3. Retirar a quantidade em excesso adicionada ao tubo com uma pipeta esterilizada, de forma a que o volume final de líquido de inóculo seja aproximadamente equivalente ao volume original do tubo ($2,3 \pm 0,15$ mL). A não realização deste ajuste de volume irá provocar um derramamento da suspensão 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 tubo 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. Dadas as elevadas concentrações de células utilizadas nos painéis **BD BBL Crystal N/H ID**, o inóculo deverão 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 ou saída da área alvo em direcção aos poços antes de se alinhar a tampa.

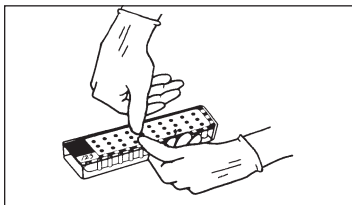


8. Alinhar a tampa de forma a que a extremidade marcada da tampa fique por cima da área alvo da base.

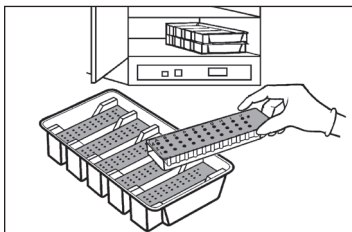


9. Empurrar até sentir uma ligeira resistência. Coloque os polegares sobre o bordo da tampa em cada um dos lados, em direcção à área central do painel, e empurre simultaneamente para baixo, até a tampa se encaixar em posição (devem ouvir-se dois cliques).

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

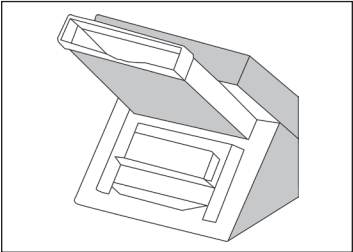


Incubação: Colocar os painéis inoculados em tabuleiros de incubação. Dez painéis podem ajustar-se num tabuleiro (5 filas de 2 painéis). Todos os painéis deverão ser incubados **virados para baixo** (com as janelas maiores viradas para cima; rótulo virado para baixo), numa incubadora sem CO₂ e com 40 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. Os painéis deverão ser lidos nos 30 min subsequentes a serem retirados da incubadora.



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 **BD 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 resultados para registar as reacções.

- a. Ler primeiro as colunas F a J, usando a fonte de luz regular (branca).
- b. Ler as colunas A a E (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 BD 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 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	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
Perfil	1	6	3	2	5	6	4	3	7	0

*(4A) = controlo negativo da fluorescência

O número de perfil resultante e a morfologia das células, se for conhecida, deverão ser introduzidos num computador pessoal (PC) que tenha instalado o **BD 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 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 –

- 1. Inocular um painel com *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* ATCC 25240 em conformidade com o procedimento recomendado (ver “Procedimento de Teste”).
- 2. Antes da incubação, deixar o painel permanecer à temperatura ambiente durante 1 minuto (durante menos de 2 min).
- 3. Ler e registar as reacções com o auxílio do leitor do painel e do quadro de cor da reacção.
- 4. Se qualquer dos poços (à excepção do 1J) 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.
- 5. Se todos os poços se mostrarem negativos, incubar o painel durante 4 h entre 35 e 37 °C.
- 6. Ler o painel com o leitor do painel e com o quadro da cor da reacção; registar as reacções no caderno de relatório.
- 7. 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.
- 8. 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 **BD BBL Crystal N/H ID** foi concebido para os grupos fornecidos. Grupos diferentes dos enumerados no Quadro 1 não se destinam a ser utilizados neste sistema.

É necessário um teste de confirmação adicional para participação de um isolado identificado no sistema como *Neisseria gonorrhoeae*, da seguinte forma: (1) quando se obtêm resultados positivos em indivíduos de baixo risco, (2) quando se obtêm resultados positivos em indivíduos com implicações sociológicas ou médico-legais.¹¹

A base de dados **BD BBL Crystal N/H ID** foi desenvolvida com meios comercializados pela **BBL**. A reactividade de alguns substratos em sistemas de identificação miniaturizados poderá depender dos meios originais usados na preparação do inóculo. Recomendamos a utilização dos seguintes meios para uso com o Sistema **BD BBL Crystal N/H ID**: Chocolate, TSA II, Columbia e Nutrientes. Também é aceitável a utilização de meios selectivos, tais como Martin-Lewis, MTM, Meio NYC, V e **BD GC-Lect**. Não se deverão usar meios contendo esculina.

Os Sistemas de Identificação **BD 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 **BD BBL Crystal N/H ID** baseia-se no uso estatístico de testes especialmente concebidos e numa base de dados exclusiva.

Embora o Sistema **BD BBL Crystal** N/H 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.

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 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 em placas de Chocolate, TSA, Columbia ou Nutrientes. Também é aceitável a utilização de meios selectivos, tais como Martin-Lewis, MTM, Meio NYC, V e **BD GC-Lect**.

Se o perfil de teste **BD 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 BD 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.

QUADRO 4

Gráfico de Controlo de Qualidade para o Sistema BD BBL Crystal N/H ID Após 4 Horas de Incubação de um Agar de Chocolate

Localização no Painel	Tampão	Código	<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i> ATCC 25240
4A	Controlo negativo da fluorescência	FCT	–
2A	4MU-fosfato	FHO	–
1A	L-prolina-AMC	FPR	–
4B	L-serina-AMC	FSE	+
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	V
1B	L-triptofano-AMC	FTR	V
4C	L-fenilalanina-AMC	FPH	+
2C	N-succinil-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	+
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	+
4D	L-ácido glutâmico-AMC	FTA	–
2D	L-arginina-AMC	FAR	V
1D	Omitina-AMC	FOR	V
4E	Glicina-AMC	FGL	+
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	–
1E	4MU-β-D-galactósido	FBG	–
4F	Sacarose	SAC	–
2F	Maltotriose	MTT	–
1F	Carubinese	CAR	–
4G	Piranoase	PYO	–
2G	Maltobiose	MTB	–
1G	Dissacárido	DIS	–
4H	Ribero	RBL	–
2H	Levulose	LEV	–
1H	p-nitrofenil-fosforilcolina	PHC	–
4I	g-L-glutamil-p-nitroanilido	GGL	–
2I	p-nitrofenil-fosfato	PHO	–
1I	o-nitrofenil-b-D-galactósido (ONPG)	OPG	–
4J	Ureia	URE	–
2J	Resazurina	REZ	+
1J	Omitina	ORN	V

QUADRO 5

Estípes de Controlo de Qualidade Adicionais para o Sistema BD BBL Crystal N/H ID Após 4 Horas de Incubação de um Agar de Chocolate

Localização no Painel	Tampão	Código	<i>Haemophilus aphrophilus</i> ATCC 19415	<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 49142	<i>Kingella denitrificans</i> ATCC 33394	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 35056
4A	Controlo negativo da fluorescência	FCT	–	–	–	–
2A	4MU-fosfato	FHO	+	–	–	+
1A	L-prolina-AMC	FPR	–	+	+	–
4B	L-serina-AMC	FSE	V	+	+	V
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	–	V	V	V
1B	L-triptofano-AMC	FTR	V	+	+	V
4C	L-fenilalanina-AMC	FPH	+	+	+	V
2C	N-succinil-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	–	–	–	–
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	V	+	V	V
4D	L-ácido glutâmico-AMC	FTA	+	–	–	–
2D	L-arginina-AMC	FAR	V	+	V	+
1D	Omitina-AMC	FOR	–	+	V	–
4E	Glicina-AMC	FGL	+	+	+	+
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	–	V	+	–
1E	4MU-b-D-galactósido	FBG	+	+	–	–
4F	Sacarose	SAC	+	–	–	–
2F	Maltotriose	MTT	+	–	–	–
1F	Carubinoose	CAR	V	–	–	–
4G	Piranose	PYO	+	V	–	V
2G	Maltobiose	MTB	+	V	–	–
1G	Dissacárido	DIS	+	–	–	–
4H	Ríberol	RBL	V	–	–	–
2H	Levulose	LEV	+	–	–	–
1H	p-nitrofenil-fosforilcolina	PHC	V	–	–	+
4I	g-L-glutamil-p-nitroanilido	GGL	+	–	–	–
2I	p-nitrofenil-fosfato	PHO	+	–	–	+
1I	o-nitrofenil-b-D-galactósido (ONPG)	OPG	+	+	–	–
4J	Ureia	URE	–	–	–	+
2J	Resazurina	REZ	V	–	V	–
1J	Omitina	ORN	V	V	V	+

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Reprodutibilidade: Num estudo externo envolvendo três laboratórios clínicos, (num total de três avaliações), procedeu-se ao estudo da reprodutibilidade das reacções de substratos **BD BBL Crystal N/H ID** (29) recorrendo a um teste de réplicas. A reprodutibilidade das reacções de substrato individuais variou entre 85,7% e 100%. A reprodutibilidade global do painel **BD BBL Crystal N/H ID** foi determinada como sendo de 95,9%.²²

Precisão de Identificação: Procedeu-se à comparação entre o desempenho do Sistema **BD BBL Crystal N/H ID** e o de um sistema actualmente disponível no mercado, utilizando **isolados clínicos e culturas em stock**. Efectuou-se um total de três estudos em três 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 513 isolados que foram testados nos três estudos utilizando o Sistema de Identificação de N/H **BD BBL Crystal**, 459 (89,5%) foram correctamente identificados sem a utilização de testes suplementares, e 480 (93,6%) foram correctamente identificados mediante a utilização de testes suplementares. Um total de 26 (5,1%) isolados foram incorrectamente identificados, tendo-se obtido uma mensagem de “Não Identificado” em 7 (1,4%) isolados.²²

DISPONIBILIDADE

N.º de Cat.	Descrição	N.º de Cat.	Descrição
245130	BD BBL Crystal N/H <i>Neisseria</i>/<i>Haemophilus</i> ID System , 1 Kit.	245036	BD BBL Crystal Panel Viewer , Tubo de Luz Branca.
245038	BD BBL Crystal ANR , GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid.	245035	BD BBL Crystal Identification Systems <i>Neisseria</i>/<i>Haemophilus</i> Manual Codebook .
245031	BD BBL Crystal Panel Viewer , Modelo doméstico, 110 V, 60 Hz.	221169	BD BBL Chocolate II Agar (GC II Agar with Hemoglobin and BD IsoVitaléX), embalagem de 20.
245032	BD BBL Crystal Panel Viewer , Modelo europeu, 220 V, 50 Hz.	221267	BD BBL Chocolate II Agar (GC II Agar with Hemoglobin and BD IsoVitaléX), caixa de 100.
245033	BD BBL Crystal Panel Viewer , Modelo japonês, 100 V, 50/60 Hz.	221165	BD BBL Columbia Agar with 5% Sheep Blood, embalagem de 20.
245034	BD BBL Crystal Panel Viewer , Tubo UV de Onda Longa.		

N.º de Cat.	Descrição	N.º de Cat.	Descrição
221263	BD BBL Columbia Agar with 5% Sheep Blood, caixa de 100.	221239	BD Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II), embalagem de 20.
221557	BD BBL Martin-Lewis Agar, embalagem de 20.	221261	BD Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II), caixa de 100.
221558	BD BBL Martin-Lewis Agar, caixa de 100.	221874	BD BBL V Agar (para <i>G. vaginalis</i>), caixa de 10.
297173	BD BBL New York City (NYC) Medium Modified, embalagem de 20.	221875	BD BBL V Agar (para <i>G. vaginalis</i>), caixa de 100.
297801	BD BBL Nutrient Agar, embalagem de 10.	297715	BD GC-Lect Agar, embalagem de 20.
221567	BD BBL Thayer-Martin, Modified (MTM II) Agar, embalagem de 20.	297928	BD GC-Lect Agar, caixa de 100.
221568	BD BBL Thayer-Martin, Modified (MTM II) Agar, caixa de 100.	212539	BD BBL Gram Stain Kit, embalagem de 4 frascos de 250 mL cada.

BIBLIOGRAFIA: Consulte "References" no texto em Inglês.

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

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 10033430206

Centro de Relacionamento com o Cliente: 0800 0555 654

BD Sistemas de Identificación BBL Crystal Equipo para la identificación de *Neisseria/Haemophilus*

CLIA COMPLEXITY: ALTO

EL CÓDIGO IDENTIFICADOR DE

ANALITO DE LOS CDC: 0412

EL SISTEMA DE PRUEBAS: 07807

Español

USO PREVISTO

El sistema **BD BBL Crystal** para la identificación (ID) de *Neisseria/Haemophilus* (N/H) es un método de identificación en miniatura que utiliza sustratos convencionales, fluorogénicos y cromogénicos modificados. Se ha diseñado para la identificación de bacterias *Neisseria* y *Haemophilus* además de varias otras bacterias exigentes aisladas frecuentemente de muestras clínicas.^{1,2,6,15,18}

RESUMEN Y EXPLICACION

Ya en 1918 había informes sobre métodos micrométricos para la identificación bioquímica de microorganismos.³ Varias publicaciones han incluido estudios sobre el uso de discos de papel impregnados de reactivos y métodos con microtubos para diferenciar las bacterias entéricas.^{3,4,8,19,21} 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 almacenamiento, 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 **BD BBL Crystal** ID son modificaciones de métodos clásicos, incluyendo pruebas para la fermentación, la oxidación, la degradación y la hidrólisis de varios sustratos. Además, hay sustratos ligados a cromógenos y fluorógenos, como en el panel **BD BBL Crystal** N/H ID, para la detección de enzimas que son utilizadas por los microbios para metabolizar varios sustratos.^{5,6,8–10,13–17}

El equipo **BD BBL Crystal** N/H ID incluye (i) tapas del panel **BD BBL Crystal** N/H ID, (ii) bases **BD BBL Crystal** y (iii) tubos **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID de fluido de inóculo (FI). La tapa contiene 29 sustratos deshidratados y un control fluorescente en las puntas de las 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 sustratos 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.²⁰ Las series de reacciones bioquímicas y enzimáticas de los 29 substratos **BD BBL Crystal** N/H ID para una gran variedad de microorganismos están almacenadas en la base de datos **BD BBL Crystal** N/H 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 **BD BBL Crystal** N/H 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 con una lámpara de luz ultravioleta.^{13,14,16,17} 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 utilizar de otro modo un sustrato en el sistema **BD 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).

TABLA 1

Grupos taxonómicos en el sistema BD BBL Crystal N/H ID
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>Cardiobacterium hominis</i> ¹
<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>
<i>Haemophilus aphrophilus/ paraphrophilus</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i> ¹
<i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Haemophilus paraaemolyticus</i> ¹
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Haemophilus segnis</i> ¹
<i>Kingella denitrificans</i>
<i>Kingella kingae</i>
<i>Kingella</i> especie (incluye <i>K. denitrificans</i> y <i>K. kingae</i>)
<i>Moraxella atlantae</i>
<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>
<i>Moraxella lacunata</i> ¹
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>
<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Moraxella phenylpyruvica</i> ¹
<i>Moraxella</i> especie (incluye <i>M. atlantae</i> , <i>M. lacunata</i> , <i>M. nonliquefaciens</i> , <i>M. osloensis</i> y <i>M. phenylpyruvica</i>)
<i>Neisseria cinerea</i> ¹
<i>Neisseria elongata</i> (incluye <i>N. elongata</i> ssp <i>elongata</i> , <i>N. elongata</i> ssp <i>glycolytica</i> y <i>N. elongata</i> ssp <i>nitroreducens</i>)
<i>Neisseria flavescens</i> ¹
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Neisseria sicca</i>
<i>Neisseria subflava</i> (incluye <i>N. subflava</i> biovar <i>flava</i> , <i>N. subflava</i> biovar <i>perflava</i> y <i>N. subflava</i> biovar <i>subflava</i>)
<i>Neisseria weaveri</i> ¹
<i>Oligella</i> especie (incluye <i>O. urethralis</i> y <i>O. ureolytica</i>)
<i>Oligella ureolytica</i> ¹
<i>Oligella urethralis</i>
<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Suttonella indologenes</i>

1 = Estos grupos taxonómicos tienen <10 números de perfil **BD BBL Crystal** únicos en la base de datos actual.

TABLA 2
Principios de las pruebas usadas en el sistema BD BBL Crystal N/H 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	4MU-fosfato	FHO	La hidrólisis enzimática del enlace amídico o glicosídico resulta en la producción de un derivado cumarínico fluorescente. ^{5,9,13,14,16,17}
1A	L-prolina-AMC	FPR	
4B	L-serina-AMC	FSE	
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	
1B	L-triptófano-AMC	FTR	
4C	L-fenilalanina-AMC	FPH	
2C	N-succinilo-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	
4D	L-ácido glutámico-AMC	FTA	
2D	L-arginina-AMC	FAR	
1D	Omitina-AMC	FOR	
4E	Glicina-AMC	FGL	
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	
1E	4MU-β-D-galactósido	FBG	
4F	Sacarosa	SAC	La utilización de carbohidratos resulta en una caída del pH y un cambio en el indicador (rojo de fenol). ^{1-4,8,18}
2F	Maltotriosa	MTT	
1F	Carubinosa	CAR	
4G	Piranosas	PYO	
2G	Maltobiosa	MTB	
1G	Disacárida	DIS	
4H	Ribitol	RBL	La hidrólisis enzimática del glicósido incoloro anilo substituido resulta en un p-nitrofenol amarillo. ^{5,10,14}
2H	Levulosa	LEV	
1H	p-nitrofenil-fosforilcolina	PHC	
4I	γ-L-glutamil-p-nitroanilida	GGL	
2I	p-nitrofenil-fosfato	PHO	
1I	o-nitrofenil-β-D-galactósido (ONPG)	OPG	
4J	Urea	URE	La hidrólisis de la urea y el amonio que resulta cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol). ^{2,7,12}
2J	Resazurina	REZ	
1J	Omitina	ORN	
			La utilización de la resazurina a la resorufina resulta en un cambio de color. ⁶
			La utilización de la omitina resulta en una subida del pH y un cambio en el color del indicador (púrpura de bromocresol). ²

REACTIVOS

El panel **BD BBL Crystal N/H ID** contiene 29 sustratos enzimáticos y bioquímicos. Vea la Tabla 3 para la lista de los ingredientes activos.

TABLA 3
Reactivos usados en el sistema BD BBL Crystal N/H ID

Posición en el panel	Sustrato	Código	Pos.	Neg.	Ingredientes Activos	Cantidad Aprox. (g/L)
4A	Control fluorescente negativo	FCT	n/a	n/a	Derivado cumarínico fluorescente	≤ 1
2A	4MU-fosfato	FHO	Fluorescencia azul > pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	4MU-fosfato	≤ 1
1A	L-prolina-AMC	FPR	Fluorescencia azul > pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	L-prolina-AMC	≤ 1
4B	L-serina-AMC	FSE	Fluorescencia azul > pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	L-serina-AMC	≤ 1
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	Fluorescencia azul > pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	LYS-ALA-AMC	≤ 1
1B	L-triptófano-AMC	FTR	Fluorescencia azul > pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	L-triptófano-AMC	≤ 1
4C	L-fenilalanina-AMC	FPH	Fluorescencia azul > pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	L-fenilalanina-AMC	≤ 1
2C	N-succinilo-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	Fluorescencia azul > pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	N-succinilo-ALA-PRO-ALA-AMC	≤ 1
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	Fluorescencia azul > pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	ALA-ALA-PHE-AMC	≤ 1

Posición en el panel	Substrato	Código	Pos.	Neg.	Ingredientes Activos	Cantidad Aprox. (g/L)
4D	L-ácido glutámico-AMC	FTA	Fluorescencia azul >pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	L-ácido glutámico-AMC	≤ 1
2D	L-arginina-AMC	FAR	Fluorescencia azul >pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	L-arginina-AMC	≤ 1
1D	Omitina-AMC	FOR	Fluorescencia azul >pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	Ornitina-AMC	≤ 1
4E	Glicina-AMC	FGL	Fluorescencia azul >pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	Glicina-AMC	≤ 1
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	Fluorescencia azul >pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	GLY-PRO-AMC	≤ 1
1E	4MU-β-D-galactósido	FBG	Fluorescencia azul >pocillo FCT	Fluorescencia azul ≤ pocillo FCT	4MU-β-D-galactósido	≤ 1
4F	Sacarosa	SAC	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	Sacarosa	≤ 300
2F	Maltotriosa	MTT	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	Maltotriosa	≤ 300
1F	Carubinoso	CAR	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	Carubinoso	≤ 300
4G	Piranosos	PYO	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	Piranosos	≤ 300
2G	Maltobiosos	MTB	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	Maltobiosos	≤ 300
1G	Disacárido	DIS	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	Disacárido	≤ 300
4H	Riberol	RBL	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	Riberol	≤ 300
2H	Levulosa	LEV	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	Levulosa	≤ 300
1H	p-n-p-fosforilcolina	PHC	Amarillo	Incoloro	p-n-p-fosforilcolina	≤ 10
4I	γ-L-glutamil-p-nitroanilida	GGL	Amarillo	Incoloro	γ-L-glutamil-p-nitroanilida	≤ 10
2I	p-n-p-fosfato	PHO	Amarillo	Incoloro	p-n-p-fosfato	≤ 10
1I	ONPG	OPG	Amarillo	Incoloro	ONPG	≤ 10
4J	Urea	URE	Verde azulado	Amarillo/verde	Urea	≤ 50
2J	Resazurina	REZ	Rosado	Azul/púrpura	Resazurina	≤ 1
1J	Omitina	ORN	Púrpura	Amarillo/gris	Omitina	≤ 200

Precauciones: Diagnóstico *in vitro*

Tras su revisión por parte de los Centers for Disease control and Prevention (CDC), y la Food and Drug Administration (FDA) de EE.UU. bajo el epígrafe CLIA 88, este producto se ha clasificado como de complejidad alta. El código identificador de analito del CDC es 0412; el código identificador del sistema de prueba CDC es 07807.

Después de usarse, todos los materiales infecciosos incluyendo las placas, las torundas de algodón, los tubos de fluido de inóculo y los paneles deben esterilizarse en un autoclave antes de desecharlos o incinerarlos degradar.

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 **BD BBL Crystal**. Las bases están apiladas boca abajo para reducir al mínimo la posibilidad de contaminación por el aire. Almacene en un lugar libre de polvo entre 2–30 °C hasta el momento de usarse. Almacene las bases sin usar en la bandeja, en una bolsa plástica. Las bandejas vacías deben usarse para incubar los paneles inoculados.

Fluido de inóculo: El fluido de inóculo (FI) del sistema **BD 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 **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H puede usarse con los paneles del sistema **BD BBL Crystal** N/H ID.

Al recibirse, el equipo **BD BBL Crystal** N/H ID 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 **BD BBL Crystal ID** no deben utilizarse directamente con muestras clínicas. Utilice aislados de un medio como agar chocolate, agar soja **BD Trypticase** con 5% de sangre de cordero (TSA), agar Columbia con 5% de sangre de cordero (Columbia) y agar nutritivo. También es aceptable el uso de medios selectivos como agar Martin-Lewis, agar Thayer-Martin modificado (MTM), medio New York City modificado (NYC), agar V (para *G. vaginalis*) y agar **BD GC-Lect**. No se deben utilizar los medios que contienen esculina. El aislado para la prueba debe ser un cultivo puro de no más de 18–24 h para la mayoría de los géneros; cultivos hasta 48 h pueden ser aceptables para algunos organismos de crecimiento lento. Solamente deben usarse torundas con puntas de algodón para preparar la suspensión del inóculo, ya que las torundas de poliéster pueden causar problemas en la inoculación de los paneles. (Vea "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 **BD 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 tomar las muestras, transportarlas y sembrarlas en medios de aislamiento primario.^{1,17}

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Materiales suministrados: Equipo **BD BBL Crystal N/H ID** –

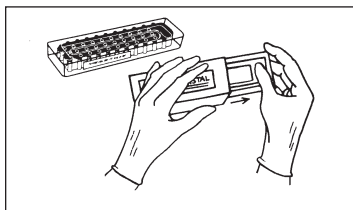
- 20 tapas del panel **BD BBL Crystal N/H ID**,
- 20 bases **BD BBL Crystal**,
- 20 tubos **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID de fluido de inóculo. Cada tubo contiene aproximadamente 2,3 ± 0,15 mL de fluido de inóculo con la siguiente fórmula: KCl 7,5 g, CaCl₂ 0,5 g, Tricina N-[2-hidroxi-1, 4-bis (hidroximetil)metil] glicina 0,895 g, agua purificada a 1000 mL.
- 2 bandejas de incubación,
- 1 bloc de informes **BD BBL Crystal N/H ID**.

Materiales no suministrados: Torundas estériles de algodón (*no use torundas de poliéster*), incubadora (35–37 °C) sin CO₂ (40–60% de humedad relativa), patrón McFarland N° 3, visor para paneles **BD BBL Crystal**, Libro electrónico de códigos para los sistemas **BD BBL Crystal ID** o Libro de códigos manual **BD BBL Crystal N/H**, y medios de cultivo apropiados.

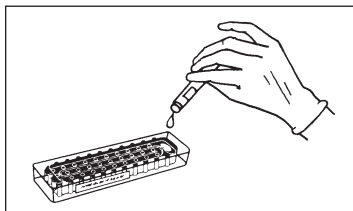
También son necesarios el equipo y material de laboratorio utilizado en la preparación, almacenamiento y manipulación de las muestras clínicas.

Procedimiento de la prueba: El sistema **BD BBL Crystal N/H ID** requiere una tinción de Gram.

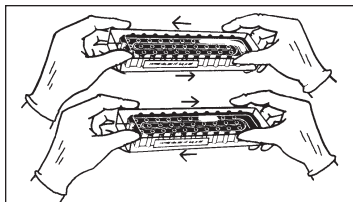
1. Saque las tapas de la envoltura. Deseche el desecante. Una vez sacadas de la envoltura, las tapas cubiertas deben usarse dentro de 1 h. No utilizar el panel si no hay desecante en la envoltura.
2. Tome un tubo de fluido de inóculo y anote el número de la muestra del paciente en la etiqueta. Usando una técnica aséptica, 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 **BD BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID de fluido de inóculo.
4. Vuelva a taponar el tubo y agite en un vórtex por 10–15 seg. La turbidez deberá ser equivalente a un patrón McFarland N° 3. Si la concentración de la suspensión del inóculo es mayor que el patrón McFarland recomendado, se recomienda seguir uno de los siguientes pasos:
 - a. Utilice un tubo de fluido de inóculo nuevo para preparar una nueva suspensión del inóculo equivalente a un patrón McFarland N° 3.
 - b. Si no hay más colonias disponibles para preparar una suspensión nueva del inóculo, utilizando técnicas asépticas diluya el inóculo agregando el mínimo volumen necesario (sin exceder 1,0 mL) de solución salina estéril al 0,85% o fluido de inóculo para reducir la turbidez a la del patrón McFarland N° 3. Utilizando una pipeta estéril, quite el volumen de fluido de inóculo sobrante que se ha agregado de modo que el volumen final sea aproximadamente igual al volumen original en el tubo (2,3 mL ± 0,15 mL). De no hacer este ajuste al volumen, la suspensión del 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.



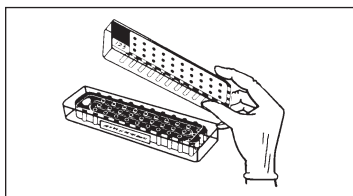
6. Vierta todo el contenido del tubo de fluido de inóculo en el área demarcada de la base.



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 **BD BBL Crystal N/H ID**, se deberá balancear el inóculo a lo largo de las bases con cuidado para asegurarse el relleno completo de los pocillos. Antes de colocar la tapa, asegúrese de que no haya exceso de líquido entre los pocillos ni líquido proveniente del área demarcada en dirección a los pocillos.



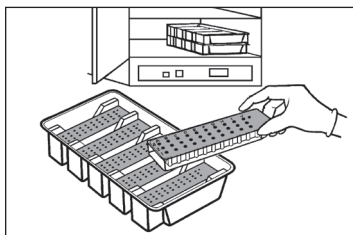
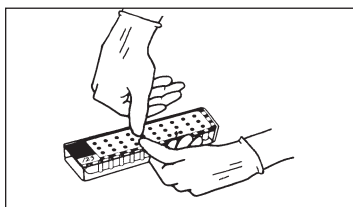
8. Alinee la tapa de modo que el extremo donde se encuentra la inscripción esté sobre el área demarcada de la base.



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").

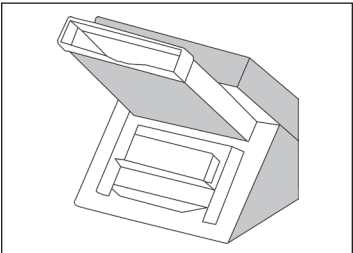
Prueba de cultivo puro: Para determinar la pureza del cultivo, extraiga una pequeña gota del tubo de fluido de inóculo con un alambre estéril, antes o después de inocular la base, e inocule un tubo de agar inclinado o una placa (cualquier medio de cultivo apropiado). Deseche el tubo del fluido de inóculo 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 adecuadas. 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 CO₂ 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). Los paneles deben leerse dentro de 30 min después de sacarlos de la incubadora.



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 **BD BBL Crystal**. Consulte la plantilla de reacciones de color y/o la Tabla 3 para la interpretación de las reacciones. Use el bloc de resultados para anotar las reacciones.

- a. Primero, lea las columnas F a J, usando la luz blanca.
- b. Lea las columnas A a E (substratos fluorescentes) usando la luz UV en el visor para paneles. 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 (4A).



Cálculo del número de perfil BD 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 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.

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

El número de perfil resultante y la morfología celular, si se conocen, deben tabularse en un PC con el Libro electrónico de códigos para el sistema **BD BBL Crystal ID** instalado para obtener la identificación. También se dispone de un libro de códigos manual. Si no se dispone de un PC, póngase en contacto con el Servicio Técnico de BD 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 –

- 1. Inocule un panel con *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* ATCC 25240 según las recomendaciones previas (consulte la sección “Procedimiento de la prueba”).
- 2. Antes de la incubación, deje el panel a temperatura ambiente durante 1 min (no más de 2 min).
- 3. Lea y anote las reacciones con ayuda del visor para paneles y la plantilla de reacciones de color.
- 4. Si de acuerdo con la plantilla de color, cualquiera de los pocillos (excepto el pocillo 1J) fuera positivo (después de 1–2 min), NO USAR LOS PANELES de ese lote. Póngase en contacto con el Servicio Técnico de BD.
- 5. Si todos los pocillos son negativos, incube el panel durante 4 h entre 35–37 °C.
- 6. Lea el panel con ayuda del visor para paneles y la plantilla de color; anote las reacciones utilizando el bloc de informes.
- 7. 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.
- 8. 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 **BD BBL Crystal N/H 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.

Se necesita una prueba de confirmación adicional antes de notificar un aislado identificado por el sistema como *Neisseria gonorrhoeae* en las siguientes situaciones: (1) cuando se obtienen resultados positivos de personas de bajo riesgo, (2) cuando se obtienen resultados positivos de pacientes con consecuencias sociológicas o medicolegales.¹¹

La base de datos del sistema **BD BBL Crystal N/H ID** se creó con medios de la marca **BBL**. La reactividad de algunos substratos en sistemas de identificación en miniatura puede depender de los medios suministrados para las preparaciones de los inóculos. Recomendamos el uso de los siguientes medios para ser utilizados con el sistema **BD BBL Crystal N/H ID**: chocolate, TSA II, Columbia y nutritivo. También es aceptable el uso de medios selectivos como Martin-Lewis, MTM, medio NYC, V y **BD GC-Lect**. No se deben utilizar medios que contienen esculina.

Los sistemas de identificación **BD 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 **BD BBL Crystal N/H ID** se basa en la interpretación estadística de pruebas específicamente diseñadas y una base de datos exclusiva.

Mientras que el sistema **BD BBL Crystal** N/H 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 en la preparación de la suspensión del inóculo ya que algunas torundas de poliéster pueden ocasionar que el fluido de inóculo se torne 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 ponen los paneles debe ser humidificada para impedir la evaporación del 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 de chocolate, TSA, Columbia o agar nutritivo. También es aceptable el uso de medios selectivos como Martin-Lewis, MTM, medio NYC, V y **BD GC-Lect**.

Si el perfil de la prueba **BD 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* **BD 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.

TABLA 4
Plantilla del control de calidad para el sistema BD BBL Crystal N/H ID después de 4 horas de incubación en agar chocolate

Posición en el panel	Substrato	Código	<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i> ATCC 25240
4A	Control fluorescente negativo	FCT	—
2A	4MU-fosfato	FHO	—
1A	L-prolina-AMC	FPR	—
4B	L-serina-AMC	FSE	+
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	V
1B	L-triptófano-AMC	FTR	V
4C	L-fenilalanina-AMC	FPH	+
2C	N-succinilo-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	+
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	+
4D	L-ácido glutámico-AMC	FTA	—
2D	L-arginina-AMC	FAR	V
1D	Ornitina-AMC	FOR	V
4E	Glicina-AMC	FGL	+
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	—
1E	4MU-b-D-galactósido	FBG	—
4F	Sacarosa	SAC	—
2F	Maltotriosa	MTT	—
1F	Carubínosa	CAR	—
4G	Piranososa	PYO	—
2G	Maltobiososa	MTB	—
1G	Disacárido	DIS	—
4H	Riberol	RBL	—
2H	Levulosa	LEV	—
1H	p-n-p-fosforilcolina	PHC	—
4I	γ-L-glutamil-p-nitroanilida	GGL	—
2I	p-n-p-fosfato	PHO	—
1I	ONPG	OPG	—
4J	Urea	URE	—
2J	Resazurina	REZ	+
1J	Ornitina	ORN	V

TABLA 5

Cepas adicionales de control de calidad para el sistema BD BBL Crystal N/H ID después de 4 horas de incubación en agar chocolate

Posición en el panel	Substrato	Código	<i>Haemophilus aphrophilus</i> ATCC 19415	<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 49142	<i>Kingella denitrifans</i> ATCC 33394	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 35056
4A	Control fluorescente negativo	FCT	—	—	—	—
2A	4MU-fosfato	FHO	+	—	—	+
1A	L-prolina-AMC	FPR	—	+	+	—
4B	L-serina-AMC	FSE	V	+	+	V
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	—	V	V	V
1B	L-triptófano-AMC	FTR	V	+	+	V
4C	L-fenilalanina-AMC	FPH	+	+	+	V
2C	N-succinilo-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	—	—	—	—
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	V	+	V	V
4D	L-ácido glutámico-AMC	FTA	+	—	—	—
2D	L-arginina-AMC	FAR	V	+	V	+
1D	Ornitina-AMC	FOR	—	+	V	—
4E	Glicina-AMC	FGL	+	+	+	+
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	—	V	+	—
1E	4MU-β-D-galactósido	FBG	+	+	—	—
4F	Sacarosa	SAC	+	—	—	—
2F	Maltotriosa	MTT	+	—	—	—
1F	Carubinoso	CAR	V	—	—	—
4G	Piranosos	PYO	+	V	—	V
2G	Maltobiosos	MTB	+	V	—	—
1G	Disacárido	DIS	+	—	—	—
4H	Riberoso	RBL	V	—	—	—
2H	Levulosos	LEV	+	—	—	—
1H	p-n-p-fosforilcolina	PHC	V	—	—	+
4I	γ-L-glutamilo-p-nitroanilida	GGL	+	—	—	—
2I	p-n-p-fosfato	PHO	+	—	—	+
1I	ONPG	OPG	+	+	—	—
4J	Urea	URE	—	—	—	+
2J	Resazurina	REZ	V	—	V	—
1J	Ornitina	ORN	V	V	V	+

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Reproducibilidad: En un estudio externo realizado en tres laboratorios clínicos (tres evaluaciones en total), se analizó la reproducibilidad de (29) reacciones de los substratos del sistema **BD BBL Crystal** N/H ID mediante pruebas múltiples. La reproducibilidad de las reacciones de los substratos individuales varió entre 85,7% y 100%. Se determinó que la reproducibilidad general del panel **BD BBL Crystal** N/H ID era del 95,9%.²²

Exactitud de la identificación: Se comparó el rendimiento del sistema **BD BBL Crystal** N/H ID con sistemas actualmente disponibles en el comercio utilizando **aislados clínicos y cultivos madre**. Un total de tres estudios se llevó a cabo en tres 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 **BD BBL Crystal** N/H identificó correctamente 459 (89,5%) de los 513 aislados totales analizados en los tres estudios sin utilizar análisis adicionales e identificó correctamente 480 (93,6%) al incluir análisis adicionales. Un total de 26 (5,1%) aislados fue identificado incorrectamente y se obtuvo un mensaje "Sin identificación" para 7 (1,4%) aislados.²²

DISPONIBILIDAD

Nº de cat.Descripción	Nº de cat.Descripción
245130 BD BBL Crystal N/H <i>Neisseria</i> / <i>Haemophilus</i> ID System, 1 kit.	245036 Fuente de luz blanca para el visor para paneles BD BBL Crystal .
245038 BD BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum Fluid (fluido de inóculo).	245035 Libro de códigos manual para el sistema BD BBL Crystal para la identificación de bacterias <i>Neisseria</i> / <i>Haemophilus</i> .
245031 Visor para paneles BD BBL Crystal , modelo USA, 110 V, 60 Hz.	221169 Agar chocolate II BD BBL (agar GC II con hemoglobina e BD IsoVitaléX), paquete de 20.
245032 Visor para paneles BD BBL Crystal , modelo europeo, 220 V, 50 Hz.	221267 Agar chocolate II BD BBL (agar GC II con hemoglobina e BD IsoVitaléX), caja de 100.
245033 Visor para paneles BD BBL Crystal , modelo japonés, 100 V, 50/60 Hz.	221165 Agar Columbia BD BBL con 5% de sangre de cordero, paquete de 20.
245034 Fuente de luz ultravioleta de onda larga para el visor para paneles BD BBL Crystal .	

Nº de cat.Descripción

221263	Agar Columbia BD BBL con 5% de sangre de cordero, caja de 100.
221557	Agar Martin-Lewis BD BBL , paquete de 20.
221558	Agar Martin-Lewis BD BBL , caja de 100.
297173	Medio New York City (NYC) BD BBL modificado, paquete de 20.
297801	Agar nutritivo BD BBL , paquete de 10.
221567	Agar Thayer-Martin BD BBL , modificado (MTM II), paquete de 20.
221568	Agar Thayer-Martin BD BBL , modificado (MTM II), caja de 100.

Nº de cat.Descripción

221239	Agar soja BD Trypticase con 5% de sangre de cordero (TSA II), paquete de 20.
221261	Agar soja BD Trypticase con 5% de sangre de cordero (TSA II), caja de 100.
221874	Agar V BD BBL (para <i>G. vaginalis</i>), paquete de 10.
221875	Agar V BD BBL (para <i>G. vaginalis</i>), paquete de 100.
297715	Agar BD GC-Lect , paquete de 20.
297928	Agar BD GC-Lect , caja de 100.
212539	Equipo BD BBL de tinción de Gram, paquete de 4 frascos de 250 mL cada uno.

REFERENCIAS: Ver "References" en el texto en inglés.

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite www.bd.com.



Manufacturer / Производител / Výrobce / Fabrikant / Hersteller / Κατασκευαστής / Fabricante / Tootja / Fabricant / Proizvodac / Gyártó / Fabbricante / Аткарушы / 제조업체 / Gamintojas / Ražotājs / Tilvirkir / Producent / Producător / Производител / Výrobca / Proizvodac / Tilvirkare / Uretilci / Виробник / 生产厂商



Use by / Исполняйте до / Spottebuigt do / Brug før / Verwendbar bis / Χρήση έως / Usar antes de / Kasutada enne / Date de péremption / 사용 기한 / Upotrebite do / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Дейін пайдалануға / Naudokite iki / Izlietot līdz / Houdbaar tot / Brukes før / Stosować do / Prazo de validade / A se utiliza până la / Исползовать до / Použite do / Upotrebite do / Använd före / Son kullanna tarihi / Використати до / 使用截止日期

YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month)
 TTMM-MM-DD / TTMM-MM (MM = край на месеца)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutning af måned)
 JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende)
 EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fin del mes)
 AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp)
 AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois)
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca)
 EEEE-HH-NN / EEEE-HH (HH = hónap utolsó napja)
 AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese)
 JOJOJO-AA-KK / JOJOJO-AA / (AA = айдын соңы)
 YYYY-MM-DD/YYYY-MM (MM = 말월)
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mēnesio pabaiga)
 GGGG-MM-DD/GGGG-MM (MM = mēneša beigas)
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = sluttén af måneden)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês)
 AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii)
 TTMM-MM-DD / TTMM-MM (MM = конец месяца)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = sluttet av månaden)
 YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu)
 PPPP-MM-DD / PPPP-MM (MM = кінець місяця)
 YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = 月末)



Catalog number / Каталоген номер / Katalogové číslo / Katalognummer / Αριθμός καταλόγου / Número de catálogo / Katalooginumber / Numéro catalogue / Kataloški broj / Katalógusszám / Numero di catalogo / Каталог номер / 카탈로그 번호 / Katalogo / numeris / Kataloga numurs / Catalogus number / Numer katalogowy / Număr de catalog / Номер по каталогу / Katalógové číslo / Kataloški broj / Katalog numarası / Номер за каталогом / 目录号



Authorized Representative in the European Community / Оторизирани представител в Европейската общност / Autorizovaný zástupce pro Evropském společenství / Autoriseret repræsentant i De Europæiske Fællesskaber / Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Reprezentante autorizado en la Comunidad Europea / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Reprezentant autorisé par la Communauté européenne / Autorizirani predstavnik u Europskoj uniji / Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségben / Reprezentante autorizzato nella Comunità Europea / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / 유럽 공동체의 위임 대표 / galotais atstavas Eiropas Bendrijos / Pilnvarotais pārstāvis Eiropas Kopienā / Bevoegde vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap / Autoriseret repræsentant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo we Wspólnocie Europejskiej / Reprezentante autorizado na Comunidade Europeia / Reprezentantul autorizat pentru Comunitatea Europeană / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Autorizovanu predstavništvo u Europskoj uniji / Auktoriserad representant i Europeiska gemenskapen / Автура Топлулугу Yetkilil Temsilcisi / Упоноважений представник у країнах ЄС / 欧洲共同体授权代表



In Vitro Diagnostic Medical Device / Медицинский уреа за диагностика ин витро / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική аппаратура / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In vitro diagnostisk medicinskiniaparatuur / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medicinska romagala za In Vitro Diagnostiku / In vitro diagnostikai orvosi eszköz / Dispositivo medicale per diagnostica in vitro / Жасанды жағдайда жұмыс істейтін медициналық диагностика аспабы / In Vitro Diagnostik 의료 기기 / In vitro diagnostikos prietais / Medicīnas ierīces, ko lieto in vitro diagnostikā / Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek / In vitro diagnostisk medicinsk udstyr / Uządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Dispositiv medical pentru diagnostic in vitro / Медицинский прибор для диагностики in vitro / Medicinska pomôcka na diagnostiku in vitro / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik / In Vitro Diagnostik Tibbi Cihaz / Медицинский прибор для диагностики in vitro / 体外诊断医疗设备



Temperature limitation / Температурни ограничения / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturbegrensning / Περιορισμοί θερμοκρασίας / Limitación de temperatura / Temperaturi piirang / Limites de température / Dozvoljena temperatura / Hőmérsékleti határ / Limiti di temperatura / Температурны шектеу / 온도 제한 / Laikymo temperatūra / Temperatūros ierobežojimai / Temperatuurlimit / Temperaturbegrænsning / Ograniczenie temperatury / Limites de temperatura / Limite de temperatură / Ограничение температуры / Ohranenie teploty / Ograničenje temperature / Temperaturgrens / Szaklık szinrılması / Омеження температури / 温度制限



Upper limit of temperature / Горен лимит на температурата / Horní hranice teploty / Øvre temperaturgrænse / Temperaturobergrenze / Ανώτερο όριο θερμοκρασίας / Limite superior de temperatura / Üstəmine temperaturu / Limite supérieure de température / Gornja dozvoljena temperatura / Felső hőmérsékleti határ / Limite superiore di temperatura / Температуранын рұқсат етілен жоғарғы шегі / 상한 온도 / Aukščiausia laikymo temperatūra / Augšējā temperatūras robeža / Hoogste temperatuurlimiet / Øvre temperaturgrense / Gornja granica temperatura / Limite máximo de temperatura / Limită maximă de temperatură / Верхний предел температуры / Horná hranica teploty / Gornja granica temperature / Øvre temperaturgräns / Sicaklık üst sınırı / Максимальная температура / 温度上限



Keep dry / Пазете сухо / Skladujte v suchém prostředí / Opbevaars tørt / Trocklagern / Φυλάξτε το στεγνό / Mantener seco / Hoida kuivaks / Conserver au sec / Držati na suhom / Százraz helyen tartandó / Tenere all'asciutto / Құрғақ күйінде ұста / 건조 상태 유지 / Laikykite sausiai / Uzglabāt sausu / Droog houden / Houdes tørt / Przechowywać w stanie suchym / Manter seco / A se feri de umezeală / Не допускать попадания влаги / Uchovávať v suchu / Držite na suvom mestu / Förvaras tørt / Kuru bir şekilde muhafaza edin / Беречь від вологи / 请保持干燥



Collection time / Време на събиране / Čas odběru / Opsamlingsdstpunkt / Entnahmeuhrzeit / Ώρα συλλογής / Hora de recogida / Kogumisaeg / Heure de prélèvement / Sati prikupljanja / Mintavétel időpontja / Ora di raccolta / Жинау уақыты / 수집 시간 / Paėmimo laikas / Savākšanas laiks / Verzameltijd / Tid prøvetaking / Godzina pobrania / Hora de coleta / Ora colectării / Breaa odberu / Vreme prikupljanja / Uppsamlingsdtid / Toplama zamani / Час забору / 采集时间



Peel / Обелете / Otevfeite zde / Äbn / Abziehen / Αποκολλήστε / Desprendre / Koorida / Décoller / Otvoriti skini / Húzza le / Staccare / Ўстінгі қабатын алып таста / Plešiti čia / Atliemt / Schillen / Trekk av / Oderwać / Destacar / Se dezlipeste / Отклеить / Odrhňte / Oluštiti / Dra isår / Айрма / Вискрети / 撕下



Perforation / Перфорация / Perforace / Perforering / Διείσδυση / Perforación / Perforatsioon / Perforacija / Perforálás / Perforazione / Тесик тесу / 절취선 / Perforacja / Perforácia / Perforatie / Perforacja / Perforação / Perforare / Перфорация / Perforácia / Perforasyon / Перфорация / 穿孔



Do not use if package damaged / Не използвайте, ако опаковката е повредена / Nepoužívejte, je-li obal poškozený / Má ikke anvendes hvis emballagen er beskadiget / Inhal beschädigter Packungsnicht verwenden / Μην χρησιμοποιείτε εάν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά. / No usar si el paquete está dañado / Mitte kasutada, kui pakend on kahjustatud / Ne pas l'utiliser si l'emballage est endommagé / Ne koristiti ako je oštećeno pakiranje / Ne használni, ha a csomagolás sérült / Non usare se la confezione è danneggiata / Егер пакет бұзылған болса, пайдаланба / 폐기처리가 손상된 경우 사용 금지 / Jei pakuoję pažeista, nenaudoti / Nelietot, ja iepakojums bojāts / Niet gebruiken indien de verpakking beschadigd is / Má ikke brukes hvis pakke er skadet / Nie używać, jeśli opakowanie jest uszkodzone / Nào usar se a embalagem estiver danificada / A nu se folosi dacă pachetul este deteriorat / Не използвайте при повреди на опаковки / Nepoužívať, ak je obal poškodený / Ne koristite ako je pakovanje oštećeno / Använd ej om förpackningen är skadad / Ambalaj hasar görmüşse kullanmayın / Не використовувати за пошкодженою опаковкою / 如果包装破损, 请勿使用



Keep away from heat / Пазете от топлина / Nevstaviujte pri bližnjemu toplu / Má ikke udsættes for varme / Vor Wärme schützen / Κρατήστε το μακριά από τη θερμότητα / Mantener alejado de fuentes de calor / Hoida eemal valgusest / Protéger de la chaleur / Držati dalje od izvora topline / Övja a melegtől / Tenere lontano dal calore / Салқын жерде сақта / 열을 피해야 함 / Laikyti atokiau nuo šilumos šaltinių / Sargát no gaismas / Niet blootstellen aan zonlicht / Beschermen tegen warmte / Má ikke settes for varme / Przechowywać z dala od źródeł ciepła / Manter ao abrigo do calor / A se feri de căldură / H neperazet / Uchovávať mimo zdroja tepla / Držite dalje od toplote / Får ej utsättas för värme / Isidan uzak tutun / Беречь від дії тепла / 请远离热源



Cut / Срежете / Odstřihněte / Klip / Schneiden / Κόψτε / Cortar / Lõigata / Découper / Redzi / Vágja ki / Tagliare / Кесіңіз / 잘라내기 / Kirpti / Nogrietz / Knippen / Kutt / Odciać / Sbyrnat / Decupari / Отрезать / Odstřihněte / Iseći / Klipp / Kesme / Розрізати / 剪下



Collection date / Дата на събиране / Datum odberu / Opsamlingsdato / Entnahmetermin / Ημερομηνία συλλογής / Fecha de recogida / Kogumiskupäev / Date de prélèvement / Dani prikupljanja / Mintavétel dátuma / Data di raccolta / Жинаған тізбекүні / 수집 날짜 / Paėmimo data / Savākšanas datums / Verzameldatum / Datum prøvetaking / Data pobrania / Data de coleta / Data colectării / Breaa odberu / Datum prikupljanja / Uppsamlingsdatum / Toplama tarihi / Дата забору / 采集日期



µL/test / µL/тест / µL/Test / µL/тестирование / µL/prueba / µL/testzt / µL/테스트 / мкл/тест / µL/tyrimas / µL/pārbaude / µL/teste / мкл/анализ / µL/检测



Keep away from light / Пазете от светлина / Nevstaviujte svetlu / Má ikke udsættes for lys / Vor Licht schützen / Κρατήστε το μακριά από το φως / Mantener alejado de la luz / Hoida eemal valgusest / Conserver à l'abri de la lumière / Držati dalje od svetla / Fény nem érheti / Tenere al riparo dalla luce / Қараңғыланған жерде ұста / 빛을 피해야 함 / Laikyti atokiau nuo šilumos šaltinių / Sargát no gaismas / Niet blootstellen aan zonlicht / Má ikke udsættes for lys / Przechowywać z dala od źródeł światła / Manter ao abrigo da luz / Feriti de lumină / Хранить в темноте / Uchovávať mimo dosahu svetla / Držite dalje od svetlosti / Får ej utsättas för ljus / Isidan uzak tutun / Беречь від дії світла / 请远离光线



H₂ Hydrogen gas generated / Образован в водород газ / Možnost úniku plyného vodíku / Frembringer hydrogen gas / Wasserstoffgas erzeugt / Δημιουργία αερίου υδρογόνου / Producción de gas de hidrógeno / Vesinikigaasi tekitatud / Produit de l'hydrogène gazeux / Sadržaj hidrogena / Hidrogen gázt felejt / Produzione di gas idrogeno / Газтесик сүтери найда болды / 수소 가스 생성됨 / Išskiria vandenilio dujas / Rodas išdegadis / Waterstofgas gegenereerd / Hydrogen gas generated / Powoduje powstawanie wodoru / Produção de gás de hidrogênio / Generare gaz de hidrogen / Выделение водорода / Vyrobene použitím vodíka / Oslobađa se vodonik / Genererad vätegas / Aciqda çikan hidrojen gazı / Реакция з виділенням водню / 会产生氢气



Patient ID number / ИД номер на пациента / ID pacienita / Patientens ID-nummer / Patienten-ID / Αριθμός αναγνώρισης ασθενούς / Número de ID del paciente / Patsiendi ID / No d'identification du patient / Identifikacijski broj pacijenta / Beleg azonosító száma / Numero ID paziente / Пациенттің идентификациялық нөмірі / 환자 ID 번호 / Paciento identifikavimo numeris / Pacienita ID numurs / Identificatienummer van de patiënt / Pacienita ID-nummer / Numero ID pacienita / Número do ID do doente / Număr ID pacient / Идентификационный номер пациента / Identifikačné číslo pacienta / ID broj pacijenta / Patientnummer / Hasta kimlik numarası / Идентификатор пациента / 患者标识号



Fragile, Handle with Care / Чупливо. Работете с необходимото внимание. / Kéheklé. Pfi manipulaci postupje opatně. / Forsigtigt, kan gå i stykker. / Zerbrechlich, vorsichtig handhaben. / Ευφροσύνου. Χρησιτείτε το με προσοχή. / Frägl, Manipuler con cuidado. / Öm, käsitsege ettevaatlikult. / Fragile. Manipuler avec précaution. / Lomljivo, rukujte pažljivo. / Törékeny! Óvatosan kezelendő. / Fragile, maneggiare con cura. / Сынғын, абайлап пайдаланыңыз. / 조심 깨지기 쉬운 처리. / Trapu, eiklės atsargiai. / Trausis; rikoties užmanigi / Breekbaar, voorzichtig hanteren. / Ømtålig, håndter forsigtigt. / Krucha zawartość, przenośić ostrożnie. / Frägl, Manusele con Cuidado. / Frägl, manipuleri cu atenție. / Хрупкое! Обращаться с осторожностью. / Krehké, vyžaduje sa opatrná manipulácia. / Lomljivo - rukujte pažljivo. / Bräckligt. Hantera försiktigt. / Kolay Kırılır, Dikkatli Tasayın. / Тендітна, звертатися з обережністю / 易碎, 小心轻放

R_x Only

This only applies to US: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner." / S'applique uniquement aux États-Unis: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner." / Vale solo per gli Stati Uniti: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner." / Gilt nur für die USA: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner." / Sólo se aplica a los EE.UU.: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner."



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



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

Australian Sponsor:
Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde, NSW 2113
Australia

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

© 2019 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.