

BD Sistemas de Identificación BBL Crystal ID

Equipo para la identificación de bacterias grampositivas

USO PREVISTO

El sistema **BBL Crystal** para la identificación (ID) de bacterias gram-positivas (GP) es un método de identificación en miniatura que utiliza substratos convencionales, fluorogénicos y cromogénicos modificados. Se ha diseñado para la identificación de bacterias aerobias gram-positivas aisladas frecuentemente de muestras clínicas.

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. 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 **BBL Crystal ID** son modificaciones de métodos clásicos, incluyendo pruebas para la fermentación, la oxidación, la degradación y la hidrólisis de varios substratos. Además, hay substratos ligados a cromógenos y fluorógenos, como en el panel **BBL Crystal GP ID**, para la detección de enzimas que son utilizadas por los microbios para metabolizar varios substratos.

El equipo **BBL Crystal GP ID** incluye (i) tapas del panel **BBL Crystal GP ID**, (ii) bases **BBL Crystal** y (iii) tubos **BBL Crystal ANR, GP RGP, N/H ID** de fluido de inóculo (FI). La tapa contiene 29 substratos 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 substratos secos e inicia las reacciones de las pruebas.

Después de un periodo 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.¹⁸ Las series de reacciones bioquímicas y enzimáticas de los 29 substratos **BBL Crystal GP ID** para una gran variedad de microorganismos están almacenadas en la base de datos **BBL Crystal GP 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 (vea pgs. 28-29) muestra la lista de grupos taxonómicos que comprende la base de datos actual.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los paneles del sistema **BBL Crystal GP 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. Los substratos cromogénicos, después de sufrir hidrólisis, producen cambios de color que pueden detectarse visualmente. Además, hay pruebas que detectan la capacidad de un organismo de hidrolizar, degradar, reducir o de alguna forma utilizar un substrato en los sistemas **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 (vea pgs. 30-32). 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).

REACTIVOS

El panel **BBL Crystal GP ID** contiene 29 substratos enzimáticos y bioquímicos. Vea la Tabla 3 (vea pgs. 33-36) para la lista de los ingredientes activos.

Advertencias y precauciones:

Para uso diagnóstico *in vitro*.

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.

ALMACENAMIENTO Y MANEJO/VIDA UTIL

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

Bases: Las bases están envasadas en dos grupos de diez en las bandejas de incubación **BBL Crystal**. Las bases están apiladas boca abajo para reducir al mínimo la posibilidad de contaminación por el aire.

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

Al recibirse, el equipo **BBL Crystal** GP 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 **BBL Crystal** ID no deben utilizarse directamente con muestras clínicas. Utilice aislados de un medio como agar soja **Trypticase** con 5% de sangre de cordero (TSA II) o agar Columbia con 5% de sangre de cordero (Columbia). También es aceptable el uso de medios selectivos como agar alcohol feniletílico con 5% de sangre de cordero (PEA) o agar Columbia CNA con 5% de sangre de cordero (CNA). 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. Cuando se usan torundas, solamente deben usarse torundas con puntas de algodón para preparar las suspensiones del inóculo. 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 **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.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

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

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

20 bases **BBL Crystal**,

20 tubos **BBL Crystal** ANR, GP, RGP, N/H ID de fluido de inóculo. Cada tubo contiene aproximadamente 2,3 ± 0,15 mL de fluido

de inóculo con la siguiente fórmula: KCl 7,5 g, CaCl₂ 0,5 g, Tricina N-[2-hidroxi-1, 1-bis (hidroximetil)metil] glicina 0,895 g, agua purificada a 1000 mL.

2 bandejas de incubación,

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

Materiales necesarios pero 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° 0,5, visor para paneles **BBL Crystal**, Libro electrónico de códigos para los sistemas **BBL Crystal** ID o Libro de códigos manual **BBL Crystal** GP, y medio de cultivo apropiado.

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

Procedimiento de la prueba: El sistema **BBL Crystal** GP 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

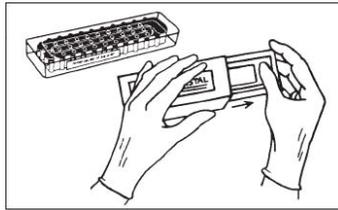
un palillo de madera o un asa plástica desechable varias colonias de la misma morfología de uno de los medios recomendados (vea la sección “Recogida y tratamiento de las muestras”).

3-Ponga las colonias en suspensión en un tubo **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID** de fluido de inóculo.

4-Vuelva a taper el tubo y agite en un vórtex pro 10–15 s. La turbidez deberá ser equivalente a un patrón McFarland N° 0,5. 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° 0,5.

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° 0,5. 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 ($2,3 \text{ mL} \pm 0,15 \text{ mL}$). 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.

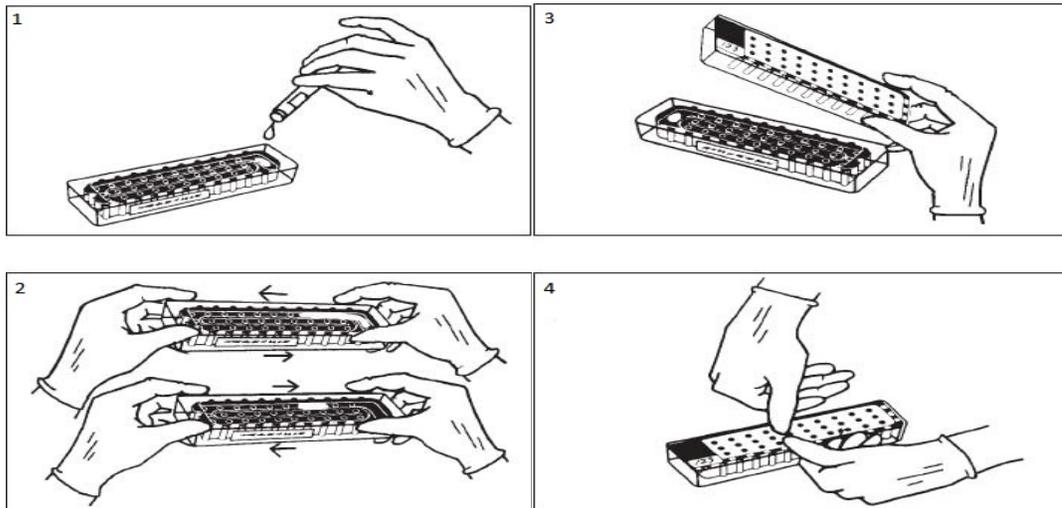
6-Vierta todo el contenido del tubo de fluido de inóculo en el área demarcada de la base.

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.

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”).

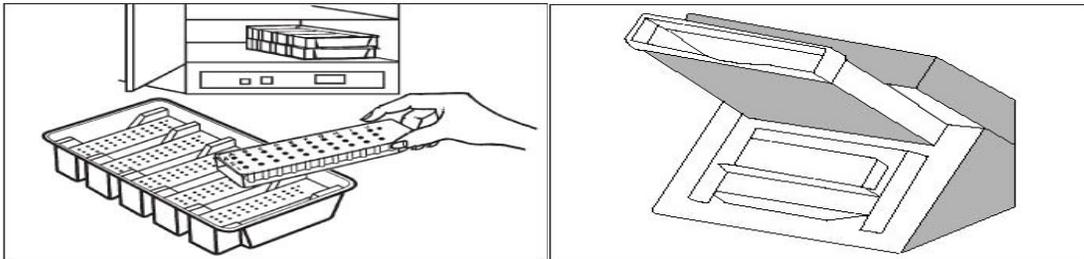
Prueba de cultivo puro: Para determinar la pureza del cultivo, extraiga una pequeña gota del tubo de fluido de inóculo con un alambre estéril, antes o después de inocular la base, e inocule un tubo de agar inclinado o una placa (cualquier medio de cultivo apropiado). Deseche el tubo del fluido de inóculo 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 18–24 h a una temperatura de 35–37 °C. Si los paneles se incuban durante 24 h, éstos 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 **BBL Crystal**. Consulte la plantilla de reacciones de color y/o la Tabla 3 (vea pgs. 33-36) para la interpretación de las reacciones. Use el bloc de informes **BBL Crystal GP** para anotar las reacciones. También puede utilizarse el lector automático **BBL Crystal** para leer los paneles.

- Primero, lea las columnas E a J, usando la luz blanca.
- Lea las columnas A a D (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 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: ABCDEFGH I J

4 *+2 -++ 1 +-+

Perfil 163

- + + + - + + - - + + - - - + + 256437 0

*(4A) = Control negativo de fluorescencia El número de perfil resultante y morfología celular deben introducirse en un PC en el que se haya instalado el software **BBL Crystal MIND**, 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 Diagnostics para obtener ayuda con la identificación. Si se utiliza el lector automático **BBL Crystal**, el PC identifica automáticamente los microorganismos.

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 *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 según las recomendaciones previas (consulte la sección “Procedimiento de la prueba”).

2-Incuba el panel durante 18–20 h entre 35–37 °C.

3-Lea el panel con ayuda del visor para paneles y la plantilla de color; anote las reacciones utilizando el bloc de informes. También puede leerse el panel en el lector automático **BBL Crystal**.

4-Compare los resultados anotados con los de la Tabla 4 (vea pg. 37). 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.

Los resultados esperados de la prueba para cepas de pruebas de control de calidad adicionales aparecen en la Tabla 5 (vea pgs. 38-39).

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones de NCCLS y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El sistema **BBL Crystal** GP 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.

La base de datos del sistema **BBL Crystal** GP 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 **BBL Crystal** GP ID: TSA II y agar sangre Columbia. También es aceptable el uso de medios selectivos como PEA o CNA. No se deben utilizar los medios que contienen esculina.

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

Mientras que el sistema **BBL Crystal** GP 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.

Aunque la mayoría de los aislados de *Enterococcus faecium* son correctamente identificados en el sistema **BBL Crystal** GP, algunas cepas de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina producen reacciones atípicas de sustratos que pueden conducir a identificarlos como *Enterococcus durans* o, con menos frecuencia, como *Helcococcus kunzii*. Por consiguiente, si el reporte identifica alguno de estos dos organismos, se recomienda hacer otro análisis para confirmar el resultado.

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 utilice.

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.

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Reproducibilidad: En un estudio externo realizado en cuatro laboratorios clínicos (cuatro evaluaciones en total), se analizó la reproducibilidad de (29) reacciones de los substratos del sistema **BBL Crystal** GP ID mediante pruebas múltiples. La reproducibilidad de las reacciones de los substratos individuales varió entre 79,2% y 100%. Se determinó que la reproducibilidad general del panel **BBL Crystal** GP ID era del 96,7%.²⁰

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

El sistema **BBL Crystal** GP ID identificó correctamente 668 (90,9%) de los 735 aislados totales analizados en los estudios (incluyendo los aislados que requirieron análisis adicional). Un total de 56 aislados (7,6%) fue identificado incorrectamente y se obtuvo un mensaje "Sin identificación" para 11 aislados (1,5%).

DISPONIBILIDAD

| Nº de cat. | Descripción | Nº de cat. | Descripción |
|------------|---|------------|---|
| 245140 | Equipo BBL Crystal para la identificación de bacterias gram-positivas, con 20 tapas del panel BBL Crystal GP ID, 20 bases BBL Crystal y 20 tubos con fluido de inóculo BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID. | 221165 | Agar Columbia BBL con 5% de sangre de cordero, paquete de 20. |
| 245038 | Fluido de inóculo BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID, caja de 10. Visor para paneles BBL Crystal , modelo USA, 110 V, 60 Hz. Visor para paneles BBL Crystal , modelo europeo, 220 V, 50 Hz. | 221263 | Agar Columbia BBL con 5% de sangre de cordero, caja de 100. Agar Columbia CNA BBL con 5% de sangre de cordero, paquete de 20. Agar Columbia CNA BBL con 5% de sangre de cordero, caja de 100. Agar alcohol feniletílico BBL con 5% de sangre de cordero, paquete de 20. Agar alcohol feniletílico BBL con 5% de sangre de cordero, caja de 100. Agar soja Trypticase BBL con 5% de sangre de cordero (TSA II), paquete de 20. Agar soja Trypticase BBL con 5% de sangre de cordero (TSA II), caja de 100. Equipo BBL de tinción de Gram, paquete de 4 frascos de 250 mL cada uno. |
| 245031 | Visor para paneles BBL Crystal , modelo japonés, 100 V, 50/60 Hz. Fuente de luz ultravioleta de onda larga para el visor para paneles BBL Crystal . Fuente de luz blanca para el visor para paneles BBL Crystal . Libro de códigos manual para el sistema BBL Crystal para la identificación de bacterias gram-positivas. | 221352 | |
| 245032 | | 221353 | |
| 245033 | | 221179 | |
| 245034 | | 221277 | |
| 245036 | | 221239 | |
| 245037 | | 221261 | |
| 245300 | Lector automático BBL Crystal | 212539 | |
| 441010 | Software BBL Crystal | | |