

BD Sistemas de Identificación BBL Crystal Equipo para la identificación de anaerobios

Español

USO PREVISTO

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

RESUMEN Y EXPLICACION

Ya en 1918 había informes sobre métodos micrométricos para la identificación bioquímica de microorganismos.¹⁰ Varias publicaciones han incluido estudios sobre el uso de discos de papel impregnados de reactivos y métodos con microtubos para diferenciar las bacterias entéricas.¹⁰⁻¹⁴ 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 ANR ID**, para la detección de enzimas que son utilizadas por los microbios para metabolizar varios substratos.^{12,15-22}

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

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

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los paneles del sistema **BBL Crystal ANR ID** contienen 29 substratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados. Para rehidratar los substratos se utiliza una suspensión de bacterias en el fluido de inóculo. Las pruebas usadas en el sistema se basan en la utilización y degradación microbiana de substratos específicos detectados por varios sistemas indicadores. La hidrólisis enzimática de los substratos fluorogénicos que contienen derivados cumarínicos del 4-metil-umbeliferona (4MU) o del 7-amino-4-metilcumarín (7-AMC) resulta en un aumento de la fluorescencia que se detecta fácilmente a simple vista¹⁵⁻¹⁹ con una lámpara de luz ultravioleta.¹⁹⁻²¹ Los substratos cromogénicos, después de sufrir hidrólisis, producen cambios de color que pueden detectarse visualmente. Además, hay pruebas que detectan la capacidad de un organismo de hidrolizar, degradar, reducir o de alguna forma utilizar un substrato en el sistema **BBL Crystal ID**.

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

Tabla1

Grupos taxonómicos en el sistema BBL Crystal ANR ID

Bacilos Gram negativos

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

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

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

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

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

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

Tabla 2
Principios de las pruebas usadas en el sistema BBL Crystal ANR ID

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

REACTIVOS

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

Tabla 3

Reactivos usados en el sistema BBL Crystal ANR ID

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

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

Precauciones: Diagnóstico *in vitro*

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

ALMACENAMIENTO Y MANEJO/VIDA UTIL

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

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

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

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

RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

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

La incubadora utilizada debe ser humidificada para impedir la evaporación del fluido de los pocillos durante la incubación. La humedad relativa recomendada es del 40 – 60%. La utilidad de los sistemas **BBL Crystal ID** o cualquier otro procedimiento de diagnóstico a usarse con una muestra clínica está directamente afectado por la calidad de las mismas muestras. Se recomienda firmemente que los laboratorios utilicen los métodos discutidos en el *Manual of Clinical Microbiology* para recoger las muestras, transportarlas y sembrarlas en medios de aislamiento primario.¹ Otras lecturas recomendadas referentes al manejo de muestras de anaerobios incluyen *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*⁹ y *Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology*.³

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

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

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

20 bases **BBL Crystal**,

20 tubos **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID** de fluido de inóculo. Cada tubo contiene aproximadamente 2,3 ± 0,15 mL de fluido de inóculo con la siguiente fórmula: KCl 7,5 g, 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,

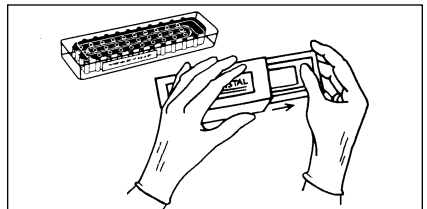
1 bloc de informes **BBL Crystal ANR ID**.

Materiales no suministrados: Torundas estériles de algodón (*no use torundas de poliéster*), incubadora (35 – 37° C) sin CO₂ (40 – 60% de humedad relativa), patrones McFarland N° 4 y N° 5, visor para paneles **BBL Crystal**, Libro electrónico de códigos para los sistemas **BBL Crystal ID** o Libro de códigos manual **BBL Crystal ANR**, cuentagotas del reactivo de indol **BBL DMACA**, placas de cultivo no selectivo y reactivo de la catalasa.

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

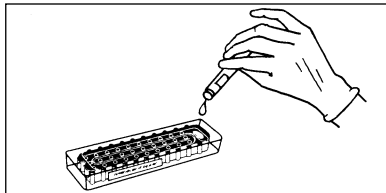
Procedimiento de la prueba: El sistema **BBL Crystal ANR ID** requiere los resultados de la tinción Gram y de las pruebas de la catalasa y del indol. Antes de preparar los paneles, deberán hacerse las pruebas de la catalasa y del indol. La prueba del indol debe hacerse de acuerdo con las instrucciones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

1. Saque las tapas de la envoltura. Deseche el desecante. Una vez sacadas de la envoltura, las tapas cubiertas deben usarse dentro de 1 h. No utilizar el panel si no hay desecante en la envoltura.

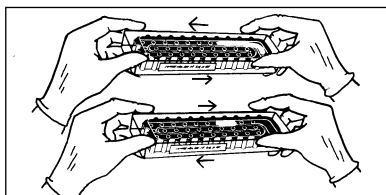


2. Tome un tubo de fluido de inóculo y anote el número de la muestra del paciente en la etiqueta. Usando una técnica aseptica, levante con la punta de una torunda de algodón estéril (*no use torundas de poliéster*) o con un palillo de madera o un asa plástica desechable varias colonias de la misma morfología de uno de los medios recomendados (vea la sección "Recogida y tratamiento de las muestras").

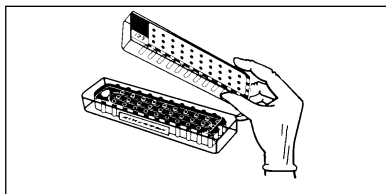
- Ponga las colonias en suspensión en un tubo **BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID** de fluido de inóculo.
- Vuelva a **tapar** el tubo y agite en un **vórtex** por 10 a 15 seg. La turbidez deberá ser equivalente a un patrón McFarland N° 4 (sin superar el patrón McFarland N° 5). Si la concentración del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



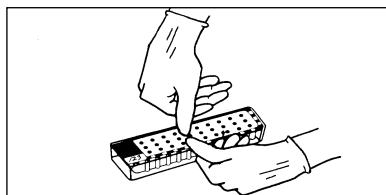
- Tome la base con ambas manos, balanceándola suavemente hasta que los pocillos se llenen con el inóculo. Balancee la base **nuevamente** para escurrir el exceso de líquido de vuelta al área demarcada, y ponga la base sobre la mesa. Debido a las altas concentraciones de células en los paneles **BBL Crystal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



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

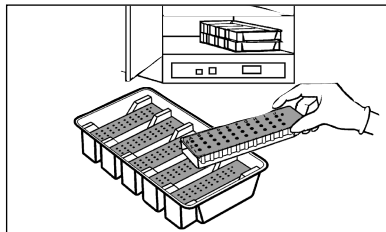


- Presione hacia abajo hasta sentir una leve resistencia. Ponga los pulgares a cada lado del borde de la tapa en el medio del panel y presione hacia abajo simultáneamente hasta que la tapa se asiente en su lugar (se escucharán dos "golpecitos").

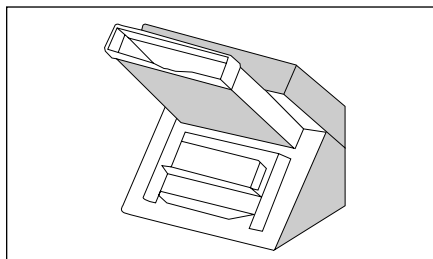


Prueba de cultivo puro: Para determinar la pureza del cultivo, extraiga una pequeña gota del tubo de inóculo con un alambre estéril, antes o después de inocular la base, e inóculé un tubo de agar inclinado o una placa (cualquier medio de cultivo no selectivo). Deseche el tubo del inóculo con su tapón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

Incubación: Ponga los paneles inoculados en bandejas de incubación. Se pueden poner diez paneles en una bandeja (5 filas de 2 paneles). Todos los paneles deben incubarse **boca abajo** (ventana grande hacia arriba; etiqueta hacia abajo) en una incubadora sin 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).



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



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

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

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

*(4A) = Control negativo de fluorescencia

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

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

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

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

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

Todas las bases de datos de los sistemas **BBL Crystal ANR ID** se crearon con medios **BBL**. La reactividad de algunos substratos en sistemas de identificación rápida puede depender de los medios suministrados para las preparaciones de los inóculos. Recomendamos el uso de los siguientes medios **BBL** para ser utilizados con el sistema **BBL Crystal ANR ID**: Agar de sangre para anaerobios CDC, agar Schaedler con vitamina K₁ y 5% de sangre de oveja, agar Columbia con 5% de sangre de oveja y agar de sangre Brucella con hemina y vitamina K₁ (vea "Disponibilidad").

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

Tabla 4
Plantilla del control de calidad para el sistema BBL Crystal ANR ID*

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

1 = Negativo en medio BBL Schaedler

4 = Negativo en medio BBL Brucella

7 = Negativo en medio BBL Columbia

2 = Positivo en medio BBL Schaedler

5 = Positivo en medio BBL Brucella

8 = Positivo en medio BBL Columbia

3 = Variable en medio BBL Schaedler

6 = Variable en medio BBL Brucella

9 = Variable en medio BBL Columbia

Tabla 5
Cepas adicionales de control de calidad para el sistema BBL Crystal ANR ID

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

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

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

Sólo se deben utilizar torundas con puntas de algodón, palillos de madera o asas plásticas desechables en la preparación de la suspensión de inóculo ya que algunas torundas de poliéster pueden ocasionar que el fluido de inóculo se 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 colocan los paneles debe ser humidificada para impedir la evaporación de fluido de inóculo de los pocillos durante el período de incubación. La humedad relativa recomendada es del 40 – 60%.

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

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

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

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

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

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

DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción	Nº de cat.	Descripción
245010	Sistema BBL Crystal ANR ID , con 20 tapas BBL Crystal ANR ID , 20 bases BBL Crystal y 20 tubos con fluido de inóculo BBL Crystal ANR ID .	221734	Agar de sangre BBL CDC para anaerobios con 5% de sangre de oveja, caja de 100 placas.
245038	Fluido de inóculo BBL Crystal ANR , GP, RGP, N/H ID, caja de 10.	221539	Agar <i>Schaedler BBL</i> con vitamina K ₁ y 5% de sangre de oveja, paquete de 20.
245031	Visor para paneles BBL Crystal , modelo USA, 110V, 60 Hz.	221540	Agar <i>Schaedler BBL</i> con vitamina K ₁ y 5% de sangre de oveja, caja de 100.
245032	Visor para paneles BBL Crystal , modelo europeo, 220V, 50 Hz.	221165	Agar <i>Columbia BBL</i> con 5% de sangre de oveja, paquete de 20.
245033	Visor para paneles BBL Crystal , modelo japonés, 100 V, 50/60 Hz.	221263	Agar <i>Columbia BBL</i> con 5% de sangre de oveja, caja de 100.
245034	Fuente de luz ultravioleta de onda larga para el visor para paneles BBL Crystal .	297848	Agar de sangre <i>Brucella BBL</i> con hemina y vitamina K ₁ , paquete de 20.
245036	Fuente de luz blanca para el visor para paneles BBL Crystal .	297716	Agar de sangre <i>Brucella BBL</i> con hemina y vitamina K ₁ , caja de 100.
245011	Manual de códigos para el sistema BBL Crystal de identificación de anaerobios.	261187	Cuentagotas para el reactivo del indol BBL DMACA , caja de 50.
221733	Agar de sangre BBL CDC para anaerobios con 5% de sangre de oveja, paquete de 20 placas.	212539	Equipo de tinción Gram BBL , paquete de 4 frascos de 250 mL cada uno.

BIBLIOGRAFIA: Vea “Referencias” en el texto en inglés.