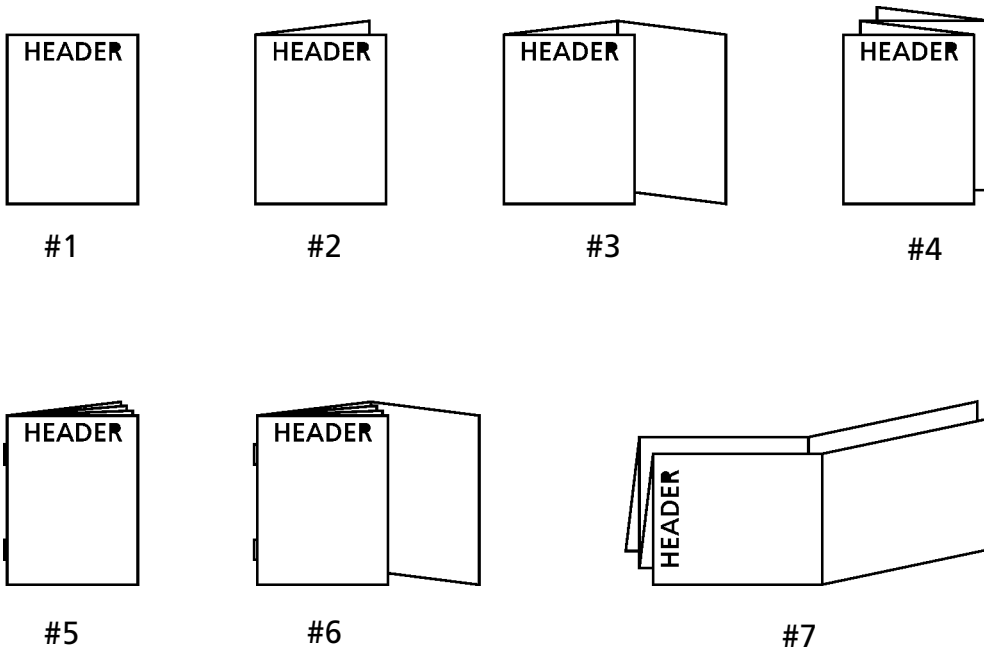


Revisions


Rev from	Rev to	ECO #
0505	0607	4417-07

Notes:

- BD Cat. Number 245000
- Blank (Sheet) Size : Length: 8.5" Width: 11"
 Number of Pages: 44 Number of Sheets: 12
 Page Size: Length 8.5" Width 5.5" Final Folded Size: 5.5" x 8.5"
- Style (see illustrations below): # 5



- See Specification Control Number N/A for Material Information
- Ink Colors: Printed two sides Yes No
 No. of Colors: 1 Standard Black
- Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level

Label Design	Date	COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION	 Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA	
Proofer	Date			
Checked By	Date			
Part Number: 8809241JAA		Category and Description Package Insert BBL Crystal Identification Systems Enteric/ Nonfermenter ID Kit REF 245000	Sheet: 1 of 45 Scale: NONE	A

BD BBL Crystal™ Identification Systems **Enteric/Nonfermenter ID Kit**



English: pages 1 – 6
Français : pages 7 – 12
Deutsch: Seiten 13 – 18
Italiano: pagine 19 – 24

Português: páginas 25 – 30
Español: páginas 31 – 35
Japanese pages 39 – 43

CLIA COMPLEXITY: HIGH

CDC IDENTIFIER CODES

ANALYTE: 0412

TEST SYSTEM: 07485

8809241JAA

2007/06

U.S. Pat. 5,182,082

Pokyny vám poskytne miestni zástupce spoločnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőjétől. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Instrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Contactați reprezentantul dumneavoastră local BD pentru instrucțiuni. / Talimatlar için yerel BD temsilcileriniz danışın.

INTENDED USE

The **BBL Crystal™** Enteric/Nonfermenter (E/NF) Identification (ID) System is for the identification of aerobic gram-negative bacteria that belong to the family *Enterobacteriaceae* as well as some of the more frequently isolated glucose fermenting and nonfermenting gram-negative bacilli.

SUMMARY AND EXPLANATION

The **BBL Crystal E/NF ID** System is a miniaturized identification method. Many of the tests used are modifications of classical methods. These include tests for fermentation, oxidation, degradation and hydrolysis of various substrates. In addition, there are chromogen linked substrates to detect enzymes that microbes use to metabolize various substrates.¹⁻⁵

The **BBL Crystal E/NF ID** kit is comprised of (i) **BBL Crystal E/NF** panel lids, (ii) **BBL Crystal** bases and (iii) **BBL Crystal™** Enteric/Stool ID Inoculum Fluid (IF) tubes. The lid contains 30 dehydrated substrates 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. Color changes result from metabolic activities of the microorganisms. The resulting pattern of the 30 reactions is converted into a ten digit profile number that is used as the basis for identification.⁶ Biochemical and enzymatic reaction patterns for the 30 **BBL Crystal E/NF ID** substrates with a wide variety of microorganisms are stored in the **BBL Crystal E/NF ID** database. 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 E/NF database is provided in Table 1 (page 36).

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The tests used in the **BBL Crystal E/NF ID** System are based on microbial utilization and degradation of specific substrates detected by various indicator systems. Fermentation reactions detect the ability of an isolate to metabolize carbohydrates in the absence of atmospheric oxygen, and oxidation reactions are based on the ability of an organism to metabolize the substrate with oxygen as the final electron acceptor. Both reactions are usually detected by the use of a pH indicator in the test substrate. Chromogenic substrates upon hydrolysis produce color changes that can be detected visually. In addition, there are other tests that detect the ability of an organism to hydrolyze, degrade, reduce or otherwise utilize a substrate in the **BBL Crystal ID** System. Reactions employed by various substrates and a brief explanation of the principles employed in the system are described in the "Reagents" section.

REAGENTS

The **BBL Crystal E/NF ID** panel contains 30 enzymatic and biochemical substrates as described below. Panel location indicates the row and column where the well is located (example: 1J refers to Row 1 in Column J).

Precautions: For *in vitro* Diagnostic Use

Reagents and Principles of Tests Employed in the BBL Crystal E/NF ID System

Panel Location	Active Ingredient	Code	Approx. Amt. (g/10 mL)	Pos.	Neg.	Principle (Reference)
4A	Arabinose	ARA	3.5	Gold/Yellow	Orange/Red	Utilization of carbohydrate results in lower pH and change in indicator (Phenol red). ⁷⁻¹⁰
4B	Mannose	MNS	3.0	Gold/Yellow	Orange/Red	
4C	Sucrose	SUC	2.8	Gold/Yellow	Orange/Red	
4D	Melibiose	MEL	1.0	Gold/Yellow	Orange/Red	
4E	Rhamnose	RHA	3.0	Gold/Yellow	Orange/Red	
4F	Sorbitol	SOR	3.5	Gold/Yellow	Orange/Red	
4G	Mannitol	MNT	1.8	Gold/Yellow	Orange/Red	
4H	Adonitol	ADO	2.5	Gold/Yellow	Orange/Red	
4I	Galactose	GAL	1.5	Gold/Yellow	Orange/Red	
4J	Inositol	INO	1.3	Gold/Yellow	Orange/Red	

Reagents and Principles of Tests Employed in the BBL Crystal E/NF ID System (continued)

Panel Location	Active Ingredient	Code	Approx. Amt. (g/10 mL)	Pos.	Neg.	Principle (Reference)
2A	p-n-p-phosphate	PHO	0.025	Yellow	Colorless	Enzymatic hydrolysis of the colorless aryl substituted glycoside or phosphate ester releases yellow p-nitrophenol. ^{1,5}
2B	p-n-p- α - β -glucoside	BGL	0.025	Yellow	Colorless	
2C	p-n-p- β -galactoside	NPG	0.06	Yellow	Colorless	
2D	Proline nitroanilide	PRO	0.07	Yellow	Colorless	Enzymatic hydrolysis of colorless amide substrate releases yellow p-nitroaniline. ^{1,5}
2E	p-n-p bis-phosphate	BPH	0.02	Yellow	Colorless	Enzymatic hydrolysis of the colorless aryl substituted glycoside or phosphate ester releases yellow p-nitrophenol. ^{1,5}
2F	p-n-p-xyloside	BXY	0.03	Yellow	Colorless	
2G	p-n-p- α -arabinoside	AAR	0.03	Yellow	Colorless	
2H	p-n-p-phosphorylcholine	PHC	0.03	Yellow	Colorless	
2I	p-n-p- β -glucuronide	GLR	0.02	Yellow	Colorless	
2J	p-n-p-N-acetyl glucosaminide	NAG	0.04	Yellow	Colorless	
1A	γ -L-glutamyl p-nitroanilide	GGL	0.03	Yellow	Colorless	Enzymatic hydrolysis of the colorless amide substrate releases yellow p-nitroaniline. ^{1,5}
1B	Esculin	ESC	0.14	Brown/ Maroon	Clear/Straw	Hydrolysis of esculin results in a black precipitate in the presence of ferric ion. ¹¹
1C	p-nitro-DL-phenylalanine	PHE	0.1	Gold/ Dk. Orange	Yellow	Oxidative deamination of phenylalanine results in a brown color in the presence of ferric ion. ^{7,11}
1D	Urea	URE	0.2	Aqua/Blue	Yellow/Green	Hydrolysis of urea and the resulting ammonia change the pH indicator color (Bromthymol blue). ^{7,11,12}
1E	Glycine	GLY	0.7	Aqua/Blue	Yellow/Green	Degradation of glycine results in alkaline metabolites that change color of the pH indicator (Bromthymol blue). ¹³
1F	Citrate	CIT	0.8	Aqua/Blue	Yellow/Green	Utilization of citrate results in alkaline metabolites that change color of the pH indicator (Bromthymol blue). ^{7,14}
1G	Malonic acid	MLO	1.5	Aqua/Blue	Yellow/Green	Utilization of malonate results in alkaline metabolites that change color of the pH indicator (Bromthymol blue). ¹¹
1H	Triphenyl Tetrazolium chloride	TTC	0.15	Pink/Red*	Clear	Reduction of the tetrazolium compound results in formation of a red formazan. ¹³
1I	Arginine	ARG	1.5	Red/Purple	Yellow/Brown	Anaerobic catabolism results in pH rise and change in the color of the indicator (Bromcresol purple). ^{7,15}
1J	Lysine	LYS	0.5	Red/Purple	Yellow/Brown	

*Precipitate may or may not be visible.

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

STORAGE AND HANDLING/SHELF LIFE

On receipt, store the **BBL Crystal E/NF** kit at 2 – 25°C. DO NOT FREEZE. If the kit or any components are stored refrigerated, each should be brought to room temperature prior to use.

Lids: Lids are individually packaged and must be stored unopened. Visually inspect the package for holes or cracks in the foil package. Do not use if the packaging appears to be damaged. Lids in the original packaging, if stored as recommended, will retain expected reactivity until the date of expiration.

Bases: Bases are packaged in two sets of ten, in **BBL Crystal** incubation trays. The bases are stacked facing down to minimize air contamination. Store unused bases in the tray, in plastic bag. Empty trays should be used to incubate panels.

Inoculum Fluid: **BBL Crystal** Enteric/Stool 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). Expiration dating is shown on the tube label. **BBL Crystal** Enteric/Stool ID Inoculum Fluid may be used with either **BBL Crystal E/NF** or **RS/E** panels.

SPECIMEN COLLECTION AND PROCESSING

BBL Crystal ID Systems are **not** for use directly with clinical specimens. Use isolates from a blood agar plate such as **Trypticase™** Soy Agar with 5% Sheep Blood. Use of a MacConkey Agar plate is also acceptable. The test isolate must be a pure culture no more than 24 h old. Only cotton-tipped applicator swabs should be used to prepare inoculum, as some polyester swabs may cause problems with inoculation of the panels. (See "Limitations of the Procedure.") Once lids are removed from the sealed pouches, they must be used within 1 h to ensure adequate performance. The plastic cover should remain on the lid until used.

The incubator used should be humidified to prevent evaporation of fluid from the wells during incubation. The recommended humidity level is 40 – 60%. The usefulness of **BBL Crystal** ID Systems or any other diagnostic procedure performed on clinical specimens is directly influenced by the quality of the specimens themselves. It is strongly recommended that laboratories employ methods discussed in the *Manual of Clinical Microbiology* for specimen collection, transport and placement on primary isolation media.¹⁶

TEST PROCEDURE

Materials Provided: BBL Crystal Enteric/NF kit:

20 BBL Crystal Enteric/NF Panel Lids,

20 BBL Crystal Bases,

20 BBL Crystal Enteric/Stool ID Inoculum Fluid Tubes. Each tube has approximately 2.2 ± 0.1 mL of Inoculum Fluid containing: NaCl 8.50 g, 3-Morpholinopropanesulfonic acid 0.8372 g, purified water to 1000 mL.

2 incubation trays,

1 BBL Crystal E/NF Report Pad.

Materials Required But Not Provided: Sterile cotton swabs (*do not use polyester swabs*); Incubator (35 – 37°C non-CO₂ (40 – 60% humidity); BBL Crystal Light Box/Panel Viewer (includes BBL Crystal Color Reaction Charts) with BBL Crystal ID System Electronic Codebook or BBL E/NF Manual Codebook (see “Availability”), or BBL Crystal AutoReader; nonselective culture plate (e.g., Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood); BBL DMACA Indole Reagent Droppers; BBL Oxidase Reagent Droppers (see “Availability”).

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

Test Procedure: BBL Crystal E/NF ID System requires oxidase and indole test results. Prior to BBL Crystal E/NF panel set-up, oxidase and indole tests should be performed from a nonselective isolation plate no more than 24 h old. Perform oxidase and indole tests per instructions provided in the package insert for these reagents.

Refer to Procedural Chart Illustrations, page 38.

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. See Fig. A.
2. Take an inoculum 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 one well isolated large (2 – 3 mm or larger in diameter) colony (or 4 – 5 smaller colonies of the same morphology) from a blood plate such as Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood. Use of a MacConkey Agar plate is also acceptable.
3. Suspend colonies in a tube of BBL Crystal Enteric/Stool Inoculum Fluid.
4. Recap tube and vortex for approximately 10 – 15 s.
5. Take a base, and mark the patient’s specimen number on the side wall.
6. Pour entire contents of inoculum fluid into target area of the base. See Fig. B.
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. See Fig. C.
8. Align the lid so that the labeled end of the lid is on top of the target area of the base. See Fig. D.
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”). See Fig. E.

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 media) for purity check. Discard inoculum fluid tube and cap in a biohazard disposal container. Incubate the slant or plate for 18 – 24 h at 35 – 37°C in a non-CO₂ incubator. 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 E/NF panels is **18 – 20 h** at 35 – 37°C. See Fig. F.

Reading: After the recommended period of incubation, remove the panels from the incubator. All panels should be read **face down** (larger windows up; label facing down) using the BBL Crystal Light Box or Panel Viewer. See Fig. G. Refer to the color reaction chart and/or the chart in the “Reagents” section for an interpretation of the reactions. Use the BBL Crystal E/NF Report Pad to record reactions. Alternatively, the BBL Crystal AutoReader may be used to read the panels.

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

Example:

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

The resulting profile number and off-line test results (indole and oxidase) should be entered on a PC in which the BBL Crystal ID System Electronic Codebook has been installed, to obtain the identification. A manual codebook is also available. If a PC is not available contact BD Technical Services for assistance with the identification. If using the BBL Crystal AutoReader, organisms are automatically identified by the PC.

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

1. Set up a **BBL Crystal E/NF** panel with *Klebsiella pneumoniae* ATCC™ 33495 per recommended procedure (refer to “Test Procedure”).
2. Incubate panel for 18 – 20 h at 35 – 37°C.
3. Read panel with **BBL Crystal** Light Box or Panel Viewer and **BBL Crystal E/NF Color Reaction Chart**; record reactions using the **BBL Crystal E/NF Report Pad**. Alternatively, read the panel on the **BBL Crystal AutoReader**.
4. Compare recorded reactions with those listed in Table 2 (page 37). If discrepant results are obtained, confirm purity of quality control strain before contacting **BD Technical Services**.

Expected test results for additional quality control test strains are also listed in Table 2 (page 37).

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

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

When antisera are available, the biochemical identification of selected organisms, such as *Salmonella*, *Salmonella* subgroup 3, *Shigella*, enteropathogenic *Escherichia coli* A-D, and *Vibrio cholerae*, should be extended by antigenic analysis.^{9,16}

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 a blood agar plate such as **Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood**. Use of a **MacConkey Agar** plate is also acceptable.

BBL Crystal Identification Systems are NOT for use directly with clinical specimens.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Reproducibility: In an external study involving three (3) clinical laboratories, the reproducibility of E/NF substrates’ (30) reactions was studied by replicate testing. The reproducibility of individual substrate reactions ranged from 96.3 – 100%. The overall reproducibility of **BBL Crystal E/NF** panel was determined to be 99.6%.

Accuracy of Identification: The performance of **BBL Crystal E/NF ID System** was compared to currently available commercial systems using clinical isolates and stock cultures.

In an internal study, the performance of the **BBL Crystal E/NF** was evaluated. Results from 169 enteric and nonenteric isolates (representing 45 species) tested were analyzed. Discrepant identifications were resolved by the use of other commercial systems. These results are shown below:

N = 169	ID Without Supplemental Testing	ID With Supplemental Testing	NO ID or Misidentified
BBL Crystal E/NF	163 (96.4%)	167 (98.8%)	2 (1.2%)

The performance of the **BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID** test was evaluated in three independent clinical laboratories.¹³ Both 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 the 299 fresh clinical isolates tested by the laboratories’ current identification methods, the **BBL Crystal ID System** correctly reported 96.7% (289) including 16 instances where two or three organisms were reported and required supplemental testing to resolve.

Out of the 291 previously identified challenge strains confirmed by the laboratories’ current identification methods, the **BBL Crystal ID System** correctly reported 96.9% (282) including 8 instances where two or three organisms were reported and required supplemental testing to resolve.¹³

AVAILABILITY

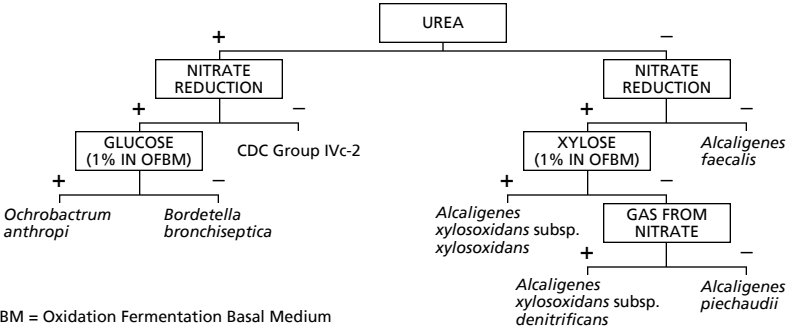
Cat. No.	Description	Cat. No.	Description
245000	BBL Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID Kit, containing 20 each: BBL Crystal™ Enteric/NF Panel Lids, BBL Crystal™ Bases, BBL Crystal™ Enteric/Stool ID Inoculum Fluid tubes.	245002	BBL Crystal™ Identification Systems Enteric/Nonfermenter Manual Codebook.
245031	BBL Crystal™ Panel Viewer, Domestic model, 110 V, 60 Hz.	245029	BBL Crystal™ Enteric/Stool ID Inoculum Fluid, ctn of 10.
245032	BBL Crystal™ Panel Viewer, European model, 220 V, 50 Hz.	245300	BBL Crystal™ AutoReader.
245033	BBL Crystal™ Panel Viewer, Japanese model, 100 V, 50/60 Hz.	221239	Trypticase™ Soy Agar with 5% Sheep Blood, pkg of 20 plates.
245034	BBL Crystal™ Panel Viewer Longwave UV Tube.	221261	Trypticase™ Soy Agar with 5% Sheep Blood, ctn of 100 plates.
245036	BBL Crystal™ Panel Viewer White Light Tube.	261187	BBL™ DMACA Indole Reagent Droppers, 50s.
		261181	BBL™ Oxidase Reagent Droppers, 50s.

REFERENCES

1. Edberg, S.C., and C.M. Kontnick. 1986. Comparison of β -glucuronidase-based substrate systems for identification of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 24:368-371.
2. Kampfer, P., O. Rauhoff, and W. Dott. 1991. Glycosidase profiles of members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 29:2877-2879.
3. Kilian, M., and P. Bulow. 1976. Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae* 1: detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.* 84:245-251.
4. Manafi, M., W. Kneifel, and S. Bascomb. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol. Rev.* 55:335-348.
5. Muytjens, H. L., J. van der Ros-van de Repe, and H. A. M. van Druten. 1984. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the ∞ -glucosidase reactions and reproducibility of the test system. *J. Clin. Microbiol.* 20:684-686.
6. Sneath, P.H.A. 1957. The application of computers to taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* 17:201-221.
7. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 1998. *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*, 10th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
8. Cowan, S.T., and K.J. Steel. 1974. *Manual for the identification of medical bacteria*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
9. Ewing, W.H. 1986. *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
10. Le Minor, L. 1972. *Le Diagnostic de Laboratoire des Bacilles a Gram Negatif Enterobacteries*. Tom. 1, 4th ed. Editions de La Tourelle, St. Mandé-94, France.
11. MacFaddin, J.F. 2000. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 3rd Ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore.
12. Ferguson, W.W., and A.E. Hook. 1943. Urease activity of *Proteus* and *Salmonella* organisms. *J. Lab. Clin. Med.* 28:1715-1720.
13. Data on file at BD Diagnostics.
14. Simmons, J.S. 1926. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon-aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *J. Infect. Dis.* 39:209-214.
15. Moeller, V. 1955. Simplified tests for amino acid decarboxylases and for arginine dihydrolase system. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 36:158-172.
16. Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover. 1999. *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

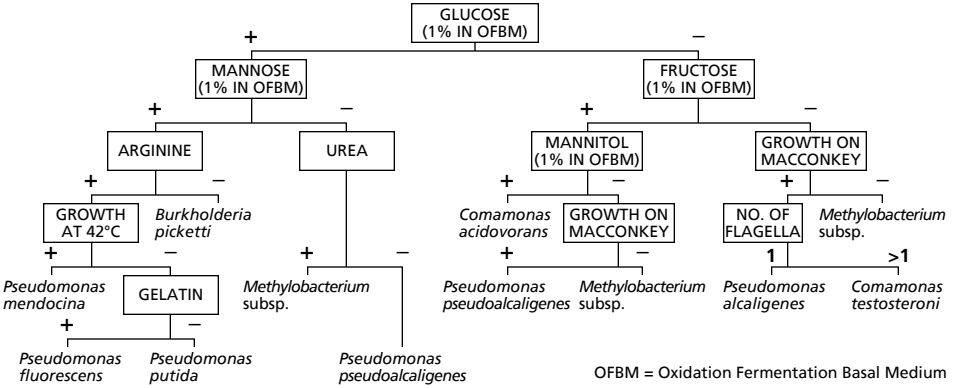
Miscellaneous Gram-Negative Bacilli

Chart No. 1 (Motile by Peritrichous Flagella)



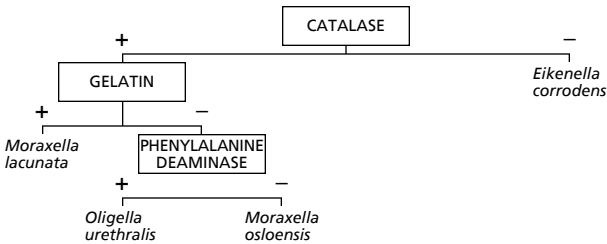
Miscellaneous Gram-Negative Bacilli

Chart No. 2 (Motile by Polar Flagella)



Miscellaneous Gram-Negative Bacilli

Chart No. 3 (Nonmotile)



- References:
1. Gilardi, G.L., *Identification of Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Rods*, 1/90
 2. Manual of Clinical Microbiology, 5th Edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991

BD Systèmes d'identification

BBL Crystal

Trousse pour l'identification des entérobactéries/non fermentants

APPLICATION

Le système d'identification (ID) entérique/non fermentaire (E/NF) **BBL Crystal** permet d'identifier les bactéries aérobies gram-négatif qui appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* tout comme certains des bacilles gram-négatif glucosiques fermentaires et non fermentaires plus fréquemment isolés.

RESUME ET EXPLICATION

Le système ID E/NF **BBL Crystal** est une méthode d'identification miniaturisée. Un grand nombre de tests utilisés sont des modifications des méthodes classiques. Entre autres, les tests de fermentation, d'oxydation, de dégradation et l'hydrolyse des divers substrats. Par ailleurs, il existe des substrats liés à des chromogènes permettant de détecter des enzymes que les microbes utilisent pour métaboliser les divers substrats.¹⁻⁵

Le kit ID E/NF **BBL Crystal** comprend (i) des couvercles de galeries E/NF **BBL Crystal**, (ii) des bases **BBL Crystal** et (iii) des tubes du fluide d'inoculum ID entérique/selles **BBL Crystal**. Le couvercle contient 30 substrats déshydratés aux extrémités des pointes en plastique. La base possède 30 puits de réaction. L'inoculum du test est préparé avec le fluide d'inoculum et est utilisé pour remplir les 30 puits dans la base. Lorsque le couvercle est aligné sur la base et mis en place, l'inoculum du test réhydrate les substrats asséchés et lance les réactions du test.

Après une période d'incubation, les changements de couleur des puits sont examinés. Ces changements de couleur résultent d'activités métaboliques des microorganismes. Le schéma obtenu à partir des 30 réactions est converti en un numéro profil composé de dix chiffres qui est utilisé comme base pour l'identification.⁶ Les schémas des réactions biochimiques et enzymatiques des 30 substrats ID E/NF **BBL Crystal** composés d'un grand nombre de microorganismes sont stockés dans la base de données ID E/NF **BBL Crystal**. L'identification découle d'une analyse comparative du modèle des réactions de l'isolat testé par rapport à celles de la base de données. Une liste complète de taxonomies qui comprend la base de données E/NF actuelle est fournie dans le Tableau 1 (page 36).

PRINCIPES DE LA METHODE

Les tests utilisés dans le système ID E/NF **BBL Crystal** reposent sur une utilisation et une dégradation microbienne de substrats spécifiques détectés par divers systèmes indicateurs. Les réactions de fermentation détectent l'aptitude d'un isolat à métaboliser les hydrates de carbone en l'absence d'oxygène atmosphérique, et les réactions d'oxydation reposent sur l'aptitude d'un organisme à métaboliser le substrat avec de l'oxygène comme accepteur d'électrons final. Ces deux réactions sont habituellement détectées par l'utilisation d'un indicateur de pH dans le substrat testé. Les substrats chromogènes au moment de l'hydrolyse produisent des changements de couleur qui peuvent être détectés visuellement. Par ailleurs, d'autres tests existent dans le système ID **BBL Crystal** pour détecter l'aptitude d'un organisme à l'hydrolyse, la dégradation, la réduction ou l'utilisation d'un substrat. Les réactions employées par divers substrats et une explication brève des principes employés dans le système sont décrites dans la section « Réactifs ».

REACTIFS

La galerie ID E/NF **BBL Crystal** comprend 30 substrats enzymatiques et biochimiques comme décrit ci-dessous. L'emplacement des galeries indique la rangée et la colonne où le puits est situé (exemple : 1J signifie rangée 1 colonne J).

Réactifs et principes des tests employés dans le système ID E/NF BBL Crystal

Emplacement de la galerie	Principe actif	Code	Qté approx. (g/10 mL)	Pos.	Nég.	Principe (Référence)
4A	Arabinose	ARA	3,5	Or/Jaune	Orange/Rouge	
4B	Mannose	MNS	3,0	Or/Jaune	Orange/Rouge	
4C	Sucrose	SUC	2,8	Or/Jaune	Orange/Rouge	
4D	Melibiose	MEL	1,0	Or/Jaune	Orange/Rouge	
4E	Rhamnose	RHA	3,0	Or/Jaune	Orange/Rouge	
4F	Sorbitol	SOR	3,5	Or/Jaune	Orange/Rouge	
4G	Mannitol	MNT	1,8	Or/Jaune	Orange/Rouge	
4H	Adonitol	ADO	2,5	Or/Jaune	Orange/Rouge	
4I	Galactose	GAL	1,5	Or/Jaune	Orange/Rouge	
4J	Inositol	INO	1,3	Or/Jaune	Orange/Rouge	
2A	p-n-p-phosphate	PHO	0,025	Jaune	Incolore	
2B	p-n-p α-β-glucoside	BGL	0,025	Jaune	Incolore	
2C	p-n-p-β-galactoside	NPG	0,06	Jaune	Incolore	
2D	Proline nitroanilide	PRO	0,07	Jaune	Incolore	

L'emploi d'hydrates de carbone entraîne une diminution du pH et une modification de l'indicateur (rouge de phénol).⁷⁻¹⁰

L'hydrolyse enzymatique du glycoside aryl substitué glucoside or phosphate ester releases yellow p-nitrophenol.¹⁻⁵

L'hydrolyse enzymatique du substrat amide non coloré libère de la p-nitroaniline qui est jaune.¹⁻⁵

Réactifs et principes des tests employés dans le système ID E/NF BBL Crystal (suite)

Emplacement de la galerie	Principe actif	Code	Qté approx. (g/10 mL)	Pos.	Nég.	Principe (Référence)
2E	p-n-p bis-phosphate	BPH	0,02	Jaune	Incolore	
2F	p-n-p-xyloside	BXY	0,03	Jaune	Incolore	
2G	p-n-p- α -arabinoside	AAR	0,03	Jaune	Incolore	L'hydrolyse enzymatique du glycoside aryl substitué ou du diester de phosphate non colorés libère du p-nitrophénol jaune. ¹⁻⁵
2H	p-n-p-phosphorylcholine	PHC	0,03	Jaune	Incolore	
2I	p-n-p- β -glucuronide	GLR	0,02	Jaune	Incolore	
2J	p-n-p-N-acetyl glucosaminide	NAG	0,04	Jaune	Incolore	
1A	γ -L-glutamyl p-nitroanilide	GGL	0,03	Jaune	Incolore	
1B	Esculin	ESC	0,14	Marron/Bordeaux	Transparent/Paille	L'hydrolyse de l'esculine donne un précipité noir en présence de fer ferrique. ¹¹
1C	p-nitro-DL-phenylalanine	PHE	0,1	Or/ Foncé Orange	Jaune	La désamination oxydative de la phénylalanine donne une couleur marron en présence de fer ferrique. ^{7,11}
1D	Urée	URE	0,2	Liquide/Bleu	Jaune/Vert	L'hydrolyse de l'urée et de l'ammoniaque qui en résulte changent la couleur de l'indicateur de pH (bleu de bromothymol). ^{7,11,12}
1E	Glycine	GLY	0,7	Liquide/Bleu	Jaune/Vert	La dégradation de la glycine donne des métabolites alcalins qui changent la couleur de l'indicateur de pH (bleu de bromothymol). ¹³
1F	Citrate	CIT	0,8	Liquide/Bleu	Jaune/Vert	L'emploi du citrate donne des métabolites alcalins qui changent la couleur de l'indicateur de pH (bleu de bromothymol). ^{7,14}
1G	Acide malonique	MLO	1,5	Liquide/Bleu	Jaune/Vert	L'emploi du malonate donne des métabolites alcalins qui changent la couleur de l'indicateur de pH (bleu de bromothymol). ¹¹
1H	Chlorure de triphényl tétrazolium	TTC	0,15	Rose/Rouge*	Transparent	La réduction du composé de tétrazolium donne la formation d'un formazan rouge. ¹³
1I	Arginine	ARG	1,5	Rouge/Pourpre	Jaune/Marron	Le catabolisme anaérobie donne une augmentation du pH et change la couleur de l'indicateur (pourpre de bromocrésol). ^{7,15}
1J	Lysine	LYS	0,5	Rouge/Pourpre	Jaune/Marron	

*Il se peut qu'un précipité soit ou ne soit pas visible.

Précautions : pour le diagnostic *in vitro*.

Après utilisation, tout le matériel contaminé comprenant boîtes, tampons d'ouate, tubes d'inoculum, papiers filtre utilisés pour les tests d'oxydase ou d'indole et pour les galeries **BBL Crystal** doivent passer à l'autoclave avant d'être jetés ou incinérés.

STOCKAGE ET MANIPULATION/DUREE DE CONSERVATION

Dès sa réception, maintenez le kit E/NF **BBL Crystal** entre 2 – 25 °C. NE PAS CONGELER. Si le kit ou l'un de ses éléments est conservé au réfrigérateur, le sortir et le laisser à température ambiante avant de l'utiliser.

Couvercles : les couvercles sont emballés individuellement et doivent être conservés fermés. Examinez visuellement les emballages pour vous assurer qu'ils ne présentent pas de trous ni de fissures. Ne pas utiliser si l'emballage a l'air endommagé. S'ils sont stockés selon les recommandations dans leur emballage d'origine, les couvercles conserveront la réactivité attendue jusqu'à la date d'expiration.

Bases : les bases sont emballées dans des plateaux d'incubation **BBL Crystal** en deux jeux de dix. Elles sont empilées et orientées vers le bas afin de réduire au minimum la contamination atmosphérique. Conservez les bases non utilisées en plateau dans un sac en plastique. Les plateaux vides doivent être utilisés pour incuber les galeries.

Fluide d'inoculum : le fluide d'inoculum ID entérique/selles **BBL Crystal** est emballé dans deux jeux de dix tubes. Examinez les tubes pour vous assurer qu'ils ne présentent pas de fissures, de fuites, etc. Ne les utilisez pas si c'est le cas ou si le tube ou le bouchon semble endommagé ou encore s'ils présentent des signes de contamination (ç.-à-d., contenu flou ou trouble). La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du tube. Le fluide d'inoculum ID entérique/selles **BBL Crystal** peut être utilisé avec les galeries E/NF ou RS/E **BBL Crystal**.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les systèmes ID **BBL Crystal** ne sont pas destinés à être utilisés directement avec les échantillons cliniques. Utilisez des isolats d'une boîte de gélose au sang telle que la gélose au soja **Trypticase** avec 5 % de sang de mouton. L'utilisation d'une boîte de gélose MacConkey est également acceptable. L'isolat du test doit être une culture pure vieille de moins de 24 h. Seuls des tampons d'ouate montés sur un stylet doivent être utilisés pour préparer l'inoculum, car des tampons en polyester peuvent poser des problèmes d'inoculation des galeries. (Voir « Limites de la méthode ».) Une fois que les couvercles sont retirés des poches scellées, ils doivent être utilisés dans l'heure qui suit pour garantir un fonctionnement adéquat. La protection en plastique doit rester sur le couvercle jusqu'à son utilisation.

L'incubateur utilisé doit être humidifié pour éviter l'évaporation de liquide des puits pendant l'incubation. Le niveau d'humidité recommandé est de 40 – 60 %. La valeur de toute méthode de diagnostic que ce soit des systèmes ID **BBL Crystal** ou de tout autre système, effectuée sur des échantillons cliniques, dépend directement de la qualité des échantillons mêmes. Il est fortement recommandé aux laboratoires d'employer les méthodes présentées dans le manuel *Manual of Clinical Microbiology* pour le prélèvement d'échantillons, leur transport et leur mise en place dans le milieu d'isolement primaire.¹⁶

PROCEDURE DE TEST

Matériel fourni : kit entérique/NF **BBL Crystal** :

20 Couverts de galeries entériques/NF **BBL Crystal**,

20 Bases **BBL Crystal**,

20 Tubes du fluide d'inoculum ID entérique/selles **BBL Crystal**. Chaque tube contient environ 2,2 mL ± 0,1 mL de fluide d'inoculum comprenant : NaCl 8,50 g, acide 3-morpholinopropanesulfonique 0,8372 g, eau purifiée qsp 1000 mL.

2 plateaux d'incubation,

1 Bloc rapport E/NF **BBL Crystal**.

Matériel requis mais non fourni : tampons d'ouate stériles (*ne pas utiliser de tampons en polyester*) ; Incubateur (35 – 37 °C) non-CO₂ (40 – 60 % d'humidité) ; Boîte éclairante/Visualiseur de galeries **BBL Crystal** (comprend Graphiques des réactions des couleurs **BBL Crystal**) avec Livre de codes électroniques pour système ID **BBL Crystal** ou Livre de codes manuels E/NF **BBL** (voir « Matériel disponible »), ou Lecteur automatique **BBL Crystal** ; culture en boîte non sélective (p. ex., gélose **Trypticase Soja** au sang de mouton à 5 %) ; Compte-gouttes **BBL DMACA** du réactif de l'indole ; Compte-gouttes **BBL** du réactif de l'oxydase (voir « Matériel disponible »).

L'équipement et le matériel de laboratoire utilisés pour la préparation, le stockage et la manipulation des échantillons cliniques sont également nécessaires.

Procédure de test : le système ID E/NF **BBL Crystal** requiert les résultats des tests d'oxydase et d'indole. Avant de configurer la galerie E/NF **BBL Crystal**, les tests d'oxydase et d'indole doivent être effectués à partir d'une boîte d'isolation non sélective datant au plus de 24 h. Effectuez les tests d'oxydase et d'indole selon les instructions fournies dans la notice contenue à l'intérieur du conditionnement du produit pour ces réactifs.

Reportez-vous aux illustrations des graphiques relatifs aux procédures, page 38.

1. Retirez les couvercles de la poche. Jetez le dessiccatif. Une fois sortis de la poche, les couvercles protégés doivent être utilisés dans l'heure qui suit. N'utilisez pas la galerie s'il n'y a pas de dessiccatif dans la poche. Voir Fig. A.
2. Prenez un tube d'inoculum et apposez-lui une étiquette portant le numéro d'échantillon du patient. A l'aide d'une technique aseptique, saisissez l'extrémité d'un tampon d'ouate stérile (*ne pas utiliser un tampon en polyester*) ou une tige de bois ou une boucle en plastique à usage unique et choisissez une grande colonie bien isolée (diamètre de 2 à 3 mm ou plus) (ou 4 à 5 colonies plus petites de même morphologie) dans une boîte contenant du sang telle qu'une gélose **Trypticase Soja** au sang de mouton à 5 %. L'utilisation d'une boîte de gélose MacConkey est également acceptable.
3. Mettez les colonies en suspension dans un tube du fluide d'inoculum entérique/selles **BBL Crystal**.
4. Remettez le bouchon sur le tube et agitez au vortex pendant environ 10 – 15 s.
5. Prenez une base et inscrivez le numéro d'échantillon du patient sur la paroi latérale.
6. Versez tout le contenu du fluide d'inoculum dans la zone cible de la base. Voir Fig. B.
7. Tenez la base des deux mains et laissez s'écouler l'inoculum doucement le long des conduits jusqu'à remplissage de tous les puits. Faites revenir tout excès de liquide dans la zone cible et placez la base sur une paille. Voir Fig. C.
8. Alignez le couvercle de sorte que son extrémité étiquetée soit au-dessus de la zone cible de la base. Voir Fig. D.
9. Poussez jusqu'à ressentir une légère résistance. Placez le pouce sur le bord du couvercle vers le centre de la galerie de part et d'autre et poussez vers le bas simultanément jusqu'à ce que le couvercle s'insère (deux clics doivent s'entendre). Voir Fig. E.

Boîte de pureté : à l'aide d'une boucle stérile, récupérez une petite goutte du tube du fluide d'inoculum soit avant soit après l'inoculation de la base et inoculez une gélose inclinée ou une boîte de gélose (tout milieu approprié) pour vérifier la pureté. Jetez le tube et le bouchon du fluide d'inoculum dans un récipient pour déchets biologiques. Incubez la gélose inclinée ou la boîte de gélose de 18 à 24 h entre 35 – 37 °C dans un incubateur non CO₂. La boîte de pureté ou le tube de gélose inclinée peuvent également être utilisés pour tout test ou sérologie complémentaire, si nécessaire.

Incubation : placez les galeries inoculées dans des plateaux d'incubation. Un plateau peut contenir dix galeries (5 rangées de 2 galeries). Toutes les galeries doivent être incubées **orientées vers le bas** (fenêtres plus grandes vers le haut ; étiquette vers le bas) dans un incubateur non CO₂ avec 40 – 60 % d'humidité. Ne pas empiler plus de deux plateaux pendant l'incubation. La durée d'incubation pour les galeries E/NF est de 18 – 20 h entre 35 – 37 °C. Voir Fig. F.

Lecture : après la période d'incubation recommandée, retirez les galeries de l'incubateur. Toutes les galeries doivent être lues **orientées vers le bas** (fenêtres plus grandes vers le haut ; étiquette vers le bas) à l'aide de la boîte éclairante ou du visualiseur de galeries **BBL Crystal**. Voir Fig. G. Reportez-vous au graphique des réactions des couleurs et/ou au graphique dans la section « Réactifs » pour une interprétation des réactions. Utilisez le bloc rapport E/NF **BBL Crystal** pour enregistrer les réactions. Le lecteur automatique **BBL Crystal** peut être utilisé comme autre système de lecture des galeries.

Calcul du numéro profil du BBL Crystal : à chaque résultat de test donné positif est attribuée une valeur de 4, 2 ou 1, selon la rangée de positionnement du test. Une valeur égale à 0 (zéro) est attribuée à tout résultat négatif. Les nombres (valeurs) découlant de chaque réaction positive dans chaque colonne sont ensuite additionnés entre eux. Un nombre de 10 chiffres est généré ; c'est le numéro profil.

Exemple:

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

Le numéro profil qui en résulte ainsi que les résultats des tests autonomes (d'indole et d'oxydase) doivent être saisis sur un PC dans lequel le livre des codes électroniques pour système ID **BBL Crystal** a été installé, afin d'obtenir l'identification. Un livre de codes manuels est également disponible. Si vous n'avez pas accès à un PC, contactez les services techniques **BD** pour vous aider à effectuer l'identification. Si vous utilisez le lecteur automatique **BBL Crystal**, les organismes sont automatiquement identifiés par le PC.

Contrôle de qualité réalisé par l'utilisateur : Un test de contrôle de qualité est recommandé pour chaque lot de galeries. Procédez comme suit :

1. Configurez une galerie E/NF **BBL Crystal** avec *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495 selon la procédure recommandée (reportez-vous à « Procédure de test »).
2. Incubez la galerie pendant 18 à 20 h entre 35 – 37 °C.
3. Lisez la galerie à l'aide de la boîte éclairante ou du visualiseur de galeries **BBL Crystal** et du graphique des réactions des couleurs E/NF **BBL Crystal** ; enregistrez les réactions à l'aide du bloc rapport E/NF **BBL Crystal**. L'autre solution est de lire la galerie à l'aide du lecteur automatique **BBL Crystal**.
4. Comparez les réactions enregistrées avec celles listées dans le Tableau 2 (page 37). Si les résultats divergent, confirmez la pureté de la souche de contrôle de qualité avant de contacter les services techniques **BD**.

Les résultats de tests attendus des souches de tests de contrôle de qualité supplémentaires sont également listés dans le Tableau 2 (page 37).

LIMITES DE LA METHODE

Le système ID E/NF **BBL Crystal** est conçu pour les taxonomies E/NF fournies. Les taxonomies autres que celles listées dans le Tableau 1 ne sont pas destinées à être utilisées dans ce système.

Les systèmes d'identification **BBL Crystal** utilisent un microenvironnement modifié. Les valeurs attendues de leurs tests individuels peuvent, par conséquent, différer des informations préalablement établies avec des réactions de tests conventionnelles. La précision du système d'identification E/NF **BBL Crystal** repose sur l'utilisation statistique de tests spécialement conçus et d'une base de données exclusive.

Lorsque des antisérums seront disponibles, l'identification biochimique des organismes sélectionnés, tels que *Salmonella*, *Salmonella* sous-groupe 3, *Shigella*, *Escherichia coli* A-D entéropathogène et *Vibrio cholerae*, pourra se prolonger par une analyse antigénique.^{9,16}

Seuls des tampons d'ouate montés sur un stilet doivent être utilisés pour préparer la suspension d'inoculum car certains tampons en polyester peuvent rendre le fluide d'inoculum visqueux. Ceci peut entraîner un remplissage insuffisant des puits en fluide d'inoculum. Une fois que les couvercles sont retirés des poches scellées, ils doivent être utilisés dans l'heure qui suit pour garantir un fonctionnement adéquat. La protection en plastique doit rester sur le couvercle jusqu'à son utilisation.

L'incubateur dans lequel les galeries sont placées doit être humidifié pour éviter l'évaporation du fluide d'inoculum des puits pendant l'incubation. Le niveau d'humidité recommandé est de 40 à 60 %.

Après inoculation, les galeries doivent être incubées **orientées vers le bas** seulement (fenêtres plus grandes vers le haut ; étiquette vers le bas) pour maximiser l'efficacité des substrats.

Utilisez des colonies d'une boîte de gélose au sang telle que la gélose **Trypticase** Soja au sang de mouton à 5 %. L'utilisation d'une boîte de gélose MacConkey est également acceptable.

Les systèmes d'identification **BBL Crystal** ne sont PAS destinés à être utilisés directement avec des échantillons cliniques.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Reproductibilité : lors d'une étude externe impliquant trois (3) laboratoires cliniques, la reproductibilité des (30) réactions des substrats E/NF a été étudiée à l'aide d'un test en parallèle. La reproductibilité des réactions des substrats individuels était comprise entre 96,3 – 100 %. La reproductibilité globale de la galerie E/NF **BBL Crystal** a été évaluée à 99,6 %.

Précision de l'identification : la performance du système ID E/NF **BBL Crystal** a été comparée à des systèmes actuellement disponibles dans le commerce à l'aide d'isolats cliniques et de cultures mères.

Une étude interne a évalué la performance du système E/NF **BBL Crystal**. Les résultats provenant de 169 isolats entériques et non entériques (représentant 45 espèces) testés ont été analysés. Les identifications divergentes ont été rétablies en utilisant d'autres systèmes disponibles dans le commerce. Ces résultats sont donnés ci-dessous :

N =169	ID sans test supplémentaire	ID avec test supplémentaire	Pas d'ID ou mal identifiée
E/NF BBL Crystal	163 (96,4%)	167 (98,8%)	2 (1,2%)

La performance du test ID entérique/non fermentaire **BBL Crystal** a été évaluée dans trois laboratoires cliniques indépendants.¹³ Les isolats de routine arrivant au laboratoire clinique ainsi que les isolats préalablement identifiés provenant du choix des sites de l'essai clinique ont été utilisés pour établir les caractéristiques de performance.

Sur les 299 isolats cliniques frais testés par les méthodes d'identification actuelles des laboratoires, le système ID **BBL Crystal** a fait état d'une valeur honorable de 96,7 % (289) incluant 16 cas où deux ou trois organismes ont été rapportés et pour lesquels un test supplémentaire a été effectué.

Sur les 291 souches provocatrices préalablement identifiées confirmées par les méthodes d'identification actuelles des laboratoires, le système ID **BBL Crystal** a fait état d'une valeur honorable de 96,9 % (282) incluant 8 cas où deux ou trois organismes ont été rapportés et pour lesquels un test supplémentaire a été effectué.¹³

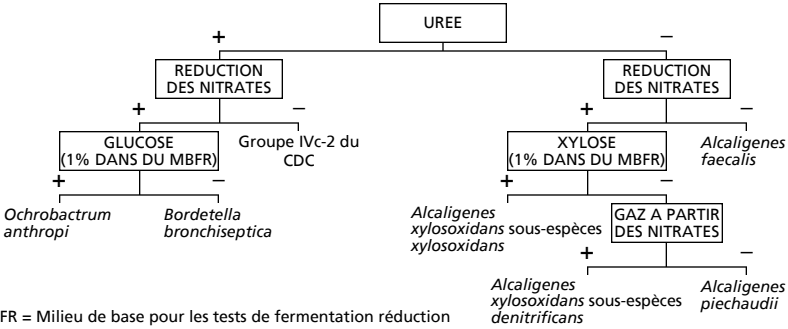
MATERIEL DISPONIBLE

N° Cat.	Description	N° Cat.	Description
245000	Kit ID entérique/non fermentaire BBL Crystal , contenant 20 éléments de chaque : couvercles de galeries entériques/NF BBL Crystal , bases BBL Crystal , tubes du fluide d'inoculum ID entérique/selles BBL Crystal .	245002	Livre de codes manuels entériques/non fermentaires des systèmes d'identification BBL Crystal .
245031	Visualiseur de galeries BBL Crystal , modèle nord-américain, 110 V, 60 Hz.	245029	Inoculum entérique/selles ID BBL Crystal Fluide, contenance de 10.
245032	Visualiseur de galeries BBL Crystal , modèle européen, 220 V, 50 Hz.	245300	Lecteur automatique BBL Crystal .
245033	Visualiseur de galeries BBL Crystal , modèle japonais, 100 V, 50/60 Hz.	221239	Gélose soja Trypticase au sang de mouton à 5 %, lot de 20 boîtes.
245034	Tube UV à ondes longues du visualiseur de galeries BBL Crystal .	221261	Gélose soja Trypticase au sang de mouton à 5 %, lot de 100 boîtes.
245036	Tube de lumière blanche du visualiseur de galeries BBL Crystal .	261187	Compte-gouttes BBL DMACA du réactif de l'indole, 50.
		261181	Compte-gouttes BBL du réactif de l'oxydase, 50.

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

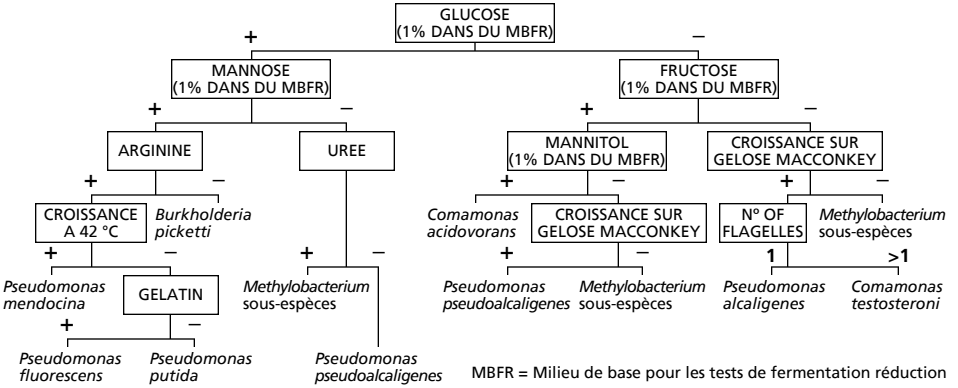
Bacilles Gram-négatifs divers

Diagramme N° 1 (Mobiles, Flagelles péritriches)



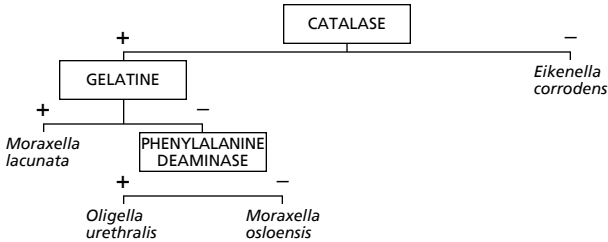
Bacilles Gram-négatifs divers

Diagramme N° 2 (Mobiles, Flagelles Polaires)



Bacilles Gram-négatifs divers

Diagramme N° 3 (Non-Mobiles)



Bibliographie: 1. Gilardi, G.L., *Identification of Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Rods*, 1/90
 2. *Manual of Clinical Microbiology*, 5th Edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991


BD BBL Crystal

Identifizierungssysteme

Testsystem zur Identifizierung von Enterobacteriaceae und anderen gramnegativen Stäbchen

VERWENDUNGSZWECK

Das **BBL Crystal**-System zur Identifizierung (ID) von *Enterobacteriaceae* und anderen gramnegativen Stäbchen (E/NF) dient zur Identifizierung klinisch wichtiger, aerober gramnegativer Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* sowie einiger der häufiger vom Menschen isolierten gramnegativen Bakterien, die Glukose sowohl fermentieren als auch nicht fermentieren.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Das **BBL Crystal** E/NF-ID-System ist eine miniaturisierte Identifizierungsmethode. Viele der derzeit verwendeten Tests sind Modifikationen der klassischen Methoden. Dazu gehören Tests auf Fermentation, Oxidation, Abbau und Hydrolyse verschiedener Substrate. Es gibt außerdem chromogen gebundene Substrate zum Nachweis von Enzymen, die von Mikroorganismen zur Metabolisierung verschiedener Substrate verwendet werden.¹⁻⁵

Der **BBL Crystal** E/NF-ID-Kit besteht aus (i) Deckeln für die **BBL Crystal** E/NF-Panels, (ii) **BBL Crystal** Untersätzen und (iii) Röhrchen mit **BBL Crystal** Entero/Stuhl ID-Inokulumflüssigkeit (IF). Der Deckel enthält 30 dehydrierte Substrate auf den Spitzen von Plastikzapfen. Der Untersatz besitzt 30 Reaktionsvertiefungen. Das Test-Inokulum wird mit der Inokulumflüssigkeit 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 einer Inkubationszeit werden die Vertiefungen auf Farbumschlag untersucht. Farbumschläge entstehen durch metabolische Aktivität der Mikroorganismen. Das sich ergebende Muster der 30 Reaktionen wird in eine zehnziffrige Profilnummer umgewandelt, die als Basis für die Identifizierung dient.⁶ Biochemische und enzymatische Reaktionsmuster für die 30 **BBL Crystal** E/NF-ID-Substrate für eine Vielzahl von Mikroorganismen sind in der **BBL Crystal** E/NF-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 (Seite 36).

VERFAHRENSPRINZIP

Die im **BBL Crystal** E/NF-ID-System verwendeten Tests basieren auf der mikrobiellen Nutzung und dem mikrobiellen Abbau spezifischer Substrate, welche von verschiedenen Indikatorsystemen nachgewiesen werden. Gärungsreaktionen weisen die Fähigkeit eines Isolats nach, unter Ausschluß von Luftsauerstoff Kohlenhydrate zu metabolisieren, und Oxydationsreaktionen basieren auf der Fähigkeit eines Organismus, das Substrat mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor zu metabolisieren. Beide Reaktionen werden in der Regel durch die Verwendung eines pH-Indikators im Testsubstrat nachgewiesen. 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 **BBL Crystal**-ID-Systemen. Eine Beschreibung der von verschiedenen Substraten erzeugten Reaktionen und eine kurze Beschreibung der im System angewandten Prinzipien sind im Abschnitt "Reagenzien" aufgeführt.

REAGENZIEN

Das **BBL Crystal** E/NF-ID-Panel enthält 30 enzymatische und biochemische Substrate, die nachfolgend aufgeführt sind. "Panel-Position" gibt die Reihe und Spalte der Vertiefungen an (Beispiel: 1J bezieht sich auf Reihe 1, Spalte J).

Im **BBL Crystal** E/NF-ID-System verwendete Reagenzien und Testprinzipien

Panel-Position	Wirkstoff	Code	Ungef. Menge (g/10 mL)	Pos.	Nég.	Prinzip (Literaturnachweis)
4A	Arabinose	ARA	3,5	Gold/Gelb	Orange/Rot	Verwertung von Kohlenhydraten führt zu pH-Abfall und Indikatorumschlag (Phenolrot). ⁷⁻¹⁰
4B	Mannose	MNS	3,0	Gold/Gelb	Orange/Rot	
4C	Saccharose	SUC	2,8	Gold/Gelb	Orange/Rot	
4D	Melibiose	MEL	1,0	Gold/Gelb	Orange/Rot	
4E	Rhamnose	RHA	3,0	Gold/Gelb	Orange/Rot	
4F	Sorbit	SOR	3,5	Gold/Gelb	Orange/Rot	
4G	Mannitol	MNT	1,8	Gold/Gelb	Orange/Rot	
4H	Adonit	ADO	2,5	Gold/Gelb	Orange/Rot	
4I	Galaktose	GAL	1,5	Gold/Gelb	Orange/Rot	
4J	Inosit	INO	1,3	Gold/Gelb	Orange/Rot	
2A	P-n-p-Phosphat	PHO	0,025	Gelb	Farblos	Enzymatische Hydrolyse von farblosem aryl-substituierten Glykosid oder Phosphatester setzt gelbes p-Nitrophenol frei. ¹⁻⁵
2B	P-n-p- α - β -Glukosid	BGL	0,025	Gelb	Farblos	
2C	P-n-p- β -Galaktosid	NPG	0,06	Gelb	Farblos	
2D	Prolinnitroanilid	PRO	0,07	Gelb	Farblos	Enzymatische Hydrolyse des farblosen Amidsubstrats setzt gelbes p-Nitroanilin frei. ¹⁻⁵

Im BBL Crystal E/NF-ID-System verwendete Reagenzien und Testprinzipien (Fortsetzung)

Panel-Position	Wirkstoff	Code	Ungef. Menge (g/10 mL)	Pos.	Nég.	Prinzip (Literaturnachweis)
2E	P-n-p Biphosphat	BPH	0,02	Gelb	Farblos	
2F	P-n-p-Xylosid	BXY	0,03	Gelb	Farblos	
2G	P-n-p- α -Arabinosid	AAR	0,03	Gelb	Farblos	Enzymatische Hydrolyse von farblosem aryl-substituierten Glykosid oder Phosphatester setzt gelbes p-Nitrophenol frei. ¹⁻⁵
2H	P-n-p-Phosphorylcholin	PHC	0,03	Gelb	Farblos	
2I	P-n-p- β -Glukuronid	GLR	0,02	Gelb	Farblos	
2J	P-n-p-N-Acetylglucosaminid	NAG	0,04	Gelb	Farblos	
1A	γ -L-Glutamyl p-Nitroanilid	GGL	0,03	Gelb	Farblos	Enzymatische Hydrolyse des farblosen Amidsubstrats setzt gelbes p-Nitroanilin frei. ^{1,5}
1B	Äsculin	ESC	0,14	Braun/ Kastanienbraun	Farblos/ Strohfarben	Hydrolyse von Äsculin erzeugt ein schwarzes Präzipitat in Gegenwart von Eisen(III)-Ionen. ¹¹
1C	p-Nitro-DL-Phenylalanin	PHE	0,1	Gold/ Dunkel Orange	Gelb	Oxidative Desaminierung von Phenylalanin erzeugt eine braune Farbe in Gegenwart von Eisen(III)-Ionen. ^{7,11}
1D	Harnstoff	URE	0,2	Blaugrün/Blau	Gelb/Grün	Hydrolyse von Harnstoff und das resultierende Ammonium lösen den Farbumschlag des pH-Indikators (Bromthymolblau) aus. ^{7,11,12}
1E	Glyzin	GLY	0,7	Blaugrün/Blau	Gelb/Grün	Durch Abbau von Glyzin entstehen alkalische Stoffwechselprodukte, die den Farbumschlag des pH-Indikators (Bromthymolblau) auslösen. ¹³
1F	Citrat	CIT	0,8	Hellblau/Blau	Gelb/Grün	Durch Verwertung von Citrat entstehen alkalische Stoffwechselprodukte, die den Farbumschlag des pH-Indikators (Bromthymolblau) auslösen. ^{7,14}
1G	Malonsäure	MLO	1,5	Hellblau/Blau	Gelb/Grün	Durch Verwertung von Malonat entstehen alkalische Stoffwechselprodukte, die den Farbumschlag des pH-Indikators (Bromthymolblau) auslösen. ¹¹
1H	Triphenyltetrazoliumchlorid	TTC	0,15	Rosa/Rot*	Farblos	Reduktion der Tetrazoliumverbindung führt zur Bildung von rotem Formazan. ¹³
1I	Arginin	ARG	1,5	Rot/Violett	Gelb/Braun	Anaerober Katabolismus führt zu pH-Anstieg und Farbumschlag des Indikators (Bromkresolviolett). ^{7,15}
1J	Lysin	LYS	0,5	Rot/Violett	Gelb/Braun	

*Präzipitat ist nicht unbedingt sichtbar.

Sicherheitshinweise: Zur *In-Vitro*-Diagnostik.

Nach der Verwendung und vor der Entsorgung sollten alle infektiösen Materialien einschließlich Platten, Baumwolltupfer, Inokulationsröhrchen, Filterpapier aus dem Oxidase- oder Indoltest, sowie die **BBL Crystal** Panels autoklaviert oder direkt verbrannt werden.

AUFBEWAHRUNG UND HANDHABUNG/HALTBARKEIT

BBL Crystal E/NF-Kit nach Erhalt bei 2 – 25 °C aufbewahren. NICHT EINFRIEREN. Falls der Kit oder seine Bestandteile in Kühlschrank aufbewahrt werden, sollten sie vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt werden.

Deckel: Die Deckel sind individuell verpackt und müssen ungeöffnet aufbewahrt werden. Die Packung visuell auf Löcher oder Risse der Folienverpackung überprüfen. Nicht verwenden, falls die Verpackung beschädigt erscheint. In der Originalverpackung gemäß den Empfehlungen aufbewahrte Deckel bleiben bis zum Verfallsdatum reaktiv.

Untersätze: Die Untersätze sind in zwei Sätzen zu je zehn in **BBL Crystal** Inkubationsschalen verpackt. Die Untersätze sind mit dem Boden nach oben gestapelt, um Luftkontamination zu minimieren. Die nicht verwendeten, sich in der Schale befindenden Untersätze in der Plastikhülle aufbewahren. Leere Schalen sind zum Inkubieren der Panels zu verwenden.

Inokulumflüssigkeit: Die **BBL Crystal Entero/Stuhl ID**-Inokulumflüssigkeit (IF) ist in zwei Sätzen zu je zehn Röhrchen verpackt. Die Röhrchen einer Sichtprüfung auf Risse, undichte Stellen, usw. unterziehen. Falls undichte Stellen vorhanden sind, das Röhrchen oder die Kappe beschädigt sind oder sichtbare Anzeichen von Kontamination (d. h. Schleier, Trübung) vorliegen, dürfen die Röhrchen nicht verwendet werden. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des Röhrchens angegeben. Die **BBL Crystal Entero/Stuhl ID**-Inokulumflüssigkeit kann sowohl mit den **BBL Crystal E/NF** als auch den **RS/E** Panels verwendet werden.

PROBENENTNAHME UND VERARBEITUNG

BBL Crystal ID-Systeme sind nicht zur direkten Verwendung mit klinischen Proben geeignet. Isolate müssen auf Blutagarplatten wie z. B. **Trypticase Soja-Agar** mit 5 % Schafblut gewachsen sein. Eine **MacConkey-Agarplatte** kann ebenfalls verwendet werden. Das Testisolat muß eine höchstens 24 h alte Reinkultur sein. Zur Vorbereitung des Inokulums sollten ausschließlich Tupfer mit Baumwollspitze verwendet werden, da einige Polyester tupfer bei der Inokulation 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. Die Kunststoffhülle erst unmittelbar vor Gebrauch vom Deckel entfernen.

Der verwendete Inkubator sollte feuchte Luft enthalten, um die Verdunstung von Flüssigkeit aus den Vertiefungen während der Inkubation zu vermeiden. Die empfohlene Luftfeuchtigkeit beträgt 40 – 60 %. Die Zweckdienlichkeit der **BBL Crystal** ID-Systeme oder jedes anderen diagnostischen Verfahrens, das mit klinischen Proben durchgeführt 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 auf primären Isolierungsmedien anzuwenden.¹⁶

TESTVERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: BBL Crystal E/NF-Kit:

20 **BBL Crystal** Entero/NF Panel-Deckel,

20 **BBL Crystal** Untersätze,

20 Röhrcchen mit **BBL Crystal** Entero/Stuhl ID-Inokulumflüssigkeit. Jedes Röhrcchen enthält etwa $2,2 \pm 0,1$ mL Inokulumflüssigkeit folgender Zusammensetzung: NaCl 8,50 g, 3-Morpholinopropan sulfonsäure 0,8372 g, destilliertes Wasser auf 1000 mL.

2 Inkubationsschalen,

1 **BBL Crystal** E/NF Berichtsbogen.

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial: Sterile Baumwolltupfer (*keine Polyester tupfer verwenden*); Inkubator (35 – 37 °C) CO₂-frei (40 – 60 % Luftfeuchtigkeit); **BBL Crystal** Leuchtkasten/Panel-Betrachter (einschließlich der **BBL Crystal** Farbreaktionstabelle) mit dem Elektronischen Codebuch für das **BBL Crystal** ID-System oder dem Manuellen Codebuch für das **BBL E/NF** ID-System (s. "Lieferbare Produkte"), oder dem **BBL Crystal** AutoReader; nicht-selektive Kulturplatte (z. B. **Trypticase** Soja-Agar mit 5 % Schafblut); Tropfpipetten für das **BBL DMACA** Indolreagenz; Tropfpipetten für das **BBL Oxidasereagenz** (s. "Lieferbare Produkte").

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

Testverfahren: Für das **BBL Crystal** E/NF ID-System werden die Ergebnisse von Oxidase- und Indoltests benötigt. Vor dem Aufstellen des **BBL Crystal** E/NF-Panels sollten Oxidase- und Indoltests mit Material von einer höchstens 24 h alten, nicht-selektiven Isolierungsplatte durchgeführt werden. Oxidase- und Indoltests gemäß den Anleitungen in der Packungsbeilage der Reagenzien durchführen.

Siehe Abbildungen auf der Verfahrenskarte (Seite 38).

1. Deckel aus der Hülle nehmen. Trockenmittel verwerfen. Deckel sollten innerhalb einer Stunde nach Entnahme aus der Hülle verwendet werden. Deckel nicht verwenden, wenn sich kein Trockenmittel im Beutel befindet. Siehe Abb. A.
2. Ein Röhrcchen mit Inokulumflüssigkeit mit der Nummer der Patientenprobe beschriften. Unter Anwendung aseptischer Arbeitsweise eine gut isolierte große (2 – 3 mm Durchmesser oder größer) Kolonie (oder 4 – 5 kleinere Kolonien derselben Morphologie) mit der Spitze eines sterilen Baumwolltupfers (*keine Polyester tupfer verwenden*) oder einem hölzernem Applikatorstäbchen oder einer Einweg-Impföse aus Kunststoff von einer Blutagarplatte, wie z. B. **Trypticase** Soja-Agar mit 5 % Schafblut, entnehmen. Eine MacConkey-Agarplatte kann ebenfalls verwendet werden.
3. Kolonien in einem Röhrcchen mit **BBL Crystal** Entero/Stuhl-Inokulumflüssigkeit suspendieren.
4. Röhrcchen wieder verschließen und etwa 10 – 15 s. im dem Vortex-Mixer mischen.
5. Einen Untersatz nehmen und die Nummer der Patientenprobe auf die Seitenwand schreiben.
6. Den ganzen Inhalt des Inokulumflüssigkeit-Röhrcchens in das dafür vorgesehene Reservoir des Untersatzes füllen. Siehe Abb. B.
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. Siehe Abb. C.
8. Den Deckel so ausrichten, daß sich die Etikettenseite des Deckels über dem Reservoir des Untersatzes befindet. Siehe Abb. D.
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). Siehe Abb. E.

Reinkultur: Zur Durchführung einer Reinheitsprüfung entweder vor oder nach Beimpfen des Untersatzes mit einer sterilen Öse einen kleinen Tropfen von Inokulumflüssigkeit-Röhrcchen entnehmen und damit einen Schrägagar oder eine Agarplatte (jegliches geeignete Medium) beimpfen. Das Inokulumflüssigkeit-Röhrcchens einschließlich der Kappe in einem Behälter für biologisch gefährlichen Abfall entsorgen. Den Schrägagar oder die Agarplatte 18 – 24 h lang bei 35 – 37 °C in einem CO₂-freien Inkubator inkubieren. 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 die E/NF Panels beträgt **18 – 20 h** bei 35 – 37 °C. Siehe Abb. F.

Ablesen: Nach der empfohlenen Inkubationszeit die Panels aus dem Inkubator nehmen. Alle Panels sollten **umgekehrt** (größere Fenster nach oben, Etiketten nach unten) mit Hilfe des **BBL Crystal**-Leuchtkasten oder dem Panel-Betrachter abgelesen werden. Siehe Abb. G. Zur Interpretation der Reaktionen die Farbreaktionstabelle oder die Tabelle im Abschnitt "Reagenzien" heranziehen. Die Reaktionen auf dem **BBL Crystal** E/NF-Berichtsbogen eintragen. Zum Ablesen der Panels kann auch der **BBL Crystal** AutoReader verwendet werden.

Errechnen der BBL Crystal Profilnummer: Jedem positiven Testergebnis wird entsprechend der Reihe, in der sich der Test befindet, ein Wert von 4, 2 oder 1 zugeordnet. Jedes negative Ergebnis erhält einen Wert von 0 (Null). Die Zahlen (Werte) von jedem positiven Ergebnis in jeder Reihe werden dann addiert. Daraus ergibt sich eine 10-stellige Zahl; dies ist die Profilnummer.

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

Um eine Identifizierung zu erhalten, müssen die entstandene Profilnummer und externe Testergebnisse (Indol- und Oxidase), in einen Computer eingegeben werden, in dem das Elektronische Codebuch für das **BBL Crystal ID**-System installiert wurde. Ein Manuelles Codebuch ist ebenfalls erhältlich. Falls kein Computer zur Verfügung steht, leistet der Technische Dienst von **BD** Hilfestellung bei der Identifizierung. Bei Verwendung des **BBL Crystal** AutoReaders identifiziert der Computer die Organismen automatisch.

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

1. Gemäß empfohlenem Verfahren (s. "Testverfahren") ein **BBL Crystal E/NF**-Panel mit *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495 beschicken.
2. Inkubieren das Panel 18 – 20 h bei 35 – 37 °C.
3. Panel mit Hilfe des **BBL Crystal** Leuchtkastens oder dem Panel-Betrachter und der **BBL Crystal E/NF**-Farbreaktionstabelle ablesen; Reaktionen im **BBL Crystal E/NF**-Berichtsbogen eintragen. Das Panel kann auch mit Hilfe des **BBL Crystal** AutoReader abgelesen werden.
4. Die aufgezeichneten Reaktionen mit den Reaktionen in Tabelle 2 (Seite 37) vergleichen. Falls abweichende Ergebnisse erzielt wurden, vor Kontaktaufnahme mit dem Technischen Dienst von **BD** die Reinheit des Qualitätskontrollstamms bestätigen.

Erwartete Testergebnisse für zusätzliche Qualitätskontroll-Teststämme sind ebenfalls in Tabelle 2 (Seite 37) aufgeführt.

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Das **BBL Crystal E/NF-ID**-System ist für die mitgelieferten E/NF-Taxa vorgesehen. In diesem System sollten keine anderen als die in Tabelle 1 aufgeführten Taxa verwendet werden.

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

Falls Antiseren zur Verfügung stehen, sollte die biochemische Identifizierung ausgewählter Organismen, wie z. B. *Salmonella*, *Salmonella* Untergruppe 3, *Shigella*, enteropathogene *Escherichia coli* A-D und *Vibrio cholerae*, durch Antigenanalyse ergänzt werden.^{9,16}

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. Die Kunststoffhülle erst unmittelbar vor Gebrauch vom Deckel entfernen.

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 müssen auf Blutagarplatten wie z. B. **Trypticase** Soja-Agar mit 5 % Schafblut gewachsen sein. Eine MacConkey-Agarplatte kann ebenfalls verwendet werden.

BBL Crystal ID-Systeme sind NICHT zur direkten Verwendung mit klinischen Proben geeignet.

LEISTUNGSMERKMALE

Reproduzierbarkeit: In einer externen Studie an drei (3) klinischen Labors wurde die Reproduzierbarkeit der Reaktionen der E/NF-Substrate (30) in Wiederholungstests untersucht. Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Substratreaktionen betrug zwischen 96,3 – 100 %. Insgesamt lag die Reproduzierbarkeit des **BBL Crystal E/NF**-Panel bei 99,6 %.

Genauigkeit der Identifizierung: Die Leistung des **BBL Crystal E/NF-ID**-Systems wurde anhand von klinischen Isolaten und Stammkulturen mit derzeit im Handel erhältlichen Systemen verglichen.

Die Leistung des **BBL Crystal E/NF-ID-Systems** wurde in einer internen Studie beurteilt. Ergebnisse von 169 enterischen und nicht-enterischen Isolaten (repräsentativ für 45 Spezies) wurden analysiert. Abweichende Identifizierungen wurden durch die Verwendung anderer kommerzieller Systeme gelöst. Diese Ergebnisse sind nachstehend aufgeführt:

N =169	ID ohne zusätzliche Tests	ID mit zusätzlichen Tests	KEINE ID oder falsch identifiziert
BBL Crystal E/NF	163 (96,4%)	167 (98,8%)	2 (1,2%)

Die Leistung des **BBL Crystal** Testsystems zur Identifizierung von Enterobacteriaceae und anderen gramnegativen Stäbchen wurde in drei unabhängigen Laboratorien beurteilt.¹³ Zur Erstellung der Leistungsmerkmale wurden sowohl frische, im klinischen Labor routinemäßig ankommende Isolate als auch zuvor identifizierte, von dem Testlabor ausgewählte Isolate verwendet.

Von den 299 frischen klinischen Isolaten, die mit den gegenwärtigen Identifizierungsmethoden der Laboratorien getestet wurden, lieferte das **BBL Crystal ID-System** 96,7 % (289) richtige Ergebnisse einschließlich 16 Fällen, in denen zwei oder drei Organismen nachgewiesen wurden und zusätzliche Tests zur Klärung erforderlich waren.

Von den 291 zuvor identifizierten Referenzstämmen, die mit den gegenwärtigen Identifizierungsmethoden der Laboratorien bestätigt wurden, lieferte das **BBL Crystal ID-System** 96,9 % (282) richtige Ergebnisse einschließlich 8 Fällen, in denen zwei oder drei Organismen nachgewiesen wurden und zusätzliche Tests zur Klärung erforderlich waren.¹³

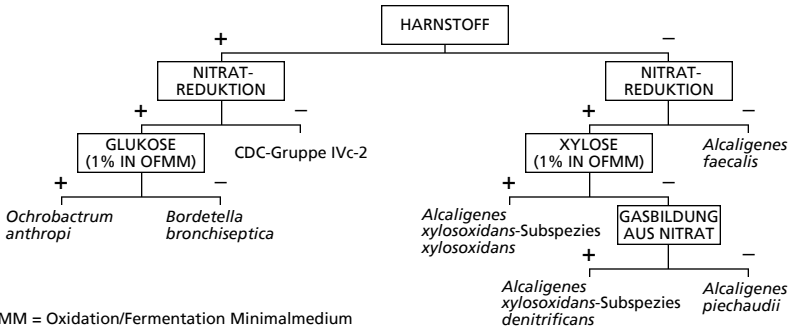
LIEFERBARE PRODUKTE

Best.-Nr.	Beschreibung	Best.-Nr.	Beschreibung
245000	BBL CRYSTAL Testsystems zur Identifizierung von Enterobacteriaceae und anderen gramnegativen Stäbchen, mit je 20: Deckeln für BBL Crystal E/NF-Panel , BBL Crystal Untersätzen, Röhrchen mit BBL Crystal Entero/Stuhl ID-Inokulumflüssigkeit.	245002	Manuelles Codebuch für das BBL Crystal E/NF-ID-System .
245031	BBL Crystal Panel-Betrachter, USA-Modell, 110 V, 60 Hz.	245029	BBL Crystal Entero/Stuhl ID-Inokulumflüssigkeit, 10er-Karton.
245032	BBL Crystal Panel-Betrachter, Europäisches Modell, 220 V, 50 Hz.	245300	BBL Crystal AutoReader.
245033	BBL Crystal Panel-Betrachter, Japanisches Modell, 100 V, 50/60 Hz.	221239	Trypticase Soja-Agar mit 5 % Schafblut, Packung mit 20 Platten.
245034	Langwellen-UV-Lichtrohre für den BBL Crystal Panel-Betrachter.	221261	Trypticase Soja-Agar mit 5 % Schafblut, Karton mit 100 Platten.
245036	Weißlicht-Lichtrohre für den BBL Crystal Panel-Betrachter.	261187	Tropfpipetten für das BBL DMACA Indol-Reagenz, 50 Stück.
		261181	Tropfpipetten für das BBL Oxidase -Reagenz, 50 Stück.

LITERATUR: S. "References" im englischen Text.

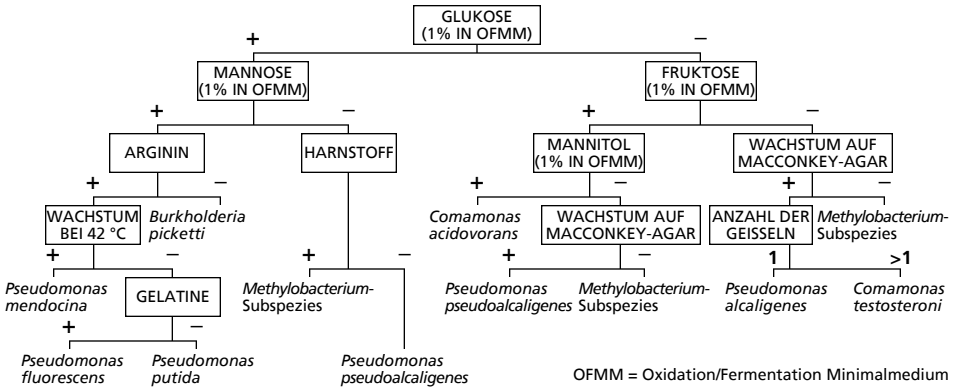
Verschiedene Gramnegative Bakterien

Darstellung Nr. 1 (Beweglich, Peritrich begeißelt)



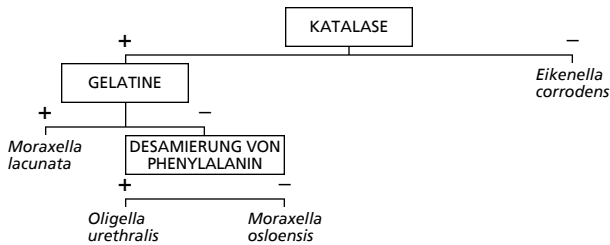
Verschiedene Gramnegative Bakterien

Darstellung Nr. 2 (Beweglich, Polar begeißelt)



Verschiedene Gramnegative Bakterien

Darstellung Nr. 3 (Unbeweglich)



Literaturnachweis: 1. Gilardi, G.L., *Identification of Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Rods*, 1/90
 2. *Manual of Clinical Microbiology*, 5th Edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991

BD Sistemi d'identificazione BBL Crystal Kit per l'identificazione di patogeni enterobatteri/non fermentanti

Italiano

USO PREVISTO

Il sistema **BBL Crystal** di identificazione (ID) enterico/non fermentante (E/NF) trova impiego per l'identificazione di batteri aerobi gram-negativi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* e di alcuni bacilli gram-negativi, più frequentemente isolati, fermentanti e non fermentanti del glucosio.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il sistema **BBL Crystal E/NF ID** è un metodo di identificazione miniaturizzato. Molti dei test utilizzati sono adattamenti di test convenzionali e includono test di fermentazione, ossidazione, degradazione e idrolisi di vari substrati. Sono inoltre presenti substrati cromogeni per la rilevazione degli enzimi utilizzati dai microbi nella metabolizzazione di vari substrati.¹⁻⁵

Il kit **BBL Crystal E/NF ID** è composto da (i) coperchi per pannello **BBL Crystal E/NF**, (ii) basi **BBL Crystal** e (iii) provette di inoculo ID enterico/feci **BBL Crystal**. Il coperchio contiene 30 substrati disidratati su puntali di asticelle in plastica. La base contiene 30 pozzetti di reazione. L'inoculo del test viene preparato con il fluido per inoculazione e utilizzato per riempire tutti e 30 i pozzetti della base. Quando il coperchio è allineato sulla base e fissato in posizione, l'inoculo del test reidrata i substrati anidri ed inizia le reazioni dei test.

Dopo un periodo di incubazione, i pozzetti vengono esaminati per individuarne le variazioni cromatiche indotte dalle attività metaboliche dei microrganismi. Il pattern delle 30 reazioni viene convertito in un profilo numerico a dieci cifre che verrà utilizzato come base per l'identificazione.⁶ I pattern delle reazioni biochimiche ed enzimatiche per i 30 substrati **BBL Crystal E/NF ID**, assieme ad un'ampia varietà di microrganismi, vengono memorizzati nel database **BBL Crystal E/NF ID**. L'identificazione è conseguente ad un'analisi comparativa tra il pattern di reazione dell'isolato del test e quelli memorizzati nel database. Un elenco completo delle unità tassonomiche che include il database E/NF attuale viene fornito nella tabella 1 (pagina 36).

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

I test usati nel sistema **BBL Crystal E/NF ID** si basano sull'impiego e sulla degradazione microbica di specifici substrati rilevati da vari indicatori. Le reazioni di fermentazione rilevano la capacità di un isolato di metabolizzare i carboidrati in assenza di ossigeno atmosferico, mentre le reazioni di ossidazione si basano sulla capacità di un organismo di metabolizzare il substrato utilizzando l'ossigeno come accettore terminale di elettroni. Entrambe le reazioni sono generalmente rilevate per mezzo di un indicatore di pH nel substrato del test. I substrati cromogeni sottoposti ad idrolisi danno origine a variazioni cromatiche apprezzabili visivamente. Inoltre, il sistema **BBL Crystal ID** include altri test che rilevano la capacità di un organismo di idrolizzare, degradare, ridurre o utilizzare in altro modo un substrato. La sezione "Reagenti" comprende sia la descrizione delle reazioni utilizzate dai vari substrati che una breve spiegazione dei principi impiegati nel sistema.

REAGENTI

Il pannello **BBL Crystal E/NF ID** contiene 30 substrati enzimatici e biochimici come descritto qui di seguito. La posizione del pannello indica la fila e la colonna di ubicazione del pozzetto (esempio: 1J sta a indicare la fila 1 nella colonna J).

Reagenti e principi di test usati nel sistema **BBL Crystal E/NF ID**

Posizione del pannello	Principio attivo	Codice	Quantità approx. (g/10 mL)	Pos.	Neg.	Principio (Riferimento)
4A	Arabinosio	ARA	3,5	Giallo/oro	Rosso/arancione	
4B	Mannosio	MNS	3,0	Giallo/oro	Rosso/arancione	
4C	Saccarosio	SUC	2,8	Giallo/oro	Rosso/arancione	
4D	Melibiosio	MEL	1,0	Giallo/oro	Rosso/arancione	
4E	Ramnosio	RHA	3,0	Giallo/oro	Rosso/arancione	
4F	Sorbitolo	SOR	3,5	Giallo/oro	Rosso/arancione	
4G	Mannitolo	MNT	1,8	Giallo/oro	Rosso/arancione	
4H	Adonitolo	ADO	2,5	Giallo/oro	Rosso/arancione	
4I	Galattosio	GAL	1,5	Giallo/oro	Rosso/arancione	
4J	Inositolo	INO	1,3	Giallo/oro	Rosso/arancione	
2A	p-n-p-fosfato	PHO	0,025	Giallo	Incolore	
2B	p-n-p a-β-glucoside	BGL	0,025	Giallo	Incolore	L'idrolisi enzimatica del glicoside aril sostituito incolore o dell'estere fosfato libera p-nitrofenolo di colore giallo. ⁷⁻¹⁰
2C	p-n-p-β-galattoside	NPG	0,06	Giallo	Incolore	
2D	Prolina nitroanilide	PRO	0,07	Giallo	Incolore	L'idrolisi enzimatica del substrato di amide incolore libera p-nitroanilina di colore giallo. ¹⁻⁵

Reagenti e principi di test usati nel sistema BBL Crystal E/NF ID (continua)

Posizione del pannello	Principio attivo	Codice	Quantità appross. (g/10 mL)	Pos.	Neg.	Principio (Riferimento)
2E	p-n-p bis-fosfato	BPH	0,02	Giallo	Incolore	
2F	p-n-p-xiloside	BXY	0,03	Giallo	Incolore	
2G	p-n-p-a-arabinoside	AAR	0,03	Giallo	Incolore	
2H	p-n-p-fosforilcolina	PHC	0,03	Giallo	Incolore	
2I	p-n-p-β-glucuronide	GLR	0,02	Giallo	Incolore	L'idrolisi enzimatica del glicoside aril sostituito incolore o dell'estere fosfato libera p-nitrofenolo di colore giallo. ¹⁻⁵
2J	p-n-p-N-acetil glucosamminide	NAG	0,04	Giallo	Incolore	
1A	γ-L-glutamminil p-nitroanilide	GGL	0,03	Giallo	Incolore	L'idrolisi enzimatica del substrato di amide incolore libera p-nitroanilina di colore giallo. ¹⁻⁵
1B	Esculina	ESC	0,14	Marrone/ marrone rossiccio	Chiaro/ paglierino	L'idrolisi dell'esculina dà come risultato un precipitato nero in presenza di ione ferrico. ¹¹
1C	p-nitro-DL-fenilalanina	PHE	0,1	Oro/ scuro Arancione	Giallo	La deaminazione ossidativa della fenilalanina sviluppa un colore marrone in presenza di ione ferrico. ^{7,11}
1D	Urea	URE	0,2	Blu/acqua	Verde/giallo	L'idrolisi dell'urea e l'ammoniaca che ne risulta modificano il colore dell'indicatore di pH (blu di bromotimolo). ^{7,11,12}
1E	Glicina	GLY	0,7	Blu/acqua	Verde/giallo	La degradazione della glicina dà origine a metaboliti alcalini che modificano il colore dell'indicatore di pH (blu di bromotimolo). ¹³
1F	Citrato	CIT	0,8	Blu/acqua	Verde/giallo	L'utilizzo del citrato dà origine a metaboliti alcalini che modificano il colore dell'indicatore di pH (blu di bromotimolo). ^{7,14}
1G	Acido malonico	MLO	1,5	Blu/acqua	Verde/giallo	L'utilizzo del malonato dà origine a metaboliti alcalini che modificano il colore dell'indicatore di pH (blu di bromotimolo). ¹¹
1H	Trifenil tetrazolio idrocloruro	TTC	0,15	Rosso/rosa*	Chiaro	La riduzione del composto tetrazolio dà origine alla formazione di formazan rosso. ¹³
1I	Arginina	ARG	1,5	Rosso/violetto	Marrone/giallo	Il catabolismo anaerobico dà origine ad un innalzamento di pH e modifica il colore dell'indicatore (violetto di bromocresolo). ^{7,15}
1J	Lisina	LYS	0,5	Rosso/violetto	Marrone/giallo	

*Il precipitato può essere visibile o invisibile.

Precauzioni: Per uso diagnostico *in vitro*.

Dopo l'uso, tutti i materiali infettivi comprese piastre, tamponi di cotone, provette di inoculo, filtri di carta usati per il test dell'ossidasi o dell' indolo ed i pannelli **BBL Crystal** devono essere sterilizzati in autoclave prima dello smaltimento oppure inceneriti.

CONSERVAZIONE E TRATTAMENTO/DURATA DI INUTILIZZO

Alla consegna, conservare il kit **BBL Crystal E/NF a 2 – 25°C**. NON CONGELARE. Prima dell'uso, portare a temperatura ambiente il kit o qualsiasi altro componente precedentemente refrigerato.

Coperchi: I coperchi sono confezionati individualmente e devono essere conservati non aperti. Esaminare visivamente la confezione per escludere eventuali fori o screpolature della busta di carta metallizzata. Non usare il coperchio se la confezione appare danneggiata. Se conservati secondo le istruzioni, i coperchi mantengono la reattività prevista fino alla data di scadenza.

Basi: Le basi sono confezionate in due set da 10 in vassoi per incubazione **BBL Crystal** Le basi sono impilate capovolte per ridurre al minimo la contaminazione per contatto con l'aria. Conservare le basi non usate nel vassoio e in un sacchetto di plastica. I vassoi vuoti vanno impiegati per l'incubazione dei pannelli.

Inoculo: L'inoculo ID enterico/feci **BBL Crystal** è disponibile in confezione di due set da dieci provette. Esaminare visivamente le provette per escludere eventuali incrinature, perdite ecc. Non usarle in caso di perdite, di danni alle provette o ai tappi oppure di evidente contaminazione (opacità, torbidezza). La data di scadenza è visibile sull'etichetta della provetta. L'inoculo ID enterico/feci **BBL Crystal** può essere usato sia con i pannelli **BBL Crystal E/NF** che con i pannelli **RS/E**.

PRELIEVO E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Non usare i sistemi **BBL Crystal ID** direttamente su campioni clinici. Usare isolati provenienti da una piastra in agar sangue tipo agar di soia **Trypticase** con sangue di montone al 5%. Anche l'impiego di una piastra agar MacConkey è accettabile. L'isolato del test deve essere una coltura pura, preparata da non oltre 24. Per la preparazione dell'inoculo, usare solo applicatori con la punta in cotone, poiché con alcuni tamponi in poliestere, l'inoculazione dei pannelli potrebbe risultare problematica. (Vedere "Limitazioni della procedura"). Una volta che i coperchi sono stati rimossi dalle bustine sigillate, dovranno essere utilizzati entro 1 h per garantire prestazioni adeguate. Il rivestimento di plastica dovrà rimanere sul coperchio fino al momento dell'uso.

Umidificare l'incubatore per impedire l'evaporazione del liquido dai pozzetti durante l'incubazione. Il livello di umidità consigliato è del 40 – 60%. L'utilità dei sistemi **BBL Crystal ID** o di altre procedure diagnostiche eseguite su campioni clinici dipende direttamente dalla qualità dei campioni. Si consiglia vivamente ai laboratori di impiegare i metodi descritti nel *Manual of Clinical Microbiology* per la raccolta, il trasporto e l'inserimento dei campioni in terreni di isolamento primari.¹⁶

PROCEDURA DEL TEST

Materiali forniti: Kit Enterico/NF **BBL Crystal**

20 Coperchi di pannelli per inoculo Enterico/NF **BBL Crystal**

20 Basi **BBL Crystal**

20 Provette di inoculo ID enterico/feci **BBL Crystal**. Ogni provetta contiene circa $2,2 \pm 0,1$ mL di inoculo composto da: 8,50 g di NaCl, 0,8372 g di acido 3-morfolinopropansulfonico, acqua purificata q.b. a 1000 mL.

2 Vassoi di incubazione

1 Quadernetto di refertazione **BBL Crystal E/NF**.

Materiali richiesti ma non forniti: Tamponi di cotone sterile (*non usare tamponi in poliestere*); incubatore (35 – 37°C non-CO₂; umidità: 40 – 60%); visore luminoso/visore per pannelli **BBL Crystal** (comprende le tabelle di reazione del colore **BBL Crystal**) con il registro elettronico dei codici del sistema ID **BBL Crystal** oppure il registro manuale dei codici **BBL E/NF** (vedi "Disponibilità"), oppure l'AutoReader **BBL Crystal**; piastra per coltura non selettiva (ad es. agar di soia **Trypticase** con sangue di montone al 5%); contagocce di reagente indolo **BBL DMACA**; contagocce di reagente ossidasi **BBL** (vedi "Disponibilità").

Si devono anche avere a disposizione le attrezzature di laboratorio necessarie per la preparazione, la conservazione e il trattamento dei campioni clinici.

Procedura del test: Per utilizzare il sistema ID E/NF **BBL Crystal** sono necessari i risultati del test dell'ossidasi e dell'indolo. Prima dell'impostazione del pannello E/NF **BBL Crystal**, vanno eseguiti i test dell'ossidasi e dell'indolo su una piastra di isolamento non selettiva preparata da non oltre 24 h. Durante l'esecuzione del test dell'ossidasi e dell'indolo, attenersi alle istruzioni fornite nel foglio illustrativo incluso nella confezione di questi reagenti.

Fare riferimento alle illustrazioni delle tabelle procedurali a pagina 38.

1. Togliere i coperchi dalla busta. Eliminare l'essiccante. Una volta tolti dalla busta, i coperchi rivestiti vanno utilizzati entro un'ora. Non usare il pannello se non vi è essiccante nella busta. Vedi Fig. A.
2. Etichettare una provetta per inoculo con il numero di campione del paziente. Con tecnica asettica, e con la punta di un tampone di cotone sterile (*non usare un tampone in poliestere*) oppure con bastoncino in legno o ansa di plastica monouso, raccogliere una grande colonia (2 – 3 mm di diametro o maggiore) isolata in pozzetto (oppure 4 – 5 colonie più piccole della stessa morfologia) da una piastra sangue come ad esempio agar di soia **Trypticase** con sangue di montone al 5%. È accettabile inoltre anche una piastra agar MacConkey.
3. Sospendere le colonie in una provetta di inoculo enterico/feci **BBL Crystal**.
4. Tappare la provetta e centrifugare per circa 10 – 15 s.
5. Prendere una base e contrassegnare il numero di campione sulla parete laterale.
6. Versare l'intero contenuto dell'inoculo nell'area bersaglio della base. Vedi Fig. B.
7. Tenere la base con entrambe le mani e ruotarla delicatamente in modo che l'inoculo scorra lungo i percorsi fino a quando tutti i pozzetti sono riempiti. Riversare il liquido in eccesso nell'area bersaglio e collocare la base sulla superficie di un tavolo. Vedi Fig. C.
8. Allineare il coperchio in modo che la parte etichettata si trovi sopra l'area bersaglio della base. Vedi Fig. D.
9. Spingere in basso fino a quando si avverte una leggera resistenza. Con i pollici sul bordo su entrambi i lati del coperchio, all'altezza della metà del pannello, spingere contemporaneamente in basso fino a quando il coperchio scatta in posizione (si avvertiranno due "clic"). Vedi Fig. E.

Piastra per il controllo della purezza: Con un'ansa sterile, recuperare una piccola goccia dalla provetta dell'inoculo, prima o dopo l'inoculazione della base ed inoculare un agar slant o piastra (con qualsiasi terreno appropriato) per il controllo della purezza. Gettare la provetta di inoculo e il cappuccio in un contenitore per materiali a rischio biologico. Incubare lo slant o la piastra per 18 – 24 h a 35 – 37°C in un incubatore non-CO₂. Se necessario, la piastra o lo slant per il controllo della purezza potranno inoltre essere utilizzati anche per ulteriori test o in sierologia.

Incubazione: Collocare i pannelli inoculati nei vassoi di incubazione. Ogni vassoio può alloggiare dieci pannelli (5 file di 2 pannelli). Tutti i pannelli vanno incubati **capovolti** (le finestre più grandi rivolte in alto e l'etichetta rivolta in basso) in un incubatore non-CO₂ con il 40 – 60% di umidità. Durante l'incubazione non impilare più di due vassoi. Il tempo di incubazione dei pannelli E/NF è di 18 – 20 h a 35 – 37°C. Vedi Fig. F.

Letture: Al termine del periodo di incubazione consigliato, togliere i pannelli dall'incubatore. Tutti i pannelli vanno letti **capovolti** (con le finestre più grandi rivolte in alto e l'etichetta rivolta in basso) utilizzando il visore luminoso/visore per pannelli **BBL Crystal**. Vedi Fig. G. Per un'interpretazione delle reazioni, fare riferimento alla tabella di reazione dei colori e/o alla tabella nella sezione "Reagenti". Per la registrazione delle reazioni, usare il quadernetto di refertazione **BBL Crystal E/NF**. Alternativamente, per la lettura dei pannelli, si potrà impiegare l'AutoReader **BBL Crystal**.

Calcolo del numero del profilo BBL Crystal: Ad ogni risultato positivo del test viene assegnato un valore di 4, 2, o 1, in base alla fila in cui si trova il test. Ai risultati del test negativi viene assegnato il valore 0 (zero). Vengono quindi sommati i risultati numerici (valori) di ogni reazione positiva in ciascuna colonna. Ne risulterà un numero a 10 cifre corrispondente al numero di profilo.

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

Per acquisire l'identificazione, il numero del profilo ottenuto e i risultati dei test fuori linea (indolo ed ossidasi) vanno inseriti in un PC in cui sia stato installato il registro elettronico dei codici del sistema **BBL Crystal ID**. E' anche disponibile un registro manuale dei codici. Se non si dispone di un PC, rivolgersi all'assistenza tecnica **BD** per supporto con le procedure di identificazione. Se si utilizza l'AutoReader **BBL Crystal**, gli organismi verranno identificati automaticamente dal PC.

Controllo di qualità per l'utente: Si consiglia di eseguire il test di controllo di qualità per ciascun lotto di pannello, come indicato di seguito:

1. Preparare un pannello **BBL Crystal E/NF** con *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495 e attenersi alla procedura consigliata (fare riferimento alla "Procedura del test").
2. Incubare il pannello per 18 – 20 h a 35 – 37°C.
3. Leggere il pannello con un visore luminoso o con un visore del pannello **BBL Crystal** e con una tabella di reazione dei colori **BBL Crystal E/NF**; registrare le reazioni sul quadrernetto di refertazione **BBL Crystal E/NF**. Alternativamente, leggere il pannello con l'AutoReader **BBL Crystal**.
4. Confrontare le reazioni registrate con quelle elencate nella Tabella 2 (pagina 37). Se si ottengono dei risultati discordi, prima di contattare l'assistenza tecnica **BD**, procedere alla verifica della purezza del ceppo del controllo di qualità.

I risultati dei test attesi per ulteriori ceppi di test del controllo di qualità sono elencati nella Tabella 2 (pagina 37).

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il sistema **BBL Crystal E/NF ID** è predisposto per le unità tassonomiche E/NF fornite. Con questo sistema, non si potranno utilizzare unità tassonomiche diverse da quelle elencate nella Tabella 1.

I sistemi di identificazione **BBL Crystal** impiegano un microambiente modificato: pertanto i valori attesi per i singoli test potranno essere diversi dalle informazioni precedentemente stabilite con le reazioni dei test convenzionali. L'accuratezza del sistema di identificazione **BBL Crystal E/NF** si basa sull'impiego statistico di test predisposti a questo scopo e di un database esclusivo.

Quando sono disponibili degli antisieri, l'identificazione biochimica degli organismi selezionati, come ad esempio *Salmonella*, *Salmonella* sottopopolazione 3, *Shigella*, *Escherichia coli* A-D enteropatogenica, e *Vibrio cholerae*, deve essere ampliata mediante analisi antigenica.^{9,16}

Nella preparazione della sospensione di inoculo, usare esclusivamente applicatori con punta in cotone perché alcuni tamponi in poliestere potrebbero far diventare viscoso l'inoculo e renderlo insufficiente al riempimento di tutti i pozzetti. Una volta rimossi i coperchi dalle bustine sigillate, utilizzarli entro 1 ora per garantire prestazioni adeguate. Il rivestimento di plastica dovrà rimanere sul coperchio fino al momento dell'uso.

Per impedire l'evaporazione del liquido dai pozzetti, durante l'incubazione umidificare l'incubatore contenente i pannelli. Il livello di umidità consigliato è del 40 – 60%.

Per ottimizzare l'effetto dei substrati, dopo l'inoculazione, i pannelli vanno incubati esclusivamente **capovolti** (le finestre più grandi rivolte in alto e l'etichetta rivolta in basso).

Usare colonie provenienti da una piastra in agar sangue tipo agar di soia **Trypticase** con sangue di montone al 5%. È accettabile anche una piastra agar MacConkey.

I sistemi di identificazione **BBL Crystal NON** devono essere usati direttamente su campioni clinici.

CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

Riproducibilità: In uno studio esterno in tre (3) laboratori clinici, è stata studiata la riproducibilità delle reazioni di 30 substrati E/NF mediante analisi di replicati. La riproducibilità delle reazioni di substrati singoli è risultata compresa nel range di 96,3 – 100%. La riproducibilità globale del pannello **BBL Crystal E/NF** è risultata del 99,6%.

Accuratezza dell'identificazione: Le prestazioni del sistema di identificazione **BBL Crystal E/NF** sono state confrontate a sistemi attualmente disponibili in commercio, utilizzando isolati clinici e stock culture.

In uno studio interno si sono valutate le prestazioni del sistema **BBL Crystal E/NF**. Sono stati analizzati i risultati di 169 isolati enterici e non enterici (rappresentativi di 45 specie) precedentemente testati. Le identificazioni discordi sono state risolte con l'impiego di altri sistemi in commercio. I risultati sono presentati qui di seguito.

N =169	ID senza ulteriore test	ID con ulteriore test	ID mancata o identificazione errata
BBL Crystal E/NF	163 (96,4%)	167 (98,8%)	2 (1,2%)

Le prestazioni del test di identificazione enterico/non fermentante **BBL Crystal** sono state valutate in tre laboratori clinici indipendenti.¹³ Per stabilire le prestazioni metodologiche sono stati utilizzati entrambi gli isolati di routine pervenuti al laboratorio clinico e quelli identificati in precedenza in base alla scelta operata nei siti degli studi clinici.

Su 299 isolati clinici freschi, analizzati secondo i metodi di identificazione in vigore nei laboratori, il sistema **BBL Crystal ID** ne ha riportati correttamente 289 (96,7%), compresi 16 casi in cui erano stati individuati due o tre microrganismi che hanno richiesto ulteriori test per la risoluzione.

Su 291 ceppi di riferimento precedentemente confermati dai metodi di identificazione in uso nei laboratori, il sistema **BBL Crystal ID** ne ha identificati correttamente 282 (96,9%) compresi 8 casi in cui erano stati rilevati due o tre microrganismi che hanno richiesto ulteriori test per la risoluzione.¹³

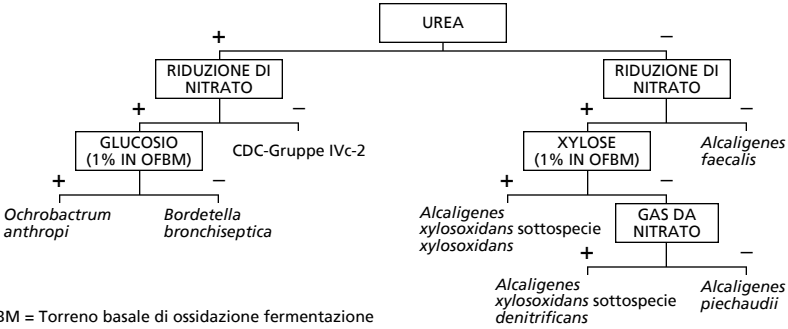
DISPONIBILITÀ

N° di Cat.	Descrizione	N° di Cat.	Descrizione
245000	Kit ID enterico/non fermentante BBL Crystal , contenente 20 di ciascuno dei seguenti articoli: coperchi di pannello enterico/NF BBL Crystal , basi BBL Crystal , provette di inoculo ID enterico/feci BBL Crystal .	245002	Registro manual dei codici e enterico/non fermentante del sistema di identificazione BBL Crystal .
245031	Visore per pannello BBL Crystal , modello U.S.A., 110 V, 60 Hz.	245029	Inoculo ID enterico/feci BBL Crystal liquido, confezione da 10.
245032	Visore per pannello BBL Crystal , modello europeo 220 V, 50 Hz.	245300	AutoReader BBL Crystal .
245033	Visore per pannello BBL Crystal , modello giapponese, 100 V, 50/60 Hz.	221239	Agar di soia Trypticase di sangue di montone al 5%, confezione da 20 piastre.
245034	Provetta UV ad onde lunghe del visore del pannello BBL Crystal .	221261	Agar di soia Trypticase con sangue di montone al 5%, confezione da 100 piastre.
245036	Provetta a luce bianca del visore per pannello BBL Crystal .	261187	Contagocce di reagente indolo BBL DMACA , 50.
		261181	Contagocce reagente ossidasi BBL , 50.

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.

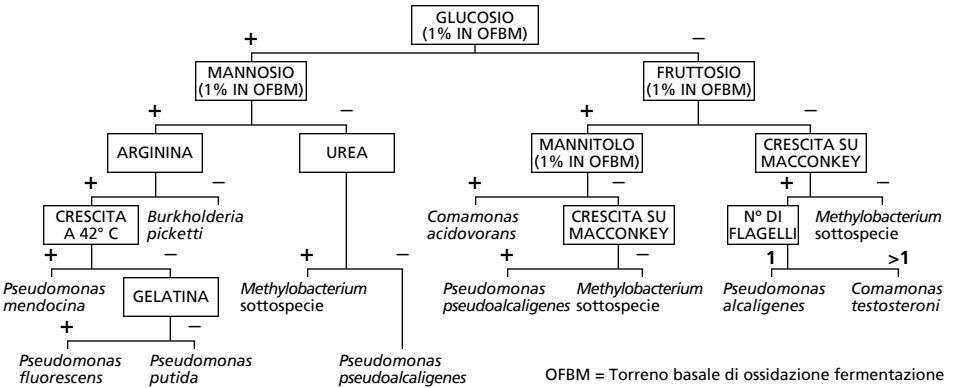
Miscellanea di batteri Gram-negativi

Diagramma N° 1 (Mobili Mediante Flagelli Peritrici)



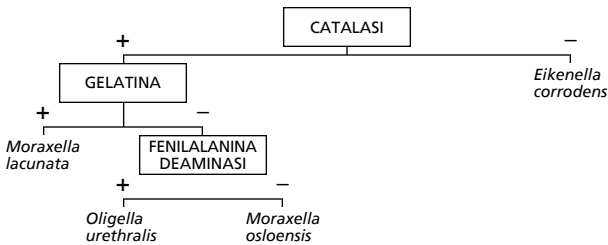
Miscellanea di batteri Gram-negativi

Diagramma N° 2 (Mobili Mediante Flagelli Polari)



Miscellanea di batteri Gram-negativi

Diagramma N° 3 (Non-Mobili)



Bibliografia:

1. Gilardi, G.L., *Identification of Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Rods*, 1/90
2. *Manual of Clinical Microbiology*, 5th Edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O Sistema de Identificação (ID) de Bactérias Entericas/Não fermentadoras (E/NF) **BBL Crystal** destina-se à identificação de bactérias aeróbias gram-negativas que pertençam à família das *Enterobacteriaceae*, assim como de alguns bacilos gram-negativos fermentadores e não fermentadores da glicose, isolados com maior frequência.

SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

O Sistema de Identificação E/NF **BBL Crystal** é um método de identificação miniaturizado. Muitos dos testes utilizados são modificações dos métodos clássicos. Neles se incluem testes para a fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos. Além disso, existem substratos ligados a cromogénios para a detecção de enzimas utilizadas pelos microorganismos para metabolizarem vários substratos.¹⁻⁵

O **BBL Crystal E/NF ID kit** (Conjunto de **BBL Crystal** para ID de E/NF) é constituído por (i) tampas dos painéis para ID de E/NF **BBL Crystal**, (ii) bases **BBL Crystal** e (iii) tubos com Líquido de Inóculo para identificação de Entericos/Fezes **BBL Crystal Enteric/Stool ID Inoculum Fluid (IF)**. A tampa contém 30 substratos desidratados e 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. As alterações de cor são consequência das actividades metabólicas dos microorganismos. O padrão resultante das 30 reacções é convertido num número do perfil com dez dígitos que é utilizado como base para a identificação.⁶ Os padrões das reacções bioquímicas e enzimáticas para os 30 substratos **BBL Crystal E/NF ID**, contendo uma grande variedade de microorganismos, estão armazenados na base de dados **BBL Crystal E/NF ID**. 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 é fornecida uma lista completa dos grupos taxonómicos que constituem a base de dados E/NF actual (página 36).

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Os testes utilizados no Sistema **BBL Crystal E/NF ID** baseiam-se na utilização e degradação de substratos específicos pelos microorganismos, detectados por vários sistemas indicadores. As reacções de fermentação detectam a capacidade que um isolado apresenta para metabolizar hidratos de carbono na ausência de oxigénio atmosférico, sendo as reacções de oxidação baseadas na capacidade que um microorganismo apresenta para metabolizar o substrato, actuando o oxigénio como o aceitador final de electrões. As duas reacções são habitualmente detectadas graças à utilização de um indicador do pH no substrato de teste. Após hidrólise, os substratos cromogénicos produzem alterações de cor que podem ser detectadas visualmente. Além disso, existem outros testes no Sistema **BBL Crystal ID** que detectam a capacidade de um microorganismo de hidrolisar, degradar, reduzir ou de outra forma utilizar um substrato. Na secção "Reagentes" são descritas as reacções utilizadas pelos vários substratos e é apresentada uma breve explicação dos princípios utilizados no sistema.

REAGENTES

O painel **BBL Crystal E/NF ID** contém 30 substratos enzimáticos e bioquímicos, descritos em baixo. A localização no painel indica a fila e a coluna onde o poço está situado (exemplo: 1J refere-se à Fila 1 na Coluna J).

Reagentes e Princípios dos Testes Utilizados no Sistema BBL Crystal E/NF ID

Localização no Painel	Princípio activo	Código	Qtd.		Pos.	Neg.	Princípio (Referência)
			Aprox.	(g/10 mL)			
4A	Arabinose	ARA	3,5		Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	A utilização dos hidratos de carbono origina a diminuição do pH e a alteração do indicador (Vermelho de fenol). ⁷⁻¹⁰
4B	Manose	MNS	3,0		Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	
4C	Sacarose	SUC	2,8		Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	
4D	Melibiose	MEL	1,0		Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	
4E	Ramnose	RHA	3,0		Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	
4F	Sorbitol	SOR	3,5		Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	
4G	Manitol	MNT	1,8		Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	
4H	Adonitol	ADO	2,5		Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	
4I	Galactose	GAL	1,5		Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	
4J	Inositol	INO	1,3		Dourado/Amarelo	Laranja/Vermelho	

Reagentes e Princípios dos Testes Utilizados no Sistema BBL Crystal E/NF ID (continuação)

Localização no Painel	Princípio activo	Código	Qtd.		Neg.	Princípio (Referência)
			Aprox. (g/10 mL)	Pos.		
2A	p-n-p-fosfato	PHO	0,025	Amarelo	Incolor	A hidrólise enzimática do glicosídeo substituído por aril incolor ou do éster de fosfato liberta o p-nitrofenol amarelo. ¹⁻⁵
2B	p-n-p- α - β -glucósido	BGL	0,025	Amarelo	Incolor	
2C	p-n-p- β -galactósido	NPG	0,06	Amarelo	Incolor	A hidrólise enzimática do substrato amida incolor liberta a p-nitroanilina de cor amarela. ¹⁻⁵
2D	Prolina nitroanilido	PRO	0,07	Amarelo	Incolor	
2E	p-n-p bis-fosfato	BPH	0,02	Amarelo	Incolor	
2F	p-n-p-xilósido	BXY	0,03	Amarelo	Incolor	
2G	p-n-p- α -arabinósido	AAR	0,03	Amarelo	Incolor	
2H	p-n-p-fosforilcolina	PHC	0,03	Amarelo	Incolor	
2I	p-n-p- β -glucuronídeo	GLR	0,02	Amarelo	Incolor	A hidrólise enzimática do glicosídeo substituído por aril incolor ou do éster de fosfato liberta o p-nitrofenol amarelo. ¹⁻⁵
2J	p-n-p-N-acetil-glucosaminida	NAG	0,04	Amarelo	Incolor	
1A	γ -L-glutamil	GGL	0,03	Amarelo p-nitroanilido	Incolor	A hidrólise enzimática do substrato amida incolor liberta a p-nitroanilina de cor amarela. ¹⁻⁵
1B	Esculina	ESC	0,14	Castanho/Bordeaux	Transparente/Palha	Na presença do ião férrico, a hidrólise da esculina produz um precipitado preto. ¹¹
1C	p-nitro-DL-fenilalanina	PHE	0,1	Dourado/Laranja escuro	Amarelo	Na presença do ião férrico, a desaminação oxidativa da fenilalanina produz uma cor castanha. ^{7,11}
1D	Ureia	URE	0,2	Aqua/Azul	Amarelo/Verde	A hidrólise da ureia e a amónia resultante alteram a cor do indicador de pH (Azul de bromotimol). ^{7,11,12}
1E	Glicina	GLY	0,7	Aqua/Azul	Amarelo/Verde	A degradação da glicina produz metabolitos alcalinos que alteram a cor do indicador de pH (Azul de bromotimol). ¹³
1F	Citrato	CIT	0,8	Aqua/Azul	Amarelo/Verde	A utilização do citrato produz metabolitos alcalinos que alteram a cor do indicador de pH (Azul de bromotimol). ^{7,14}
1G	Ácido malónico	MLO	1,5	Aqua/Azul	Amarelo/Verde	A utilização do malonato produz metabolitos alcalinos que alteram a cor do indicador de pH (Azul de bromotimol). ¹¹
1H	Cloreto de tetrazólio trifenil	TTC	0,15	Rosa/Vermelho*	Transparente	A redução do composto tetrazólio origina a formação de um composto de cor vermelha. ¹³
1I	Arginina	ARG	1,5	Vermelho/Púrpura	Amarelo/Castanho	O catabolismo anaeróbio origina um aumento do pH e a alteração de cor do indicador (Violeta de bromocresol). ^{7,15}
1J	Lisina	LYS	0,5	Vermelho/Púrpura	Amarelo/Castanho	

*O precipitado pode ou não ser visível.

Precauções: Para Uso em Diagnóstico *in vitro*

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

ARMAZENAMENTO E MANIPULAÇÃO/PRAZO DE VALIDADE

Após a recepção, armazene o **BBL Crystal E/NF** kit entre 2 e 25°C. **NÃO CONGELAR**. Se o conjunto ou qualquer dos constituintes for armazenado no frigorífico, deverá ser trazido à temperatura ambiente antes de se proceder à sua utilização.

Tampas: As tampas são embaladas individualmente e devem ser armazenadas ainda por abrir. Inspeccionar visualmente a embalagem relativamente à existência de buracos ou fissuras na folha de alumínio. Não utilizar se a embalagem se parecer danificada. Na embalagem original, as tampas, caso sejam armazenadas conforme recomendado, irão manter a sua reactividade esperada até ao final do prazo de validade.

Bases: As bases são embaladas em dois conjuntos de dez, em tabuleiros de incubação **BBL Crystal**. As bases são empilhadas viradas para baixo, com o objectivo de minimizar a contaminação pelo ar. Armazenar as bases não usadas no tabuleiro, num saco de plástico. Deverão utilizar-se tabuleiros vazios para incubar os painéis.

Líquido de Inóculo: O Líquido de Inóculo **BBL Crystal Enteric/Stool ID Inoculum Fluid (IF)** para Entéricos/Fezes 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). O prazo de validade está impresso no rótulo do tubo. O Líquido de Inóculo **BBL Crystal** para ID de para Entéricos/Fezes pode ser usado com os painéis **BBL Crystal E/NF** ou **RS/E**.

COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Os Sistemas **BBL Crystal ID** não se destinam a uso directo com amostras clínicas. Utilizar isolados de uma placa de agar de sangue tal como **Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** (Agar de Soja **Trypticase** com 5% de Sangue de Ovelha). A utilização de uma placa de Agar de MacConkey também é aceitável. O isolado de teste deverá ser uma cultura pura com menos de 24 h de idade. Na preparação do inóculo deverão utilizar-se apenas zaragoatas com aplicador dotado de uma ponta de algodão, dado que algumas zaragoatas 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 Sistema **BBL Crystal ID** ou de qualquer outro procedimento de diagnóstico efectuado com amostras clínicas é directamente influenciada pela qualidade das próprias amostras. Recomenda-se veementemente que os laboratórios utilizem os métodos abordados no *Manual of Clinical Microbiology* para a colheita, transporte e colocação da amostra em meios de isolamento primários.¹⁶

PROCEDIMENTO DE TESTE

Material Fornecido: **BBL Crystal Enteric/NF** kit:

- 20 Tampas dos Painéis **BBL Crystal Enteric/NF**,
- 20 Bases **BBL Crystal**,
- 20 Tubos com Líquido de Inóculo **BBL Crystal Enteric/Stool ID Inoculum Fluid (IF)**. Cada tubo possui aproximadamente 2,2 ± 0,1 mL de Líquido para Inóculo contendo: 8,50 g de NaCl, 0,8372 g de ácido 3-morfolinopropanosulfónico e água purificada até um volume de 1000 mL.
- 2 tabuleiros de incubação,
- 1 Caderno de Relatório **BBL Crystal E/NF**.

Material Necessário mas Não Fornecido: Zaragoatas de algodão estéreis (*não utilize zaragoatas de poliéster*); Incubadora (35 – 37°C) sem CO₂ (humidade entre 40 e 60%); **BBL Crystal Light Box/Panel Viewer** (Caixa de Luz/Dispositivo para Visualização do Pannel **BBL Crystal**) (inclui Tabelas das Cores das Reações **BBL Crystal**) com **BBL Crystal ID System Electronic Codebook** (Livro de Códigos Electrónico do Sistema de Identificação **BBL Crystal**) ou **BBL E/NF Manual Codebook** (Livro de Códigos Manual **E/NF BBL**) (consulte "Disponibilidade"), ou **BBL Crystal AutoReader** (Leitor Automático **BBL Crystal**); placa para cultura não selectiva (por exemplo, **Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood**); **BBL DMACA Indole Reagent Droppers** (Distribuidores de Reagente Indol **DMACA BBL**); **BBL Oxidase Reagent Droppers** (Distribuidores de Reagente Oxidase **BBL**) (consulte "Disponibilidade").

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

Procedimento de Análise: O Sistema **BBL Crystal E/NF ID** necessita dos resultados dos testes da oxidase e indol. Antes de preparar um painel **E/NF BBL Crystal**, devem ser efectuados os testes da oxidase e indol a partir de uma placa de isolamento não selectiva com um período de crescimento não superior a 24 h. Efectuar os testes de oxidase e indol em conformidade com as instruções do folheto informativo destes reagentes.

Consulte as Ilustrações da Tabela do Procedimento, página 38.

1. Retirar as tampas do saco. Descartar o exsicante. Após remoção das tampas dos sacos, estas devem ser usadas dentro de 1 h. Não usar o painel caso não exista exsicante no saco. Consulte a Fig. A.
2. Retirar um tubo para inóculo e rotular com o número da amostra do doente. Utilizando uma técnica asséptica, com a ponta de uma zaragatoa de algodão esterilizada (*não usar uma zaragatoa de poliéster*), com uma aplicadora de madeira ou com uma ansa de plástico descartável, escolher uma colónia grande (com um diâmetro de 2 a 3 mm ou superior) e bem isolada (ou 4 a 5 colónias mais pequenas, com morfologia idêntica) a partir de uma placa de sangue tal como **Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood**. A utilização de uma placa de Agar de MacConkey também é aceitável.
3. Suspender as colónias no tubo com Líquido de Inóculo **BBL Crystal Enteric/Stool**.
4. Volte a tapar o tubo e agite no vortex durante cerca de 10 a 15 s.
5. Pegar numa base e marcar o número da amostra do doente na sua face lateral.
6. Colocar a totalidade do conteúdo do líquido de inóculo na área alvo da base. Consulte a Fig. B.
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. Consulte a Fig. C.
8. Alinhar a tampa de forma a que a extremidade marcada da tampa fique por cima da área alvo da base. Consulte a Fig. D.
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 (deverem ouvir-se dois cliques). Consulte a Fig. E.

Placa de Pureza: Utilizando uma ansa esterilizada, recuperar uma pequena gota do tubo do líquido com inóculo antes ou depois de inocular a base, e inocular uma placa de agar ou um tubo de ágar inclinado (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 o tubo de ágar inclinado durante 18–24 h a 35–37°C numa incubadora

sem CO₂. A placa de pureza ou o tubo de ágar inclinado também podem ser usados para qualquer teste adicional ou serologia, caso se mostre necessário.

Incubação: Colocar os painéis inoculados em tabuleiros de incubação. Dez painéis podem ajustar-se num tabuleiro (5 filas de 2 painéis). Todos os painéis deverão ser incubados **virados para baixo** (com as janelas maiores viradas para cima; rótulo virado para baixo), numa incubadora sem 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 E/NF é de **18–20 h** a 35–37°C. Consulte a Fig. F.

Leitura: Depois do período recomendado de incubação, retirar os painéis da incubadora. Todos os painéis deverão ser lidos virados **para baixo** (com as janelas maiores para cima; rótulo virado para baixo) usando o **BBL Crystal Light Box** ou **Panel Viewer**. Consulte a Fig. G. Consulte a tabela de cores das reacções e/ou a tabela na secção "Reagentes" para interpretar as reacções. Utilize o Caderno de Relatório **BBL Crystal E/NF** para registar as reacções. Em alternativa, pode utilizar o **BBL Crystal AutoReader** para ler os painéis.

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

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

O número de perfil resultante e os resultados do teste externos (indol e oxidase), deverão ser introduzidos num computador pessoal (PC) que tenha instalado o **BBL Crystal ID System Electronic Codebook**, para se obter a identificação. Também se encontra disponível um livro de codificação manual. Se não existir nenhum PC disponível, contacte a Assistência Técnica da **BD** para obter assistência relativamente à identificação. Se utilizar o **BBL Crystal AutoReader**, os microorganismos são automaticamente identificados pelo PC.

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

1. Prepare um painel **BBL Crystal E/NF** com *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495, de acordo com o procedimento recomendado (consulte o "Procedimento do Teste").
2. Incube entre 35 e 37°C, durante 18 a 20 h.
3. Leia o painel com **BBL Crystal Light Box** ou **Panel Viewer** e a tabela de cores das reacções **BBL Crystal E/NF**; registre as reacções utilizando o Caderno de Relatório **BBL Crystal E/NF**. Em alternativa, leia o painel no **BBL Crystal AutoReader**.
4. Compare as reacções registadas com aquelas que são referidas no Quadro 2 (página 37). Se forem obtidos resultados discrepantes, confirme a pureza da estirpe do controlo de qualidade antes de contactar a Assistência Técnica da **BD**.

No Quadro 2 (página 37), são igualmente apresentados os resultados esperados para outras estirpes de teste de controlo de qualidade.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

Os Sistemas de Identificação **BBL Crystal** utilizam um micro-ambiente modificado; assim, os valores esperados para cada um dos testes podem diferir das informações anteriormente estabelecidas com as reacções de teste convencionais. A exactidão do Sistema de Identificação **BBL Crystal E/NF** baseia-se na utilização estatística de testes especialmente concebidos e de uma base de dados exclusiva.

Quando estiverem disponíveis anti-soros, a identificação bioquímica dos microorganismos seleccionados, tais como a *Salmonella*, subgrupo 3 da *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* A-D enteropatógena e *Vibrio cholerae*, deverá ser prolongada à análise antigénica.^{9,16}

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 de uma placa de ágar de sangue tal como **Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood**. A utilização de uma placa de Ágar de MacConkey também é aceitável.

Os Sistemas de Identificação **BBL Crystal** NÃO se destinam a uso directo com amostras clínicas.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Reprodutibilidade: Num estudo externo envolvendo três (3) laboratórios clínicos, procedeu-se ao estudo da reprodutibilidade das reacções dos substratos de E/NF (30) recorrendo a um teste de réplicas. A reprodutibilidade

das reacções de substrato individuais variou entre 96,3 e 100%. A reprodutibilidade global do painel **BBL Crystal E/NF** foi de 99,6%.

Precisão de Identificação: O desempenho do Sistema de Identificação **BBL Crystal E/NF** foi comparado com os sistemas actualmente disponíveis no mercado, utilizando isolados clínicos e culturas em stock.

Num estudo interno, foi avaliado o desempenho do **BBL Crystal E/NF**. Analisaram-se os resultados de 169 isolados entéricos e não entéricos (representando 45 espécies) que foram testados. As identificações discrepantes foram resolvidas mediante a utilização de outros sistemas disponíveis no mercado. Os resultados apresentam-se de seguida:

N = 169	Identificação Sem Testes Suplementares	Identificação Com Testes Suplementares	Sem Identificação ou Identificação Incorrecta
BBL Crystal E/NF	163 (96,4%)	167 (98,8%)	2 (1,2%)

O desempenho do teste para Identificação de Bactérias Entéricas/Não fermentadoras **BBL Crystal** foi avaliado em três laboratórios clínicos independentes.¹³ Para estabelecer as características do desempenho foram utilizados isolados de rotina recebidos nos laboratórios, assim como isolados previamente identificados e escolhidos pelos locais do ensaio clínico.

Dos 299 isolados clínicos frescos que foram testados com base em métodos de identificação actuais dos laboratórios, o Sistema **BBL Crystal ID** participou correctamente 96,7% (289), incluindo 16 casos em que foram participados dois ou três microrganismos, necessitando de testes suplementares para se chegar ao resultado final.

Das 291 estirpes de teste previamente identificadas que foram confirmadas pelos métodos de identificação actuais dos laboratórios, o Sistema **BBL Crystal ID** identificou correctamente 96,9% (282), incluindo 8 casos onde foram identificados dois ou três microrganismos e que necessitaram de testes suplementares para serem resolvidos.¹³

DISPONIBILIDADE

N.º de Cat.	Descrição	N.º de Cat.	Descrição
245000	BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID Kit, contendo 20 de cada: BBL Crystal Enteric/NF Panel Lids, BBL Crystal Bases, BBL Crystal Enteric/Stool ID Inoculum Fluid tubes.	245002	BBL Crystal Identification Systems Enteric/Nonfermenter Manual Codebook.
245031	BBL Crystal Panel Viewer, Modelo doméstico, 110 V, 60 Hz.	245029	BBL Crystal Enteric/Stool ID Inoculum Fluid, caixa de 10.
245032	BBL Crystal Panel Viewer, Modelo europeu, 220 V, 50 Hz.	245300	BBL Crystal AutoReader.
245033	BBL Crystal Panel Viewer, Modelo japonês, 100 V, 50/60 Hz.	221239	Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood, embalagem de 20 placas.
245034	BBL Crystal Panel Viewer Longwave UV Tube.	221261	Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood, caixa de 100 placas.
245036	BBL Crystal Panel Viewer White Light Tube.	261187	BBL DMACA Indole Reagent Droppers, caixa de 50.
		261181	BBL Oxidase Reagent Droppers, caixa de 50.

BIBLIOGRAFIA Consulte "References" no texto em Inglês.

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

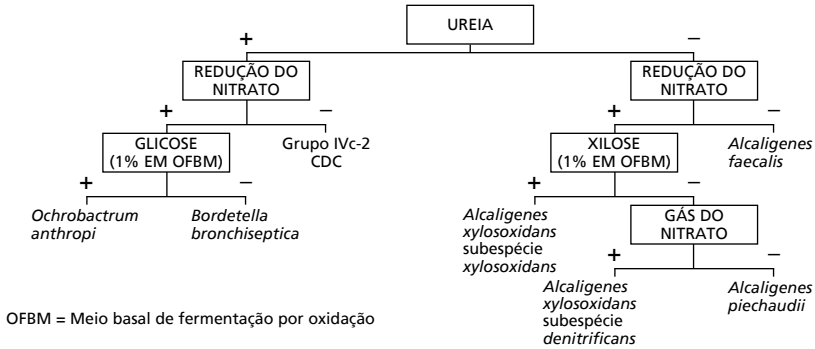
Serviço de Suporte Técnico (11)5185-9961

Registro ANVISA nº 10033430047

Centro de Relacionamento com o Cliente: 0800 0555654

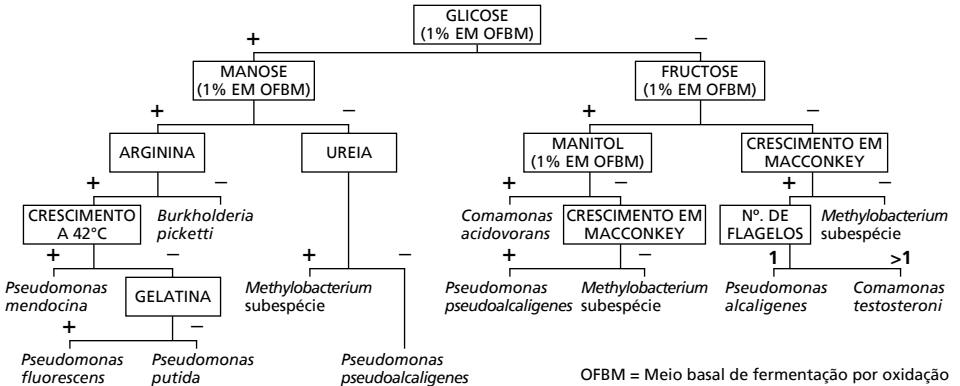
Vários bacilos Gram-negativos

Tabela Nº 1 (Mobilidade por flagelos peritríquios)



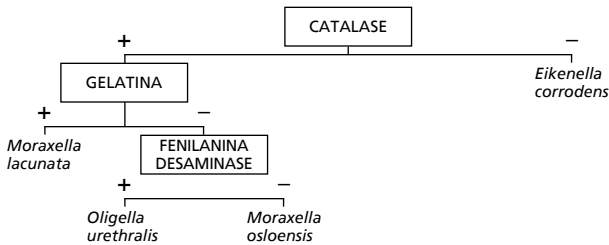
Vários bacilos Gram-negativos

Tabela Nº 2 (Mobilidade por flagelos polares)



Vários bacilos Gram-negativos

Tabela Nº 3 (Sem mobilidade)



- References:
1. Gilardi, G.L., *Identification of Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Rods*, 1/90
 2. Manual of Clinical Microbiology, 5th Edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991

BD Sistemas BBL Crystal de Identificación

Equipo para la identificación de patógenos entéricos/no fermentantes

USO PREVISTO

El sistema de identificación **BBL Crystal** (ID) de bacterias entéricas/no fermentadoras (E/NF) sirve para la identificación de bacterias aerobias gram-negativas que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* así como también de los bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores de glucosa aislados con más frecuencia.

RESUMEN Y EXPLICACION

El sistema **BBL Crystal** E/NF ID es un método miniaturizado de identificación. Muchos de los análisis utilizados son modificaciones de los métodos clásicos. Estos incluyen tests para la fermentación, oxidación, degradación e hidrólisis de diversos sustratos. Además, contienen sustratos unidos a un cromógeno para detectar las enzimas que utilizan los microbios para metabolizar distintos sustratos.¹⁻⁵

El kit **BBL Crystal** E/NF ID está compuesto de (i) las tapas del panel **BBL Crystal** E/NF, (ii) las bases **BBL Crystal** y (iii) los tubos de fluido (IF) de inóculo para organismos entéricos/heces **BBL Crystal** ID. La tapa contiene 30 sustratos deshidratados en las puntas de los dientes. La base tiene 30 pocillos de reacción. El inóculo del análisis está preparado con el fluido de inóculo y se utiliza para llenar los 30 pocillos de la base. Cuando se alinea la tapa con la base y se cierra en su lugar, el inóculo del análisis rehidrata los sustratos secos e inicia las reacciones del análisis.

Después de un período de incubación, se examinan los pocillos para observar cambios de color. Los cambios de color se producen como resultado de actividades metabólicas de los microorganismos. El patrón resultante de las 30 reacciones se convierte en un número de perfil de diez dígitos que se utiliza como base para la identificación.⁶ Los patrones de la reacción bioquímica y enzimática de los 30 sustratos **BBL Crystal** E/NF con una amplia variedad de microorganismos son almacenados en la base de datos **BBL Crystal** E/NF ID. La identificación se deriva de un análisis comparativo del patrón de reacción del aislado del análisis con aquellos que existen en la base de datos. En la tabla 1 (página 36) se muestra una lista completa de taxones que comprenden la base de datos E/NF actual.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los análisis utilizados en el sistema **BBL Crystal** E/NF ID están basados en la utilización y degradación de sustratos específicos por parte de los microorganismos detectados por distintos sistemas indicadores. Las reacciones de fermentación detectan la capacidad de un aislado para metabolizar los carbohidratos en ausencia de oxígeno atmosférico, y las reacciones de oxidación están basadas en la capacidad de un organismo para metabolizar el sustrato siendo el oxígeno el aceptor final de electrones. Ambas reacciones se detectan normalmente mediante el uso de un indicador de pH en el sustrato del análisis. Los sustratos cromógenos al sufrir hidrólisis producen cambios de color que pueden ser detectados visualmente. Además, existen otros análisis que detectan la capacidad de un organismo para hidrolizar, degradar, reducir o utilizar de otro modo un sustrato en el sistema **BBL Crystal** ID. En la sección "Reactivos" se describen las reacciones utilizadas por varios sustratos y una breve explicación de los principios utilizados en el sistema.

REACTIVOS

El panel **BBL Crystal** E/NF ID contiene 30 sustratos bioquímicos y enzimáticos según se describe a continuación. La ubicación del panel indica la fila y la columna donde se encuentra el pocillo (por ejemplo: 1J se refiere a la fila 1 en la columna J).

Reactivos y principios empleados en el sistema **BBL Crystal** E/NF ID

Ubicación del panel	Ingrediente activo	Código	Cantidad aprox. (g/10 mL)	Positivo	Negativo	Principio (Referencia)
4A	Arabinosa	ARA	3,5	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
4B	Manosa	MNS	3,0	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
4C	Sacarosa	SUC	2,8	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
4D	Melibiososa	MEL	1,0	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
4E	Rammosa	RHA	3,0	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
4F	Sorbitol	SOR	3,5	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
4G	Manitol	MNT	1,8	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
4H	Adonitol	ADO	2,5	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
4I	Galactosa	GAL	1,5	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
4J	Inositol	INO	1,3	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
2A	p-n-p-fosfato	PHO	0,025	Amarillo	Entre incoloro	
2B	p-n-p a-β-glucósido	BGL	0,025	Amarillo	Entre incoloro	La hidrólisis enzimática del glucósido incoloro aril sustituido o éster de fosfato libera p-nitrofenol amarillo. ¹⁻⁵
2C	p-n-p-β-galactósido	NPG	0,06	Amarillo	Entre incoloro	
2D	Prolina nitroanilida	PRO	0,07	Amarillo	Entre incoloro	La hidrólisis enzimática del sustrato amida incoloro libera p-nitroanilina de color amarillo. ¹⁻⁵
2E	p-n-p bis-fosfato	BPH	0,02	Amarillo	Entre incoloro	
2F	p-n-p-xilósido	BXY	0,03	Amarillo	Entre incoloro	
2G	p-n-p-a-arabinósido	AAR	0,03	Amarillo	Entre incoloro	
2H	p-n-p-fosforilcolina	PHC	0,03	Amarillo	Entre incoloro	La hidrólisis enzimática del glucósido incoloro aril sustituido o éster de fosfato libera p-nitrofenol amarillo. ¹⁻⁵
2I	p-n-p-β-glucurónido	GLR	0,02	Amarillo	Entre incoloro	
2J	p-n-p-N-acetil glucosamidina	NAG	0,04	Amarillo	Entre incoloro	
1A	γ-L-glutamil p-nitroanilida	GGL	0,03	Amarillo	Entre incoloro	La hidrólisis enzimática del sustrato amida incoloro libera p-nitroanilina de color amarillo. ¹⁻⁵
1B	Esculina	ESC	0,14	Pardo/marrón	Transparente/paja	La hidrólisis de la esculina produce un precipitado negro en presencia de iones férricos. ¹¹

Reactivos y principios empleados en el sistema E/NF ID BBL Crystal (continuación)

Ubicación del panel	Ingrediente activo	Código	Cantidad aprox. (g/10 mL)	Positivo	Negativo	Principio (Referencia)
1C	p-nitro-DL-fenilalanina	PHE	0,1	Dorado/ osc. Naranja	Amarillo	La desaminación oxidativa de la fenilalanina produce un color pardo en presencia de iones férricos. ^{7,11}
1D	Urea	URE	0,2	Turquesa/Azul	Amarillo/verde	La hidrólisis de la urea y el amonio resultante cambia el color del indicador de pH (azul de bromotimol). ^{7,11,12}
1E	Glicina	GLY	0,7	Turquesa/Azul	Amarillo/verde	La degradación de la glicina libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol). ¹³
1F	Citrato	CIT	0,8	Turquesa/Azul	Amarillo/verde	La degradación del citrato libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol). ^{7,14}
1G	Ácido malónico	MLO	1,5	Turquesa/Azul	Amarillo/verde	La degradación del malonato libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol). ¹¹
1H	Cloruro de trifenil tetrazolio	TTC	0,15	Rosa/rojo*	Transparente	La reducción del compuesto de tetrazolio produce la formación de un formazán rojo. ¹⁵
1I	Arginina	ARG	1,5	Rojo/púrpura	Amarillo/pardo	El catabolismo anaerobio produce una elevación del pH y un cambio en el color del indicador (púrpura bromocresol). ^{7,15}
1J	Lisina	LYS	0,5	Rojo/púrpura	Amarillo/pardo	

*El precipitado puede ser o no visible.

Precauciones: Para diagnóstico *in vitro*.

Después de su uso, todos los materiales infecciosos, incluyendo placas, torundas de algodón, tubos de inóculo y papeles de filtro utilizados para los análisis de oxidasa o indol y para los paneles **BBL Crystal** deben introducirse en la autoclave antes de su eliminación o incineración.

ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN/TIEMPO DE DURABILIDAD

Después de recibirlo, almacene el kit **BBL Crystal E/NF** a 2 – 25°C. NO CONGELAR. Si el kit o cualquiera de los componentes se almacena refrigerado, debe sacarse a temperatura ambiente antes de su uso.

Tapas: Las tapas están envasadas individualmente y deben guardarse sin abrir. Inspeccione el embalaje visualmente para determinar si hay orificios o grietas en el paquete de papel aluminio. No utilice el panel si su embalaje parece estar dañado. Si se almacenan de acuerdo con las recomendaciones, las tapas en el envase original, mantendrán la reactividad esperada hasta la fecha de caducidad.

Bases: Las bases vienen envasadas en dos juegos de diez, en bandejas de incubación **BBL Crystal**. Las bases están apiladas mirando hacia abajo para reducir al mínimo la contaminación por el aire. Almacene las bases no utilizadas en la bandeja, en una bolsa de plástico. Las bandejas vacías deben utilizarse para incubar los paneles.

Fluido de inóculo: El fluido de inóculo (IF) para organismos entéricos/heces **BBL Crystal** ID viene envasado en dos juegos de diez tubos. Inspeccione visualmente los tubos para determinar si tienen grietas, fugas, etc. No los utilice si parecen tener fugas, si el tubo o la tapa están dañados, o si hay evidencia visual de contaminación (p.e., palidez, turbidez). La fecha de caducidad se muestra en la etiqueta del tubo. El fluido de inóculo para organismos entéricos/heces **BBL Crystal** ID puede utilizarse con los paneles E/NF o RS/E **BBL Crystal**.

RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Los sistemas **BBL Crystal ID** no están indicados para utilizarlos directamente con las muestras clínicas. Utilice aislados de una placa de agar sangre, tal como agar de soja **Trypticase** con hemáticas de oveja al 5%. El uso de una placa agar MacConkey es también aceptable. El aislado para análisis debe ser un cultivo puro de no más de 24 h. Solamente deben utilizarse las torundas con aplicador de punta de algodón para preparar el inóculo, ya que algunas torundas de poliéster pueden producir problemas con la inoculación de los paneles. (Vea "Limitaciones del procedimiento".) Una vez que se han sacado las tapas de las bolsas selladas, deben utilizarse en el plazo de 1 h para asegurar un rendimiento adecuado. La cubierta de plástico debería permanecer sobre la tapa hasta que se use.

El incubador utilizado debe estar humectado para prevenir la evaporación del líquido de los pocillos durante la incubación. El nivel recomendado de humedad es del 40 – 60%. La utilidad de los sistemas **BBL Crystal** ID o de cualquier otro procedimiento de diagnóstico realizado sobre muestras clínicas está directamente influenciado por la calidad de las muestras. Se recomienda encarecidamente que los laboratorios empleen los métodos explicados en el *Manual of Clinical Microbiology* (Manual de Microbiología Clínica) para la recogida de muestras, su transporte y colocación en medios primarios de aislamiento.¹⁶

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Materiales suministrados: Kit **BBL Crystal** entérico/NF:

- 20 Tapas del panel entérico/NF **BBL Crystal**,
- 20 Bases **BBL Crystal**,
- 20 Tubos del fluido de inóculo para organismos entéricos/heces **BBL Crystal**. Cada tubo tiene aproximadamente 2,2 ± 0,1 mL de fluido de inóculo que contiene: 8,50 g de NaCl, 0,8372 g de ácido 3-morfolinopropanosulfónico, agua purificada hasta 1000 mL.
- 2 bandejas de incubación,
- 1 Cuaderno de informes **BBL Crystal E/NF**.

Materiales necesarios pero no suministrados: Torundas estériles de algodón (*no utilice torundas de poliéster*); Incubador (35 – 37°C) sin-CO₂ (humedad 40 – 60%); Visor del panel/caja de luz **BBL Crystal** (incluye las tablas de color de las reacciones **BBL Crystal**) con el libro de códigos electrónico del sistema **BBL Crystal** ID o el libro de códigos manual de **BBL E/NF** (ver "Disponibilidad"), o el Lector automático **BBL Crystal**; placa de cultivo no selectiva (por ejemplo, agar de soja **Trypticase** con hemáticas de oveja al 5%); cuentagotas para el reactivo de indol DMACA BBL; cuentagotas para el reactivo de oxidasa BBL (véase "Disponibilidad").

También se necesitan el equipo y los materiales de laboratorio apropiados para la preparación, almacenamiento y manipulación de las muestras clínicas.

Procedimiento de análisis: El sistema **BBL Crystal E/NF ID** requiere los resultados del análisis de indol y oxidasa. Antes de colocar el panel **BBL Crystal E/NF**, deben realizarse los análisis de indol y oxidasa a partir de una placa de aislamiento no selectiva de no más de 24 horas. Realice los análisis de indol y oxidasa según las instrucciones proporcionadas en el prospecto del envase para estos reactivos.

Consulte las ilustraciones de la Tabla de procedimientos, página 38.

1. Saque las tapas de la bolsa. Deseche el secante. Una vez sacadas de la bolsa, las tapas cubiertas deben utilizarse en el plazo de 1 hora. No utilice el panel si no hay secante en la bolsa. Vea la Fig. A.
2. Tome un tubo de inóculo y etiquételo con el número de muestra del paciente. Utilizando una técnica aséptica, con la punta de una torunda estéril de algodón (*no utilice una torunda de poliéster*) o una varilla con aplicador de madera o un asa de cultivo estéril de plástico, tome una colonia grande bien aislada (con un diámetro de 2 – 3 mm o mayor) o 4 – 5 colonias más pequeñas de la misma morfología de una placa de sangreal como agar de soja **Trypticase** con hematies de oveja al 5%. El uso de una placa agar MacConkey es también aceptable.
3. Suspense las colonias en un tubo de fluido de inóculo **BBL Crystal** para organismos entéricos/heces.
4. Vuelva a taponar el tubo y agítelo en un vórtex durante aproximadamente 10 – 15 s.
5. Tome una base y marque el número de muestra del paciente en la pared lateral.
6. Vierta todo el contenido del fluido de inóculo en el área objetivo de la base. Vea la Fig. B.
7. Sostenga la base con ambas manos y mueva el inóculo suavemente de un lado para otro a lo largo de las pistas hasta que se hayan llenado todos los pocillos. Haga retroceder cualquier líquido sobrante del área objetivo y coloque la base en la parte superior de un banquillo. Vea la Fig. C.
8. Alinee la tapa de forma que el extremo marcado de la tapa esté en la parte superior del área objetivo de la base. Vea la Fig. D.
9. Apriete hasta que perciba una ligera resistencia. Coloque el pulgar en el borde de la tapa hacia la parte media del panel en cada lado y apriete simultáneamente hasta que la tapa encaje en su lugar (tiene que escuchar dos “clics”). Vea la Fig. E.

Placa de pureza: Utilizando un asa de cultivo estéril, tome una pequeña gota del tubo de fluido de inóculo antes o después de inocular la base e inocular un tubo de agar inclinado o placa (cualquier medio apropiado) para comprobar la pureza.

Deseche el tubo de fluido de inóculo tapado en un recipiente para materiales biológicamente peligrosos. Incube el tubo de agar inclinado o la placa durante 18 – 24 h a 35 – 37°C en un incubador sin CO₂. La placa o tubo de agar inclinado de pureza puede utilizarse también para cualquier análisis suplementario o serología, si fuera necesario.

Incubación: Coloque los paneles inoculados en las bandejas de incubación. En una bandeja pueden caber diez paneles (5 filas de 2 paneles). Todos los paneles deben incubarse **mirando hacia abajo** (las ventanas más grandes mirando hacia arriba; la etiqueta mirando hacia abajo) en un incubador sin CO₂ con una **humedad** del 40 – 60%. No deben apilarse las bandejas en más de dos alturas durante la incubación. El tiempo de incubación para los paneles E/NF es de **18 – 20 h** a 35 – 37°C. Vea la Fig. F.

Lectura: Después del período recomendado de incubación, saque los paneles del incubador. Todos los paneles deben leerse **hacia abajo** (las ventanas más grandes arriba; la etiqueta mirando hacia abajo) utilizando la caja de luz o el visor del panel **BBL Crystal**. Vea la Fig. G. Consulte la tabla de colores de la reacción y/o el apartado de “Reactivos” para obtener una interpretación de las reacciones. Use el cuaderno de informes **BBL Crystal E/NF** para registrar las reacciones. Como método alternativo, puede utilizar el lector automático **BBL Crystal** para leer los paneles.

Cálculo del número de perfil de BBL Crystal: A cada resultado del análisis con un resultado positivo se le asigna un valor de 4, 2, ó 1, correspondiendo a la fila donde está ubicado el análisis. Se asigna un valor de 0 (cero) a cualquier resultado negativo. Después se suman los números (valores) resultantes de cada reacción positiva en cada columna. Se genera 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	5	4	6	0	2	4	4	3	7	1

El número de perfil resultante y los resultados del análisis fuera de línea (indol y oxidasa) deben introducirse en un PC en el que se haya instalado el libro de códigos electrónico del sistema **BBL Crystal ID**, para obtener la identificación. También hay disponible un libro de códigos manual. Si no hay un PC disponible, póngase en contacto con el Servicio técnico de **BD** para obtener ayuda con la identificación. Si se utiliza el lector automático **BBL Crystal**, el PC identifica automáticamente los organismos.

Control de calidad por parte del usuario: La prueba del control de calidad se recomienda para cada lote de paneles como se indica a continuación:

1. Coloque un panel **BBL Crystal E/NF** con *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495 por cada procedimiento recomendado (consulte “Procedimiento del análisis”).
2. Entonces incube el panel durante 18 – 20 h a 35 – 37°C.
3. Lea el panel con la caja de luz o visor del panel **BBL Crystal** y la tabla de colores de la reacción, registre las reacciones utilizando el cuaderno de informes **BBL Crystal E/NF**. Como método alternativo, puede leer el panel en el lector automático **BBL Crystal**.
4. Compare las reacciones registradas con las enumeradas en la Tabla 2 (página 37). Si se obtienen resultados discrepantes, confirme la pureza de la cepa de control de calidad antes de ponerse en contacto con el Servicio técnico de **BD**.

Los resultados esperados del análisis de las cepas adicionales del análisis de control de calidad también están enumeradas en la Tabla 2 (página 37).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El sistema **BBL Crystal E/NF ID** está diseñado para los taxones E/NF proporcionados. Los taxones diferentes a los enumerados en la Tabla 1 no están indicados para su uso en este sistema.

Los sistemas de identificación **BBL Crystal** utilizan un microambiente modificado; por lo tanto, los valores esperados para sus análisis individuales pueden diferir de la información establecida previamente con las reacciones de análisis convencionales. La precisión del sistema de identificación **BBL Crystal E/NF** está basada en el uso estadístico de análisis diseñados especialmente y en una base de datos exclusiva.

Cuando el antisuero está disponible, la identificación bioquímica de organismos seleccionados, tal como *Salmonella*, *Salmonella* subgrupo 3, *Shigella*, *Escherichia coli* A-D enteropatógenos, y *Vibrio cholerae*, debe ampliarse mediante un análisis antigenico.^{9,16}

Solamente deben utilizarse las torundas con aplicador de punta de algodón para preparar la suspensión de inóculo, ya que algunas torundas de poliéster pueden hacer que el fluido de inóculo se vuelva espeso. Esto puede producir una cantidad insuficiente de inóculo para llenar los pocillos. Una vez que se han sacado las tapas de las bolsas selladas, deben utilizarse en el plazo de 1 hora para asegurar un rendimiento adecuado. La cubierta de plástico debe permanecer sobre la tapa hasta que se use.

El incubador donde están colocados los paneles debe estar humectado para prevenir la evaporación del líquido de los pocillos durante la incubación. El nivel recomendado de humedad es el 40 – 60%.

Los paneles, después de la inoculación, deben solamente incubarse **mirando hacia abajo** (las ventanas más grandes hacia arriba; la etiqueta mirando hacia abajo) para maximizar la efectividad de los sustratos.

Las colonias deben tomarse de una placa de agar sangre, tal como agar de soja **Trypticase** con hematías de oveja al 5%. El uso de una placa agar MacConkey es también aceptable.

Los sistemas de identificación **BBL Crystal** NO están indicados para utilizarlos directamente con las muestras clínicas.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Reproducibilidad: En un estudio interno en el que participaban tres (3) laboratorios clínicos, se estudió la reproducibilidad de las reacciones de (30) sustratos E/NF mediante repetición del análisis. La reproducibilidad de las reacciones con sustrato individual osciló del 96,3 a 100%. La reproducibilidad total de un panel **BBL Crystal E/NF** fue del 99,6%.

Precisión de la identificación: El rendimiento del sistema de identificación **BBL Crystal E/NF ID** fue comparado con sistemas disponibles actualmente en el comercio utilizando aislados clínicos y cultivos madre.

En un estudio interno, se evaluó el rendimiento de **BBL Crystal E/NF**. Se analizaron los resultados de 169 aislados entéricos y no entéricos (representando 45 especies). Las identificaciones discrepantes se resolvieron utilizando otros sistemas comerciales. Estos resultados se muestran a continuación:

N = 169	ID sin análisis suplementario	ID con análisis suplementario	Ningún ID o identificado erróneamente
BBL Crystal E/NF	163 (96,4%)	167 (98,8%)	2 (1,2%)

Se evaluó el rendimiento del análisis **BBL Crystal ID** para organismos entéricos/no fermentadores en tres laboratorios clínicos independientes.¹³ Se utilizaron aislados de rutina que llegaron al laboratorio clínico así como también aislados identificados, previamente elegidos por los laboratorios de los ensayos clínicos, para establecer las características de rendimiento.

De los 299 aislados clínicos frescos analizados por los métodos actuales de identificación de los laboratorios, el sistema **BBL Crystal ID** comunicó correctamente el 96,7% (289), entre ellos 16 casos donde se comunicaron dos o tres organismos y se necesitó un análisis suplementario para conseguir un resultado válido.

De las 291 cepas en cuestión identificadas previamente y confirmadas por los métodos actuales de identificación de los laboratorios, el sistema **BBL Crystal ID** comunicó correctamente el 96,9% (282), entre ellos 8 casos donde se habían comunicado dos o tres organismos y se necesitó un análisis suplementario para conseguir un resultado válido.¹³

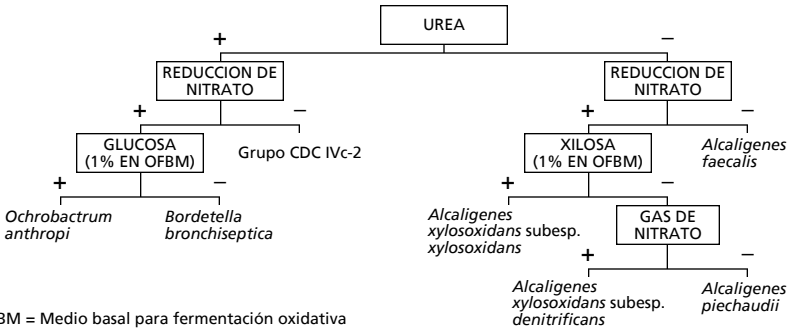
DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción	Nº de cat.	Descripción
245000	Kit BBL Crystal ID para organismos entéricos/no fermentadores, que contiene 20: Tapas para el panel entérico/NF BBL Crystal , bases BBL Crystal , tubos de fluido de inóculo BBL Crystal ID para organismos entéricos/heces.	245002	Libro de códigos manual de sistemas de identificación BBL Crystal para organismos entéricos/no fermentadores.
245031	Visor del panel BBL Crystal , modelo nacional, 110 V, 60 Hz.	245029	Inóculo para organismos entéricos/heces BBL Crystal ID . Fluido, cartón de 10.
245032	Visor del panel BBL Crystal , modelo europeo, 220 V, 50 Hz.	245300	Lector automático BBL Crystal .
245033	Visor del panel BBL Crystal , modelo japonés, 100 V, 50/60 Hz.	221239	Agar de soja Trypticase con hematías de oveja al 5%, paquete de 20 placas.
245034	Tubo de luz UV de onda larga para el visor del panel BBL Crystal .	221261	Agar de soja Trypticase con hematías de oveja al 5%, cartón de 100 placas.
245036	Tubo de luz blanca para el visor del panel BBL Crystal .	261187	Cuentagotas para el reactivo de indol BBL DMACA , 50s.
		261181	Cuentagotas para el reactivo de oxidasa BBL DMACA , 50s.

BIBLIOGRAFIA: Véase "Referencias" en el texto en inglés.

Miscelánea de bacterias gram-negativas

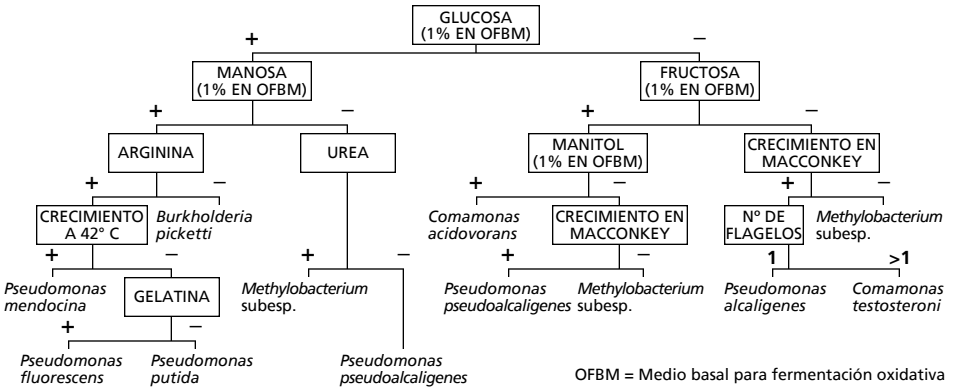
Clave Nº 1 (Movil Mediante un Flagelo Peritrico)



OFBM = Medio basal para fermentación oxidativa

Miscelánea de bacterias gram-negativas

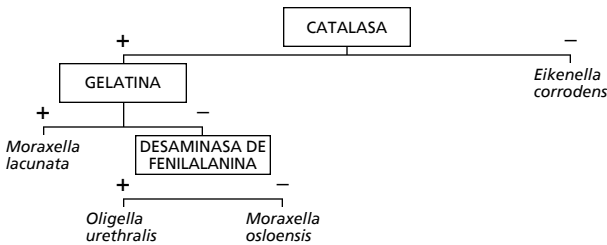
Clave Nº 2 (Movil Mediante un Flagelo Polar)



OFBM = Medio basal para fermentación oxidativa

Miscelánea de bacterias gram-negativas

Clave Nº 3 (Inmoviles)



Bibliografía:

1. Gilardi, G.L., *Identification of Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Rods*, 1/90
2. Manual of Clinical Microbiology, 5th Edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991

Table / Tableau / Tabelle / Tabella / Quadro / Tabla 1

Taxa In BBL Crystal E/NF ID System / Taxonomie dans le système BBL Crystal E/NF ID / Im BBL Crystal E/NF-ID-System gespeicherte Taxa / Unità tassonomiche nel sistema BBL Crystal E/NF ID / Grupos taxonómicos no Sistema de ID de E/NF BBL Crystal / Grupos taxonómicos del sistema BBL Crystal E/NF ID

<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Flavobacterium breve</i>	<i>Salmonella arizone</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Flavobacterium gleum</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Flavobacterium indologenes</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	<i>Salmonella species</i>
<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Flavobacterium odoratum</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Aeromonas veronii</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Serratia ficaria</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Serratia fonticola</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Cedecea davisae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia odorifera 1</i>
<i>Cedecea lapagei</i>	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	<i>Serratia odorifera 2</i>
<i>Cedecea neteri</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Serratia plymuthica</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	<i>Serratia rubidaea</i>
<i>Chryseomonas luteola</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Moellerella wisconsensis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Shigella species (S. boydii, S. flexneri)</i>
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	<i>Pasteurella aerogenes</i>	<i>Sphingobacterium multivorum</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Pasteurella haemolytica</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Tatumella pitiseos</i>
<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Proteus penneri</i>	<i>Vibrio damsela</i>
<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>
<i>Enterobacter taylorae</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Vibrio hollisae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Vibrio metschnikovii</i>
<i>Escherichia coli</i> serogroup / séogroupe / Serogrupo / sierogruppo / serogruppo O111	<i>Providencia rustigianii</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Escherichia coli</i> serogroup / séogroupe / Serogrupo / sierogruppo / serogruppo O157	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> AD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Pseudomonas diminuta</i>	<i>Weeksella virosa/zoohelcum</i>
<i>Escherichia hermannii</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> group / groupe / Gruppe / gruppo / grupo
<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Pseudomonas gladioli</i>	(<i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. frederiksenii</i> , <i>Y. intermedia</i> , <i>Y. kristensenii</i>)
<i>Ewingella americana</i>	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Flavimonas oryzzihabitans</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Yokenella regensburgei</i>
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Miscellaneous Gram-Negative Bacilli ¹
	<i>Pseudomonas vesicularis</i>	
	<i>Rahnella aquatilis</i>	

¹ "Miscellaneous Gram-Negative Bacilli" refers to a group of oxidase positive species that are relatively inactive and indistinguishable from each other in **BBL Crystal** Enteric/Nonfermenter ID System. Refer to Tables 1 and 2 provided in this insert for further identification when the first choice identification is "Miscellaneous Gram-Negative Bacilli."

¹ Les "bacilles Gram-négatifs divers" correspondent à un groupe de souches oxydase positive relativement inactives et non discernables les unes des autres dans le système **BBL Crystal** E/NF ID. Se reporter aux Tableaux 1 et 2 de ces instructions pour toute identification complémentaire lorsque le premier choix d'identification est "bacilles Gram-négatifs divers".

¹ Die Bezeichnung "verschiedene gramnegative Bakterien" bezieht sich auf eine Gruppe oxidasepositiver Spezies, die im **BBL Crystal** Entero/Nonfermenter-ID-System relativ inaktiv und undifferenzierbar sind. Falls die erste Identifizierung "verschiedene gramnegative Bakterien" lautet, sind zur genaueren Identifizierung die in dieser Packungsbeilage enthaltenen Tabellen 1 und 2 heranzuziehen.

¹ L'espressione "miscellanea di batteri gram-negativi" si riferisce ad un gruppo di specie ossidasi positive che sono relativamente inattive e non distinguibili tra loro nel sistema **BBL Crystal** E/NF ID. Per ulteriore identificazione, qualora l'identificazione di prima scelta sia "miscellanea di batteri gram-negativi", consultare le Tabelle 1 e 2 fornite in questo foglietto illustrativo per agevolare l'utente.

¹ "Vários Bacilos Gram-Negativos" refere-se a um grupo de espécies positivas para a oxidase que são relativamente inativas e indistinguíveis entre si no Sistema **BBL Crystal** Enteric/Nonfermenter ID. Consulte os Quadros 1 e 2 que constam deste folheto informativo para uma identificação adicional quando a primeira escolha de identificação é "Vários Bacilos Gram-Negativos".

¹ "Miscelánea de bacterias gram-negativas" se refiere a un grupo de especies positivas a la oxidasa que son relativamente inactivas e indistinguibles entre sí en el sistema **BBL Crystal** E/NF ID. Consulte las Tablas 1 y 2 suministradas en este prospecto para la identificación más precisa cuando la primera identificación es "Miscelánea de bacterias gram-negativas".

"Miscellaneous Gram-Negative Bacilli" include / Le groupe "bacilles Gram-négatifs divers" comprend / Zu "verschiedenen gramnegativen Bakterien" zählen / La "miscellanea di batteri gram-negativi" include / "Vários Bacilos Gram-Negativos" inclui / "Miscelánea de bacterias gram-negativas" incluye:

<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Methylobacterium species</i>
<i>Alcaligenes piechaudii</i>	<i>Moraxella lacunata</i>
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> subsp. <i>denitrificans</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> subsp. <i>xylosoxidans</i>	<i>Ochrobactrum anthrapi</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Oligella urethralis</i>
<i>Burkholderia pickettii</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
CDC Group IV C-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ²
<i>Comamonas acidovorans</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>
<i>Comamonas testosteroni</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Pseudomonas putida</i> ²

² May also be identified separately in database / ² Possibilité d'identification séparé dans la base de données / ² Kann in der Datenbank auch separat identifiziert werden / ² Possono essere identificati anche separatamente nella base-dati / ² Também podem ser identificados em separado na base de dados. / ² Puede encontrarse identificado por separado en el banco de datos

Table / Tableau / Tabelle / Tabella / Quadro / Tabla 2

Quality Control Chart For BBL Crystal E/NF ID System / Tableau de contrôle de qualité du système BBL Crystal E/NF ID / Qualitätskontroll-Tabelle für das BBL Crystal E/NF-ID-System / Tabella del controllo di qualità per il sistema BBL Crystal E/NF ID / Quadro de Controle de Qualidade para o Sistema BBL Crystal E/NF ID / Cuadro de control de calidad para el sistema BBL Crystal E/NF ID

Location	Code	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 33495	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Acinetobacter lwoffii</i> ATCC 17925	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 35030	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 35032
4A	ARA	+	V	-	-	+	-
4B	MNS	+	+	-	-	+	V
4C	SUC	+	-	-	+	+	-
4D	MEL	V	+	-	-	V	-
4E	RHA	+	+	-	-	+	-
4F	SOR	+	+	-	-	+	-
4G	MNT	V	+	-	-	+	-
4H	ADO	+	-	-	-	+	-
4I	GAL	+	+	-	+	+	+
4J	INO	+	-	-	-	-	-
2A	PHO	V	V	-	+	V	V
2B	BGL	+	-	-	+	V	-
2C	NPG	+	+	-	-	+	-
2D	PRO	V	-	-	-	-	+
2E	BPH	V	V	-	+	V	-
2F	BXY	+	-	-	-	+	-
2G	AAR	(+)	(-)	-	-	(+)	-
2H	PHC	-	-	-	+	-	V
2I	GLR	-	+	-	-	-	-
2J	NAG	-	-	-	-	+	-
1A	GGL	+	-	-	V	+	+
1B	ESC	+	-	-	+	V	-
1C	PHE	-	-	-	+	-	-
1D	URE	V	-	V	+	V	+
1E	GLY	-	-	V	V	-	+
1F	CIT	+	-	-	(+)	+	+
1G	MLO	+	-	-	-	+	+
1H	TTC	+	(+)	-	V	+	+
1I	ARG	V	V	-	V	(+)	+
1J	LYS	+	+	-	-	V	V

+ = positive reaction - = negative reaction V = variable reaction (+) = Usually positive, but occasionally negative /
 + = réaction positive - = réaction négative V = réaction variable (+) = généralement positive, mais parfois négative /
 + = positive Reaktion - = negative Reaktion V = variable Reaktion (+) = In der Regel positiv, jedoch gelegentlich negativ /
 + = reazione positiva - = reazione negativa V = reazione variabile (+) = in genere positiva, ma occasionalmente negativa /
 + = reação positiva - = reação negativa V = reação variável (+) = Habitualmente positiva, mas occasionalmente negativa /
 + = reacción positiva - = reacción negativa V = reacción variable (+) = generalmente positivo pero a veces negativo

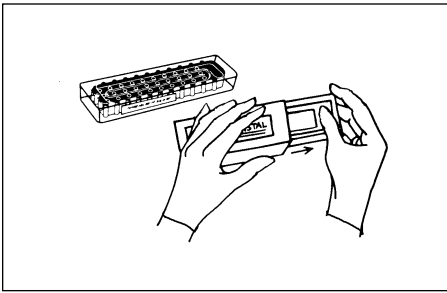


Fig. A

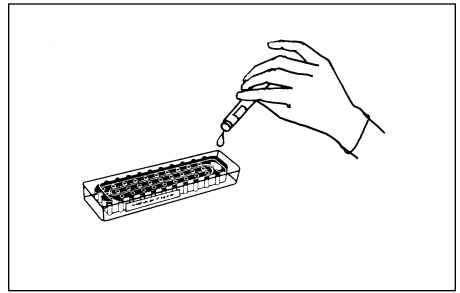


Fig. B

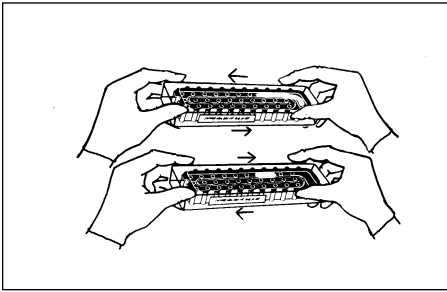


Fig. C

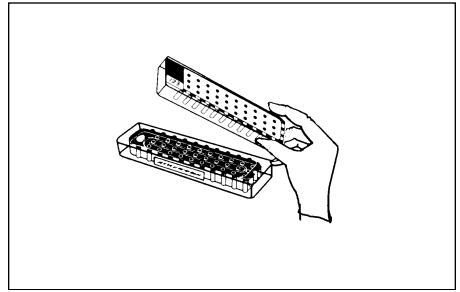


Fig. D

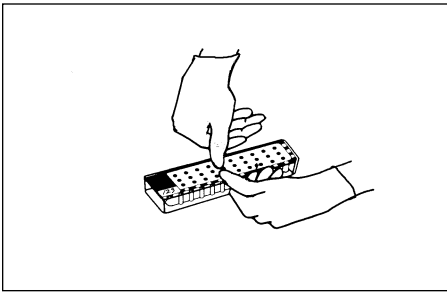


Fig. E

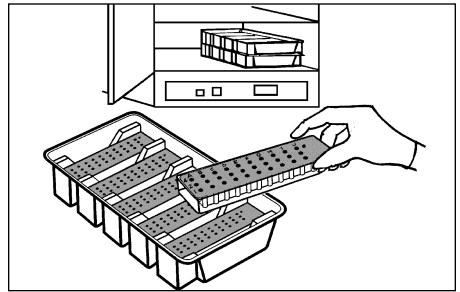


Fig. F

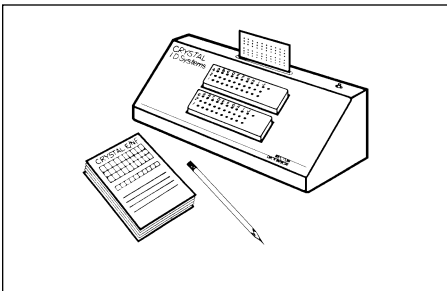


Fig. G

E/NF 同定検査キット

用途

BBL CRYSTAL E/NF 同定検査キットは、腸内細菌科に属する好気性グラム陰性桿菌、並びに検出頻度の比較的高いブドウ糖発酵性・非発酵性グラム陰性桿菌を同定するための製品です。

製品の要約・説明

BBL CRYSTAL E/NF 同定検査キットは、簡易同定法です。本キットで用いられる検査の多くは従来法の変法です。これらには、各種基質の発酵、酸化、化学分解、加水分解試験が含まれます。さらに、各種基質を代謝するために微生物が使用する酵素を検出するための色素結合基質があります。^{1,5}

BBL CRYSTAL E/NF 同定検査キットは、(1) リッド、(2) ベース、(3) グラム陰性菌用プロスから構成されています。リッドには、フォーク状プラスチックの先端に30の乾燥基質が含まれています。ベースには30の反応ウェルがあります。検査用菌液はプロスで調製し、ベースにある30の反応ウェルすべてを満たします。リッドをベースに挿入して、ばちと音がするように正しくセットすると、菌液は乾燥基質を溶解し、反応を開始します。

所定の培養時間後、反応ウェルに色の変化が起きているかどうかを調べます。色の変化は、微生物の代謝活動から生じるものです。30の反応の結果、生じるパターンが、10桁のプロファイル番号に変換され、これが、同定の根拠として使用されます。⁶ 多様な微生物を対象とする30の基質による生化学的反応・酵素反応のパターンが、**BBL CRYSTAL E/NF** データベースに登録されています。本システムの同定結果は、検査対象の分離菌の反応パターンと同データベースのパターンとを比較分析して得られます。現在のデータベースでの同定可能菌種は表1(36ページ)に記載されています。

使用手順の原理

本システムは、各種の指示薬によって検知される特異的な基質を微生物が利用・化学分解することに基づいています。発酵反応は、大気中の酸素のない条件下で、分離菌が炭水化物を代謝する能力を検知し、また酸化反応は、酸素の存在下で、微生物が最終の電子受容体として、基質を代謝する能力に基づくものです。双方の反応とも、通常、検査用基質の中でpH指示薬の利用により検知されます。加水分解が起きると直ちに、発色性の基質は色の変化を生じ、肉眼で検知できます。さらに、**BBL CRYSTAL** 同定検査キットには、微生物が、基質を加水分解したり、化学分解、還元、またはその他の方法で利用する能力を検知する他の検査もあります。各種基質の反応と、本同定検査キットの原理の簡単な説明が「試薬」の欄に述べられています。

試薬

BBL CRYSTAL E/NF 同定パネルには次のような30の酵素基質・生化学的基質が含まれます。パネル上の位置とは、反応ウェルが位置する横と縦の列を指します(例:1Jとは縦J列目にある横1列目を指します)。

BBL CRYSTAL E/NF 同定検査キットの試薬と原理

パネル上の位置	有効成分	コード	およその量 (g/10 mL)	陽性	陰性	原理 (参照)
4A	アラビノース	ARA	3.5	金色/黄	オレンジ/赤	炭水化物の利用により、pHが下がり、指示薬(フェニールレッド)が変化する。 ⁷⁻¹⁰
4B	マンノース	MNS	3.0	金色/黄	オレンジ/赤	
4C	白糖	SUC	2.8	金色/黄	オレンジ/赤	
4D	メリビオース	MEL	1.0	金色/黄	オレンジ/赤	
4E	ラムノース	RHA	3.0	金色/黄	オレンジ/赤	
4F	ソルビトール	SOR	3.5	金色/黄	オレンジ/赤	
4G	マンニトール	MNT	1.8	金色/黄	オレンジ/赤	
4H	アドニトール	ADO	2.5	金色/黄	オレンジ/赤	
4I	ガラクトース	GAL	1.5	金色/黄	オレンジ/赤	
4J	イノシトール	INO	1.3	金色/黄	オレンジ/赤	
2A	p-n-p-リン酸	PHO	0.025	黄	無色	無色のアリール置換グリコシドまたはリン酸エステルの酵素の加水分解により、黄色のp-ニトロフェニールが放出される。 ^{1,5}
2B	p-n-p- - -グルコシド	BGL	0.025	黄	無色	
2C	p-n-p- -ガラクトシド	NPG	0.06	黄	無色	
2D	プロニン・ニトロアニリド	PRO	0.07	黄	無色	
2E	p-n-p ビスリン酸塩	BPH	0.02	黄	無色	
2F	p-n-p-キシロシド	BXY	0.03	黄	無色	
2G	p-n-p- -アラビノシド	AAR	0.03	黄	無色	
2H	p-n-p- ホスホリルコリン	PHC	0.03	黄	無色	
2I	p-n-p- -グルクロニド	GLR	0.02	黄	無色	
2J	p-n-p-N-アセチルグルコサミニド	NAG	0.04	黄	無色	
1A	-L-グルタミルp-ニトロアニリド	GGL	0.03	黄	無色	無色のアミド基質の酵素の加水分解により、黄色のp-ニトロアニリドが放出される。 ^{1,5}
1B	エスクリン	ESC	0.14	茶/栗色	清涼/変わら色	
1C	p-ニトロ-DL-フェニルアラニン	PHE	0.1	金色/ 濃オレンジ	黄	

BBL CRYSTAL E/NF 同定検査キットの試薬と原理 (続き)

パネル上の位置	有効成分	コード	およその量 (g/10 mL)	陽性	陰性	原理 (参照)
1D	尿素	URE	0.2	明るい緑味青/青	黄/緑	尿素の加水分解と、その結果できるアンモニアにより、pH指示薬の色(プロムチモールブルー)が変化します。 ^{7,11,12}
1E	グリシン	GLY	0.7	明るい緑味青/青	黄/緑	グリシンの化学分解により、アルカリ性代謝物が発生し、それがpH指示薬の色(プロムチモールブルー)を変化させる。 ¹³
1F	クエン酸塩	CIT	0.8	明るい緑味青/青	黄/緑	クエン酸塩の利用により、アルカリ性代謝物が発生し、それがpH指示薬の色(プロムチモールブルー)を変化させる。 ^{7,14}
1G	マロン酸塩	MLO	1.5	明るい緑味青/青	黄/緑	マロン酸塩の利用により、アルカリ性代謝物が発生し、それがpH指示薬の色(プロムチモールブルー)を変化させる。 ¹¹
1H	トリフェニルテトラゾリウム	TTC	0.15	ピンク/赤*	清涼	テトラゾリウム化合物の還元により、赤色のホルマザンが形成される。 ¹³
1I	アルギニン	ARG	1.5	赤/紫	黄/茶	嫌気性異化作用により、pHが上がり、指示薬の色(プロムチモールブルー)が変化する。 ^{7,15}
1J	リジン	LYS	0.5	赤/紫	黄/茶	

*沈殿物が見られるとは限らない。

注意：体外診断用医薬品

平板培地、綿棒、グラム陰性菌用プロス、オキシダーゼまたはインドール検査に使用したる紙、パネルを含む全ての感染性器具は、使用後、廃棄前にオートクレーブで滅菌、または焼却しなければなりません。

貯法と取り扱い/有効期限

受け取り次第、**BBL CRYSTAL E/NF**キットは2~25°Cで保存して下さい。冷凍はしないで下さい。キットやその部品を冷蔵保存する場合は、いずれも使用前に室温に戻して下さい。

リッド：リッドは個々に包装されていますので、開封せずに保存して下さい。ホイルの包装容器に穴またはひび割れがないか、包装容器を検査して下さい。包装容器に破損がある場合は、使用しないで下さい。元の包装容器に入ったリッドは、指示どおり保存した場合、有効期限までは反応が維持されます。

ベース：ベースは、**BBL CRYSTAL**培養トレイに、10個ずつ1セットの計2セットが包装されています。ベースは、空気汚染を最小限に抑えるため、表面を下向きにして重ねてあります。未使用のベースはトレイに入れ、ビニール袋に入れて保存して下さい。パネルの培養には空のトレイを使って下さい。

プロス：**BBL CRYSTAL**グラム陰性菌用プロスは、プロス10本1セットで合計2セットが包装されています。ひび割れや漏れ等がないかどうか、チューブを検査して下さい。漏れ、チューブまたはキャップの破損、ないしは汚染があるように見える(くもり、濁り)場合には、使用しないで下さい。有効期限はチューブのラベルに示されています。このプロスは、**BBL CRYSTAL E/NF**用パネルまたはRS/E用パネルに使用することができます。

検体採取と分離培養法

本システムは、臨床検体を直接使用するものではありません。トリプチケースノイ5%羊血液寒天培地等の平板培地からの分離菌をご使用下さい。マッコンキー寒天平板も使用可能です。検査用分離菌は、24時間以内の純培養菌でなければなりません。ポリエステル製綿棒の中には、パネルの接種で問題を起こすものもあるので、菌液の調整には、綿製の綿棒をご使用下さい(「使用手順の限界」の欄参照)。封印された袋からいす取り出したリッドは、高性能を確保するために必ず1時間以内に使用して下さい。使用の時まで、リッドはビニール袋に入れておいて下さい。

使用するフラン器は、培養中、反応ウェルからの菌液の蒸発を防ぐため、加湿して下さい。望ましい湿度は40~60%です。**BBL CRYSTAL**同定検査キットおよび臨床検体に用いるその他の診断薬の有用性は、検体それ自体の質に直接影響されます。検体の採取、輸送、初代分離培地への接種法については、*Manual of Clinical Microbiology* (臨床微生物学マニュアル)に述べられている方法を使用することを強くお勧めします。¹⁶

検査手順

製品に含まれるもの：**BBL CRYSTAL E/NF**同定検査キット

リッド 20個

ベース 20個

グラム陰性菌用プロス 20本 プロスの成分は、NaCl 8.50 g、3-モルフォリノプロバン・スルホン酸0.8372 gで合計約2.2±0.1mL、および精製水1000mLです。

培養トレイ 2個

報告用紙 1冊

必要な材料で本品に含まれていないもの：滅菌綿棒(ポリエステル製綿棒は用いない)、非CO₂フラン器(温度：35~37°C；湿度：40~60%)、**BBL CRYSTAL**ライトボックス/パネルビューア (**BBL CRYSTAL** カラーチャートを含む)と**BBL CRYSTAL**同定検査キットコンピュータコードブックまたは**BBL CRYSTAL E/NF**同定マニュアルコードブック(「包装単位」の欄参照)、あるいは**BBL CRYSTAL** オートリーダー、非選択平板培地(例：トリプチケースノイ5%羊血液寒天培地)、**BBL DMACA**インドール試薬スポイト、**BBL**オキシダーゼ試薬スポイト(「包装単位」の欄参照)。

そのほか、臨床検体の調整、保存、取扱い用に必要な器具と白衣が必要です。

検査手順：本システムは、オキシダーゼとインドールの検査結果を必要とします。**BBL CRYSTAL E/NF**用パネルのセットアップの前に、非選択分離培地で培養開始後24時間以内の培養物について、オキシダーゼとインドールの検査を行います。試薬の添付文書に出ている指示に従い、オキシダーゼとインドールの検査を行って下さい。

38 ページの手順の図を参照して下さい。

1. リッドを袋から取り出し、乾燥剤を捨てます。封印された袋からいったん取り出したリッドは、1時間以内に使用して下さい。袋に乾燥剤が入っていなかった場合は、パネルを使用しないで下さい。図Aを参照して下さい。
2. プロスを取り出し、患者の検体番号をラベルに記入します。無菌手法を用いて、滅菌綿棒（ポリエステル製は用いない）の先端、または木製のアプリケーション棒やプラスチック製ディスクポーザブル白金耳で、トリプチケースノイ5%羊血液寒天培地等から、よく分離された大きな（直径2~3mmまたはそれ以上の）コロニーを1個（あるいは同じ形態の小さなコロニー4~5個）釣菌します。マッコンキー寒天平板も使用可能です。
3. グラム陰性菌用プロスにコロニーを懸濁させます。
4. 再びプロスにキャップをして、約10~15秒間ボルテックスミキサーで攪拌します。
5. ベースを手にとり、患者の検体番号を側壁に記入します。
6. 菌液全部をベースのターゲットエリアに注ぎます。図Bを参照して下さい。
7. 両手でベースを持ち、静かに揺らして菌液を溝に沿って流し、反応ウエル全部を満たします。余分な液はターゲットエリアに揺り戻し、ベースを机の上に置きます。図Cを参照して下さい。
8. リッドの位置を揃えて、ラベルのついたリッドの端がベースのターゲットエリアの上に来るようにします。図Dを参照して下さい。
9. 少し抵抗が感じられるまで下に押しします。パネル両側面の真中あたりのリッドの端に両手の親指を置き、リッドがしるべき位置にばちっとはまるまで（2回「ばちっ」という音を聞く）同時に下の方へ押しします。図Eを参照して下さい。

純培養菌チェック用平板：ベースへの接種前もしくは後に滅菌白金耳を使って、プロス用の懸濁液を1滴、純培養チェックのために寒天平板培地（適切な培地ならいずれでもよい）に接種します。試験管とキャップは生物学的危険物廃棄用容器に捨てます。寒天平板を35~37°Cにて18~24時間培養します。必要であれば、純培養チェック用平板は追加検査や血清学検査にも使用できます。

培養：接種したパネルを培養トレイに入れます。1枚のトレイに10枚のパネルが入ります（5列×パネル2枚）。全てのパネルを、非CO₂フラン器内で湿度40~60%にて、表面を下に向けて（大きな窓が上に、ラベルが下に向くように）培養します。培養中、トレイを重ねる場合2枚が限度です。E/NF パネルの培養時間は、35~37°Cで18~20時間です。図Fを参照して下さい。

判定：指示された培養時間が過ぎたら、パネルをフラン器から取り出します。パネルは、**BBL CRYSTAL** ライトボックス又はパネルビューアを使って、表面を下に向けて（大きな窓が上に、ラベルが下に向くように）判定します。反応の解釈にはカラーチャートおよび「または」試薬欄の表を参照して下さい。結果の記録には**BBL CRYSTAL** E/NF 報告用紙を使用して下さい。また、**BBL CRYSTAL** オートリーダーでパネルの判定を行うこともできます。図Gを参照して下さい。

BBL CRYSTAL プロファイル番号の計算：陽性となった各検査結果には、検査の位置にある横の列に対応して、4、2、1の値が与えられます。陰性の結果にはいずれも0の値が与えられます。次に各縦の列の各陽性結果から与えられた数字（値）を合計します。こうして10桁の数字が生まれますが、これがプロファイル番号です。

例：	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
2	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
プロファイル	5	4	6	0	2	4	4	3	7	1

こうして得られたプロファイル番号とオフライン検査結果（インドールとオキシナーゼ）を、**BBL CRYSTAL** 同定用コンピュータコードブックで判定します。マニュアルコードブックを利用することも可能です。**BBL CRYSTAL** オートリーダーを使うと、微生物が自動的に同定されます。

使用者による品質管理：ロット毎に、下記のように品質管理試験を行うことをお勧めします。

1. **BBL CRYSTAL** E/NF パネルを、指示された手順に従い、*Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495 を用いてセットアップして下さい（「検査手順」欄参照）。
2. 35~37°Cで18~20時間、パネルの培養を行って下さい。
3. **BBL CRYSTAL** ライトボックス又はパネルビューアと**BBL CRYSTAL** E/NF カラーチャートを用いて、パネルを判定し、報告用紙に結果を記録して下さい。または、**BBL CRYSTAL** オートリーダーでパネルを判定して下さい。
4. 記録された反応と表2（31 ページ）の反応とを比較します。

その他の品質管理試験用菌株の予想試験結果は表2（37 ページ）にあります。

使用手順の限界

BBL CRYSTAL E/NF 同定検査キットは、本添付文書で指定されているE/NF 菌株の同定用です。表1に記載のない菌株は、本システムの使用対象ではありません。本システムは修正微生物培養環境を使用していますので、個々の検査の予想値は、従来法の結果と異なる場合があります。**BBL CRYSTAL** E/NF 同定検査キットの精度は、特定の設計をした試験の統計的利用と独自のデータベースに基づいています。

抗血清が利用できる時は、サルモネラ菌、サルモネラ菌サブグループ3、赤痢菌属、病原性大腸菌A-D、コレラ菌など選択した微生物の生化学的同定を抗原分析によって確認して下さい。^{9,16}

ポリエステル製の綿棒で菌液を調製すると、菌液に粘りが出る可能性があるため、菌液の調製には綿製の綿棒のみを使用して下さい。菌液に粘りが出ると、ウェルを満たすための量に足りなくなる恐れがあります。封印された袋からいったん取り出したリッドは、高性能を確保するために必ず1時間以内に使用して下さい。使用の時まで、リッドはビニール袋に入れておいて下さい。

培養中、反応ウエルからの菌液の蒸発を防ぐため、パネルを入れたフラン器内を加湿して下さい。望ましい温度は40～60°です。

接種後、基質の反応を最大にするため、パネルは表面を下に向けた（大きな窓が上に、ラベルが下に向くように）状態で培養します。

コロニーはトリプチケース5%羊血液寒天培地等から採取して下さい。マッコンキ-寒天平板の使用も可能です。

性能特性

再現性：臨床検査機関3施設で評価を行い、E/NF用基質（30）反応の再現性を検討しました。その結果個々の基質の反応の再現性は96.3～100%であり、**BBL CRYSTAL E/NF**同定検査キットの全般的再現性は99.6%と判定されました。

同定の精度：臨床分離株と保存株を用いて、**BBL CRYSTAL E/NF**同定検査キットの性能を、現在市販されているシステムと比較しました。

社内研究では、**BBL CRYSTAL E/NF**システムの性能が評価検討されました。169の腸内細菌および非腸内細菌の分離菌（45種）検査結果を分析し、異なる同定結果が出た場合は、他の市販システムを使って相違を解消しました。これらの結果は下記のとおりです。

N=169	補完試験なしの同定	補完試験を伴う同定	同定不能 または誤った同定
BBL CRYSTAL E/NF	163 (96.4%)	167 (98.8%)	2 (1.2%)

BBL CRYSTAL E/NF同定検査キットの性能は、独立臨床検査機関3施設で評価検討されました。¹⁸ 臨床検査機関に到着するルーティンの新鮮分離菌、並びに臨床実験施設が選択した、以前に同定済みの分離菌の双方を使用して、性能特性を確立しました。

これらの臨床検査機関の現行同定法により検査された299の新鮮臨床分離株の内、本システムは、96.7%（289）を正確に同定しました。この中には、2～3種類の該当細菌が報告されて、同定のために補完試験を行った16のケースも含まれています。

これらの臨床検査機関の現行同定法により確認された、以前に同定済みの同定の難しい菌株291の内、本システムは、96.9%（282）を正確に同定しました。この中には、2～3種類の該当細菌が報告されて、同定のために補完試験を行った8つのケースも含まれています。¹³

参考文献：英文の"References"欄を御参照下さい。

包装単位

カタログ番号

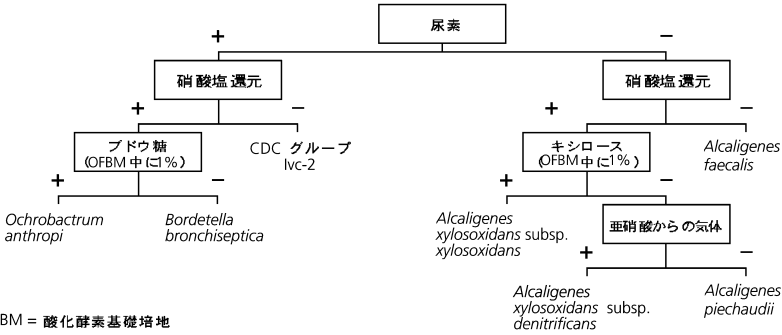
245000	BBL CRYSTAL E/NF 同定検査キット (BBL CRYSTAL E/NF パネル・リッド、 BBL CRYSTAL ベース、 BBL CRYSTAL グラム陰性菌用プロス各20個入り)
245031	BBL CRYSTAL パネルピュアー、米国用機種、110V、60Hz
245032	BBL CRYSTAL パネルピュアー、欧州用機種、220V、50Hz
245033	BBL CRYSTAL パネルピュアー、日本用機種、100V、50/60 Hz
245034	BBL CRYSTAL パネルピュアー-長波長UV管

カタログ番号

245036	BBL CRYSTAL パネルピュアー-白色電球
245002	BBL CRYSTAL 同定検査キットE/NF マニュアルコードブック
245029	BBL CRYSTAL グラム陰性菌用プロス、10本
245300	BBL CRYSTAL オートリーダー
221239	トリプチケース5%羊血液寒天培地、20枚入り
221261	トリプチケース5%羊血液寒天培地 100枚入り
261187	BBLDMACA インドール試薬スポイト、50個
261181	BBL オキシダーゼ試薬スポイト、50個

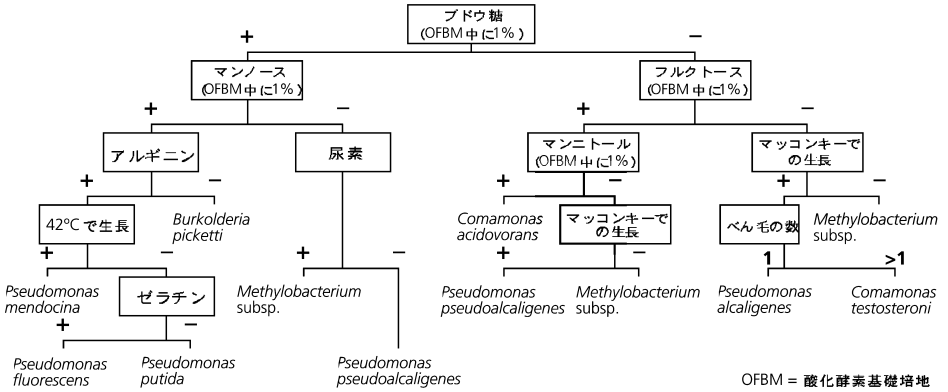
その他のグラム陰性桿菌

図1 (周毛による移動)



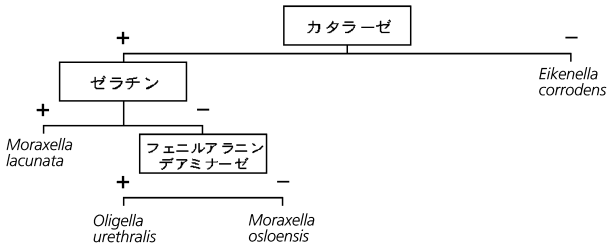
その他のグラム陰性桿菌

図2 (極毛による移動)



その他のグラム陰性桿菌

図3 (非移動性)



参考文献:

1. Gilardi, G.L., *Identification of Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Rods*, 1/90
2. Manual of Clinical Microbiology, 5th Edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1991



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



Use by / Spotřebujte do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použít do / Usar antes de / Använd före / Исполняйте до / A se utiliza până la / Son kullanna tarhi

YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce)
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutning af måned) /
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand)
 AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp)
 VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä)
 AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) /
 JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) /
 EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /
 ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja)
 AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) /
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mēnesio pabaiga)
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av månaden)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiac)
 aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden) /
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца) /
 AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii) /
 YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu)



Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Katalogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalógové číslo / Número de catálogo / Καταложен номер / Număr de catalog / Katalog numeras



Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret representant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autoriseret EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autoriseret representant i EU / Autorizovaný zástupce v Unii Europejskiej / Reprezentante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Reprezentante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Оторизиран представител в EU / Reprezentant autorizat în Uniunea Europeană / Avrupa Topluluğu Yetkili Temsilcisi



In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostiska meditsiiniparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches in-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnostizáltak orvosi eszközök / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietaisas / In vitro diagnostisk medicinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik / Медицински уред за диагностика ин витро / Aparatură medicală de diagnosticare in vitro / In Vitro Diagnostik Tibbi Cihaz



Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperatuurlimiet / Temperatuuri piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturenbereich / Οριο θερμοκρασίας / Hőmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrænsning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenie teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning / Температурни ограничения / Limitare de temperatură / Sicaklık sınırlaması



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



Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeđa kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen / Направете справка в инструкциите за употреба / Consultați instrucțiunile de utilizare / Kullanım Talimatları'na başvurun



Becton, Dickinson and Company
 7 Loveton Circle
 Sparks, Maryland 21152 USA
 800-638-8663



BENEX Limited
 Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate
 Shannon, County Clare, Ireland
 Tel: 353-61-47-29-20
 Fax: 353-61-47-25-46