

**MASSNAHMEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE****I EINFÜHRUNG**

Phenylalanin-Agar ist ein Medium für die Differenzierung von Enterobazillen auf der Grundlage ihrer Fähigkeit, durch oxidative Deaminierung Phenylbrenztraubensäure zu produzieren.

**II LEISTUNGSPRÜFUNG**

1. Repräsentative Proben mit den nachstehend aufgeführten Kulturen inokulieren.
  - a. Mit einer kalibrierten 0,01-mL-Impföse die Agar-Oberflächen mit einer 10<sup>-1</sup>-Verdünnung von 18 bis 24 Stunden alten Kulturen auf **Trypticase**-Sojabouillon inokulieren.
  - b. Die Röhren mit gelösten Verschlüssen in einer aeroben Atmosphäre bei 35 ± 2 °C inkubieren.
2. Röhren nach 18 bis 24 h auf Wachstum überprüfen.
3. Zu jedem Röhren fünf Tropfen 10%ige wässrige Eisen (III)-Chloridlösung hinzufügen und auf Bildung einer dunkelgrünen Färbung überwachen (positive Reaktion).
4. Zu erwartende Ergebnisse

<b>Organismus</b>	<b>ATCC</b>	<b>Reaktion</b>
<i>*Proteus vulgaris</i>	8427	Positive Reaktion (grün)
<i>Morganella morganii</i>	8019	Positive Reaktion (grün)
<i>Providencia rustigianii</i>	12013	Positive Reaktion (grün)
<i>*Escherichia coli</i>	25922	Negative Reaktion (kein Farbumschlag)

\* Empfohlener Organismusstamm für die für Qualitätssicherung durch den Anwender.

**III ZUSÄTZLICHE QUALITÄTSKONTROLLE**

1. Röhren wie unter „Haltbarkeit des Produkts“ beschrieben begutachten.
2. Die repräsentativen Röhren auf sichtbare Beschädigungen prüfen, durch die ihre Verwendung beeinträchtigt werden könnte.
3. Nicht inokulierte repräsentative Röhren bei 20 bis 25 °C und 30 bis 35 °C inkubieren und nach 7 Tagen auf mikrobielle Kontamination untersuchen.

**PRODUKTINFORMATIONEN****IV VERWENDUNGSZWECK**

Phenylalanin-Agar dient zur Differenzierung von Enterobazillen auf der Grundlage von deren Fähigkeit, durch oxidative Deaminierung Phenylbrenztraubensäure zu produzieren.

**V ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG**

Erstmals wurde von Henrickson aufgezeigt, dass die *Proteus*-Spezies die Fähigkeit besitzt, Phenylalanin in Phenylbrenztraubensäure umzuwandeln.<sup>1</sup> Singer und Volcani,<sup>2</sup> Hamida und LeMinor<sup>3</sup> und andere studierten diese Reaktion und unterstrichen ihre Bedeutung bei der Klassifikation der *Enterobacteriaceae*.

Buttiaux et al. entwickelten im Rahmen ihrer Studie über die charakteristischen biochemischen Eigenschaften der Genera *Proteus* und *Providencia* ein Phenylalanin-haltiges Kulturmedium.<sup>4</sup> Dieses Medium wurde zur Differenzierung von Mitgliedern der *Proteae* von anderen Mitgliedern der *Enterobacteriaceae* vorgesehen, basierend auf der Fähigkeit der Organismen in den Genera der *Proteae*, durch enzymatische Aktivität Phenylalanin in Phenylbrenztraubensäure zu deaminieren.<sup>5</sup> Diese Fähigkeit weisen die Spezies *Proteus*, *Providencia* und *Morganella* auf. Bei **BBL Phenylalanine Agar** handelt es sich um eine Modifizierung der ursprünglichen Zusammensetzung von Ewing et al.<sup>6</sup>

**VI VERFAHRENSGRUNDLAGEN**

Phenylalanin dient als Substrat für Enzyme, die dieses Substrat deaminieren und daraus Phenylbrenztraubensäure bilden können. Durch Hinzufügen von vier bis fünf Tropfen 10%iger wässriger Eisen (III)-Chloridlösung (oder 12%iger wässriger Eisen (III)-Chloridlösung, gesäuert mit 2,5 mL konzentriertem HCl pro 100 mL Reagenz) zu den Kulturen im Anschluss an die Inkubation erscheint eine hell- bis dunkelgrüne Färbung (positive Reaktion) bzw. kein Farbumschlag (negative Reaktion).

## VII REAGENZIEN

### Phenylalanin-Agar

Ungefähre Zusammensetzung\* pro L destilliertem Wasser

DL-Phenylalanin .....	2,0	g
Hefeextrakt .....	3,0	g
Natriumchlorid .....	5,0	g
Natriumphosphat .....	1,0	g
Agar .....	12,0	g

\*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

**Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:** *In-vitro*-Diagnostikum.

Fest verschlossene Röhrchen sollten vorsichtig geöffnet werden, um Verletzungen durch Glasbruch zu vermeiden.

Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen und Anwendung aseptischer Techniken erfolgen. Präparierte Röhrchen, Probenbehälter und sonstige kontaminierte Materialien nach Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

**Aufbewahrung:** Nach Erhalt Röhrchen im Dunkeln bei 2 – 8 °C lagern, Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor Lichteinwirkung schützen. Medien in Röhrchen, die vor Gebrauch gemäß der Anleitung auf dem Etikett gelagert werden, können bis zum Verfallsdatum inokuliert und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden. Das Medium vor der Inokulation auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

**Haltbarkeit des Produkts:** Röhrchen bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

## VIII PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Die Handhabung der für die Kultivierung geeigneten Proben kann auf verschiedene Arten geschehen. Detaillierte Informationen enthält die entsprechende Fachliteratur.<sup>7,8</sup> Die Proben sollten vor der Verabreichung von Antibiotika entnommen werden. Für einen umgehenden Transport zum Labor ist zu sorgen.

## IX VERFAHREN

**Mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** Phenylalanine Agar Slants

**Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und Laborgeräte nach Bedarf.

**Testverfahren:** Aseptische Kautelen beachten.

Die Röhrchenschräge mit einem starken Inokulat einer 18 bis 24 h alten Reinkultur inokulieren. Die Röhrchen unter aeroben Bedingungen bei 35 ± 2 °C 4 h bzw. 18 bis 24 h lang inkubieren. Bei ausreichend starkem Inokulat ist eine Inkubationszeit von 4 h ausreichend.

**Qualitätskontrolle durch den Anwender:** Siehe „Massnahmen zur Qualitätskontrolle“.

Die Qualitätskontrollen müssen unter Einhaltung der örtlich, landesweit und/oder bundesweit geltenden Bestimmungen oder der Auflagen der Akkreditierungsorganisationen sowie den Standard-Qualitätskontrollverfahren Ihres Labors erfolgen. Es wird empfohlen, die korrekten Qualitätskontrollverfahren den geltenden CLSI-Richtlinien und CLIA-Bestimmungen zu entnehmen.

## X ERGEBNISSE

Im Anschluss an die Inkubation vier bis fünf Tropfen Eisen (III)-Chlorid-Reagenz auf den Schrägagar auftragen. Das Röhrchen vorsichtig drehen, um das Wachstum zu lösen. Auf grüne Farbbildung (positive Reaktion) innerhalb von 1 bis 5 min prüfen.

Mitglieder der Genera *Proteus*, *Morganella* und *Providencia* erzielen positive Ergebnisse. Andere Genera innerhalb der *Enterobacteriaceae* testen auf Phenylbrenztraubensäureproduktion negativ.<sup>9,10</sup>

## XI VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Eine positive Reaktion muss innerhalb von 5 Min. nach Hinzufügen des Reagenzes festgestellt werden, da die grüne Färbung schnell wieder verschwindet.

Einige weitere Stämme der *Enterobacteriaceae* sind ebenfalls Phenylalanin-positiv: *Enterobacter agglomerans* (20 %), *Enterobacter sakazakii* (50 %), *Rahnella aquatilis* (95 %), and *Tatumella ptyseos* (90 %).<sup>10</sup>

Zur Identifizierung müssen die Mikroorganismen in Reinkultur vorliegen. Für die endgültige Identifizierung sollten morphologische, biochemische und/oder serologische Tests durchgeführt werden. Detaillierte Informationen und empfohlene Verfahren sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.<sup>7-9</sup>

## XII LEISTUNGSMERKMALE

Vor der Freigabe werden alle Chargen von Phenylalanin-Schrägagar auf ihre Leistungsmerkmale getestet. Mit einer kalibrierten 0,01-mL-Impföse werden repräsentative Proben der Charge mit  $10^{-1}$  verdünnten Kulturen von *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Morganella morganii* (ATCC 8019), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427) und *Providencia rustigianii* (ATCC 12013) auf **Trypticase-Soja-Agar** durch Ausstreichen inokuliert. Die Röhrcchen werden mit gelösten Verschlüssen bei  $35 \pm 2$  °C inkubiert. Nach 18 bis 24 h Inkubation werden die Schrägseiten auf die Wachstumsmenge untersucht. Alle Kulturen weisen mittleres bis starkes Wachstum auf. Anschließend werden zu jedem Röhrcchen 4 bis 5 Tropfen 10%ige Eisen (III)-Chloridlösung hinzugefügt. Das Röhrcchen wird vorsichtig gedreht, um das Wachstum zu lösen. Innerhalb von 1 bis 5 min weisen die mit *M. morganii*, *P. vulgaris* und *P. rustigianii* inokulierten Schrägkulturen eine intensive Grünfärbung auf (positive Reaktion), ein Indikator für das Vorhandensein von Phenylbrenztraubensäure im Medium. Bei mit *E. coli* inokulierten Röhrcchen tritt an der Schrägseite keine Reaktion auf (kein Farbumschlag).

## XIII LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung
221342	BD BBL Phenylalanine Agar Slants, Packung mit 10 Röhrcchen der Größe K

## XIV LITERATUR

1. Henrikson, S.D. 1950. A comparison of the phenylpyruvic acid reaction and the urease test in the differentiation of *Proteus* from other enteric organisms. *J. Bacteriol.* 60:225-231.
2. Singer, J., and B.E. Volcani. 1955. An improved ferric chloride test for differentiating *Proteus-Providencia* group from other *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.* 69:303-306.
3. Hamida, F.B., and L. LeMinor. 1956. Une methode rapide de recherche de la transformation de la L-phenylalanine en acide phenylpyruvique. *Ann. Inst. Pasteur.* 90:671-673.
4. Buttiaux, R., R. Osteux, R. Fresnoy, and J. Moriamez. 1954. Les propriétés biochimiques caractéristiques du genre *Proteus*. Inclusion souhaitable des *Providencia* dans celui-ci. *Ann. Inst. Pasteur Lille.* 87:375-386.
5. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
6. Ewing, W.H., B.R. Davis and R.W. Reavis. 1957. Phenylalanine and malonate media and their uses in enteric bacteriology. *Public Health Lab.* 15:153.
7. Murray, P.R., E.J. Baron J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.) 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
9. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. Bergey's Manual™ of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
10. Farmer, J.J., III. 1999. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification, p. 442-458. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

BD Diagnostics Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung oder [www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds).



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



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

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.  
BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD