

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD**I INTRODUCCION**

Phenylalanine Agar (agar fenilalanina) es un medio para la diferenciación de bacilos entéricos sobre la base de su capacidad para producir ácido fenilpirúvico por desaminación oxidativa.

II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

1. Inocular muestras representativas con los cultivos enumerados a continuación.
 - a. Con un asa calibrada de 0,01 mL, inocular las superficies de agar con diluciones de 10^{-1} de cultivos de caldo de soja **Trypticase** de 18 – 24 h.
 - b. Incubar los tubos con las tapas flojas a 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia.
2. Examinar los tubos después de 18 – 24 h para detectar crecimiento.
3. Agregar cinco gotas de solución de cloruro férrico acuoso al 10% a cada tubo, y observar la generación de un color verde oscuro (reacción positiva).
4. Resultados previstos

Microorganismos	ATCC	Reacción
<i>*Proteus vulgaris</i>	8427	Reacción positiva (color verde)
<i>Morganella morganii</i>	8019	Reacción positiva (color verde)
<i>Providencia rustigianii</i>	12013	Reacción positiva (color verde)
<i>*Escherichia coli</i>	25922	Reacción negativa (sin cambio de color)

*Cepa de organismo recomendada para control de calidad del usuario.

III CONTROL DE CALIDAD ADICIONAL

1. Examinar los tubos como se describe en la sección “Deterioro del producto”.
2. Examinar visualmente los tubos representativos para asegurarse de que los defectos físicos existentes no interfieran con el uso.
3. Incubar tubos representativos sin inocular a una temperatura de 20 – 25 °C y 30 – 35 °C y examinar después de 7 días en busca de contaminación microbiana.

INFORMACION DEL PRODUCTO**IV USO PREVISTO**

Phenylalanine Agar se utiliza para la diferenciación de bacilos entéricos sobre la base de su capacidad de producir ácido fenilpirúvico por desaminación oxidativa.

V RESUMEN Y EXPLICACION

Henrickson en un principio demostró que la especie *Proteus* era capaz de transformar la fenilalanina en ácido fenilpirúvico¹. Singer y Volcani,² Hamida y LeMinor³ y otros, estudiaron la reacción y resaltaron su utilidad en la taxonomía de las *Enterobacteriaceae*.

Buttiaux et al. desarrollaron un medio de cultivo con fenilalanina en su estudio de las propiedades bioquímicas características de los géneros *Proteus* y *Providencia*⁴. Este medio se diseñó para diferenciar los miembros de *Proteeae* de otros miembros de *Enterobacteriaceae* por la capacidad de los organismos de los géneros de *Proteeae* para la desaminación de la fenilalanina en ácido fenilpirúvico mediante actividad enzimática⁵. Las especies *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* poseen esta capacidad. **BBL Phenylalanine Agar** es una modificación de la fórmula original de Ewing et al⁶.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La fenilalanina sirve como sustrato para las enzimas capaces de producir desaminación de la fenilalanina para formar ácido fenilpirúvico. La adición de 4 – 5 gotas de la solución de cloruro férrico acuoso al 10% (o una solución de cloruro férrico acuoso al 12% acidificada con 2,5 mL de HCl concentrado por 100 mL de reactivo) a los cultivos después de la incubación, da como resultado la generación de un color verde de claro a intenso (reacción positiva) o ausencia de color (reacción negativa).

VII REACTIVOS**Phenylalanine Agar**

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

DL-Fenilalanina	2,0	g
Extracto de levadura	3,0	g
Cloruro sódico	5,0	g
Fosfato sódico	1,0	g
Agar	12,0	g

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Advertencias y precauciones: Para uso diagnóstico *in vitro*.

Los tubos con tapas ajustadas deben abrirse con cuidado para evitar lesiones por la rotura del vidrio.

Emplear una técnica aséptica y seguir las precauciones habituales contra riesgos microbiológicos durante todo el proceso. Después de su utilización, los tubos preparados, los recipientes de muestras y otros materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser desechados.

Instrucciones para el almacenamiento: Al recibir los tubos, almacenarlos en un lugar oscuro a 2 – 8 °C. No congelar ni sobrecalentar. No abrir hasta que vayan a utilizarse. Reducir al mínimo la exposición a la luz. Los medios en tubos almacenados como se indica en sus etiquetas hasta momentos antes de su utilización pueden ser inoculados hasta la fecha de caducidad e incubados durante los períodos recomendados de incubación. Dejar que el medio se caliente a temperatura ambiente antes de la inoculación.

Deterioro del producto: No utilizar los tubos si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación o cualquier otro signo de deterioro.

VIII RECOGIDA Y MANIPULACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras adecuadas para cultivo pueden manipularse mediante diversas técnicas. Para obtener información detallada, consultar los textos correspondientes^{7,8}. Las muestras deben obtenerse antes de administrar los agentes antimicrobianos. Deben adoptarse las medidas necesarias para un transporte inmediato al laboratorio.

IX PROCEDIMIENTO

Material suministrado: Phenylalanine Agar Slants

Materiales necesarios pero no suministrados: Medios de cultivo auxiliar, reactivos, organismos para el control de calidad y el equipo de laboratorio que se requiera.

Procedimiento de análisis: Emplear técnicas asépticas.

Con un inóculo denso, inocular los agares inclinados en tubo con crecimiento de cultivo puro de 18 – 24 h. Incubar los tubos en atmósfera aerobia a 35 ± 2 °C durante 4 h o de 18 a 24 h. Si el inóculo es suficientemente denso, debe bastar con un período de incubación de 4 h⁵.

Control de calidad del usuario: Véase "Procedimientos de control de calidad".

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

X RESULTADOS

Después del período de incubación, agregar 4 – 5 gotas de reactivo de cloruro férrico a los agares inclinados. Girar suavemente el tubo para que el crecimiento se suelte. Observar la producción de color verde (reacción positiva) en un plazo de 1 – 5 min.

Los miembros de los géneros *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* producen resultados positivos. Otros géneros dentro de *Enterobacteriaceae* son negativos a la producción de ácidos penilpirúvicos^{9,10}.

XI LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Una reacción positiva debe interpretarse dentro de los 5 min posteriores a la adición de reactivo, ya que el color verde desaparece rápidamente.

Otras cepas de *Enterobacteriaceae* también dan resultado positivo a la fenilalanina. *Enterobacter agglomerans* (20%), *Enterobacter sakazakii* (50%), *Rahnella aquatilis* (95%) y *Tatumella ptyseos* (90%)¹⁰.

Para su identificación, los organismos deben encontrarse en un cultivo puro. Deben llevarse a cabo pruebas morfológicas, bioquímicas y/o serológicas para lograr una identificación final. Consultar los textos correspondientes para obtener información detallada y procedimientos recomendados⁷⁻⁹.

XII CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de Phenylalanine Agar Slants se someten a prueba para determinar sus características de rendimiento. Mediante un asa calibrada de 0,01 mL, se inoculan mediante extensión muestras representativas del lote con cultivos de caldo de soja **Trypticase** diluidos a 10⁻¹ de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Morganella morganii* (ATCC 8019), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427) y *Providencia rustigianii* (ATCC 12013). Los tubos se incuban con las tapas flojas a 35 ± 2 °C. Después de una incubación de 18 – 24 h, los agares inclinados se observan para detectar la cantidad de crecimiento. Todos los cultivos muestran crecimiento de moderado a denso. Posteriormente se agregan a cada tubo 4 – 5 gotas de solución acuosa al 10% de cloruro férrico. Los tubos se giran suavemente para que el crecimiento se suelte. Después de 1 – 5 min, los agares inclinados inoculados con *M. morganii*, *P. vulgaris* y *P. rustigianii* producen un color verde intenso (reacción positiva), que indica la presencia de ácido fenilpirúvico en el medio. La falta de reacción (sin cambio de color) es típica del agar inclinado inoculado con *E. coli*.

XIII DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
221342	BD BBL Phenylalanine Agar Slants, pqt. de 10 tubos de tamaño K

XIV REFERENCIAS

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 phenyl-pyruvique. *Ann. Inst. Pasteur.* 90:671-673.
4. Buttiaux, R., R. Osteux, R. Fresnoy, and J. Moriamez. 1954. Les proprietes biochimiques caracteristiques 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.

Servicio técnico de BD Diagnostics: póngase en contacto con el representante local de BD o visite 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