

**PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE****I INTRODUCTION**

La gélose Phenylalanine Agar est un milieu servant à la différenciation des bacilles entériques sur la base de leur capacité de production d'acide phénylpyruvique par désamination oxydative.

**II MODE OPERATOIRE DU TEST**

1. Ensemencer des échantillons représentatifs avec les cultures répertoriées ci-dessous.
  - a. Utiliser une anse calibrée (0,01 mL) pour ensemencer les surfaces gélosées avec des cultures de bouillon de **Trypticase Soy Broth** diluées au 1/10 et âgées de 18 à 24 heures.
  - b. Incuber les cultures, avec les bouchons desserrés, en atmosphère aérobie, à une température de  $35 \pm 2$  °C.
2. Examiner les tubes au bout de 18 à 24 h afin de contrôler la croissance.
3. Ajouter cinq gouttes d'une solution aqueuse contenant 10 % de chlorure ferrique dans chaque tube et contrôler la formation d'une couleur vert foncé (réaction positive).

## 4. Résultats attendus

<b>Microorganisme</b>	<b>ATCC</b>	<b>Réaction</b>
<i>*Proteus vulgaris</i>	8427	Réaction positive (couleur verte)
<i>Morganella morganii</i>	8019	Réaction positive (couleur verte)
<i>Providencia rustigianii</i>	12013	Réaction positive (couleur verte)
<i>*Escherichia coli</i>	25922	Reazione negativa (nessun viraggio)

\*Souche recommandée pour le Contrôle de qualité réalisé par l'utilisateur.

**III CONTROLE DE QUALITE SUPPLEMENTAIRE**

1. Examiner les tubes comme décrit à la rubrique « Détérioration du produit ».
2. Inspecter visuellement des tubes représentatifs pour s'assurer qu'aucun défaut physique ne peut interférer avec leur utilisation.
3. Incuber des tubes représentatifs non ensemencés entre 20 et 25 °C et 30 et 35 °C, et les examiner après 7 jours pour déceler une contamination microbienne éventuelle.

**INFORMATIONS PRODUIT****IV APPLICATION**

La Phenylalanine Agar (gélose phénylalanine) est utilisée pour différencier les bacilles entériques sur la base de leur capacité de production d'acide phénylpyruvique par désamination oxydative.

**V RESUME ET EXPLICATION**

Henrickson a démontré que l'espèce *Proteus* était capable de transformer la phénylalanine en acide phénylpyruvique.<sup>1</sup> Singer et Volcani,<sup>2</sup> Hamida et LeMinor<sup>3</sup> et d'autres ont étudié cette réaction et ont démontré son utilité dans la taxonomie de la famille des *Enterobacteriaceae*.

Buttiaux et al. ont développé un milieu de culture contenant de la phénylalanine dans le cadre de leur étude sur les propriétés biochimiques caractéristiques des genres *Proteus* et *Providencia*.<sup>4</sup> Ce milieu a été développé dans le but de différencier les membres de la famille des *Proteae* des autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae* par la capacité des organismes *Proteae* à désaminer la phénylalanine en acide phénylpyruvique par une activité enzymatique.<sup>5</sup> Les espèces *Proteus*, *Providencia* et *Morganella* possèdent cette capacité. La Phenylalanine Agar de **BBL** est une modification de la formulation originale d'Ewing et al.<sup>6</sup>

**VI PRINCIPES DE LA METHODE**

La phénylalanine est utilisée comme substrat pour les enzymes capables de la désaminer en acide phénylpyruvique. Si quatre à cinq gouttes d'une solution aqueuse contenant 10 % de chlorure ferrique (ou d'une solution aqueuse contenant 12 % de chlorure ferrique acidifiée avec 2,5 mL de HCl concentré par 100 mL de réactif) sont ajoutées aux cultures après leur incubation, on constate l'apparition d'une couleur verte allant du clair ou foncé (réaction positive) ou aucun changement de couleur (réaction négative).

## VII REACTIFS

### Phénylalanine Agar

Formule approximative\* par litre d'eau purifiée

DL-phénylalanine .....	2,0	g
Extrait de levure .....	3,0	g
Chlorure de sodium .....	5,0	g
Phosphate de sodium .....	1,0	g
Gélose .....	12,0	g

\*Ajustée et/ou complétée en fonction des critères de performances imposés.

**Avertissements et précautions :** Réservé au diagnostic *in vitro*.

Ouvrir avec précaution les tubes étroitement bouchés pour ne pas risquer d'être blessé par un bris de verre.

Toujours utiliser des techniques aseptiques et prendre les précautions en vigueur contre les dangers microbiologiques. Après utilisation, stériliser à l'autoclave les tubes préparés, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé avant de les éliminer.

**Instructions pour la conservation :** Dès réception, conserver les tubes dans l'obscurité, à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Ne pas ouvrir prématurément. Maintenir à l'abri de la lumière. Les milieux en tube conservés conformément aux instructions jusqu'au moment de leur utilisation peuvent êtreensemencés jusqu'à la date de péremption indiquée et incubés pendant les durées recommandées. Laisser le milieu s'équilibrer à température ambiante avant de l'ensemencer.

**Détérioration du produit :** Ne pas utiliser les tubes s'ils présentent des signes de contamination microbienne, décoloration ou dessiccation, ou d'autres signes de détérioration.

## VIII PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons adaptés à la mise en culture peuvent être manipulés selon différentes techniques. Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.<sup>7,8</sup> Prélever les échantillons avant l'administration des agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

## IX PROCEDURE

**Matériaux fournis :** Phénylalanine Agar Slants

**Matériaux requis mais non fournis :** Milieux de culture auxiliaires, réactifs, souches de contrôle de qualité et matériel de laboratoire requis.

**Mode opératoire du test :** Respecter les techniques d'asepsie.

A l'aide d'un inoculum lourd, ensemencer les géloses inclinées en tubes avec une croissance provenant d'une culture pure âgée de 18 à 24 h. Incuber les tubes en atmosphère aérobie à 35 ± 2 °C pendant 4 h ou pendant 18 à 24 h. Si l'inoculum est suffisamment lourd, une incubation d'une durée de 4 h suffit généralement.<sup>5</sup>

**Contrôle de qualité par l'utilisateur :** Voir « Procédures de contrôle de qualité ».

Effectuer les contrôles de qualité conformément à la réglementation nationale et/ou internationale, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives CLSI et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

## X RESULTATS

A la fin de la période d'incubation, verser quatre à cinq gouttes de réactif au chlorure ferrique sur les pentes. Faire doucement tourner le tube pour détacher la croissance. Observer l'apparition d'une couleur verte (réaction positive) dans un délai d'1 à 5 min.

Les membres des genres *Proteus*, *Morganella* et *Providencia* produisent des résultats positifs. D'autres genres de la famille des *Enterobacteriaceae* produisent des résultats négatifs pour la production d'acide phénylpyruvique.<sup>9,10</sup>

## XI LIMITES DE LA PROCEDURE

Une réaction positive doit être interprétée dans les 5 min suivant l'ajout du réactif car la couleur verte disparaît rapidement.

Quelques souches de la famille des *Enterobacteriaceae* se révèlent également positives au test de phénylalanine :

*Enterobacter agglomerans* (20 %), *Enterobacter sakazakii* (50 %), *Rahnella aquatilis* (95 %) et *Tatumella ptyseos* (90 %).<sup>10</sup>

Pour procéder à l'identification, les organismes doivent se trouver en culture pure. Des tests morphologiques, biochimiques et/ou sérologiques doivent être effectués pour l'identification finale. Pour plus d'informations, et pour connaître les procédures recommandées, consulter les publications citées en référence.<sup>7-9</sup>

## XII CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Tous les lots de Phenylalanine Agar Slants sont soumis à des tests en usine permettant d'évaluer les caractéristiques de leurs performances. A l'aide d'une anse calibrée (0,01 mL), des échantillons représentatifs du lot sont ensemencés avec des cultures de bouillon de **Trypticase** Soy Broth, diluées au 1/10 d'*Escherichia coli* (ATCC 8019), de *Morganella morganii* (ATCC 8019), de *Proteus vulgaris* (ATCC 8427) et de *Providencia rustigianii* (ATCC 12013). Les tubes sont incubés, avec les bouchons desserrés, à  $35 \pm 2$  °C. La croissance sur les pentes est évaluée au bout de 18 à 24 h d'incubation. Toutes les cultures présentent une croissance modérée à forte. Ensuite, 4 à 5 gouttes d'une solution aqueuse contenant 10 % de chlorure ferrique sont ajoutées à chaque tube. Le tube doit être remué doucement pour détacher la croissance. En l'espace d'1 à 5 min, les pentes ensemencées avec *M. morganii*, *P. vulgaris* et *P. rustigianii* produisent une couleur vert foncé (réaction positive) indiquant la présence d'acide phénylpyruvique dans le milieu. Aucune réaction (pas de changement de couleur) ne se produit sur la pente ensemencée avec *E. coli*.

## XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
221342	<b>BD BBL</b> Phenylalanine Agar Slants, boîte de 10 tubes de taille K

## XIV REFERENCES

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.

Service et assistance technique de BD Diagnostics : contacter votre représentant local de BD ou consulter le site [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