

PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ**I INTRODUZIONE**

BBL Phenylalanine Agar è un terreno usato per la differenziazione di bacilli enterici in base alla capacità di produrre acido fenilpiruvico mediante deaminazione ossidativa.

II PROCEDURA DEL TEST

1. Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sotto elencate.
 - a. Con l'ausilio di un'ansa calibrata da 0,01 mL, inoculare le superfici agar usando diluizioni 10^{-1} di colture di 18 – 24 h di **Trypticase Soy Broth**.
 - b. Incubare le provette – con i tappi non completamente avvitati – a 35 ± 2 °C in aerobiosi.
2. Esaminare le provette dopo 18 – 24 h per verificare la crescita.
3. Dispensare cinque gocce di soluzione acquosa di cloruro ferrico al 10% in ogni provetta e verificare l'eventuale sviluppo di una colorazione verde scura (reazione positiva).

4. Risultati attesi

Organismo	ATCC	Reazione
<i>*Proteus vulgaris</i>	8427	Reazione positiva (color verde)
<i>Morganella morganii</i>	8019	Reazione positiva (color verde)
<i>Providencia rustigianii</i>	12013	Reazione positiva (color verde)
<i>*Escherichia coli</i>	25922	Reazione negativa (nessun viraggio)

*Ceppo batterico raccomandato per il controllo di qualità a cura dell'utente.

III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

1. Esaminare le provette come descritto in "Deterioramento del prodotto".
2. Eseguire un esame visivo delle provette rappresentative per garantire che l'eventuale presenza di difetti fisici non interferisca con l'uso.
3. Incubare a 20 – 25 °C e a 30 – 35 °C le provette rappresentative non inoculate ed esaminarle dopo 7 giorni per verificare la contaminazione microbica.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO**IV USO PREVISTO**

BBL Phenylalanine Agar è un terreno usato per la differenziazione di bacilli enterici in base alla capacità di produrre acido fenilpiruvico mediante deaminazione ossidativa.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Henrickson ha inizialmente dimostrato la capacità di *Proteus* spp. di trasformare la fenilalanina in acido fenilpiruvico.¹ Singer e Volcani,² Hamida e LeMinor³ et al. hanno studiato la reazione, sottolineandone l'utilità nella tassonomia delle *Enterobacteriaceae*.

In uno studio delle proprietà biochimiche caratteristiche dei generi *Proteus* e *Providencia*, Buttiaux et al. hanno sviluppato un terreno di coltura contenente fenilalanina,⁴ concepito per differenziare i membri della famiglia delle *Proteeae* da altri membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* in base alla capacità dei microrganismi appartenenti ai vari generi della famiglia delle *Proteeae* di deaminare la fenilalanina in acido fenilpiruvico mediante attività enzimatica.⁵ *Proteus*, *Providencia* e *Morganella* spp. possiedono tale capacità. **BBL Phenylalanine Agar** è una modifica della formula originaria di Ewing et al.⁶

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

La fenilalanina funge da substrato per gli enzimi in grado di deaminarla per formare acido fenilpiruvico. L'aggiunta di quattro o cinque gocce di soluzione acquosa di cloruro ferrico al 10% (o soluzione acquosa di cloruro ferrico al 12% acidificata con 2,5 mL di HCl concentrato per 100 mL di reagente) alle colture dopo l'incubazione, determina lo sviluppo di una colorazione verde chiara – intensa (reazione positiva) o nessun viraggio (reazione negativa).

VII REAGENTI**BBL Phenylalanine Agar**

Formula approssimata* per L di acqua purificata

DL-fenilalanina	2,0	g
Estratto di lievito	3,0	g
Cloruro di sodio	5,0	g
Fosfato sodico	1,0	g
Agar	12,0	g

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di performance.

Avvertenze e precauzioni: Per uso diagnostico *in vitro*.

Aprire con estrema cautela le provette con i tappi serrati allo scopo di evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.

Durante tutte le procedure, adottare tecniche asettiche e seguire le precauzioni standard contro i rischi microbiologici. Dopo l'uso, le provette preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati devono essere sterilizzati in autoclave prima dello smaltimento.

Istruzioni per la conservazione: Al ricevimento, conservare le provette al buio a 2 – 8 °C. Evitare congelamento e surriscaldamento. Aprire soltanto al momento dell'uso. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. I terreni in provetta conservati come indicato sull'etichetta sino al momento dell'uso, possono essere inoculati fino alla data di scadenza e incubati per i tempi di incubazione raccomandati. Prima dell'inoculo, attendere che il terreno si porti a temperatura ambiente.

Deterioramento del prodotto: Non usare le provette se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, essiccamento o altri segni di deterioramento.

VIII RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

I campioni idonei per coltura possono essere manipolati con varie tecniche. Per informazioni dettagliate, consultare la documentazione appropriata.^{7,8} Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

IX PROCEDURA

Materiale fornito: BBL Phenylalanine Agar Slants

Materiali necessari ma non forniti: Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Procedura del test: Adottare tecniche asettiche.

Usando un inoculo di rilevante entità, inoculare gli slant in provetta con la crescita di una coltura pura di 18 – 24 h. Incubare le provette in aerobiosi a 35 ± 2 °C per 18 – 24 h. Se l'inoculo è di entità sufficiente, un'incubazione di 4 h dovrebbe risultare adeguata.⁵

Controllo di qualità a cura dell'utente: Vedere "Procedure di controllo di qualità".

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione CLSI in merito.

X RISULTATI

Dopo la fase di incubazione, dispensare quattro o cinque gocce di reagente cloruro ferrico negli slant. Roteare delicatamente la provetta per stimolare la crescita. Osservare se entro 1 – 5 min si sviluppa una colorazione verde (reazione positiva).

I membri dei generi *Proteus*, *Providencia* e *Morganella* producono risultati positivi. Gli altri generi nell'ambito delle *Enterobacteriaceae* sono negativi per la produzione di acido fenilpiruvico.^{9,10}

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Interpretare le reazioni positive entro 5 min dalla dispensazione del reagente in quanto la colorazione verde svanisce rapidamente.

Alcuni ceppi di *Enterobacteriaceae* sono anche fenilalanina-positivi: *Enterobacter agglomerans* (20%), *Enterobacter sakazakii* (50%), *Rahnella aquatilis* (95%) e *Tatumella ptyseos* (90%).¹⁰

Ai fini dell'identificazione, i microrganismi devono essere in coltura pura. Per l'identificazione finale, è necessario eseguire test morfologici, biochimici e/o sierologici. Per informazioni dettagliate e procedure raccomandate, consultare la documentazione appropriata.⁷⁻⁹

XII PERFORMANCE

Prima della spedizione, vengono testate le performance di tutti i lotti di slant Phenylalanine Agar. Con l'ausilio di un'ansa calibrata da 0,01 mL, campioni rappresentativi del lotto vengono inoculati con uno striscio di colture in **Trypticase** Soy Broth diluite 10⁻¹ di *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Morganella morganii* (ATCC 8019), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427) e *Providencia rustigianii* (ATCC 12013). Le provette vengono incubate a 35 ± 2 °C, con i tappi non completamente avvitati. Dopo 18 – 24 h di incubazione, gli slant vengono esaminati per verificare l'entità della crescita. Tutte le colture evidenziano crescita moderata – intensa. Successivamente, vengono dispensate in ogni provetta 4 – 5 gocce di soluzione acquosa di cloruro ferrico al 10%. La provetta viene delicatamente roteata per stimolare la crescita. Entro 1 – 5 min, gli slant inoculati con *M. morganii*, *P. vulgaris* e *P. rustigianii* sviluppano una colorazione verde intensa (reazione positiva) indicante la presenza di acido fenilpiruvico nel terreno. Nello slant inoculato con *E. coli* non si ha alcuna reazione (nessun viraggio).

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
------------	-------------

221342	BD BBL Phenylalanine Agar Slants, confezione da 10 provette di misura K
--------	---

XIV BIBLIOGRAFIA

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. Moriametz. 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.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito 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