

POSTUPCI KONTROLE KVALITETE**I UVOD**

Agar fenilalanina podloga je za diferencijaciju enteričnih bacila na temelju njihove mogućnosti da proizvode fenilpiruvične kiseline oksidativne deaminacije.

II POSTUPAK ISPITIVANJA UČINKOVITOSTI

- Inokulirajte reprezentativne uzorke dolje navedenim kulturama.
 - Pomoću ušice kalibrirane na 0,01 mL inokulirajte površine agara s 10^{-1} otopine kulture sojinog bujona **Trypticase Soy Broth** od 18 – 24 h.
 - Inkubirajte epruvete s malo odvjanim čepovima na 35 ± 2 °C u aerobnoj atmosferi.
- Pregledajte epruvete nakon 18 – 24 h i pregledajte rast.
- Dodajte pet kapi 10%-tne vodene otopine željezo-klorida u svaku epruvetu i provjerite stvaranje tamnozeleno boje (pozitivna reakcija).
- Očekivani rezultati

Organizam	ATCC	Reakcija
* <i>Proteus vulgaris</i>	8427	Pozitivno (zelena boja)
<i>Morganella morganii</i>	8019	Pozitivno (zelena boja)
<i>Providencia rustigianii</i>	12013	Pozitivno (zelena boja)
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Negativno (bez promjene boje)

*Preporučeni soj organizama za korisničku kontrolu kvalitete.

III DODATNA KONTROLE KVALITETE

- Provjerite epruvete prema objašnjenju iz poglavlja „Pogoršanje kvalitete proizvoda“.
- Vizualno pregledajte reprezentativne epruvete da biste utvrdili kako nemaju fizičkih oštećenja koja mogu utjecati na upotrebu.
- Inkubirajte neinokulirane reprezentativne epruvete na 20 – 25 °C i 30 – 35 °C te nakon 7 dana potražite kontaminaciju mikrobima.

INFORMACIJE O PROIZVODU**IV NAMJENA**

Agar fenilalanina koristi se za diferencijaciju enteričnih bacila na temelju njihove mogućnosti da proizvode fenilpiruvične kiseline oksidativne deaminacije.

V SAŽETAK I OBJAŠNENJE

Henrickson je početno pokazao da su vrste *Proteus* imale mogućnost transformacije fenilalanina u fenilpiruvičnu kiselinu.¹ Singer i Volcani,² Hamida i LeMinor³ i suradnici proučavali su reakciju i naglasili korisnost tog agara u taksonomiji vrste *Enterobacteriaceae*.

Buttiaux i suradnici razvili su podlogu kulture koja sadrži fenilalanin u svojoj studiji karakterističnih biokemijskih svojstava vrste *Proteus* i *Providencia*.⁴ Ta je podloga dizajnirana za diferencijaciju članova roda *Proteae* od ostalih članova *Enterobacteriaceae* zahvaljujući mogućnosti da organizmi iz roda *Proteae* deaminiraju fenilalanin u fenilpiruvičnu kiselinu enzimskom aktivnošću.⁵ Tu mogućnost imaju vrste *Proteus*, *Providencia* i *Morganella*. **BBL Phenylalanine Agar** (agar fenilalanin) je modifikacija originalne formulacije Ewinga i suradnika.⁶

VI NAČELA POSTUPKA

Fenilalanin služi kao supstrat za enzime koji ga mogu deaminirati u fenilpiruvičnu kiselinu. Dodavanjem četiri ili pet kapi 10%-tne vodene otopine željezo-klorida (ili 12% vodene otopine željezo-klorida zakiseljene s 2,5 mL koncentriranog HCl-a u svakih 100 mL reagensa) u kulture nakon čega ide inkubacija, nastaje svijetlozelena do tamnozeleno boja (pozitivna reakcija) ili nema promjene boje (negativna reakcija).

VII REAGENSI

Agar fenilalanin

Približna formula* po litri pročišćene vode

DL-fenilalanin	2,0 g
Ekstrakt kvasca	3,0 g
Natrijev klorid	5,0 g
Natrijev fosfat	1,0 g
Agar	12,0 g

*Prilagođeno i/ili dodano prema potrebi kako bi se udovoljilo kriterijima učinkovitosti.

Upozorenja i mjere opreza: Za *in vitro* dijagnostiku.

Epruvete sa zategnutim čepovima treba oprezno otvarati kako ne bi došlo do ozljeda pri pucanju stakla.

Primjenjujte aseptične tehnike i utvrđene mjere opreza protiv mikrobioloških opasnosti tijekom svih postupaka. Nakon upotrebe, pripremljene epruvete, spremnici za uzorke i ostali kontaminirani materijali moraju se sterilizirati u autoklavu prije odlaganja.

Upute za čuvanje: Epruvete po primitku pohranite na tamnom mjestu na temperaturi od 2 °C do 8 °C. Pazite da ne dođe do smrzavanja i pregrijavanja. Otvorite neposredno prije upotrebe. Smanjite izlaganje svjetlosti na najmanju moguću mjeru. Podloge u epruvetama koje se čuvaju prema uputama na naljepnici prije same upotrebe mogu se inokulirati sve do isteka roka valjanosti i inkubirati tijekom preporučenih rokova inkubacije. Prije inokulacije pričekajte da se podloga zagrije do sobne temperature.

Pogoršanje kvalitete proizvoda: Ne upotrebljavajte epruvete ako imaju vidljive znakove kontaminacije mikrobima, promjene boje, sušenja ili ostale znakove pogoršanja kvalitete.

VIII PRIKUPLJANJE UZORAKA I RUKOVANJE

Uzorci pogodni za podlogu mogu se obraditi raznim tehnikama. Detaljne informacije potražite u odgovarajućim tekstovima.^{7,8} Uzorke treba uzeti prije obrade protumikrobnih agensa. Potrebno je izraditi propise za brzu dostavu u laboratorij.

IX POSTUPAK

Priloženi materijal: Kosi agar fenilalanin

Potreban materijal koji se nabavlja zasebno: podloga za dodatne kulture, reagensi, organizmi za kontrolu kvalitete i laboratorijska oprema prema potrebi.

Postupak ispitivanja: Primjenjujte aseptične tehnike.

Korištenjem jakog inokuluma, inokulirajte kose podloge u epruvetama čiste kulture s rastom od 18 do 24 h. Inkubirajte epruvete aerobno na 35 ± 2 °C 4 h ili 18 – 24 h. Ako se dobije dovoljno inokuluma, razdoblje inkubacije od 4 h trebalo bi biti dovoljno.⁵

Korisnička kontrola kvalitete: Pogledajte poglavlje „Postupci kontrole kvalitete“

Zahtjevi kontrole kvalitete moraju biti ispunjeni u skladu s važećim lokalnim, državnim i/ili saveznim propisima ili uvjetima akreditiranja i postupcima standardne kontrole kvalitete vašeg laboratorija. Preporučuje se da korisnik konzultira relevantne smjernice CLSI-ja i propise CLIA kako bi se upoznao s odgovarajućim postupcima kontrole kvalitete.

X REZULTATI

Nakon inkubacije dodajte četiri ili pet kapi željezo-klorida u kosi agar. Lagano rotirajte epruvetu da biste oslobodili rast. Pratite nastajanje zelene boje (pozitivna reakcija) u roku 1 – 5 min.

Članovi roda *Proteus*, *Morganella* i *Providencia* daju pozitivne rezultate. Ostali rodovi unutar *Enterobacteriaceae* negativni su u stvaranju fenilpiruvične kiseline.^{9,10}

XI OGRANIČENJA POSTUPKA

Pozitivnu reakciju treba interpretirati u roku prvih 5 min nakon dodavanja reagensa jer se zelena boja brzo gubi.

Nekoliko ostalih sojeva *Enterobacteriaceae* također je pozitivno na fenilalanin: *Enterobacter agglomerans* (20%), *Enterobacter sakazakii* (50%), *Rahnella aquatilis* (95%) i *Tatumella ptyseos* (90%).¹⁰

Za identifikaciju organizmi moraju biti u čistoj kulturi. Za konačnu identifikaciju potrebno je provesti morfološka, biokemijska i/ili serološka ispitivanja. U odgovarajućim poglavljima potražite dodatne informacije i preporučene postupke.⁷⁻⁹

XII RADNA SVOJSTVA

Prije izdavanja ispitana su radna svojstva svih pakiranja kosih agara fenilalanina. Pomoću kalibrirane ušice od 0,01 mL razmazivanjem su inokulirani reprezentativni uzorci serije s kulturama sojinog bujona **Trypticase** razrijeđene s 10^{-1} vrste *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Morganella morganii* (ATCC 8019), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427) i *Providencia rustigianii* (ATCC 12013). Epruvete su inkubirane s odviženim čepovima na 35 ± 2 °C. Nakon inkubacije 18 – 24 h na kosom agaru provjeren je rast. Sve kulture pokazale su umjeren do jak rast. Prema tome, 4 – 5 kapi 10%--tne vodene otopine željezo-klorida dodano je u svaku epruvetu. Epruveta se lagano rotira da bi se oslobodio rast. U roku 1 – 5 min kosi agari inokulirani s *M. morganii*, *P. vulgaris* i *P. rustigianii* stvorili su zelenu boju (pozitivna reakcija) što znači prisutnost fenilpiruvične kiseline u podlozi. Nije bilo reakcije (bez promjene boje) za kose agare inokulirane s *E. coli*.

XIII DOSTUPNOST

Kat. br.	Opis
221342	BD BBL Phenylalanine Agar Slants (kosi agar fenilalanina), pakiranje od 10 epruveta veličine K

XIV REFERENCE

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.

Tehnički servis i podrška na BD Diagnostics: obratite se lokalnom predstavniku tvrtke BD ili posjetite 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