

ISTRUZIONI PER L'USO

PHENYLALANINE AGAR

Terreno di coltura in polvere


 Phenylalanine Agar: da sinistra provetta non inocolata, *P. mirabilis* +, *E. coli* -

1 - DESTINAZIONE D'USO

 Diagnostico *in vitro*. Terreno per la differenziazione dei generi *Proteus*, *Morganella* e *Providencia* dagli altri enterobatteri sulla base del test di deaminazione della fenilalanina.

2 - COMPOSIZIONE
FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)*

Estratto di lievito	3 g
D-L fenilalanina	2 g
Sodio fosfato bibasico	1 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	15 g

* Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

 Phenylalanine Agar è un terreno differenziale sviluppato da Buttieux¹ e successivamente modificato da Ewing, Davis, e Reavis². È da usarsi in provetta per la differenziazione dei generi *Proteus*, *Providencia* e *Morganella* dagli altri enterobatteri sulla base del test di deaminazione della fenilalanina ad acido fenilpiruvico. Tale reazione enzimatica è evidenziata dalla aggiunta al terreno di cloruro ferrico che, reagendo con l'acido fenilpiruvico, dà luogo ad un complesso di color verde. L'estratto di lievito è una fonte di carbonio ed azoto per la crescita batterica, il sodio fosfato agisce da sistema tampone, il sodio cloruro mantiene l'equilibrio osmotico del terreno.

4- METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 26 g di polvere in 1000 ml di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione; distribuire in provette ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Lasciar solidificare in modo da ottenere un lungo becco di clarino ed un corto fondo.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, bianca
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	incoloro, limpido
pH (20-25°C)	7,2 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Phenylalanine Agar	Terreno di coltura in polvere	4019162	500 g (19,2 L)

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, provette, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

Reagente cloruro ferrico: ferro cloruro 12 g, HCL concentrato 2,5 ml, acqua purificata 100 ml.

8 - CAMPIONI

Il campione è costituito da colture pure di batteri isolati da campioni clinici o altri materiali

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Inoculare il terreno pesantemente con un'ansata di crescita di una coltura pura del ceppo in esame, strisciando sul becco del clarino. Incubare in aerobiosi per 18-24 ore a 35-37 °C. Se la provetta è inocolata pesantemente, potrebbe essere sufficiente un periodo di incubazione di 4 ore.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, aggiungere alla crescita sul becco di clarino 4-5 gocce di reagente cloruro ferrico e ruotare delicatamente la provetta. Il test positivo (deaminazione della fenilalanina) è indicato dallo sviluppo di una colorazione da verde lieve a verde intenso sul clarino ed a carico del reattivo, entro 1-5 minuti.

Il test negativo è indicato dall'assenza di colore verde: il reattivo rimane giallo.

Proteus spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp risultano positivi al test di deaminazione della fenilalanina mentre gli altri enterobatteri risultano negativi.




11 - CONTROLLO DI QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T° / t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>P.mirabilis</i> ATCC 25933	35-37°C / 18-24H / A	sviluppo di colorazione verde dopo aggiunta di reattivo cloruro ferrico
<i>E.coli</i> ATCC 25922	35-37°C / 18-24H / A	il reattivo cloruro ferrico non sviluppa colorazione verde

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di terreno in polvere Phenylalanine Agar viene testato per le caratteristiche prestazionali, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

Colonie pure coltivate su Tryptic Soy Agar di 5 ceppi con risultato atteso positivo (*P.vulgaris* ATCC 9484, *P.mirabilis* ATCC 10005, *P.stuartii* ATCC 33672, *P.morganii* d'isolamento clinico, *P.rettgeri* ATCC 39944) e 4 ceppi con risultato atteso negativo (*E.coli* ATCC 25922, *E.aerogenes* ATCC 13048, *K.pneumoniae* ATCC 27736, *S.Thyphimurium* ATCC 14028), vengono inoculati per striscio sul becco di clarino del terreno in provetta. Dopo incubazione a 35-37 °C per 18-25 ore in aerobiosi, viene aggiunto il reattivo cloruro ferrico ed osservato il viraggio di colore. Tutti i ceppi mostrano una reattività secondo le specifiche per entrambi i lotti testati.

13 - LIMITI DEL METODO

- La lettura della reazione con l'osservazione del cambiamento di colore verso il verde deve essere letta entro 5 minuti dall'aggiunta del reattivo poiché il colore tende a diminuire velocemente. La rotazione della provetta per impregnare il becco di clarino con il reattivo, contribuisce a rendere la reazione più rapida ed il colore più intenso.³
- L'identificazione completa dei microrganismi esaminati sul terreno deve essere effettuata con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato. e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utilizzatore è responsabile del processo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).




BIBLIOGRAFIA

- Buttiaux R, Osteux R, Fresnoy R, Moriamez J. Les propriétés biochimiques caractéristiques de genre Proteus: inclusion souhaitable des Providencia dans celui-ca. Ann Inst Pasteur Lille 1954; 87:375.
- Ewing WH, Davis BR Reavis RW. Phenylalanine and malonate media and their use in enteric bacteriology. Publ Health Lab 1975; 15:153.
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.





TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	o REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del layout	06/2020
Revisione 7	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	03/2022
Revisione 8	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

