

ISTRUZIONI PER L'USO

DEOXYRIBONUCLEASE TEST MEDIUM

Terreno di coltura in polvere


 DNase Test Medium –
da sinistra *S.aureus* DNasi +, *K.pneumoniae* DNasi -

1 - DESTINAZIONE D'USO

 Diagnostico *in vitro*. Terreno per la differenziazione dei microrganismi sulla base della produzione dell'enzima desossiribonucleasi (DNasi).

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

Triptosio	20 g
Acido desossiribonucleico	2 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

 Deoxyribonuclease Test Medium, preparato secondo la formula di Jeffries, Holtman e Guse¹, è un terreno differenziale per la messa in evidenza della produzione dell'enzima DNasi. Questo test, insieme ad altri, è utile nella identificazione di *Staphylococcus aureus* (+)² e per distinguere i ceppi non pigmentati di *Serratia* (+) da *Klebsiella-Enterobacter* (-).³

 Cunningham, Catlin e Garilhe⁴ nel 1956 hanno dimostrato che i ceppi di *S.aureus* coagulasi positivi, mannitolo fermentanti e cromogeni, producono una desossiribonucleasi termostabile calcio-dipendente, capace di idrolizzare i legami 5'-fosfodiesterici del DNA e come tale distinguibile dagli altri enzimi simili di origine diversa. Weckman e Caltin⁵ in uno studio condotto su 87 ceppi di stafilococco di origine clinica hanno dimostrato che l'attività desossiribonucleasica è ben correlata con la presenza dell'enzima coagulasi e che il test della coagulasi può essere affiancato dal test della DNasi nella determinazione degli stafilococchi patogeni.

Il triptosio fornisce composti di carbonio e di azoto necessari per la crescita; il sodio cloruro mantiene l'equilibrio osmotico del terreno; l'acido desossiribonucleico permette di evidenziare la DNasi che depolimerizza il DNA.

Con il terreno qui descritto la DNasi è individuata aggiungendo una soluzione di acido cloridrico alle piastre con la crescita in esame che fa precipitare il DNA polimerizzato, rendendo opaco il terreno; nell'area attorno alla crescita di un ceppo DNasi positivo il DNA è depolimerizzato, la precipitazione non avviene ed il terreno rimane trasparente.

Il terreno può essere addizionato con mannitolo, indicatore di pH e coloranti per ottenere informazioni differenziali aggiuntive o per evitare l'uso dell'acido cloridrico per evidenziare la DNasi.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 42 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 47-50°C e distribuire in piastre sterili.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, biancastra
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	biancastro, opalescente
pH (20-25°C)	7,3 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Deoxyribonuclease Test Medium	Terreno di coltura in polvere	4013682	500 g (11,9 L)

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori; soluzione 1N di HCl.

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 da una piastra di agar sangue, TSA, BHI Agar o altro terreno, lungo una striscia o inoculare in più punti usando un'ansa. Su una stessa piastra possono essere inoculati fino a quattro ceppi. Incubare le piastre in aerobiosi per 18 – 24 ore a 35 – 37 °C. Se vengono analizzati ceppi batterici diversi da *Staphylococcus* o *Enterobacteriaceae* o se vengono analizzati i miceti, incubare secondo le rispettive caratteristiche.




10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, versare sulla superficie della piastra circa 10 ml di HCl 1N; la soluzione deve permeare l'intera superficie della piastra; lasciare a temperatura ambiente per alcuni minuti fino a che il terreno diventa omogeneamente opaco.

Il test positivo (produzione di DNasi) è indicato dalla formazione di un'area trasparente attorno alla crescita.

Il test negativo (nessuna produzione di DNasi) è indicato dall'assenza dell'area trasparente.

11 - ADDITIVI DISCREZIONALI

Al terreno di base possono essere aggiunti composti per ottenere informazioni differenziali aggiuntive o per evitare l'uso dell'acido cloridrico per individuare la produzione di DNasi. Il terreno modificato come sotto descritto può essere incubato con le medesime modalità riportate in precedenza.

1. DNase Test Agar W/Mannitol (Coobe⁶): al terreno di base aggiungere, prima della sterilizzazione, mannitolo 10 g/L e rosso fenolo o blu di bromo timolo 0,025 g/L; il terreno così modificato consente di evidenziare anche la fermentazione del mannitolo (sviluppo di colonie gialle con alone giallo).
2. DNasi Test Agar W/Toluidine Blue (Schreir⁷): al terreno di base aggiungere, prima della sterilizzazione, toluidina blu 0,1 g/L; il terreno così modificato di colore blu per la formazione di complessi con il DNA polimerizzato, consente di evidenziare la formazione di DNasi senza l'aggiunta di acido cloridrico alla piastra (DNasi +: zona rosa attorno alla crescita, DNasi -: il terreno rimane blu). Il terreno con toluidina è inibitorio per i Gram positivi quindi si presta alla determinazione della DNasi delle sole *Enterobacteriaceae*.
3. DNasi Test Agar W/Methyl Green (Smith⁸): al terreno di base aggiungere, dopo la sterilizzazione a 47-50°C, 10 ml/L di una soluzione 0,5% in acqua di verde metile, ripetutamente estratta con cloroformio; il terreno così modificato di colore verde per la formazione di complessi con il DNA polimerizzato, consente di evidenziare la formazione di DNasi senza l'aggiunta di acido cloridrico alla piastra (DNasi +: zona incolore attorno alla crescita, DNasi -: il terreno rimane verde).

12 - 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>S. aureus</i> ATCC 25923	35-37°C / 18-24H / A	alone trasparente attorno alla crescita (DNasi +)
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 27736	35-37°C / 18-24H / A	nessuna reazione specifica (DNasi -)

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

13 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

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

Colonie pure coltivate su Tryptic Soy Agar di 3 ceppi DNasi positivi (*S.aureus* ATCC 25923, *S.mareescens* ATCC 8100, *B.cereus* ATCC 11778) e 2 ceppi DNasi negativi (*K.pneumoniae* ATCC 27736, *S.epidermidis* ATCC 12228) vengono inoculati per striscio sulla superficie del terreno in piastra. Dopo incubazione a 35-37 °C per 18-24 ore in aerobiosi, viene aggiunto il reattivo HCl 1N ed osservata la formazione dell'area di chiarificazione attorno alle crescite. Tutti i ceppi mostrano una reattività secondo le specifiche per entrambi i lotti testati.

14 - LIMITI DEL METODO

- La determinazione dell'enzima DNasi non è un elemento sufficiente a definire la patogenicità degli stafilococchi né è sufficiente all'identificazione del ceppo esaminato; per tali scopi devono essere effettuati test diagnostici addizionali.³
- Altri microrganismi, oltre a *S.aureus* e *S.marcescens* producono DNasi o sono variabili a tale test: *B.bronchispetica*, *P.vulgaris*, *P.mirabilis*, *C.diphtheriae*, *Clostridium septicum*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *A.hydrophila*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Streptococcus*.³
- L'aggiunta di HCl 1N alla piastra inattiva la crescita microbica e le piastre non possono essere ulteriormente incubate o impiegate per altri test diagnostici.
- Sia *S.aureus* che *S.epidermidis* producono una DNasi extracellulare, tuttavia la quantità prodotta da *S.aureus* è di molto superiore.³
- Alcuni ceppi MRSA non danno risultati positivi al test della DNasi e alcuni ceppi di stafilococchi coagulasi negativi come *Staphylococcus capitis* possono dare reazioni deboli.⁹
- 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.

15- PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I terreni in polvere devono essere manipolati con una adeguata protezione delle vie respiratorie. Prima dell'uso consultare la Scheda di Sicurezza del prodotto.
- Il terreno in polvere qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* sugli animali e quelli durante il processo di produzione e distribuzione dei materiali non possono garantire in maniera assoluta che questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto qui descritto con le precauzioni d'uso specifiche per i prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare). Scaricare da sito web www.biolifeitaliana.it il documento con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- 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.
- Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto 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.










**16 - CONSERVAZIONE**

Conservare a +10°C / +30°C al riparo della luce e dall'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 o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento).

17 - BIBLIOGRAFIA

1. Jeffries CD, Holtman D, Guse DG. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J Bacteriol* 1957; 73: 590.
2. Public Health England. UK Standards for Microbiology Investigations. Deoxyribonuclease test. Test Procedure TP 12, 09.18.
3. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
4. Cunningham L, Catlin BW, de Garihe MP. A deoxyribonuclease *Micrococcus pyogenes*. *J Am Chem Soc*, 1956; 78:4642-4645.
5. Weckman BG, Catlin BW Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources. *J. Bacteriol* 1957; 73:747-753.
6. Coobe ER. The rapid recognition of *Staphylococcus aureus*: deoxyribonuclease and coagulase test in correlation with sensitivities and other properties. *Ulster Med J* 1968; 37:146-149.
7. Schreir JB. Modification of deoxyribonuclease test medium for rapid identification of *Serratia marcescens*. *Amer J Clin Path* 1969;51:711-716.
8. Smith PB, Hancock GA, Rhoden DL. Improved medium for detecting deoxyribonuclease-producing bacteria. *Appl Microbiol* 1969; 18: 991-994.
9. Deoxyribonuclease (DNase) Test: Principle, Procedure and results - Learn Microbiology Online.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	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 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	06/2020
Revisione 6	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

