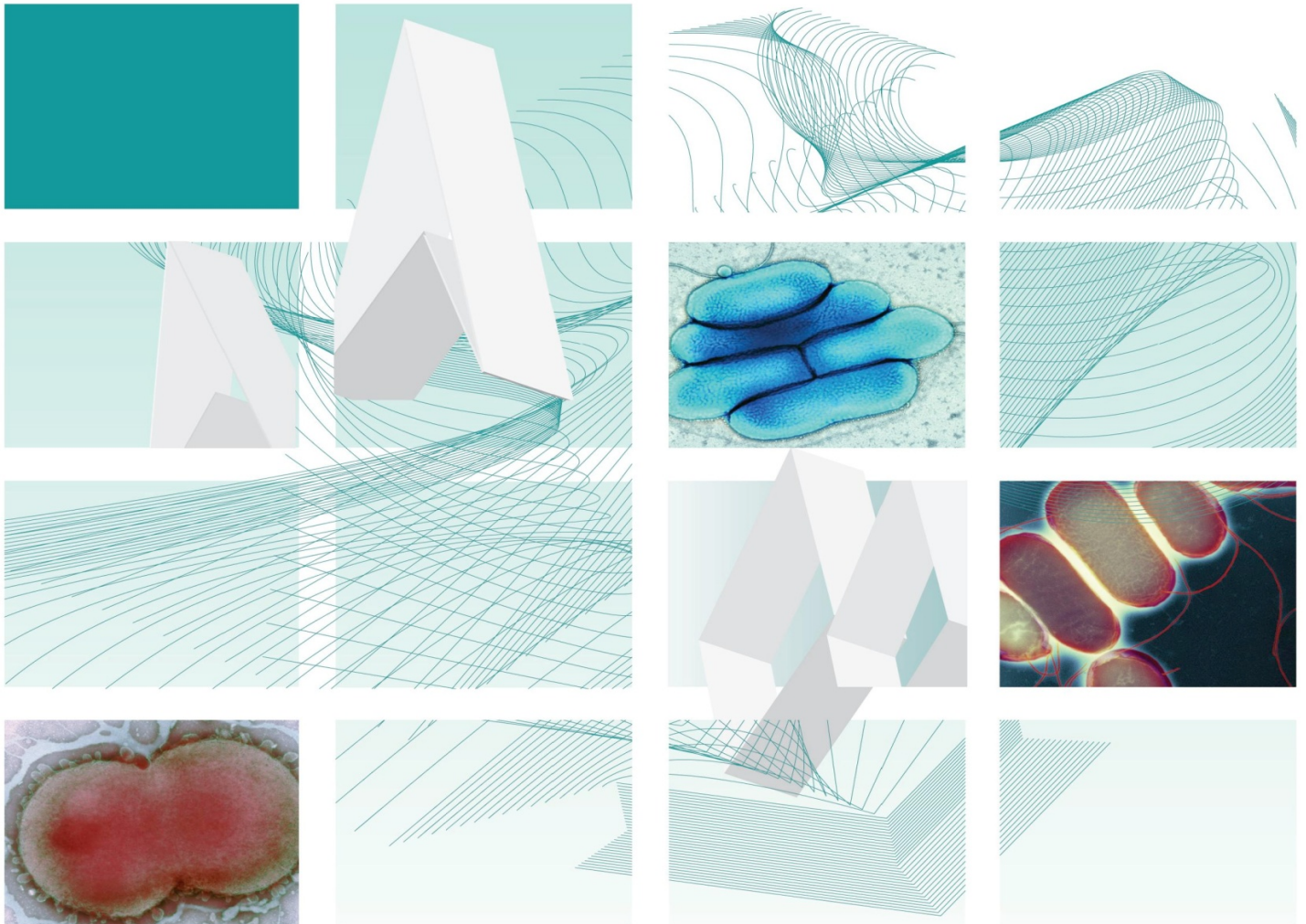




# Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

## Test della Desossiribonucleasi



## Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida della Public Health England (PHE) in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale (NHS - National Health Service), la Sanità Pubblica del Galles e con le organizzazioni professionali i cui loghi sono di seguito elencati sul sito web <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnerships>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <http://www.hpa.org.uk/SMI/WorkingGroups>).

Si ringraziano per contributi forniti i numerosi operatori dei laboratori clinici, gli specialisti e i laboratori di riferimento che hanno fornito informazioni e commenti durante lo sviluppo di questo documento. Si ringraziano i Revisori Medici per le modifiche apportate ai contenuti clinici.

Per ulteriori informazioni contattare:

Standards Unit  
Microbiology Services Division  
Health Protection Agency  
61 Colindale Avenue  
London NW9 5EQ  
E-mail: [standards@phe.gov.uk](mailto:standards@phe.gov.uk)

Website: <http://www.hpa.org.uk/SMI>

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche sono sviluppate con la collaborazione di:



## Contenuti

---

RINGRAZIAMENTI.....	2
COTENUTI.....	3
TABELLA MODIFICHE .....	4
RICERCHE MICROBIOLOGICHE STANDARD DEL REGNO UNITO: SCOPO E OBIETTIVO.....	5
SCOPO DEL DOCUMENTO .....	8
INTRODUZIONE.....	8
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI.....	8
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA .....	9
2 REAGENTI E STRUMENTAZIONE .....	9
3 MICRORGANISMI PER CONTROLLO DI QUALITA' .....	9
4 PROCEDURA E RISULTATI.....	9
APPENDICE: TEST DELLA DESOSSIRIBONUCLEASI .....	11
BIBLIOGRAFIA .....	12



NICE ha accreditato la procedura usata dalla Public Health England per elaborare gli Standards for Microbiology Investigations. L'accreditamento è valido per 5 anni dal Luglio 2011. Informazioni più dettagliate sull'accreditamento possono essere consultate: [www.nice.org.uk/accreditation](http://www.nice.org.uk/accreditation).

Per ulteriori informazioni sul nostro accreditamento consultare: : [www.nice.org.uk/accreditation](http://www.nice.org.uk/accreditation)

## Tabella delle Modifiche

Ciascun metodo SMI possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso la [standards@phe.gov.uk](mailto:standards@phe.gov.uk).

I documenti nuovi o revisionati devono essere controllati in ciascun laboratorio in accordo con il sistema locale di gestione della qualità.

Modifica No/Data.	7/13.03.14
Emissione eliminata. no	2.4
Emissione inserita no.	2.5
<b>Sezione(i) interessate/Pagina no.</b>	<b>Modifica.</b>
Documento intero .	<p>Il documento è stato inserito in un nuovo formato che evidenzia il passaggio della Health Protection Agency alla Public Health England.</p> <p>Prima pagina ridisegnata.</p> <p>Rinominata la pagina di “Stato come Scopo” e Obiettivo ed aggiornata in modo appropriato.</p> <p>I loghi delle organizzazioni professionali sono stati revisionati ed aggiornati.</p> <p>Revisionati e aggiornati Standard di sicurezza e referenti delle denunce</p> <p>Il contenuto scientifico rimane invariato.</p>

Modifica No/Data.	6/05.04.12
Emissione eliminata. no	2.3
Emissione inserita no.	2.4
<b>Sezione(i) interessate.</b>	<b>Modifica.</b>
Intero documento	Documento presentato in nuovo formato.

# Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito<sup>#</sup>: Scopo e Obiettivo

## Utilizzatori delle SMI

- Nel Regno Unito le SMI sono principalmente destinate come risorsa generale ai professionisti che operano nel campo della medicina di laboratorio e delle malattie infettive.
- Le SMI forniscono ai clinici informazioni in merito allo standard dei servizi di laboratorio riferibili alle ricerche per la diagnosi delle infezioni nei loro pazienti e le documentazioni forniscono indicazioni che facilitano la prenotazione elettronica di tests appropriati da parte dei reparti ospedalieri.
- Le SMI forniscono gli standard per le ricerche microbiologiche anche ai responsabili della sanità pubblica che devono considerarle come parte delle procedure da adottare per la salute (sia clinica che pubblica) per la propria popolazione.

## Informazioni di Base per le SMI

Le SMI comprendono algoritmi e procedure raccomandate che riguardano tutte le componenti del processo diagnostico dalla fase pre-analitica (sindrome clinica) alle diverse fasi analitiche (prove di laboratorio) e post-analitiche (interpretazione e comunicazione dei risultati).

Gli algoritmi delle sindromi sono corredati da informazioni più dettagliate contenenti consigli sulle indagini per specifiche malattie e infezioni. Note orientative riguardano il contesto clinico, la diagnosi differenziale e indagini appropriate per particolari condizioni cliniche. Le note orientative descrivono metodologie di laboratorio essenziali che sono alla base della qualità, ad esempio la validazione della prova, la garanzia della qualità, la definizione dell'incertezza della determinazione.

La Standardizzazione del processo diagnostico conseguente all'adozione delle SMI consente di garantire in tutto il Regno Unito strategie d'indagine equivalenti nei diversi laboratori ed è una condizione essenziale per interventi nel campo della sanità pubblica, della sorveglianza, e per le attività di ricerca e di sviluppo. Nel Regno Unito le SMI rappresentano strategie omogenee per le prove diagnostiche e la programmazione degli interventi di sanità pubblica

## Collaborazione Paritaria

La preparazione e stesura delle SMI è effettuata mediante collaborazione paritaria fra PHE, NHS, Royal College of Pathologists e le organizzazioni professionali.

L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito

<http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnerships>

L'inclusione del logo di una organizzazione in una SMI implica il sostegno degli obiettivi e del processo di preparazione del documento. I rappresentanti delle organizzazioni professionali fanno parte del comitato direttivo e dei Gruppi di Lavoro che sviluppano le SMI. Le opinioni dei rappresentanti possono non essere rigorosamente conformi a quelle dei membri delle organizzazioni a cui appartengono né a quelle delle loro organizzazioni. I rappresentanti prescelti rappresentano uno strumento bidirezionale per la consultazione e dialogo. Le opinioni espresse sono ricercate con un processo di consultazione.

Le SMI sono sviluppate, revisionate ed aggiornate con un ampio processo di consultazione

<sup>#</sup> Microbiologia è usato come termine generico per includere le due specialità di Microbiologia Medica riconosciute dal GMC (General Medical Council), (che comprende Batteriologia, Micologia e Parassitologia) e la Virologia Medica.



## Assicurazione di Qualità

Il NICE (National Institute for Health and Care Excellence) ha accreditato la procedura utilizzata dai Gruppi di Lavoro per produrre le SMI. L'accREDITamento è applicabile a tutte le linee guida prodotte dall'Ottobre del 2009. La procedura per lo sviluppo delle SMI è certificata dalla ISO 9001:2008.

Le SMI rappresentano una procedura standard di buona qualità pratica alla quale si devono attenere per la propria attività tutti i laboratori di microbiologia clinica e di sanità pubblica del Regno Unito. Le SMI sono accreditate dal NICE e non rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di complesse indagini di laboratorio disponibili nel Regno Unito. Utilizzando le SMI, i laboratori dovranno tenere conto delle esigenze locali e intraprendere ricerche aggiuntive qualora opportune. Le SMI aiutano i laboratori a soddisfare i requisiti dell'accREDITamento con la promozione di procedure d'elevata qualità che possono essere verificate. Le SMI forniscono inoltre un punto di riferimento per lo sviluppo del metodo. Queste stesse devono essere utilizzate in associazioni con altre SMI.

Le prestazioni della SMI dipendono dal personale ben addestrato e dalla qualità dei reagenti e delle attrezzature utilizzate. I laboratori dovrebbero assicurare che tutti i reagenti di tipo commerciale e quelli messi a punto in laboratorio siano stati validati e risultati idonei allo scopo. I laboratori devono partecipare a programmi di valutazione di qualità esterni ed eseguire le relative procedure del controllo di qualità interno.

## Coinvolgimento del Paziente e della Comunità

Nello sviluppo delle SMI i rispettivi Gruppi di Lavoro sono impegnati per favorire il coinvolgimento dei pazienti e dell'opinione pubblica. Grazie al coinvolgimento pubblico, di operatori sanitari, ricercatori e organizzazioni di volontariato la SMI risultante sarà strutturalmente valida e atta a soddisfare le esigenze dell'utente. L'opportunità di partecipazione per contribuire alla consultazione è estesa al pubblico con l'accesso libero al nostro sito web

## Informazione della Gestione e dei Dati Sensibili

La PHE è un'organizzazione che condivide le direttive Caldicott. Ciò significa prendere ogni possibile precauzione per prevenire la diffusione non autorizzata di informazioni sui pazienti e di garantire che le informazioni relative agli stessi siano mantenute in condizioni di sicurezza.

Lo sviluppo di metodi SMI è assoggettato agli obiettivi PHE di Uguaglianza [http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1317133470313](http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317133470313). I Gruppi di Lavoro SMI sono impegnati a raggiungere gli obiettivi di parità di consultazione efficace con gli appartenenti al pubblico, i partner, le parti interessate ed i gruppi specialistici coinvolti.

## Dichiarazione Legale

Mentre ogni cura è stata intrapresa per la preparazione delle SMI, PHE e ogni altra organizzazione di sostegno, deve, per quanto possibile in base a qualunque legge vigente, escludere la responsabilità per tutte le perdite, costi, reclami, danni o spese derivanti da o connessi all'uso di una SMI o con qualsiasi informazione ivi contenuta. Se si apportano modifiche a una SMI, si deve porre in evidenza dove e da chi sono state effettuate tali modifiche.

Le conoscenze di base e la tassonomia microbica per la SMI sono le più complete possibili, al momento della pubblicazione. Eventuali omissioni e nuove informazioni saranno considerate nel corso della prossima revisione. Queste procedure standard (SMI) possono essere sostituite solo da revisioni dello standard, azione legislativa, o in seguito ad indicazioni da parte dell'ente accreditato NICE.

I diritti d'autore delle SMI sono della "Crown" e questi dovrebbero essere riconosciuti quando appropriato.

## Citazione Suggesta per questo Documento

Public Health England. (2014). Deoxyribonuclease Test. UK Standards for Microbiology Investigations. TP 12 Emissione 2.5. <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>.

## Scopo del Documento

---

Questo test è utilizzato per determinare la capacità di un microrganismo di produrre deossiribonucleasi (DNasi), enzima che è in grado di degradare l'acido desossiribonucleico (DNA). Il test è descritto nella [TP 34 - Thermonuclease Activity Test](#).

## Introduzione<sup>1</sup>

---

Il test è utilizzato principalmente per riconoscere gli stafilococchi patogeni produttori di grandi quantità di DNasi extracellulare. Reagisce con supporti contenenti DNA con conseguente idrolisi del DNA. Gli oligonucleotidi liberati per idrolisi sono solubili in acido e la reazione positiva successiva all'aggiunta di acido cloridrico produce una zona di chiarificazione intorno alla semina. A causa della precipitazione del DNA, dovuta all'azione dell'acido cloridrico, la reazione negativa conduce alla formazione di una soluzione torbida. Diversamente dall'acido cloridrico, il blu di toluidina evidenzia aree più chiaramente delineate relative all'attività della DNasi <sup>2</sup>.

La maggior parte dei ceppi *Staphylococcus aureus* idrolizza il DNA presentando reazioni positive a questo test, diversamente da alcuni MRSA e stafilococchi coagulasi negativi che possono fornire reazioni deboli. Le sottospecie di *Staphylococcus schleiferi* sono DNasi positive e producono nucleasi stabili al calore. Anche alcuni altri organismi, come *Serratia* e specie *Moraxella*, producono deossiribonucleasi.

## Informazioni Tecniche / Limitazioni

---

Semiare i ceppi in aree limitate (spot), compresi i controlli, in modo da non sovrapporli. Confrontare sempre la zona delimitante il ceppo di prova con quelle di controllo.

Alcuni ceppi di *Staphylococcus intermedius* sono DNasi positivi.

Alcuni ceppi di MRSA sono DNasi negativi.

La sottospecie di *Staphylococci schleiferi* sono DNasi positive e producono nucleasi stabili al calore.

Alcuni stafilococchi coagulasi negativi, come *Staphylococcus capitis* producono reazioni deboli.

Questo test deve sempre essere associato a un altro per la conferma dell'identificazione dei ceppi di stafilococco isolati.

L'attività ottimale della DNasi dipende da un'esatta concentrazione di blu di toluidina O (TBO - toluidine blue O) nelle soluzioni usate per sommergere le colonie. Pertanto, si deve porre particolare attenzione al contenuto di colorante disponibile nelle polveri di TBO commerciali disponibili; le concentrazioni di TBO devono corrispondere alle concentrazioni reali del colorante. I calcoli devono includere un fattore di conversione che rappresenta il vero contenuto di colorante nei preparati commerciali<sup>1,2</sup>.



## 1 Considerazioni sulla Sicurezza<sup>3-19</sup>

---

Fare riferimento alle attuali linee guida sulla manipolazione sicura di tutti i microrganismi descritti in questa SMI.

Tutte le procedure che possono generare aerosol devono essere eseguite in cabina microbiologica di sicurezza.

Nota: L'acido cloridrico è una sostanza corrosiva.

Le linee guida precedentemente esplicitate devono essere supplementate con la COSHH locale e con la valutazione del rischio.

## 2 Reagenti e Strumentazione<sup>1,2,17,20</sup>

---

Colonie batteriche isolate cresciute su terreno solido.

Agar per test DNasi

Ansa batteriologica con filo metallico diritto/ ansa (preferibilmente nichelcromo) o, in alternativa, monouso o pipette Pasteur monouso

Acido cloridrico 1 M (3.6%) o

Soluzione da 0.01% a 0.05% di blu di toluidina O.

## 3 Microrganismi per Controllo di Qualità

---

### Controllo positivo

*Staphylococcus aureus* NCTC 6571

### Controllo negativo

*Staphylococcus haemolyticus* NTCT 4276

NB: Questi ceppi non sono validati dalla NCTC per fornire questo risultato

## 4 Procedura e Risultati

---

Tutti i metodi richiedono l'essiccamento dell'umidità superficiale dalle piastre e ciascuna di loro deve essere suddivisa in sezioni con linee tracciate fino al suo fondo.

### 4.1 Semina di area limitata (spot)

- Sfiorare con l'ansa una colonia della specie *Staphylococcus* o *Moraxella* in accertamento e seminare i batteri su una superficie circoscritta della piastra al centro di un'area preselezionata, in modo che al termine dell'incubazione si formi una placca di crescita evidente del diametro 5-10 mm.

### 4.2 Strisciare o tracciare una linea di semina

- Utilizzare un inoculo consistente e disegnare una linea lunga 3-4 centimetri dal bordo verso il centro della piastra.
- Incubare la piastra a 37° C per un minimo di 15 ore e un massimo di 24.

### 4.3 Rilievo attività DNAsi con immersione in acido cloridrico

- Coprire la superficie della piastra con pochi millimetri di acido cloridrico 1M per precipitare il DNA non idrolizzato,.
- Lasciare riposare la piastra per qualche minuto, decantare l'acido cloridrico in eccesso ed esaminare poi su sfondo scuro.
- I DNA non idrolizzato è precipitato e produce nell'agar un'opacità bianca.

#### Risultato positivo

Culture circondate da zone chiare comparabili in ampiezza a quelle del controllo DNasi-positivo.

#### Risultato negativo

Nessuna zona di chiarificazione o zona più limitata rispetto al controllo DNasi-positivo.

### 4.4 Rilievo di attività DNAsi con immersione in soluzione blu di toluidina (TBO)

- Coprire la superficie della piastra con qualche millimetro di TBO che si complessa con il DNA idrolizzato e non idrolizzato.
- Lasciare riposare la piastra per 3-5 minuti, decantare il TBO in eccesso ed esaminare immediatamente. Esaminare a intervalli di 5 minuti per 30 minuti.
- Il colorante TBO forma un complesso con il DNA idrolizzato che produce zone luminose circostanti le colonie rosa su sfondo blu scuro (blu royal). I batteri DNasi-negativi non producono alcun cambiamento del colore di sottofondo.

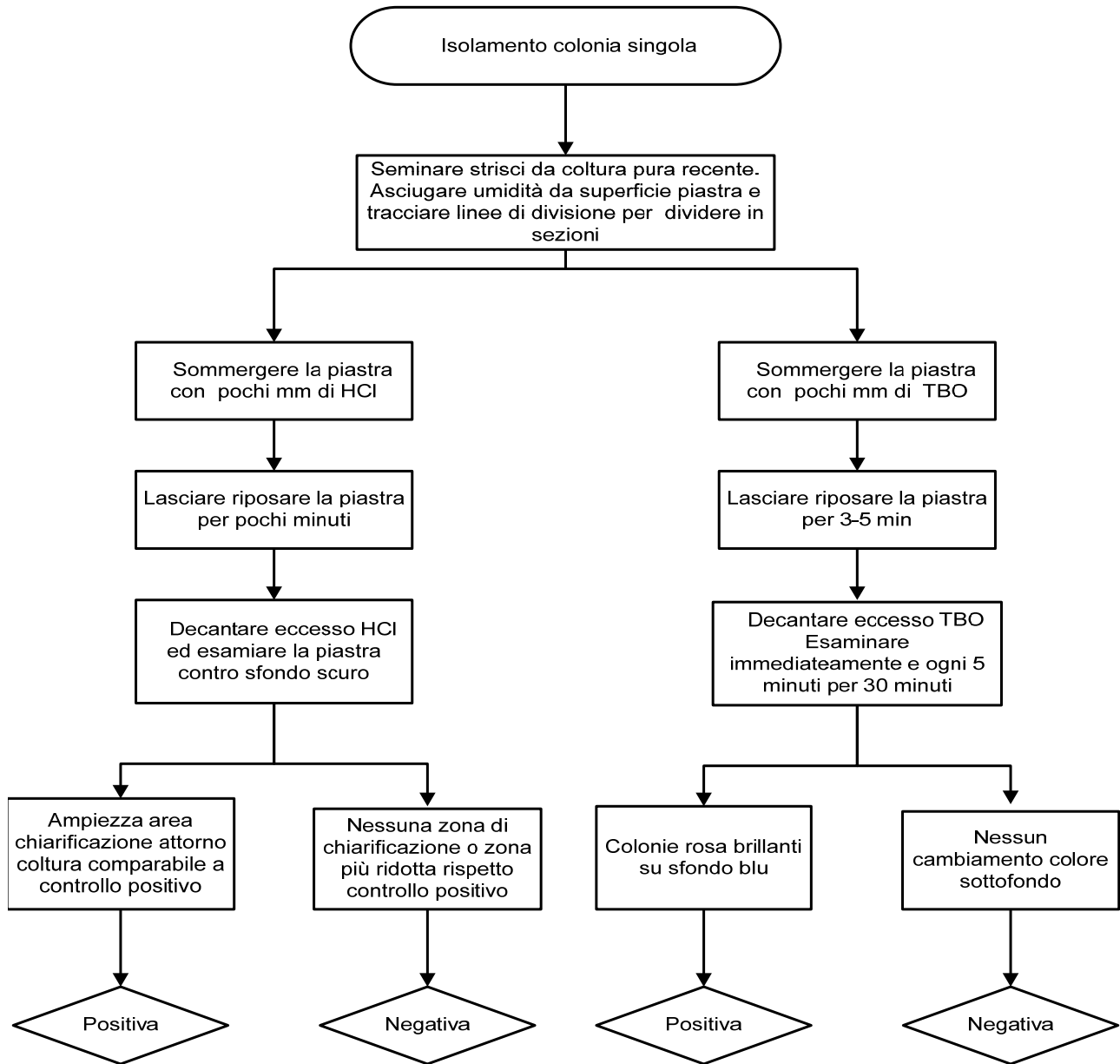
#### Risultato positivo

Zone luminose circostanti le colonie rosa su sfondo blu scuro paragonabile a quello intorno al controllo DNasi positivo.

#### Risultato negativo

Nessun cambiamento del colore di sottofondo.

## Appendice: Desossiribonucleasi



Nota:

**Controllo positivo :** *Staphylococcus aureus* NCTC 6571

**Controllo negativo :** *Staphylococcus haemolyticus* NCTC 4276

## Bibliografia

---

1. MacFaddin JF. Optochin Disk Test. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000. p. 363-7.
2. Waller JR, Hodel SL, Nuti RN. Improvement of two toluidine blue O-mediated techniques for DNase detection. J Clin Microbiol 1985;21:195-9.
3. European Parliament. UK Standards for Microbiology Investigations (SMIs) use the term "CE marked leak proof container" to describe containers bearing the CE marking used for the collection and transport of clinical specimens. The requirements for specimen containers are given in the EU in vitro Diagnostic Medical Devices Directive (98/79/EC Annex 1 B 2.1) which states: "The design must allow easy handling and, where necessary, reduce as far as possible contamination of, and leakage from, the device during use and, in the case of specimen receptacles, the risk of contamination of the specimen. The manufacturing processes must be appropriate for these purposes".
4. Official Journal of the European Communities. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices. 7-12-1998. p. 1-37.
5. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
6. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
7. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
8. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
9. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
10. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
11. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
12. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological Agents: Managing the Risks in Laboratories and Healthcare Premises. Appendix 1.2 Transport of Infectious Substances - Revision. Health and Safety Executive. 2008.
13. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. MMWR Surveill Summ 2012;61:1-102.
14. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. 5th ed. HSE Books; 2002.
15. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
16. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
17. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.

18. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
19. British Standards Institution (BSI). BS 5726:2005 - Microbiological safety cabinets. Information to be supplied by the purchaser and to the vendor and to the installer, and siting and use of cabinets. Recommendations and guidance. 24-3-2005. p. 1-14
20. Snell JJS, Brown DFJ, Roberts C, editors. Quality Assurance Principles and Practice in the Microbiology Laboratory. London: Public Health Laboratory Service; 1999. p. 147-8