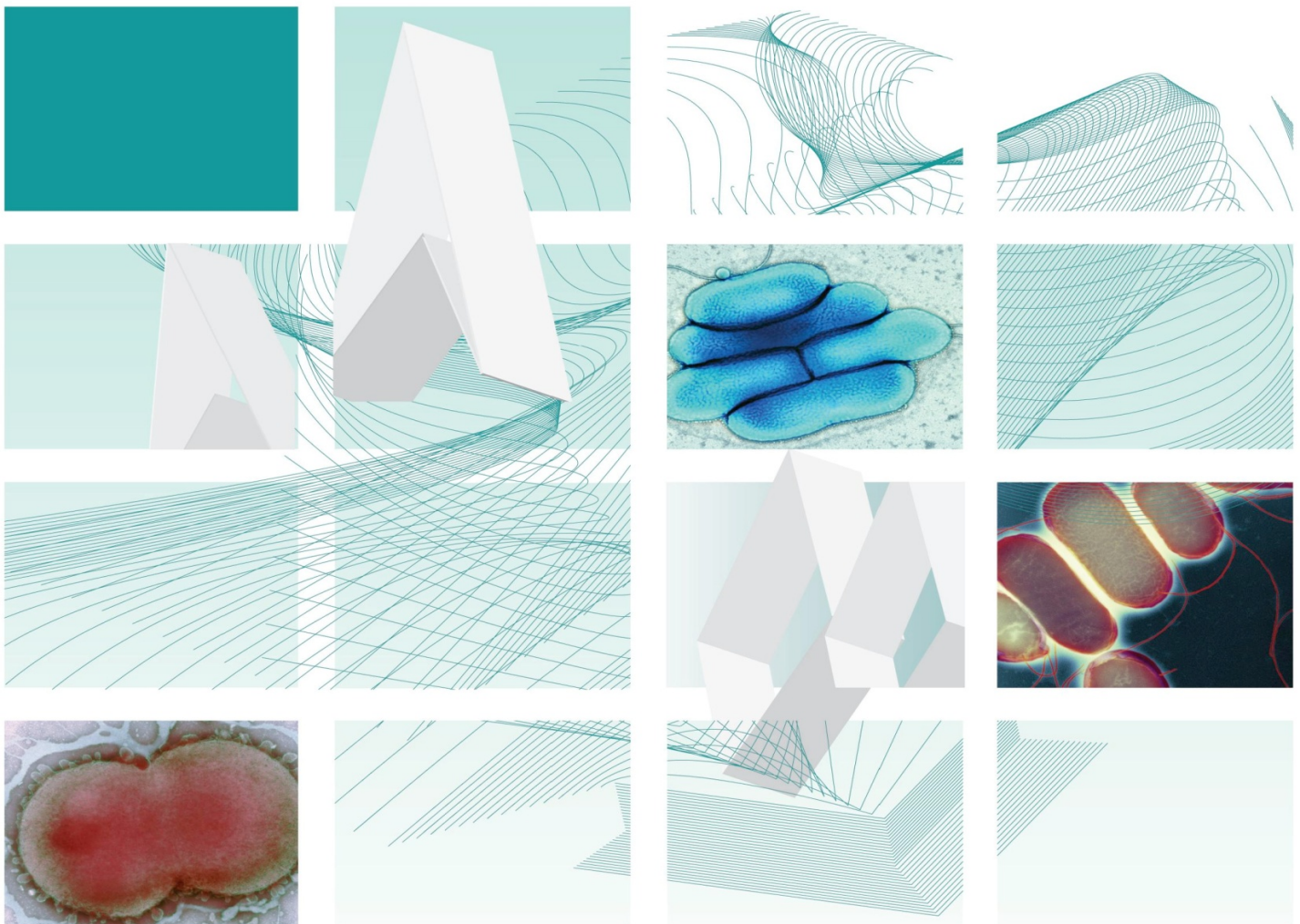




Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

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 <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <https://www.gov.uk/government/groups/standards-for-microbiology-investigations-steering-committee>).

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
Public Health England
61 Colindale Avenue
London NW9 5EQ
E-mail: standards@phe.gov.uk

Website: <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Numero di accesso alle pubblicazioni PHE: 2018493

UK Standards for Microbiology Investigatio



I loghi sono aggiornati al momento della pubblicazione

Contenti

Ringraziamenti	2
Contenuti	3
Tabella modifiche.....	4
Scopo del documento.....	7
Introduzione	7
Informazione tecnica/limitazioni	7
1 Considerazioni sulla sicurezza	9
2 Reagenti e strumentazione	9
3 Microrganismi controllo qualità	9
4 Procedura e risultati	9
Appendice: Test della decarbossilasi	12
Bibliografia	13



NICE ha accreditato la procedura usata dalla Public Health England per elaborare gli Standards for Microbiology Investigations. L'accreditamento è valido fino 30 Giugno 2021Luglio e si applica alle linee guida prodotte usando le procedura descritta negli UK standard for microbiology investigation (UKSMIs Development process,S9365',2016. L'accreditamento originale è iniziato nel Luglio 2011."

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.

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

Modifica numero/data.	9/11.09.18
Emissione eliminata. no	3
Emissione inserita numero	4
Data anticipate prossima revisione*	11.09.21
Sezione(i) interessate	Modifica
Intero documento	Documento aggiornato Limitazioni tecniche / informazioni aggiornate con sottotitoli. Bibliografia aggiornata con valutazione di GRADE (Grading of Recommendation, Assessment and Evaluation) Diagramma di flusso aggiornato . Microrganismi di controllo della qualità aggiornati

*La revisione può essere protratta a cinque anni in funzione delle risorse disponibili.

SMI RU[#]: scopo e obiettivo

Utilizzatori delle SMI del RU

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 test appropriati. I documenti 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.

Informazione di base delle 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 standardizzazione del processo diagnostico conseguente all'adozione delle SMI consente di garantire in tutto il Regno Unito strategie d'indagine equivalenti nei diversi laboratori che è una condizione essenziale per interventi di sorveglianza della salute pubblica, e per le attività di ricerca e di sviluppo.

Coinvolgimento delle organizzazioni professionali

Lo sviluppo delle SMI è condotto in condizione paritaria da PHE, NHS, Royal College of Pathologists e organizzazioni professionali. L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. L'inclusione del logo di un'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 partecipanti non sono necessariamente quelle espresse da tutta l'organizzazione che essi rappresentano. I rappresentanti agiscono da tramite con funzione di collegamento bi-direzionale per informazione e dialogo. Le attività di rappresentanza sono ricercate tramite un processo di consultazione. Le SMI sono sviluppate, revisionate e aggiornate tramite un ampio processo di consultazione.

Assicurazione di qualità

La Nice ha accreditato la procedura usata dai SMI Working Groups per produrre le SMI. L'accREDITAMENTO è applicabile a tutte le linee guida emesse dall'Ottobre 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 rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di

[#] Microbiology is used as a generic term to include the two GMC-recognised specialties of Medical Microbiology (which includes Bacteriology, Mycology and Parasitology) and Medical Virology.

complesse indagini di laboratorio. 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. Le prestazioni della SMI dipendono da 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 che i risultati siano 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 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 <https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/equality-and-diversity>.

I Gruppi di Lavoro SMI del RU 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, la 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 ad una SMI del RU da un utente finale per uso locale, deve essere chiaro dove nel documento queste sono state apportate e da chi e riconosciuto che la PHE e le organizzazioni partner non devono essere coinvolte da responsabilità per tali modifiche. Per maggiore chiarezza, dal momento che le SMI del Regno Unito sono state sviluppate per l'applicazione nel Regno Unito, qualsiasi applicazione al di fuori del Regno Unito è a rischio dell'utente.

Le conoscenze di base e la tassonomia microbica per la SMI del RU sono le più complete possibili, al momento della pubblicazione. Eventuali omissioni e nuove informazioni saranno considerate nel corso della revisione successiva. 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.

Le SMI sono assoggettate a diritti d'autore che dovrebbero essere riconosciuti ove appropriata

Citazione suggerita per documento

Public Health England. (2018). Deoxyribonuclease test. UK Standards for Microbiology Investigations. TP 12 Emissione 4. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

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)¹. Il test della DNasi deve essere usato insieme ad altri test per l'identificazione di *S. aureus*.

Il test è descritto nella [TP 34 - Thermonuclease test](#).

Questa SMI del RU deve essere utilizzata con le altre SMI.

Introduzione

Il test è utilizzato principalmente per riconoscere come prova presuntiva gli stafilococchi presunti patogeni produttori di grandi quantità di DNasi extracellulare. La DNasi reagisce con terreni contenenti DNA con conseguente idrolisi del DNA. Gli oligonucleotidi liberati dall'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 DNasi².

La maggior parte dei ceppi *Staphylococcus aureus* idrolizzano il DNA presentando reazioni positive a questo test, diversamente da alcuni e stafilococchi MRSA coagulasi negativi che possono fornire reazioni deboli come i ceppi di *Staphylococcus capitis*. Alcuni ceppi di *Staphylococcus intermedius* sono DNasi positivi. Le sottospecie di *Staphylococcus schleiferi* sono DNasi positive e producono nucleasi stabili al calore³.

Questo test aiuta anche nella differenziazione dei generi strettamente correlati nella divisione fra *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* delle Enterbatteriaceae e per alcuni altri agenti patogeni, tra questi *Pseudomonas aeruginosa*^{3,4}.

Anche le specie *Serratia* e *Moraxella* producono deossiribonucleasi.

Informazione tecnica/limitazioni

Semiare i ceppi in aree limitate (spot)

Semiare i ceppi in aree limitate (spot), compresi i controlli, in modo da non sovrapporli. .

Procedura con acido cloridrico 1M

Alcuni svantaggi limitano l'utilità della procedura con acido cloridrico (HCl 1M); l'HCl 1M è battericida per stafilococchi su colonie isolate o con semina più dense, con maggiore crescita confluyente. Una volta applicato l'HCl, il test deve essere letto entro 5 minuti e non può poi essere nuovamente incubato^{1,5}.

Concentrazione del blu di toluidine O

L'attività ottimale della DNasi dipende da un'esatta concentrazione di blu di toluidina O (TBO) 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^{2,3}.

Terreno alternativo DNasi agar di metile

Il test Verde di metile - agar DNasi è un terreno alternativo migliorato, altamente sensibile, che può essere utilizzato in sostituzione al tradizionale agar test DNase. L'uso di questo terreno agarizzato si basa sulla modifica della procedura di Jefferies e al¹. Consente la crescita di entrambi i batteri Gram positivi e Gram negativi. In questa situazione, i microrganismi produttori di DNasi depolimerizzano il substrato del DNA nel terreno con conseguente scolorimento del verde di metile in un composto incolore che si manifesta con zone chiare distinte intorno alla crescita su uno sfondo verde. Lo scolorimento non compare immediatamente, ma occorre da 4 a 6 ore di incubazione perché si manifesti³. Il suo principale vantaggio è la mancata richiesta di aggiungere un reagente in quanto contenuto nell'agar preparato.

1 Considerazioni sulla sicurezza⁶⁻²³

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

L'acido cloridrico è una sostanza altamente corrosiva. I rischi delle soluzioni di acido cloridrico dipendono dalla concentrazione, Per ridurre al minimo i rischi durante la manipolazione di acido cloridrico indossare dispositivi di protezione individuale, come guanti di gomma o PVC, occhiali protettivi e indumenti protettivi e scarpe

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

E' essenziale l'osservanza delle regolamentazioni postal e del trasporto

2 Reagenti e Strumentazione

Colonie batteriche isolate cresciute su terreno solido.

Agar test DNasi

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

Acido cloridrico 1 M^{1,3}

Nota: alcuni produttori faranno riferimento a questo acido come "acido cloridrico 1N". Entrambi significano la stessa cosa.

O

Soluzione da 0.01% a 0.05% di blu di toluidina O².

3 Microrganismi per controllo di qualità

Controllo positivo

Staphylococcus aureus NCTC 6571 o NCTC 12973

Controllo negativo

Staphylococcus haemolyticus NCTC 11042

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

4 Procedure 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 fondo della piastra. Possono essere eseguite due modalità di semina. Sono di seguito descritte: inoculazione a spot o inoculazione di strisca o linea³. Per la progressione della procedura riguardante l'esecuzione delle inoculazioni, fare riferimento alla SMI del RU [Q 5: Inoculation of culture media for bacteriology](#).

Semina a spot³

- Sfiocare una colonia del microrganismo in esame con un'ansa e inoculare su una piccola area della piastra di agar DNasi, al centro di una piccola zona definita per formare dopo incubazione una densa placca di crescita di 5-10mm di diametro. Si può usare anche la semina per infissione come pure sulla superficie della piastra
- Incubare la piastra a 37 ° C per 18-24 ore

Strisciare o tracciare una linea di semina³

- 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.

4.1 Rilievo della attività della DNasi con immersione in acido cloridrico¹

- ricoprire la superficie della piastra con pochi millimetri di acido cloridrico 1M per precipitare il DNA non idrolizzato.
- lasciare riposare la piastra per qualche minuto, per consentire al reagente di essere assorbito nella piastra di agar DNasi.
- decantare l'acido cloridrico in eccesso ed esaminare poi su sfondo scuro.
- confrontare sempre l'area circostante il ceppo in accertamento con le aree dei ceppi di controllo.
- il DNA non idrolizzato è precipitato e produce nell'agar un'opacità bianca dovuta alla reazione di HCl con i sali DNA nella piastra di agar test di DNasi .

Risultato positivo

Colonie circondate da aree chiare comparabili in ampiezza a quelle del controllo DNasi-positivo

Risultato negativo

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

○

Precipitato nebuloso intorno alla colonia e nella piastra di agar test DNasi.

4.2 Rilievo di attività della DNasi con immersione in soluzione di blu O (TBO)^{2,3}

- ricoprire la superficie della piastra con qualche millimetro di TBO perché si complessi con il DNA idrolizzato e non idrolizzato
- lasciare riposare la piastra per 3-5 minuti
- decantare il TBO in eccesso ed esaminare immediatamente
- confrontare sempre l'area circostante il ceppo in accertamento con quelle dei ceppi di controllo
- esaminare a intervalli di 5 minuti per 30 minuti

- il TBO forma un complesso con il DNA idrolizzato che produce zone luminose rosa circostanti le colonie su sfondo blu reale. I batteri DNasi-negativi non producono alcun cambiamento del colore di sottofondo.

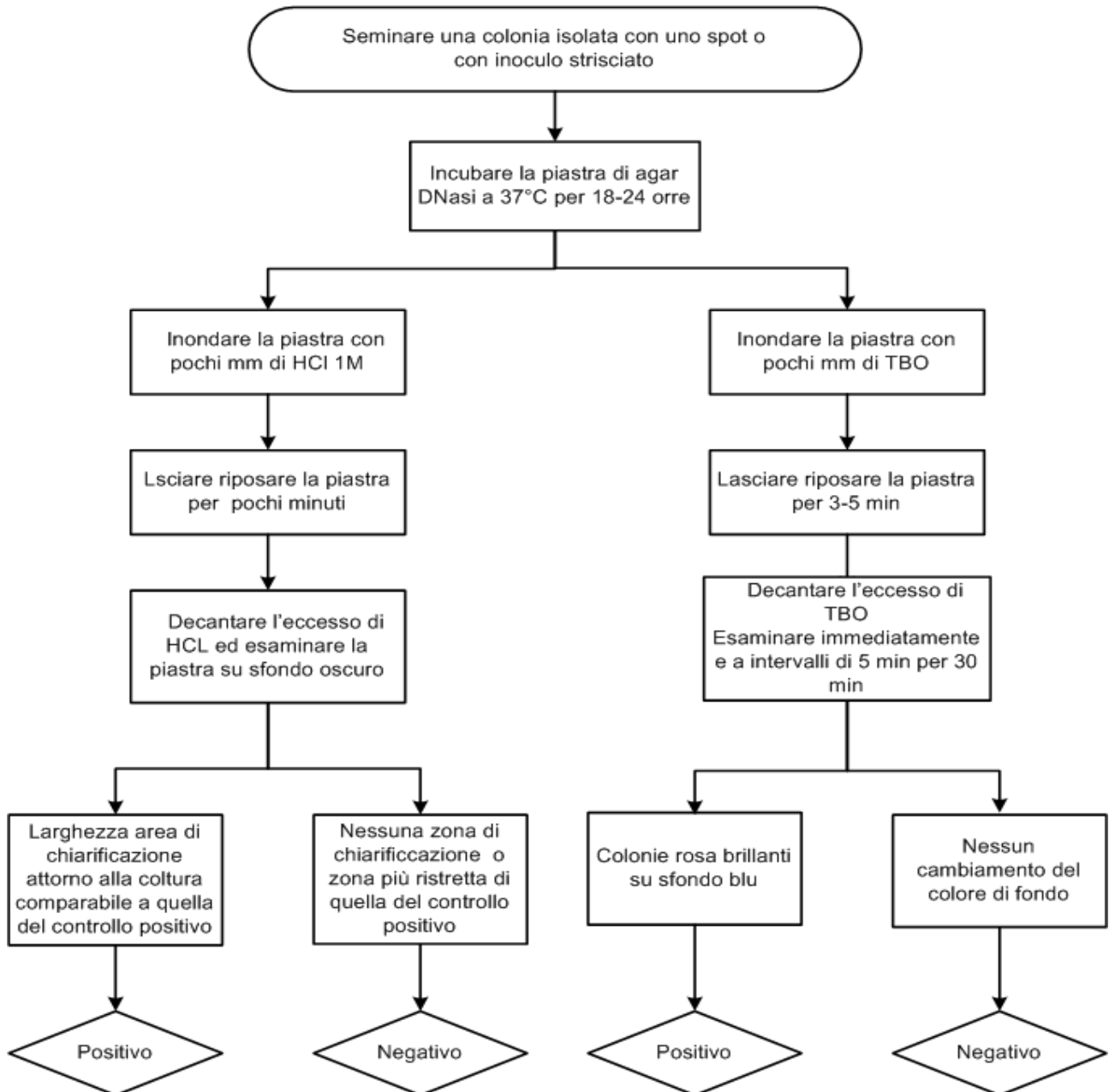
Risultato positivo

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

Risultato negativo

Nessun cambiamento del colore di sottofondo.

Appendice: Test della desossiribonucleasi



Nota:

Controllo positivo: *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 o NCTC 12973

Controllo negativo: *Staphylococcus haemolyticus* NCTC 11042

Il diagramma di flusso è solo indicativo.

Bibliografia

Tabella di GRADE (Grading of Recommendations, Assessment, Development, and Evaluation) modificata, utilizzata dalle SMI UK nella valutazione della bibliografia

Il GRADE (Grading of Recommendations, Assessment, Development, and Evaluation) è un approccio sistematico alla valutazione della bibliografia. Per le UK SMI si utilizza un metodo GRADE modificato per valutare l'inclusione dei riferimenti bibliografici. Ogni riferimento bibliografico è valutato e assegnato a un grado di consistenza delle raccomandazione (A-D) e alla qualità delle prove soggettive (I-VI). Di seguito è presentata una tabella riassuntiva che definisce il grade e deve essere utilizzata in congiunzione con l'elenco delle voci bibliografiche.

Consistenza della raccomandazione	Evidenza della qualità
A Fortemente raccomandata	I Dimostrazione da studi controllati, randomizzati, meta-analisi, e revisioni sistematicamente
B Raccomandata ma possono essere accettabili altre alternative	II Dimostrazione da studi non randomizzati
C Debolmente raccomandata: ricercare alternative	III Studi non-analitici, es. casi riportati, recensioni, serie di casi
D Mai consigliate	IV Opinione degli esperti e ampia accettazione come buona pratica, ma con nessuna prova di studio
	V Richiesto dalla normativa, codice di buona pratica o norma nazionale
	VI Lettera o altro

1. Jeffries CD, Holtman DF, Guse DG. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *JBacteriol* 1957;73:590-1. **C, III**
2. Waller JR, Hodel SL, Nuti RN. Improvement of two toluidine blue O-mediated techniques for DNase detection. *JClinMicrobiol* 1985;21:195-9. **B, II**
3. MacFaddin JF. Deoxyribonuclease and Thermonuclease Tests. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd ed. Philadelphia; 2000. p. 137-59. **B, III**
4. Pimenta FP, Souza MC, Pereira GA, Hirata R, Jr., Camello TC, Mattos-Guaraldi AL. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *LettApplMicrobiol* 2008;46:307-11. **B, II**
5. Gerceker D, Karasartova D, Elyurek E, Barkar S, Kiyan M, Ozsan TM et al. A new, simple, rapid test for detection of DNase activity of microorganisms: DNase Tube test. *JGenApplMicrobiol* 2009;55:291-4. **B, II**
6. European Parliament. UK Standards for Microbiology Investigations (UK 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". 1998. **A, V**

7. 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 1998. 1-37. **A, V**
8. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 2009. **A, V**
9. Department for Transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011. **A, V**
10. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2017-2018. 2017. **A, V**
11. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001. **A, V**
12. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive 2013. 1-35. **A, V**
13. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office 2003. **A, V**
14. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive 2005. **A, V**
15. 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. **A, V**
16. 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. **B, IV**
17. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002 (as amended). HSE Books,. 2013. **A, V**
18. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books,. 2002. **A, V**
19. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books,. 2002. **A, V**
20. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books 2003. **A, V**
21. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets 2000. **A, V**
22. 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. 2005. 1-14. **A, V**

23. Department of Health. Transport of Infectious Substances. Best Practice Guidance for Microbiology Laboratories. Department of Health. 1-13. 2007. **A, V**