

## Finalidade:

A prova de DNase é um teste utilizado na diferenciação de microrganismos com base na atividade da desoxirribonuclease (DNase), tais como o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Serratia marcescens*.

## Registro ANVISA:

10097010134

## Apresentação:

540219 - DNASE ÁGAR-C/ AZUL DE TOLUIDINA-20mL-PL90X15-10PL

LB 172268  
Rev 04 – 09/2024

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1956, Weckman e Catlin demonstraram haver uma correlação entre uma atividade aumentada de DNase dos *Staphylococcus aureus* e a coagulase positiva. Sugeriram que a atividade de DNase poderia ser utilizada para identificar estafilococos potencialmente patogênicos, bem como diferenciar *Serratia* spp. de *Enterobacter* spp., *Staphylococcus aureus* de estafilococos coagulase negativo e *Moraxella catarrhalis* das espécies de *Neisseria* spp.

DiSalvo confirmou estes resultados obtendo uma correlação excelente entre a atividade de coagulase e de DNase dos estafilococos isolados provenientes de amostras clínicas. Jeffries, Holtman e Guse incorporaram DNA num meio de ágar para estudarem a produção de DNase por bactérias e fungos.

Neste meio de cultura, a triptona fornece os nutrientes para o crescimento. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico. O ácido desoxirribonucléico molecular permite a detecção da desoxirribonuclease (DNase) que despolimeriza o DNA.

A presença do corante metacromático Azul de Toluidina, visa eliminar a necessidade de adição de ácido clorídrico ao meio após sua incubação.

Este meio é predominantemente utilizado na identificação dos estafilococos, mas também pode ser utilizado na detecção da atividade de DNase em outros microrganismos.

As peptonas fornecem aminoácidos e outros compostos nitrogenados, além de substâncias para apoiar o crescimento bacteriano. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico. O DNA é o substrato da enzima DNase. O azul de toluidina forma um complexo com o DNA intacto, com coloração azul. A ação enzimática da DNase, quebra este complexo, despolimerizando e quebrando o complexo DNA-Corante, assumindo sua cor metacromática, identificada por zonas de coloração róseas a vermelha em torno do crescimento no meio de cultura. O teste negativo é indicado quando o meio permanece azul, pois não há a quebra do complexo pela ausência da enzima.

## 2. COMPOSIÇÃO

Formulação	g/L
Triptona	20,0
Cloreto de sódio	5,0
Ácido Desoxirribonucléico	2,0
Azul de Toluidina	0,0001
Ágar Base	16,0
Água deionizada	1L
pH 7,3 ± 0,2 a 25°C	

A formulação pode ser ajustada e/ou suplementada, conforme necessário, para cumprir os critérios de desempenho.

## 3. MATERIAL

### a- Amostras

- Este não é um meio de cultura para isolamento primário, é um meio de cultura utilizado para a diferenciação e/ou como auxílio na identificação de microrganismos.

- É necessário a semeadura a partir de culturas puras e que não tenham mais do que 36 horas de incubação.

- Não é recomendado a semeadura direta da amostra neste meio de cultura, devido a falta de nutrientes para este fim.

- O laboratório deve estabelecer critérios de coleta, rejeição e conservação das amostras, conforme sua política da qualidade.

- Sempre considerar as necessidades específicas dos microrganismos alvos das análises, microrganismos com necessidades especiais (suplementos específicos ou ambiente controlados) podem não apresentar crescimento adequado se semeados em meio de cultura que não apresente os requisitos mínimos.

### b- Precauções e cuidados especiais

- Produto destinado ao uso diagnóstico *in vitro*;

- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado.

- Antes de descartar o material usado, invariavelmente, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Para acondicionamento do material usado, recomendamos o uso do Detribal.

## 4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

### a- Reagente

Placas contendo meio Ágar DNase.

### b- Armazenamento e estabilidade

Para fins de transporte, o produto pode permanecer em temperatura ambiente por até 72h. No laboratório as placas devem ser armazenadas entre 2 e 8°C, condições em que se mantém estáveis até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isento de contaminação de qualquer natureza.

O uso de refrigerador tipo frost-free não é recomendado para meios de cultura devido ao efeito desidratante deste tipo de equipamento.

Considerando que este produto é gelatinoso e sua composição pode apresentar até 80% de água, ao sofrer variações de temperatura (quente-frio ou frio-quente) todo meio de cultura pode gerar condensação, de pouca a muita, acumulando água na placa. Recomenda-se guardar as placas com os meios de cultura virados para cima e, quando necessário, desprezar a água acumulada e deixar o meio de cultura estabilizar a temperatura antes de sua utilização.

Conforme descrito em literatura, o laboratório deve retirar da refrigeração apenas a quantidade de produto que deverá ser utilizada em sua rotina e deixar estabilizar a temperatura, ou secar a água condensada, antes de sua utilização, em temperatura ambiente, podendo utilizar a incubação em estufa ( $\pm 37^{\circ}\text{C}$ ) para redução do tempo de secagem ou estabilização. A repetição do processo de refrigeração/estabilização não é recomendada, a constante troca de temperatura pode levar a desidratação do meio, expor o produto a contaminações ou gerar um acúmulo de água excessivo.

A água acumulada por condensação, ocasionada por alguma variação de temperatura, não influencia no desempenho do produto, desde que este não apresente ressecamento, contaminação ou diminuição de espessura.

Devido à presença ácido desoxirribonucléico na formulação, recomenda-se manter o produto protegido de incidência direta de luz (natural ou artificial) e evitar grandes variações de temperatura até a utilização.

### c- Precauções e cuidados especiais

- O produto destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;

- Uso restrito por profissionais;

- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não inalar ou ingerir;
- Não utilizar placas com sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para "Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI M29-A" para o manuseio seguro;
- Antes de descartar o material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Para acondicionamento do material usado, recomendamos o uso do produto Detrilab.
- Contate o serviço de vigilância sanitária de sua região para garantir o cumprimento correto da legislação de descarte de produtos potencialmente contaminantes.

**5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)**

- Estufa bacteriológica;
- Bico de Bunsen;
- Alças bacteriológicas (ou outro aparato);
- Meios de cultura para semeadura primária;

**6. PROCEDIMENTO TÉCNICO**

- 1- Inocular na superfície do meio ágar DNase uma alçada (10µL), proveniente de uma colônia isolada, preferencialmente oriunda de uma semeadura primária em meio ágar sangue.
- 2- Incubar as placas entre 18 e 24 horas em condições aeróbias entre 35 e 37°C. Se forem testadas cepas de outras espécies bacterianas ou fungos, incubar de acordo com os seus requisitos.
- 3- Após a incubação, realizar interpretação do crescimento.

**Observações:**

- É fundamental que a colônia selecionada para a semeadura em ágar DNase seja proveniente de uma cultura jovem e pura. Para casos de culturas com mais de 24 horas ou que tenham passado por refrigeração, sugere-se novo repique.
- Para culturas que apresentarem crescimento de mais de um microrganismo, recomenda-se o reisolamento das colônias de interesse.
- Recomenda-se a semeadura da colônia investigada em 50% da superfície do meio, utilizando uma cepa DNase positiva como controle positivo (*Staphylococcus aureus*, por exemplo) e uma cepa DNase negativa como controle negativo (*Staphylococcus epidermidis*, por exemplo) nos outros 50% da superfície do meio.
- À critério do laboratório, e seguindo seus procedimentos, pode ser semeada mais de uma amostra na mesma placa. Sugere-se que este procedimento seja evitado, reduzindo a possibilidade de trocas de amostra.

**7. RESULTADOS**

- DNase positiva: mudança de cor do azul para púrpura rosado ao redor do crescimento.
- DNase negativa: Ausência de alteração de cor ao redor da colônia bacteriana.

**8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO**

- (Riscos Residuais identificados de acordo com a RDC 830/2023)
- O azul de toluidina pode ser tóxico para alguns cocos gram-positivos e, portanto, devem ser usados principalmente com *Enterobacteriaceae*.
  - Outros microrganismos, além do *Staphylococcus aureus* e da *Serratia marcescens* podem ser positivos para a DNase. São necessários outros testes para identificar estes microrganismos.
  - A utilização de corantes e/ou ácido dextrorribonucleico na formulação pode acarretar leve foto sensibilidade, recomenda-se proteger o produto da incidência direta da luz.
  - Meios de cultura apresentam grande quantidade de água em sua formulação, deste modo, variações de temperatura devem ocasionar a condensação e, conseqüentemente, o acúmulo de água na placa. O cuidado com o acondicionamento e exposição do meio a estas variações de temperatura são fundamentais para a manutenção da qualidade do produto.

- Algumas variações de coloração na colônia, morfologia, tamanho ou intensidade de cor podem ocorrer, devido a características únicas da cepa analisada.
- A presença de mais de uma variante genética intrínseca a cepa analisada, pode interferir nas características de crescimento e perfil de resistência. É possível que características únicas ou mutadas da cepa possam interferir no desempenho do meio de cultura afetando ou retardando o total desenvolvimento das colônias e/ou o desempenho da reação.
- A presença de mais de um microrganismo na amostra pode ocasionar sobreposição de colônias na superfície do meio de cultura, dificultando sua identificação, para estes casos, recomenda-se o reisolamento das colônias diferentes.
- A qualidade dos resultados de análises microbiológicas é intimamente ligada à qualidade da amostra, as melhores práticas pré-analíticas, como cuidados extremos com a assepsia do processo ou paciente, garantem um melhor resultado.
- A utilização de colônias provenientes de culturas jovens e puras são fundamentais para o desempenho da análise.

- Os resultados falso-negativos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Técnica de coleta inadequada
- Incubação em temperatura inadequada
- Uso de antimicrobiano
- Utilização de alça flambada não resfriada
- Tempo de incubação insuficiente
- Uso de colônias velhas ou contaminadas por outras bactérias
- Armazenamento ou transporte de amostra inadequado
- Agentes etiológicos exigentes com relação aos meios de cultura
- Necessidade de meios especiais para o crescimento de um agente infeccioso específico

- Os resultados falso-positivos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Técnica de assepsia inadequada
- Erro na conservação do material
- Tempo longo entre a coleta e análise
- Tempo excessivo de incubação
- Interpretação equivocada de colônias não patogênicas
- Utilização de material vencido, contaminado ou em condições inadequadas
- Contaminação cruzada por uso de acessórios não esterilizados corretamente ou ambiente não asséptico
- Presença de perfis de resistência diferenciados

**9. CONTROLE DA QUALIDADE**

- *Materiais necessários*

Cepas padrão (ATCC ou derivadas);

- *Controle de qualidade recomendado:*

Cepas	Resultado esperado
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Positivo para DNase
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Negativo para DNase
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	Positivo para DNase
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 33495	Negativo para DNase

ATCC – American Type Culture Collection

- *Periodicidade*

Testar a cada novo lote recebido ou em periodicidade estabelecida pelo próprio laboratório.

- *Análise dos resultados*

As placas de ágar DNase testadas com cepas padrão devem expressar os resultados esperados. Caso se constate algum problema, os resultados de amostras clínicas não devem ser liberados até que as causas tenham sido apuradas devidamente e os problemas constatados sanados.

Este produto apresenta sensibilidade  $\geq 99,2\%$  e especificidade  $\geq 99,7\%$  frente aos principais microrganismos.

Microrganismo	Sensibilidade % (Intervalo de confiança de 95%)	Especificidade % (Intervalo de confiança de 95%)
<i>Escherichia coli</i>	268/268 <b>100,0%</b> (99,8 – 100%)	268/268 <b>100,0%</b> (99,9 – 100%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	173/174 <b>99,4%</b> (99,1 – 100%)	174/174 <b>100,0%</b> (99,6 – 100%)
<i>Serratia marcescens</i>	101/103 <b>98,1%</b> (97,9 – 99,9%)	102/103 <b>99,0%</b> (98,5 – 100%)

**10. GARANTIA DA QUALIDADE.**

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário que:

- O usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
- Os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;
- Os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site [www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br). Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, entrar em contato com o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail [sac@laborclin.com.br](mailto:sac@laborclin.com.br). Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

**11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. DiSalvo, J. W. 1958. Deoxyribonuclease and coagulase activity of micrococci. Med. Tech. Bull. U. S. Armed Forces Med. J. 9: 191.
2. Jeffries, C. D., Holtman, D. F., and D. G. Guse. 1957. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acid. J. Bacteriol. 73: 590- 591.
3. MacFaddin, J. D. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, p. 275-284. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
4. Murano, E.A., and J. A. Hudnall. 2001. Media, reagents, and stains. In: Downes, F.P., and K. Ito (ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th edition. American Public Health Association, Washington. D.C.
5. Schreier, J.B. 1969. Modification of deoxyribonuclease test medium for rapid identification of *Serratia marcescens*. Am. J. Clin. Pathol. 51: 711.
6. Weckman, B. G., and B. W. Catlin. 1957. Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources. J. Bacteriol. 73: 747-753.



**Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda**

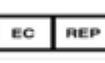
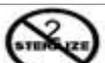
CNPJ 76.619.113/0001-31  
Insc. Estadual 1370012926  
Rua Casimiro de Abreu, 521  
Pinhais/PR CEP 83.321-210  
Telefone (41) 3661-9000  
[www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br)

**Responsável Técnico:**

Maire Wakamori – CRF/PR-20176  
Serviço de Assessoria ao Cliente  
SAC 0800-0410027  
[sac@laborclin.com.br](mailto:sac@laborclin.com.br)



ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Européia
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento		Esterilização utilizando óxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso.
	Controle		Controle Negativo
	Controle Positivo		Manter seco
	Manter afastado da luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho
	Não utilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2022)