

## DNase-Agar

Art.-Nr. CM 321

Zum Nachweis des mikrobiellen Enzyms Desoxyribonuklease, insbesondere bei Staphylokokken. Der Nährboden entspricht der ISO<sup>1</sup>.

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Tryptose	20,0
Desoxyribonukleinsäure	2,0
Natriumchlorid	5,0
Agar	12,0
pH 7,3 ± 0,2	

### Zubereitung

39 g DNase-Agar in 1 l Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.

### Beschreibung

Weckman und Catlin<sup>2</sup> stellten eine enge Korrelation zwischen der DNase-Aktivität und der Koagulase-Bildung pathogener Staphylokokken fest. Sie schlugen vor, die DNase-Aktivität zur Identifizierung zu nutzen. Jeffries et al.<sup>3</sup> brachten Desoxyribonukleinsäure in den Nährboden ein, um die DNase-Aktivität einfach nachzuweisen.

Die Bakterien werden auf der Oberfläche des Nährbodens ausgestrichen und bebrütet. Die gewachsenen Kolonien auf dem Nährboden werden dann mit 1 N Salzsäure überflutet. Polymerisierte DNA präzipitiert in Gegenwart von 1 N Salzsäure, der Nährboden wird opak. Wenn die Organismen ausreichend DNase gebildet haben, um die Desoxyribonukleinsäure im Nährboden zu spalten, bilden sich nach der Salzsäure-Behandlung klare Höfe um die Kolonien.

Zwischen der DNase-Bildung und der Koagulase-Aktivität von *Staphylococcus aureus* aus klinischem Untersuchungsmaterial wurde eine gute Korrelation nachgewiesen<sup>3-5</sup>. Sowohl *S. aureus* als auch *S. epidermidis* bilden extrazelluläre DNase<sup>6-8</sup>, *S. aureus* bildet sie jedoch in größeren Mengen<sup>1,7</sup>.

Die DNase-Reaktion unterstützt die Identifizierung nicht-pigmentierter *Serratia marcescens*<sup>9</sup> (positive DNase-Reaktion) und ihre Differenzierung von *Klebsiella/Enterobacter* (negative DNase-Reaktion).

DNase-Agar kann durch den Zusatz von Mannit (1%, w/v) und Phenolrot oder Bromthymolblau (0,0025%, w/v) als Indikator der Mannit-Verwertung modifiziert werden<sup>10</sup>. Die Veränderung des pH-Wertes um die Kolonien muß abgelesen werden, bevor die Platte mit Salzsäure geflutet wird. Nach dem Fluten können die Keime von der Nährbodenoberfläche nicht wiederbelebt werden, da 1 N Salzsäure bakterizid wirkt. Statt des Überflutens mit Salzsäure können Farbstoffe in den Nährboden eingebracht werden, um die Hydrolyse der DNA anzuzeigen. Toluidinblau<sup>8</sup> und Methylgrün<sup>11</sup> bilden mit polymerisierter DNA gefärbte Komplexe, deren Farbe sich bei der DNA-Hydrolyse verändert.

Es sei allerdings angemerkt, daß Toluidinblau das Wachstum grampositiver Bakterien hemmt und somit zur Züchtung von Staphylokokken nicht eingesetzt werden kann. Toluidinblau kann beim Nachweis der DNase-Bildung bei *Enterobacteriaceae* verwendet werden. Es wird zusam-

## Nährböden

men mit Ampicillin (30 µg/ml) auch zum Nachweis der DNase-Bildung bei *Aeromonas hydrophila* aus Faeces eingesetzt<sup>12</sup>.

### Kulturverfahren

1. DNase-Agar mit verdächtigen Kolonien so dicht beimpfen, daß nach 18 Stunden Bebrütung eine dicke Schicht entstehen kann.
2. Wurde dem Nährboden Mannit und ein pH-Indikator bzw. andere Farbstoffe zugesetzt, so sind die Reaktionen vor der Salzsäure-Flutung abzulesen.
3. Platten, denen keine Farbstoffe zum Nachweis der DNA-Hydrolyse zugesetzt wurden, mit 1 N Salzsäure überfluten und einige Minuten mit dem Deckel nach oben stehen lassen. Die Klärungshöfe um die Kolonien begutachten.

### Koloniemorphologie

DNase-Agar mit Mannit und pH-Indikator

Mannit-positiv: Gelbe Kolonien mit gelbem Hof

Mannit-negativ: Kolonien von gleicher Farbe wie der Nährboden

DNase-Agar mit Toluidinblau

DNase-positiv: Rosa Höfe im blauen Nährboden

DNase-negativ: Keine Höfe

DNase-Agar mit Methylgrün

DNase-positiv: Fast farblose Höfe

DNase-negativ: Keine Höfe

DNase-Agar nach Säureflutung

DNase-positiv: Klar abgegrenzte Höfe

DNase-negativ: Keine klaren Höfe

### Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

### Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Serratia marcescens* ATCC 8100

Negativkontrolle

*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

### Zusätzliche Hinweise

Die DNase-Reaktion bei Staphylokokken ist ein Zeichen für Pathogenität, kann aber nicht als einziges Kriterium dienen.

Kleine, klare Höfe können auch durch andere Enzyme oder organische Säurebildung verursacht werden<sup>8</sup>.

Auch andere Keime als Staphylokokken, *Serratia* und *Aeromonas* können DNase bilden. Die Testung kann nach der Säureflutung nicht durch weitere Bebrütung fortgeführt werden.

Methylgrün muß vor dem Zusetzen zum Nährboden durch Chloroform-Extraktion gereinigt werden<sup>11</sup>.

Die Leistungsfähigkeit von Toluidinblau ist von der Bezugsquelle abhängig. Toluidinblau kann nicht zur Züchtung grampositiver Keime verwendet werden.

### Literatur

1. ISO/DIS 5551 (1983) "Meat and meat products. Detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. Reference method."
2. Wecman, B.G. und Catlin, B.W. (1957) *J. of Bacteriology* 73, 747-753.
3. Jeffries, C.D., Holtman, D.F. und Guse, D.G. (1957) *J. of Bacteriology* 73, 590-591.
4. di Salvo, J.W. (1958) *Med. Techn. Suppl. to U.S. Armed Forces Medical Journal* 9, 191-196.
5. Blair, E.B., Emerson, J.S. und Tull, A.H. (1967) *Am. J. Clin. Pathol.* 47, 30-39.
6. Baird-Parker, A.C. (1965) *J. Gen. Microbiol.* 38, 363-367.
7. Raymond, E.A. und Traub, W.H. (1970) *Appl. Microbiol.* 19, 919-921.
8. Zierdt, C.H. und Gold, D.W. (1970) *Appl. Microbiol.* 20, 54-57.
9. Schreir, J.B. (1969) *Am. J. Clin. Pathol.* 51, 711-716.
10. Coobe, E.R. (1968) *Uister Med. J.* 37, 146-149.
11. Smith, P.B., Hancock, G.A. und Rhoden, D.L. (1969) *Appl. Microbiol.* 18, 991-994.
12. von Graevenitz, A. und Zinterhofer, L. (1970) *Health Lab. Sci.* T, 124-127.