BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

НАЗНАЧЕНИЕ

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) (Дифференциальный агар для стрептококка группы B (среда «Гранада») используется для выделения и идентификации *Streptococcus agalactiae* (*стрептококка* группы B) из клинических образцов.

ПРИНЦИПЫ И ОПИСАНИЕ МЕТОДИКИ

Микробиологический метод.

Streptococcus agalactiae является причиной тяжелых инфекционных болезней новорожденных, включая септицемию, менингит и полиорганные инфекции.[1-3] Новорожденный инфицируется от матери, которая может быть бессимптомным носителем микроорганизма в вагинальной микрофлоре. Частота возникновения заболеваний составляет около 1,5 случаев на 1000 рождений, а смертность составляет около 8,7 %. [3] Показано, своевременное обнаружение микроорганизма в вагинальной микрофлоре беременной женщины и последующее надлежащее лечение новорожденного могут значительно снизить риск развития инфекции.[2,3] Стандартной методикой выделения из образцов из влагалища является использование кровяного агара или селктивного кровяного агара, а также выявление характерного бета-гемолиза с последующей биохимической или серологической идентификацией.[1] Результаты недавних исследований показали, что риск развития инфекции у новорожденного представляет также низкое содержание *S. agalactiae* в вагинальной микрофлоре. Поэтому были рекомендованы методики обогащения, например бульон LIM Broth.[4] Однако данная обогатительная среда не является в полной мере селективной для *S. agalactiae*, и при использовании этого метода может происходить обогащение других грамположительных микроорганизмов, что способно замаскировать присутствие *S. agalactiae*.

В последние годы модификации среды Islam Medium, описанной в 1977 году, были проанализированы на пригодность для обнаружения и выделения данного микроорганизма.[5,6] На этих средах, так же как на среде «Новая Гранада» (New Granada), являющейся недавней модификацией среды Islam, бета-гемолитические штаммы *S. agalactiae* формируют колонии от оранжевого до желтовато-розового цвета.[7,8] Окрашивание колоний объясняется собственным пигментом микроорганизма гранаденом, орнитина рамнополиеном.[16]

Пигментация является очень специфической и не свойственна стрептококкам, группа которых отличается от B, или другим микроорганизмам. Однако стабильность среды «Новая Гранада» (New Granada) является ограниченной.[9,10]

Дифференциальный агар для стрептококка группы B (среда «Гранада») **Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**, который является модификацией среды «Новая Гранада» (New Granada) с улучшенной стабильностью и селективностью, протеозопептон № 3 (Proteose Peptone no. 3), является источником белка и прекурсоров, необходимых для образования пигмента и роста. Крахмал является питательной средой и действует как стабилизатор пигмента. Глюкоза, пируват и цистеин являются питательными веществами. Магний является примесным элементом. Комбинация MOPS и фосфата выступает в качестве буферного раствора с pH. Кристаллический фиолетовый ингибирует рост стафилококков. Ингибиторы и возбудители были добавлены для подавления сопутствующей флоры, например грамотрицательных бактерий и строгих анаэробных микроорганизмов, и стимулирования формирования пигмента.

РЕАКТИВЫ

Дифференциальный агар для стрептококка группы B (среда «Гранада») **Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**

Рецептура* на литр очищенной воды

Протеозопептон № 3	25,0 г	Натрия фосфат двузамещенный	10,7 г
Кукурузный крахмал	14,0	Кристаллический фиолетовый	0,0005
Глюкоза	2,5	Ингибиторы и возбудители	0,021
Натриевая соль пировиноградной кислоты	1,0	Агар	15,2
Гидрохлорид цистеина	0,1		
Магния сульфат	0,3		
MOPS (3-морфолино пропансульфоновая кислота), полунатриевая соль	11,0		

pH 7,4 ± 0,2

*При необходимости изменяется и/или дополняется для соответствия критериям эффективности.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD . Только для профессионального применения.

Не используйте чашки при наличии признаков бактериального заражения, изменения цвета, высыхания или других признаков разложения продукта.

Ознакомьтесь с документом **ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ,** в котором приведено описание асептических методик работы, биологических опасностей и порядка утилизации использованного продукта.

ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ

После получения храните чашки в темноте при температуре от 2 до 8 °C в оригинальной обертке до начала использования. Избегайте замораживания и перегрева. Чашки могут быть засеяны до даты истечения срока годности (см. этикетку на упаковке) и инкубированы в течение рекомендованного времени инкубации.

Чашки из открытых стопок по 10 чашек могут использоваться в течение одной недели при условии хранения с соблюдением чистоты при температуре от 2 до 8 °C.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПОЛЬЗОВАТЕЛЕМ

Засейте репрезентативные образцы следующими штаммами (подробные сведения см. в документе **ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**). Инкубируйте в анаэробных условиях в течение от 18 до 24 часов при температуре 35 ± 2 °C.

Штаммы	**Результаты роста**
Streptococcus agalactiae ATCC 12386	Рост от хорошего до превосходного; оранжевые колонии малого или среднего размера с бесцветными границами или без них
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	Рост; очень малочисленные колонии серого цвета или бесцветные
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Рост; колонии среднего размера серого цвета или бесцветные
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Полное ингибирование
Bacteroides fragilis ATCC 25285	От частичного до полного ингибирования
Proteus mirabilis ATCC 43071	От частичного до полного ингибирования, полное подавление роста, бесцветные колонии
Незасеянные	От белого до светло-серого цвета, непрозрачные

МЕТОДИКА

Поставляемые материалы

Дифференциальный агар для стрептококка группы B (среда «Гранада») **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (90-мм чашки **Stacker**). Свободные от микроорганизмов.

Непредоставляемые материалы

Дополнительная питательная среда, реагенты и лабораторное оборудование по мере необходимости.

Типы образцов

Дифференциальный агар для стрептококка группы B (среда «Гранада») **Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** может использоваться для выделения *S. agalactiae* (стрептококков группы B) из человеческих клинических образцов всех типов. Часто образцы включают мазки из женских половых путей или мазки или другие образцы от новорожденных. Используйте соответствующие методики для сбора и транспортировки образцов.[1,11]

Методика тестирования

Засейте образец как можно быстрее после его получения лабораторией на дифференциальный агар для стрептококка группы B (среду «Гранада») **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Чашка для посева используется, главным образом, для отделения чистых культур от образцов, содержащих смешанную флору.

В качестве альтернативы, если материал засевают с тампона, следует провернуть тампон над небольшим участком поверхности возле края, а затем сделать штрихи с этого участка.

Инкубируйте в анаэробных условиях в течение от 18 до 24 часов при температуре 35 ± 2 °C. В случае отрицательного результата чашки можно инкубировать еще в течение от 18 до 24 часов, хотя обычно это не требуется. Для выделения всех патогенных микроорганизмов, участвующих в инфекции или формировании колоний, образец также необходимо засеять в чашку с кровяным агаром, например, Колумбийским агаром с 5 % крови барана **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood,** которую следует инкубировать в атмосфере, обогащенной CO_2, в течение от 18 до 48 часов при температуре 35 ± 2 °C. Если используется среда для предварительного обогащения, такая как бульон Lim (Lim Broth), они могут быть пересеяны на дифференциальный агар для стрептококка группы B (среду «Гранада») **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** с помощью полной петли бульона по прошествии от 18 до 24 часов инкубации и инкубироваться как описано выше.

Результаты

После инкубации бета-гемолитические штаммы *S. agalactiae* формируют от мелких до среднего размера колонии, окрашенные в интенсивный оранжевый или желтовато-розово-оранжевый цвет, которые могут иметь бесцветные границы по окружности или не иметь их. Чтобы определить слабо пигментированные штаммы, чашки необходимо исследовать на белой поверхности. Оранжевая пигментация любой яркости считается положительным результатом. При исследовании не держите чашки напротив источника света!

Стафилококки, грамотрицательные палочки и строгие анаэробные микроорганизмы обычно полностью ингибируются в данной среде. Рост большинства других стрептококков и энтерококков не будет подавляться, но они будут формировать бесцветные или серые колонии. Негемолитические штаммы *S. agalactiae* будут также формировать колонии от серого до серо-голубого цвета. Они обнаруживаются редко (не более, чем у 4 % беременных женщин).

Для дифференцировки негемолитических стрептококков группы B от энтерококков или от стрептококков, не относящихся к группе B, может быть проведен PYR-тест (используйте набор **BD DrySlide PYR, каталожный номер 231747**) непосредственно из серых или серо-голубых колоний на дифференциальном агаре для стрептококка группы B (среде «Гранада») **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**: энтерококки,

Streptococcus pyogenes и некоторые другие стрептококки являются PYR-положительными (= от красного до лилового цвета в пределах 1 мин), тогда как *S. agalactiae* и множество других стрептококков являются PYR-отрицательными (= от желтоватого до бесцветного).[15] PYR-отрицательные изоляты из серых или серо-голубых колоний должны быть дополнительно проанализированы для подтверждения присутствия негемолитического штамма *S. agalactiae*, например с помощью серотипирования.

Оранжевая пигментация на данной среде высокоспецифична для *S. agalactiae*, и не требуется проводить серологическую или биохимическую идентификацию для подтверждения. Однако серологическое типирование можно выполнить непосредственно из дифференциального агара для стрептококка группы B (среды «Гранада») **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** без последующего пересева. Набор для ферментного анализа с латексными частицами **BBL Streptocard Enzyme Latex Test Kit** (каталожный номер 240950) может быть использован для этой цели.
Кроме того, Колумбийский агар с 5 % крови барана **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** необходимо исследовать на присутствие негемолитических штаммов *S. agalactiae* и дополнительных патогенных микроорганизмов.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ

Дифференциальный агар для стрептококка группы B (среда «Гранада») **Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** используется для выделения и идентификации *Streptococcus agalactiae* (стрептококков группы B) из человеческих клинических образцов всех типов. Оранжевое окрашивание колоний на данной среде высокоспецифично для *S. agalactiae* (см. **Рабочие характеристики**); поэтому подтверждающие анализы не являются необходимыми. В случае возникновения сомнений или при слабой пигментации штаммов серологическую группировку и/или PYR-тест следует проводить непосредственно из чашки для выделения.
Имеются сообщения о том, что гены, ответственные за образование пигмента и выработку гемолизина *S. agalactiae* являются генетически связанными.[12,13] Приблизительно от 1 до 2 % штаммов S. agalactiae являются негемолитическими[14] и поэтому могут не иметь пигментации на дифференциальном агаре для стрептококка группы B (среде «Гранада») **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Однако было определено на внутреннем уровне, что микроорганизмы со слабой выработкой гемолизина, которые являются негемолитическими, в большинстве сред на основе кровяного агара также характеризуются слабой пигментацией. Имеются сообщения о том, что гемолизин является одним из основных факторов патогенности *S. agalactiae.*[12,13]
Для обнаружения всех патогенных микроорганизмов, участвующих в инфекции, включая негемолитические штаммы стрептококков группы B, среду на основе кровяного агара, например Колумбийский агар с 5 % крови барана **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** также необходимо засеять образцом.

Дифференциальный агар для стрептококка группы B (среда «Гранада») **Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** непригоден для выделения иных стрептококков, кроме *S. agalactiae*, или других патогенов, которые могут вызывать сходные инфекции (например, *Listeria monocytogenes*).
Эффективность данной среды с ветеринарными образцами не определялась.

Эффективность

Оценка эффективности выполнялась с использованием 151 клинического образца (влагалищные или цервикальные мазки, различные образцы от новорожденных), признанные положительными на *S. agalactiae* в результате стандартного посева на чашки с кровяным агаром (Blood Agar) с последующим серотипированием изолятов.[15] Из этих 151 образца 148 были положительными при втором культивировании на Колумбийском агаре с 5 % крови барана **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** с выделением одного негемолитического и 147 бета-гемолитических изолятов.
На дифференциальном агаре для стрептококка группы B (среде «Гранада») **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**, при инкубации в анаэробных условиях

в течение от 18 до 24 часов в 149 из 151 образца наблюдался рост стрептококков группы B; из них в 148 формировались оранжевые колонии различных типов (чувствительность 98 %), которые с помощью серологического теста были все идентифицированы как стрептококки группы B. Из этих 148 культур три были оценены как «очень бледные оранжевые». Если не учитывать эти три культуры, то была достигнута чувствительность 96 %.
В данном исследовании засеянные чашки с дифференциальным агаром для стрептококков группы B (средой «Гранада») **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** также инкубировались в аэробных условиях с обогащением двуокисью углерода. В этих условиях инкубации чувствительность составила 96,8 %. В этих чашках 14 культур были оценены как «очень бледные оранжевые». Если не учитывать эти культуры, то чувствительность составляет 87,4 %.
При инкубации в анаэробных условиях было получено намного больше изолятов с ярко-оранжевой окраской колоний, чем при инкубации в аэробной атмосфере, обогащенной двуокисью углерода ($P < 0,005$). Кроме того, колонии многих штаммов были больше при инкубации в анаэробных условиях. **Поэтому анаэробная инкубация значительно увеличивает эффективность обнаружения оранжевых колоний.**

В данное исследование были также включены 52 образца, которые ранее были признаны отрицательными на *S. agalactiae*. Не было получено ложноположительных результатов при культивировании на дифференциальном агаре для стрептококка группы B (среде «Гранада») **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (специфичность = 100 %).

Использование дифференциального агара для стрептококка группы B (среды «Гранада») **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** улучшает и повышает эффективность диагностики инфекций, вызванных стрептококками группы B, а также снижает стоимость и время анализа, так как не требуется проведение дополнительных анализов по идентификации при наличии оранжевых колоний.

СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Ruoff, K.L., R.A. Whiley, and D. Beighton. *Streptococcus*. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Schuchat, A.. 1998. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States. Clin. Microbiol. Rev. 11: 497-513.
3. Juncosa, T., et al. 1998. Infeción neonatal por *Streptococcus agalactiae*. Estudio multicéntrico en el área de Barcelona. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 16: 312-315.
4. Centers for Disease Control and Prevention. 1996. Prevention of perinatal group B streptococcal diaease: a public health perspective. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 45: 1-24.
5. Islam, A.K.M. 1977. Rapid recognition of group B streptococci. Lancet I: 256-257.
6. de la Rosa, M., et al. 1983. Granada medium for detection and identification of group B streptococci. J. Clin. Microbiol. 18: 779-785.
7. de la Rosa, M., et al. 1992. New Granada medium for detection and identification of group B streptococci. J. Clin. Microbiol. 30: 1019-1021.
8. Reardon, E.P., et al. 1984. Evaluation of a rapid method for the detection of vaginal group B streptococci in women in labor. Am. J. Obstet. Gynecol. 184: 575-578.
9. Overman, S.B., et al. 2002. Evaluation of methods to increase the sensitivity and timeliness of detection of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. J. Clin. Microbiol. 40: 4329-4331.
10. de la Rosa-Fraile, M. 2003. Granada agar sensitivity and detection of group B Streptococcus. Letter to the Editor. J. Clin. Microbiol. 41: 4007.
11. Thomson, R.B., and J.M. Miller. 2003. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Spellerberg, B., et al. 1999. Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of *Streptococcus agalactiae* by IS*S1* transposition. J. Bacteriol. 181: 3212-3219.
13. Pritzlaff, C.A., et al. 2001. Genetic basis for the ß-haemolytic/cytolytic activity of group B *Streptococcus.* Molec. Microbiol. 39: 236-247.
14. Edwards, M. and J. Baker. 2000. *Streptococcus agalactiae*. *In:* Mandell, G.I., et al. (eds.) Principles and practice of infectious diseases. New York Medical Publications, New York, p. 2156-2167.
15. Данные из архива. 2003; 2010. BD Diagnostic Systems Europe. Heidelberg, Germany.

16. Rosa-Fraile, M., et al. 2006. Granadaene: proposed structure of the Group B Streptococcus polyenic pigment. Apppl. Environm. Microbiol. 72: 6367-6370.

УПАКОВКА И НАЛИЧИЕ

Дифференциальный агар для стрептококка группы B (среда «Гранада») **Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**

REF № 257079 Готовая к использованию среда в чашках; 20 чашек

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Для получения дополнительной информации обратитесь к местному представителю компании BD.

Becton Dickinson GmbH
Tullastrasse 8 – 12
D-69126 Heidelberg/Germany
Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16
Reception_Germany@europe.bd.com

http://www.bd.com
http://www.bd.com/europe/regulatory/

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection
BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2013 BD