

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

VERWENDUNGSZWECK

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) (Gruppe-B-Streptokokken-Differenzierungs-Agar (Granada-Medium)) wird zur Isolierung und Identifizierung von *Streptococcus agalactiae* (Streptokokken der Gruppe B) aus klinischen Proben verwendet.

GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Mikrobiologische Methode.

Streptococcus agalactiae ist ein Auslöser schwerer Infektionen bei Neugeborenen, u. a. Septikämie, Meningitis und multiple Organinfektionen.¹⁻³ Das Neugeborene wird durch die Mutter infiziert, die den Organismus asymptomatisch in der Vaginalflora tragen kann. Die Häufigkeit beträgt ca. 1,5 pro 1000 Lebendgeburten und die Mortalität beläuft sich auf ca. 8,7 %.³ Es hat sich gezeigt, dass der geeignete Nachweis des Erregers in der Vaginalflora schwangerer Frauen, gefolgt von der geeigneten Therapie des Neugeborenen das Infektionsrisiko beträchtlich verringern kann.^{2,3} Bei der Standardmethode zur Isolierung aus vaginalen Proben wird Blutagar oder selektives Blutagar verwendet und ein Nachweis der charakteristischen Beta-Hämolyse, gefolgt von biochemischer oder serologischer Identifikation, durchgeführt.¹ Neue Untersuchungen haben gezeigt, dass sogar eine niedrige Anzahl von *S. agalactiae* in der Vaginalflora ein Infektionsrisiko für das Neugeborene darstellen kann. Deshalb werden Anreicherungsverfahren wie z. B. LIM Broth empfohlen.⁴ Dieses Anreicherungsmedium ist jedoch nicht völlig selektiv für *S. agalactiae*, und andere grampositive Organismen können ebenfalls durch diese Methode angereichert werden, wodurch *S. agalactiae* verdeckt werden kann.

In den letzten Jahren wurden Modifikationen des 1977 beschriebenen Islam-Mediums auf ihre Eignung für den Nachweis und die Isolierung der Organismen getestet.^{5,6} Auf diesen Medien, wie auch auf dem New Granada-Medium, das eine neue Modifikation des Islam-Mediums darstellt, erzeugen die beta-hämolytischen *S. agalactiae*-Stämme orange- bis lachsfarbene Kolonien.^{7,8} Die Koloniefarbe wird durch ein Pigment des Organismus hervorgerufen, dem Granadaene, einem Ornithin-Rhamno-Polyen.¹⁶

Die Pigmentierung ist sehr spezifisch und ist ausschließlich auf Streptokokken der Gruppe B beschränkt. Die Stabilität des New Granada-Mediums ist jedoch begrenzt.^{9,10}

Im **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**, das eine Modifikation des New Granada-Mediums mit verbesserter Stabilität und Selektivität ist, stellt Proteose-Pepton Nr. 3 eine Proteinquelle dar und liefert für die Pigmentbildung und das Pigmentwachstum notwendige Präkursoren. Stärke ist ein Nährstoff und fungiert als Pigmentstabilisator. Glucose, Pyruvat und Cystein sind Nährstoffe. Magnesium ist ein Spurenelement. Die Kombination von MOPS und Phosphat dient als pH-Puffer. Kristallviolett hemmt Staphylokokken. Es wurden Inhibitoren und Induktoren hinzugefügt, um die Begleitflora (z. B. gramnegative Bakterien und obligate Anaerobier) zu unterdrücken und um die Pigmentbildung zu erhöhen.

REAGENZIEN

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

Zusammensetzung* pro 1 L destilliertem Wasser

Proteose-Pepton Nr. 3	25,0 g	Dinatriumhydrogenphosphat	10,7 g
Maisstärke	14,0	Kristallviolett	0,0005
Glucose	2,5	Hemmstoffe und Induktoren	0,021
Brenztraubensäuren-Natriumsalz	1,0	Agar	15,2
Cysteinhydrochlorid	0,1		
Magnesiumsulfat	0,3		
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure), Halbsalz	11,0		

pH 7,4 ± 0,2

*Nach Bedarf auf die geforderten Testkriterien abgestimmt und/oder ergänzt.

SICHERHEITSHINWEISE

IVD . Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal. 

Platten bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung, Rissbildung oder bei sonstigen Anzeichen einer Qualitätsverschlechterung nicht verwenden.

Hinweise zu Verfahren unter Einhaltung aseptischer Arbeitsweise, Biogefährdung und Entsorgung des gebrauchten Produkts sind dem Dokument **ALLGEMEINE GEBRAUCHSANLEITUNG** zu entnehmen.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Nach Erhalt Platten bis unmittelbar vor dem Gebrauch im Dunkeln in der Originalverpackung bei 2 – 8 °C lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Die Platten können bis zum Verfallsdatum (s. Kennzeichnung auf der Verpackung) inokuliert und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden.

Platten aus bereits geöffneten Packungen mit jeweils 10 Platten können bei Lagerung in einem sauberen Bereich bei 2 – 8 °C bis zu einer Woche verwendet werden.

QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER

Repräsentative Proben mit den nachfolgend aufgeführten Stämmen inokulieren (detaillierte Informationen siehe **ALLGEMEINE GEBRAUCHSANLEITUNG**). Platten 18 – 24 h bei 35 ± 2 °C anaerob inkubieren.

Stämme	Wachstum
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	Gutes bis ausgezeichnetes Wachstum; kleine bis mittelgroße orangefarbene Kolonien mit oder ohne farblose Ränder
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Wachstum; sehr kleine farblose bis graue Kolonien
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Wachstum; mittelgroße farblose bis graue Kolonien
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Vollständige Hemmung
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	Teilweise bis vollständige Hemmung
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Teilweise bis vollständige Hemmung, vollständig gehemmtes Schwärmen, farblose Kolonien
Nicht inokuliert	Weiß bis hellgrau, opak

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) (90 mm **Stacker**-Platten). Mikrobiologisch kontrolliert.

Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

Probenarten

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) kann zur Isolierung von *S. agalactiae* (Streptokokken der Gruppe B) aus allen menschlichen klinischen Probenarten verwendet werden. Häufige Probenarten sind Abstriche aus dem weiblichen Genitalbereich oder Abstriche und andere Proben von Neugeborenen. Geeignete Verfahren für Probennahme und transport anwenden.^{1,11}

Testverfahren

Probe so bald wie möglich nach Eingang im Labor auf dem **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** ausstreichen. Die Ausstrichplatte dient primär zur Isolierung von Reinkulturen aus Proben mit Mischflora.

Falls das Material direkt von einem Tupfer kultiviert wird, Tupfer über einen kleinen Bereich am Rand der Oberfläche rollen; anschließend zur Isolierung aus dieser inokulierten Fläche ausstreichen.

Platten 18 – 24 h bei 35 ± 2°C anaerob inkubieren. Bei negativen Resultaten Platten weitere 18 – 24 h inkubieren, obwohl dies gewöhnlich nicht notwendig ist. Um alle an einer Infektion oder Kolonisierung beteiligten Pathogene zu isolieren, muss die Probe auch auf eine Blutagarplatte

ausgestrichen werden, wie z. B. **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**, das in einer mit CO₂ angereicherten Atmosphäre 18 – 48 h bei 35 ± 2 °C inkubiert werden sollte. Wird ein flüssiges Voranreicherungsmedium wie Lim Broth verwendet, kann eine Subkultur auf dem **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** mit einer Impföse der Bouillon nach einer Inkubation von 18 – 24 h angelegt und wie beschrieben inkubiert werden.

Ergebnisse

Nach der Inkubation werden beta-hämolytische *S. agalactiae*-Stämme kleine bis mittelgroße, blass- bis dunkelorange-farbene oder lachs-/orange-farbene Kolonien erzeugen, die einen farblosen Rand haben können oder auch nicht. Um schwach pigmentierte Stämme erkennen zu können, müssen die Platten vor einem weißen Hintergrund gelesen werden. Jede Intensität orange-farbener Pigmentierung gilt als positiv. Platten nicht vor einer Lichtquelle ablesen! Staphylokokken, gramnegative Stäbchen und obligate Anaerobier werden auf dem Medium normalerweise vollständig gehemmt. Die meisten anderen Streptokokken und Enterokokken wachsen ungehemmt, erzeugen jedoch farblose bis graue Kolonien. Nichthämolytische *S. agalactiae*-Stämme bilden ebenfalls graue bis grau-blaue Kolonien. Diese kommen nur selten vor (bei schwangeren Frauen bis zu 4 %).

Zur Differenzierung nichthämolytischer Streptokokken der Gruppe B von Enterokokken oder Streptokokken, die nicht der Gruppe B angehören, kann ein PYR-Test (**BD DrySlide PYR-Kit, Best.-Nr. 231747** verwenden) direkt mit den grau bis grau-blauen Kolonien auf **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** durchgeführt werden: Enterokokken, *Streptococcus pyogenes* und mehrere andere Streptokokken-Spezies sind PYR-positiv (= rote bis purpurfarbene Färbung innerhalb 1 Min.), während *S. agalactiae* und eine Reihe anderer Streptokokken-Spezies PYR-negativ (= gelblich bis farblos) sind.¹⁵ Isolate mit PYR-negativen Ergebnissen aus grauen bis blau-grauen Kolonien müssen zur Bestätigung des Vorliegens eines nichthämolytischen *S. agalactiae*-Stammes weiter getestet werden, z. B. mithilfe einer serologischen Typisierung.

Die orange-farbene Pigmentierung auf diesem Medium ist spezifisch für *S. agalactiae*. Es ist keine serologische oder biochemische Identifikation zur Bestätigung notwendig. Eine Serotypisierung kann jedoch ohne weitere Subkultur direkt vom **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** durchgeführt werden. Das **BBL Streptocard Enzyme Latex Test Kit** (Best.-Nr. 240950) kann hierfür verwendet werden.

Die **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**-Platte muss auch auf die Anwesenheit von nichthämolytischen *S. agalactiae*-Stämmen und zusätzlichen Pathogenen untersucht werden.

LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) wird zur Isolierung und Identifizierung von *Streptococcus agalactiae* (Streptokokken der Gruppe B) bei allen menschlichen klinischen Probenarten verwendet. Die orange-farbene Koloniefärbung auf diesem Medium ist höchst spezifisch für *S. agalactiae* (siehe **Leistungsmerkmale**). Bestätigungstests sind deshalb nicht erforderlich. Im Zweifelsfall oder bei schwach pigmentierten Stämmen sollten eine serologische Gruppierung und/oder ein PYR-Test direkt von der Isolierungsplatte durchgeführt werden.

Es wurde berichtet, dass die für die Pigmentbildung und die Produktion von Hämolysin von *S. agalactiae* verantwortlichen Gene verknüpft sind.^{12,13} Ca. 1 bis 2 % der *S. agalactiae*-Stämme sind nichthämolytisch¹⁴ und können deshalb nicht auf dem **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** pigmentiert werden. Es ist jedoch intern festgestellt worden, dass schwache Hämolysin-Produzenten, die auf den meisten Blutagarmedien nichthämolytisch erscheinen, trotzdem schwach Pigmente bilden können. Berichten zufolge ist Hämolysin einer der wichtigsten pathogenen Faktoren von *S. agalactiae*.^{12,13}

Um alle an einer Infektion beteiligten Pathogene, darunter nichthämolytische Streptokokken der Gruppe B, nachweisen zu können, muss zusätzlich ein Blutagarmedium wie z. B. **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** mit der Probe inokuliert werden.

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) eignet sich nicht zur Isolierung anderer Streptokokken als *S. agalactiae* oder anderer Pathogene, die ähnliche Infektionen hervorrufen können (z. B. *Listeria monocytogenes*). Das Verhalten dieses Mediums bei tierischen Proben wurde nicht untersucht.

Leistungsmerkmale

Eine Leistungsbeurteilung wurde mit 151 klinischen Proben (Vaginal- und Zervixabstriche, verschiedene Proben von Neugeborenen) durchgeführt, die durch Ausstreichen auf Blutagarplatten und anschließende Serotypisierung der Isolate positiv auf *S. agalactiae* getestet wurden.¹⁵ 148 dieser 151 Proben waren beim zweiten Anlegen einer Kultur auf **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** positiv und lieferten ein nichthämolytisches und 147 beta-hämolytische Isolate.

Auf **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** und 18 – 24 h anaerob inkubiert zeigten 149 der 151 Proben ein B-Streptokokken-Wachstum; 148 davon lieferten eine Art von orangefarbenen Kolonien (Empfindlichkeit 98 %), die alle serologisch als Streptokokken der Gruppe B identifiziert wurden. Drei dieser 148 Kulturen wurden als „sehr blass orangefarben“ eingestuft. Werden diese drei Kulturen abgezogen, beträgt die Empfindlichkeit 96 %.

In dieser Studie wurden auch inokulierte Platten von **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** in einer mit Kohlendioxid angereicherten Atmosphäre inkubiert. Unter diesen Inkubationsbedingungen betrug die Empfindlichkeit 96,8 %. Auf diesen Platten wurden 14 Kulturen als „sehr blass orangefarben“ eingestuft. Werden diese abgezogen, beträgt die Empfindlichkeit 87,4 %.

Bei anaerober Inkubation resultierten wesentlich mehr Isolate mit stark orangefarbener Koloniefärbung als bei Inkubation in einer aeroben, mit Kohlendioxid angereicherten Atmosphäre ($P < 0,005$). Kolonien vieler Stämme waren darüberhinaus größer als bei anaerober Inkubation. **Demzufolge verbesserte die anaerobe Inkubation die Erkennung orangefarbener Kolonien wesentlich.**

52 zuvor für *S. agalactiae* negativ getestete Proben wurden ebenfalls in diese Beurteilung miteinbezogen. Es wurden keine falsch-positiven Ergebnisse bei der Anlage von Kulturen auf **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** erzielt (Empfindlichkeit = 100 %).

Die Verwendung von **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** verbessert und beschleunigt die Diagnose von Streptokokken der Gruppe B und reduziert Kosten und Umschlagzeit, da weitere Identifizierungstests von orangefarbenen Kolonien unnötig sind.

LITERATUR

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. Tenover (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. Infección 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 disease: 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. Tenenbaum (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 ISS1 transposition. *J. Bacteriol.* 181: 3212-3219.
13. Pritzlaff, C.A., et al. 2001. Genetic basis for the β -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. Unterlagen liegen vor. 2003; 2010. BD Diagnostic Systems Europe. Heidelberg, Deutschland.
16. Rosa-Fraile, M., et al. 2006. Granadaene: proposed structure of the Group B *Streptococcus* polyenic pigment. *Appl. Environm. Microbiol.* 72: 6367-6370.

VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

BD Group B *Streptococcus* Differential Agar (Granada Medium)

REF 257079 Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten

WEITERE INFORMATIONEN

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung.



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