



BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

TILSIGTET BRUG

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) (gruppe B-streptokokkdifferentialagar (Granada-medium)) bruges til isolering og identifikation af *Streptococcus agalactiae* (gruppe B-*Streptococcus*) fra kliniske præparater.

PROCEDURENS PRINCIPPER OG FORKLARING

Mikrobiologisk metode.

Streptococcus agalactiae er årsag til svære infektioner hos nyfødte, herunder blodforgiftning, meningitis og infektioner af multiple organer.¹⁻³ Det nyfødte barn inficeres af moderen, som kan have organismen asymptomatisk i vaginalfloraen. Incidensen er ca. 1,5 pr. 1000 fødsler af levende børn, og mortaliteten er ca. 8,7 %.³ Det er vist, at rettidig påvisning af stoffet i vaginalfloraen hos gravide kvinder efterfulgt af relevant behandling af det nyfødte barn kan reducere risikoen for infektion signifikant.^{2,3} Standardisoleringsteknikken til isolering fra vaginalpræparater er brug af blodagar eller selektiv blodagar og påvisning af den karakteristiske betahæmolyse, efterfulgt af biokemisk eller serologisk identifikation.¹ Nyere undersøgelser har vist, at også et lavt antal af *S. agalactiae* i vaginalfloraen kan udgøre en risiko for, at det nyfødte barn inficeres. Derfor er berigelsesteknikker som f.eks. LIM Broth (LIM-bouillon) blevet anbefalet.⁴ Dette berigelsesmedium er dog ikke fuldstændigt selektivt for *S. agalactiae*, og andre grampositive organismer kan ligeledes beriges ved denne metode og eventuelt skjule *S. agalactiae*.

I de senere år er modifikationer af Islam-mediet, der blev beskrevet i 1977, blevet testet for deres egnethed til at påvise og isolere organismen.^{5,6} På disse medier ligesom på New Granada-mediet, som er en nylig modifikation af Islam-mediet, producerer betahæmolytiske stammer af *S. agalactiae* orange til laksefarvede kolonier.^{7,8} Farvningen af kolonien skyldes organismens eget pigment, granadaene, en ornithinrhamnopolyen.¹⁶

Pigmenteringen er særdeles specifik og forekommer ikke med andre streptokokker end gruppe B eller med andre organismer. New Granada-mediets stabilitet er dog begrænset.^{9,10}

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) er en modifikation af New Granada-mediet med forbedret stabilitet og selektivitet. Proteose pepton nr. 3 en proteinkilde og skaffer de nødvendige forgængere for produktion og vækst af pigment. Stivelse er et næringsstof og agerer som en stabilisator for pigmentet. Glukose, pyruvat og cystein er næringsstoffer. Magnesium er et sporstof. Kombinationen af MOPS og fosfat virker som en pH-buffer. Krystalviolet hæmmer stafylokokker. Der er tilsat hæmmere og fremmere for at undertrykke den ledsagende flora, som f.eks. gramnegative bakterier og strengt anaerobe bakterier, og for at styrke pigmentdannelsen.

REAGENSER

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

Formel* pr. liter oprenset vand

Proteose pepton nr. 3	25,0 g	Dinatriumhydrogenfosfat	10,7 g
Majsstivelse	14,0	Krystalviolet	0,0005
Glukose	2,5	Hæmmere og fremmere	0,021
Pyrodruesyre natriumsalt	1,0	Agar	15,2
Cysteinhydrochlorid	0,1		
Magnesiumsulfat	0,3		
MOPS (3-morpholinpropansulfonsyre), heminatriumsalt	11,0		

pH 7,4 ± 0,2

* Justeret og/eller suppleret som krævet for at opfylde funktionskriterierne.

FORHOLDSREGLER

IVD . Kun til professionel brug. 

Pladerne må ikke anvendes, hvis de viser tegn på mikrobiel kontaminering, misfarvning, udtørring, brud eller andre tegn på nedbrydning.

Læs dokumentet **GENEREL BRUGSANVISNING** for procedurer om aseptisk håndtering, biologiske farer og bortskaffelse af brugte produkter.

OPBEVARING OG HOLDBARHED

Pladerne opbevares efter modtagelse i mørke ved 2 – 8 °C i deres originale hylsterindpakning indtil umiddelbart inden ibrugtagning. Undgå nedfrysning og overophedning. Pladerne kan inokuleres indtil udløbsdatoen (se etiketten på pakken) og inkuberes i de anbefalede inkubationstider.

Plader fra åbnede stabler med 10 plader kan bruges i en uge, når de opbevares i et rent område ved 2 – 8 °C.

BRUGERKVALITETSKONTROL

Inokulér repræsentative prøver med følgende stammer (se dokumentet **GENEREL BRUGSANVISNING** for at få detaljer). Inkubér anaerobt i 18 – 24 h ved 35 ± 2 °C.

Stammer	Vækstresultater
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	Vækst god til udmærket; orange kolonier af lille eller medium størrelse med eller uden farveløse kanter
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Vækst; meget små farveløse til grå kolonier
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Vækst; medium størrelse farveløse til grå kolonier
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Fuldstændig hæmning
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	Delvis til fuldstændig hæmning
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Delvis til fuldstændig hæmning, sværmen fuldstændigt hæmmet, farveløse kolonier
Ikke-inokuleret	Hvide til lysegrålige, opakke

PROCEDURE

Vedlagte materialer

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) (90 mm **Stacker** plader). Mikrobiologisk kontrolleret.

Materialer, der ikke er vedlagt

Hjælpekulturmedier, reagenser og laboratorieudstyr som påkrævet.

Præparattyper

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) kan bruges til isolering af *S. agalactiae* (gruppe B-streptokokker) fra alle slags humane, kliniske præparater. Hyppige præparater omfatter podninger fra de kvindelige kønsdele eller podninger og andre præparater fra nyfødte. Anvend egnede teknikker til præparatindsamling og -transport.^{1,11}

Testprocedure

Udstryg præparatet så hurtigt som muligt efter modtagelse i laboratoriet på **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Udstrygningspladen anvendes primært til at isolere rene kulturer fra præparater, der indeholder blandet flora.

Hvis materialet dyrkes direkte fra en podedepind, kan podedepinden rulles over et lille område på overfladen ved kanten. Derefter udstryges der for isolation fra dette inokulerede område.

Inkubér anaerobt i 18 – 24 h ved 35 ± 2 °C. Hvis pladerne er negative, kan de inkuberes i yderligere 18 til 24 h, selv om dette normalt ikke er nødvendigt. For at kunne isolere alle patogener, der er involveret i en infektion eller kolonidannelse, skal prøven også udstryges på en blodagarplade, f.eks. **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**, som bør inkuberes i en CO₂-beriget atmosfære i 18 – 48 h ved 35 ± 2 °C. Hvis flydende forberigelsesmedier som f.eks. LIM-bouillon anvendes, kan de videredyrkes på **BD Group B Streptococcus Differential Agar**

(Granada Medium) med en løkkefuld af bouillon efter 18 – 24 h inkubation og inkuberes som beskrevet ovenfor.

Resultater

Efter inkubation producerer betahæmolytiske stammer af *S. agalactiae* små til mellemstørrelse, blege til stærkt orange eller laksefarvede-orange kolonier, som muligvis kan være omgivet af farveløse kanter. For at kunne påvise svagt pigmenterede stammer skal pladerne aflæses på en hvid overflade. Enhver styrke af orange pigmentering regnes for et positivt resultat. Pladerne må ikke holdes foran en lyskilde under aflæsning! Stafylokokker, gramnegative stave og strengt anaerobe bakterier vil normalt være fuldstændigt hæmmet på mediet. De fleste andre streptokokker og enterokokker vokser uden hæmning, men producerer farveløse til grå kolonier. Ikke-hæmolytiske stammer af *S. agalactiae* producerer også grå til gråblå kolonier. De forekommer sjældent (op til 4 % hos gravide kvinder).

Til at differentiere ikke-hæmolytiske B-streptokokker fra enterokokker eller non-gruppe B-streptokokker kan der udføres en PYR-test (brug **BD DrySlide PYR kit, kat. nr. 231747**) direkte på grå til blågrå kolonier på **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**: Enterokokker, *Streptococcus pyogenes* og en række andre streptokokker er PYR-positive (= rød til lilla farve inden for 1 min), hvorimod *S. agalactiae* og en række andre streptokokker er PYR-negative (= gullige til farveløse).¹⁵ Isolater med PYR-negative resultater fra grå eller gråblå kolonier skal testes yderligere for at bekræfte forekomsten af ikke-hæmolytiske *S. agalactiae*-stammer, f.eks. ved serologisk typebestemmelse.

Den orange pigmentering på dette medium er meget specifik for *S. agalactiae*, og serologisk eller biokemisk identifikation er ikke nødvendig for bekræftelse. Dog kan serologisk typebestemmelse udføres direkte fra **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** uden yderligere videredykning. **BBL Streptocard Enzyme Latex Test Kit** (Streptocard enzym-latextestkit) (kat. nr. 240950) kan anvendes til dette formål. Desuden skal **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** pladen inspiceres for tilstedeværelsen af ikke-hæmolytiske stammer af *S. agalactiae* og for yderligere patogener.

FUNKTIONSDATA OG PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) bruges til isolering og identifikation af *Streptococcus agalactiae* (gruppe B-streptokokker) fra alle slags humane, kliniske præparater. Den orange kolonifarvning på dette medium er yderst specifik for *S. agalactiae* (se **Funktionsdata**). Derfor er konfirmatoriske test ikke nødvendige. I tilfælde af tvivl, eller hvor der er svagt pigmenterede stammer, bør serologisk gruppering og/eller en PYR-test udføres direkte fra isoleringspladen.

Det er rapporteret, at de gener, der er ansvarlige for pigmentproduktionen og for produktionen af hæmolysin hos *S. agalactiae*, er genetisk kædet.^{12,13} Ca. 1 – 2 % af *S. agalactiae*-stammer er ikke-hæmolytiske¹⁴ og bliver derfor måske ikke pigmenteret på **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Det er dog blevet bestemt internt, at svage hæmolysinproducenter, der forekommer ikke-hæmolytiske på de fleste blodagarmedier, stadig kan være svage pigmentproducenter. Det er rapporteret, at hæmolysin er en af de vigtigste patogenicitetsfaktorer hos *S. agalactiae*.^{12,13}

For at kunne påvise alle de patogener, der er involveret i en infektion, inklusive ikke-hæmolytiske stammer af B-streptokokker, skal et blodagarmedium som f.eks. **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** også inokuleres med prøven.

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) er ikke egnet til isolering af andre streptokokker end *S. agalactiae* eller andre patogener, der kan give lignende infektioner (f.eks. *Listeria monocytogenes*).

Dette mediums funktion med veterinærpræparater er ikke blevet bestemt.

Funktionsdata

Der blev foretaget en funktionsevaluering med 151 kliniske præparater (vaginal- og cervikalpodninger, forskellige præparater fra nyfødte), der var påvist positive for *S. agalactiae*, ved standardpladedyrkning på en blodagarplade efterfulgt af serologisk typebestemmelse af

isolaterne.¹⁵ Af disse 151 præparater var 148 positive ved anden dyrkning på **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** og gav ét ikke-hæmolytisk og 147 betahæmolytiske isolater. Efter anaerob inkubation i 18 – 24 h på **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** gav 149 af de 151 præparater vækst af B-streptokokker. Af disse gav 148 vilkårlige typer orange af kolonier (sensitivitet 98 %), som alle blev identificeret serologisk som værende B-streptokokker. Af disse 148 kulturer fik tre score som "meget blegorange". Hvis disse tre kulturer trækkes fra, opnås 96 % sensitivitet.

I denne undersøgelse blev inokulerede plader af **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** også inkuberet i en aerob atmosfære beriget med kuldioxid. Under disse inkubationsforhold var sensitiviteten 96,8 %. På disse plader fik 14 kulturer score som "meget blegorange". Hvis disse trækkes fra, er sensitiviteten 87,4 %.

Ved anaerob inkubation blev der opnået mange flere isolater med en stærk orange kolonifarvning end efter inkubationen i en aerob atmosfære beriget med kuldioxid ($P < 0,005$). Desuden var kolonier af mange stammer større, når de blev inkuberet anaerobt. **Derfor forbedrer den anaerobe inkubation påvisningen af orangefarvede kolonier signifikant.**

I denne evaluering blev 52 præparater, der tidligere var blevet påvist negative for *S. agalactiae*, også inkluderet. Der opnåedes ingen falsk positive ved dyrkning på **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (specificitet = 100 %).

Brug af **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** forbedrer og fremskynder diagnosen af B-streptokokker og reducerer omkostningerne og tiden, da yderligere identifikationstest fra orange kolonier er unødvendige.

LITTERATUR

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. Tenover (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. Data i arkiv. 2003; 2010. BD Diagnostic Systems Europe. Heidelberg, Tyskland.
16. Rosa-Fraile, M., et al. 2006. Granadaene: proposed structure of the Group B Streptococcus polyenic pigment. Appl. Environm. Microbiol. 72: 6367-6370.

EMBALLERING/BESTILLING

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

REF 257079

Plademedier klar til brug, 20 plader

YDERLIGERE OPLYSNINGER

Kontakt den lokale BD-repræsentant angående yderligere oplysninger.



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