



BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

PRZEZNACZENIE

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) jest przeznaczone do izolacji i identyfikacji *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* grupy B) z próbek klinicznych.

ZASADY I OBJAŚNIENIE PROCEDURY

Metoda mikrobiologiczna.

Streptococcus agalactiae jest przyczyną ciężkich zakażeń u noworodków, między innymi posocznicy, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych oraz zakażeń wielonarządowych.¹⁻³ Noworodek zostaje zakażony przez matkę, u której drobnoustroj może występować we florze pochwy nie wywołując objawów. Częstość występowania zakażeń paciorkowcami grupy B wynosi około 1,5 na 1000 żywych urodzeń, a śmiertelność około 8,7%.³ Wykazano, że wykrycie czynnika chorobotwórczego we florze pochwy ciężarnej, a następnie odpowiednie leczenie noworodka może w sposób istotny zmniejszyć ryzyko zakażenia.^{2,3} Standardowa technika izolacji bakterii z próbek z pochwy polega na zastosowaniu agaru z domieszką krwi lub selektywnego agaru z domieszką krwi oraz detekcji charakterystycznej beta hemolizy, a następnie przeprowadzeniu identyfikacji biochemicznej lub serologicznej.¹ Ostatnio przeprowadzone badania wykazały również, że nawet niewielka ilość *S. agalactiae* we florze pochwy może stanowić ryzyko zakażenia dla noworodka. Dlatego zaleca się techniki wykorzystujące podłoża wzbogacające, takie jak bulion LIM.⁴ Ta wzbogacona pożywka nie jest jednakże w pełni selektywna dla *S. agalactiae* i może dojść do nadmiernego wzrostu innych drobnoustrojów Gram dodatnich, które mogą spowodować ukrycie *S. agalactiae*.

W ostatnich latach badano przydatność opisanej w 1977 roku odmiany pożywki Islam do wykrywania i izolacji tego drobnoustroju.^{5,6} Na tej pożywce, podobnie jak na pożywce New Granada, która jest ostatnio uzyskaną odmianą pożywki Islam, szczepy beta-hemolityczne *S. agalactiae* wytwarzają kolonie w kolorze od pomarańczowego do łososiowego.^{7,8} Zabarwienie kolonii wynika z obecności własnego barwnika drobnoustroju (granadyny) — wielonienasycone połączenia ornityny i ramnozy.¹⁶

Zabarwienie jest bardzo swoiste i nie występuje u innych paciorkowców oprócz paciorkowców grupy B oraz u innych drobnoustrojów. Stabilność podłoża New Granada jest jednak ograniczona.^{9,10}

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) stanowi odmianę pożywki New Granada, o lepszej stabilności i selektywności. Proteose Peptone nr 3 jest źródłem białka i dostarcza prekursorów potrzebnych do wytwarzania barwnika i wzrostu. Skrobia stanowi środek odżywczy i działa jako stabilizator barwnika. Glukoza, pirogronian i cysteina są składnikami odżywczymi. Magnez jest pierwiastkiem śladowym. Połączenie MOPS i fosforanu działa jako bufor pH. Fiolet krystaliczny hamuje wzrost gronkowców. W celu zahamowania wzrostu flory towarzyszącej, takiej jak bakterie Gram ujemne i bezwzględne beztlenowce oraz nasilenia tworzenia barwnika, dodano inhibitory oraz czynniki indukujące.

ODCZYNNIKI

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

Skład* w przeliczeniu na litr wody oczyszczonej

Proteose Peptone Nr 3	25,0 g	Wodorofosforan dwusodowy	10,7 g
Skrobia kukurydziana	14,0	Fiolet krystaliczny	0,0005
Glukoza	2,5	Inhibitory i induktory	0,021
Sól sodowa kwasu pirogronowego	1,0	Agar	15,2
Chlorowodorek cysteiny	0,1		
Siarczan magnezu	0,3		
MOPS (Kwas 3-morfolinopropanowosulfonowy), sól sodowa	11,0		

pH 7,4 ±0,2

*Skorygowany i/lub uzupełniony zgodnie z wymaganiami, których celem jest spełnienie kryteriów wydajności.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

IVD . Wyłącznie do zastosowań profesjonalnych. ②

Nie należy używać płytek, jeżeli są na nich widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia, pęknięcia lub inne oznaki pogorszenia jakości.

Procedury aseptycznej techniki pracy z produktem, zagrożenia biologiczne oraz usuwanie zużytego produktu opisano w dokumencie **OGÓLNA INSTRUKCJA DOTYCZĄCA STOSOWANIA**.

WARUNKI I OKRES PRZECHOWYWANIA

Dostarczone płytki należy przechowywać w zaciemnionym pomieszczeniu, w temperaturze od 2 do 8°C, w oryginalnych opakowaniach w formie rękawa, aż do momentu użycia. Nie zamrażać i nie przegrzewać. Płytki należy wykorzystać do posiewu bakterii przed upływem daty ważności (zobacz etykietę na opakowaniu) i inkubować zgodnie z zalecanymi czasami inkubacji. Płytki z otwartego zestawu 10 płytek można zużyć w ciągu tygodnia, pod warunkiem przechowywania w czystym miejscu w temperaturze od 2 do 8°C.

KONTROLA JAKOŚCI PRZEZ UŻYTKOWNIKA

Reprezentatywne próbki podłoża zaszczipia się hodowlami wymienionych niżej szczepów (szczegółowe informacje — patrz dokument **OGÓLNA INSTRUKCJA DOTYCZĄCA STOSOWANIA**). Inkubować w warunkach beztlenowych przez 18 do 24 godzin w temperaturze 35 ± 2° C.

Szczepy	Wyniki wzrostu
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	Wzrost dobry do bardzo dobrego, kolonie małe do średniej wielkości z odbarwionymi brzegami lub bez
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Wzrost; kolonie bardzo małe, bezbarwne lub szare
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Wzrost; kolonie średniej wielkości, bezbarwne lub szare
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Całkowite zahamowanie wzrostu
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	Wzrost zahamowany częściowo lub całkowicie
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Częściowe lub całkowite zahamowanie wzrostu, namnażanie całkowicie zahamowane, kolonie bezbarwne
Bez posiewu	Biały do jasnoszarawego, matowy

PROCEDURA

Dostarczane materiały

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) (płytki 90 mm **Stacker**).

Sprawdzone pod względem obecności drobnoustrojów.

Materiały niedostarczane

Pomocnicze pożywki hodowlane, odczynniki oraz wyposażenie laboratoryjne zgodne z wymaganiami.

Typy próbek

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) może być stosowany do izolacji *S. agalactiae* (paciorkowce grupy B) z każdego rodzaju próbek klinicznych pochodzenia ludzkiego. Częstymi próbkami są wymazy z kobiecych dróg rodnych oraz wymazy i inne próbki od noworodków. Zastosować odpowiednie techniki do pobierania i transportu próbek.^{1,11}

Procedura testowa

Rozprowadzić próbkę, jak najszybciej po jej uzyskaniu na podłożu **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Płytkę do posiewu służy przede wszystkim do izolowania czystych hodowli z próbek zawierających florę mieszaną.

Innym sposobem, jeżeli materiał jest hodowany bezpośrednio z wymazu, jest przetoczenie wymazówki po niewielkiej powierzchni krawędzi płytki, a następnie posiew pasmowy z zaszczepionego obszaru w celu uzyskania pojedynczych kolonii.

Inkubować w warunkach beztlenowych przez 18 do 24 godzin w temperaturze $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Jeżeli wynik jest ujemny, próbki można inkubować przez dodatkowe 18 do 24 godzin, chociaż zwykle nie jest to konieczne. W celu wyizolowania wszystkich drobnoustrojów odpowiedzialnych za zakażenie lub kolonizację, próbkę należy również posiać na płytce z agarem z domieszką krwi, np. **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**, który należy inkubować w środowisku wzbogaconym w CO_2 przez 18 do 48 godzin, w temperaturze $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Jeżeli wykorzystywane są najpierw wzbogacone pożywki płynne, takie jak bulion Lim, można następnie dokonać przesiewania na podłożu **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** po 18 do 24 godzinach inkubacji i inkubować według opisu powyżej.

Wyniki

Po inkubacji beta-hemolityczne szczepy *S. agalactiae* wytwarzają kolonie małe lub średniej wielkości, blade lub w kolorze silnie pomarańczowym, które mogą posiadać bezbarwne brzegi. W celu detekcji szczepów o słabym zabarwieniu płytki należy odczytywać na białej powierzchni. Zabarwienie pomarańczowe o każdej intensywności jest uważane za wynik dodatni. Podczas odczytu nie trzymać płytek naprzeciw silnego źródła światła! Wzrost gronkowców, pałeczek Gram ujemnych oraz bezwzględnych beztlenowców ulega całkowitemu zahamowaniu na podłożu. Większość innych paciorkowców i enterokoków wzrasta bez zahamowania, ale wytwarza kolonie bezbarwne lub szare. Niehemolityczne szczepy *S. agalactiae* będą także dawać kolonie o barwie szarej do szaroniebieskie. Ich występowanie jest rzadkie (do 4% u kobiet ciężarnych).

W celu odróżnienia niehemolitycznych paciorkowców B od enterokoków lub paciorkowców innych niż grupy B, można przeprowadzić test PYR (stosując zestaw **BD DrySlide PYR, nr kat. 231747**) bezpośrednio na koloniach o barwie szarej do szaroniebieskiej rosnących na podłożu **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**: enterokoki, *Streptococcus pyogenes* i kilka innych paciorkowców daje dodatni wynik PYR (=kolor czerwony do purpurowego w ciągu 1 minuty), natomiast *S. agalactiae* i szereg innych paciorkowców daje ujemny wynik PYR (=żółtawe lub brak barwy).¹⁵ Izolaty z ujemnymi wynikami PYR pochodzące z kolonii szarych lub szaroniebieskich muszą zostać zbadane dodatkowo w celu potwierdzenia obecności niehemolitycznego szczepu *S. agalactiae*, np. za pomocą serotypowania.

Pomarańczowe zabarwienie na tej pożywce jest bardzo swoiste dla *S. agalactiae* i dla potwierdzenia nie jest wymagana identyfikacja serologiczna lub biochemiczna. Typowanie serologiczne można wykonywać bezpośrednio z podłoża **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** bez dodatkowego przesiewania. Można w tym celu użyć zestawu **BBL Streptocard Enzyme Latex Test** (nr kat. 240950).

Płytkę podłożem **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** należy również ocenić pod względem wzrostu niehemolitycznych szczepów *S. agalactiae* i dodatkowych drobnoustrojów chorobotwórczych.

CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA I OGRANICZENIA PROCEDURY

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) stosowany jest do izolacji i identyfikacji *Streptococcus agalactiae* (paciorkowiec grupy B) z próbek klinicznych pochodzenia ludzkiego, każdego rodzaju. Pomarańczowe zabarwienie na tej pożywce jest wysoce swoiste dla *S. agalactiae* (zobacz **Charakterystyka wydajnościowa**); dlatego nie jest konieczne wykonywanie testów potwierdzających. W razie wątpliwości lub w przypadku szczepów o słabym zabarwieniu grupowanie serologiczne i/lub test PYR należy przeprowadzić bezpośrednio z płytki izolacyjnej.

Istnieją doniesienia, że geny odpowiedzialne za produkcję pigmentu oraz za produkcję hemolizyny *S. agalactiae* są powiązane genetycznie.^{12,13} Około 1 do 2% szczepów *S. agalactiae* jest niehemolitycznych¹⁴ i dlatego może nie wykazywać zabarwienia na podłożu **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Określono jednak, że szczepy słabo produkujące hemolizynę, które wydają się być niehemolityczne na większości pożywek agarowych zawierających krew, mogą mimo to produkować niewielkie ilości pigmentu. Opisano, że hemolizyna jest jednym z głównych czynników patogenicznych *S. agalactiae*.^{12,13} W celu wykrycia wszystkich drobnoustrojów odpowiedzialnych za zakażenie, między innymi niehemolitycznych szczepów paciorkowców grupy B, należy wysiać próbkę na agar z domieszką krwi taki, jak **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**.

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) nie jest odpowiednim podłożem do izolacji paciorkowców innych niż *S. agalactiae* lub drobnoustrojów, które mogą powodować podobne zakażenia (np. *Listeria monocytogenes*). Nie określono działania próbek pochodzących od zwierząt na tej pożywce.

Charakterystyka wydajnościowa

Ocenę wyników przeprowadzono na podstawie 151 próbek klinicznych (wymazów pochwoowych i z szyjki macicy, różnorodnych próbek pobranych od noworodków) określonych jako dodatnie wobec *S. agalactiae* poprzez wysianie na płytce agarowej z domieszką krwi oraz serologiczne określanie szczepów.¹⁵ Spośród tych 151 próbek, dla 148 uzyskano wynik dodatni w drugiej hodowli na podłożu **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** i uzyskano jeden szczep niehemolityczny oraz 147 szczepów beta-hemolitycznych.

Na podłożu **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**, inkubowanym w warunkach beztlenowych przez 18 do 24 godzin, w 149 na 151 próbkach uzyskano wzrost Streptococci B; a w tej grupie 148 dawało zabarwienie w dowolnym odcieniu koloru pomarańczowego (czułość 98%) i wszystkie zostały zidentyfikowane serologicznie jako paciorkowce grupy B. Spośród tych 148 hodowli trzy oceniono jako „bardzo jasnopomarańczowe”. Jeżeli pominiemy te trzy hodowle, czułość wynosi 96%.

W tym badaniu płytki z podłożem **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** inkubowano również w środowisku tlenowym, o wzbogaconej zawartości dwutlenku węgla. W takich warunkach inkubacji czułość wynosiła 96,8%. Spośród tych płytek 14 hodowli określono jako „bardzo jasnopomarańczowe”. Po ich pominięciu czułość wynosi 87,4%.

W razie inkubacji w warunkach beztlenowych uzyskano o wiele więcej szczepów o silnym pomarańczowym zabarwieniu kolonii, niż w przypadku inkubacji w środowisku tlenowym o większej zawartości dwutlenku węgla ($P < 0,005$). Ponadto, w warunkach beztlenowych kolonie wielu szczepów były większe. **Dlatego inkubacja beztlenowa poprawia znacząco detekcję pomarańczowych kolonii.**

Ocenie poddano również 52 próbki ocenione wcześniej jako ujemne wobec *S. agalactiae*. Nie uzyskano wyników fałszywie dodatnich podczas hodowli na podłożu **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (swoistość = 100%).

Zastosowanie podłoża **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** poprawia i przyspiesza rozpoznawanie zakażeń wywołanych przez paciorkowce grupy B oraz zmniejsza koszty i czas pracy, ponieważ nie jest potrzebne wykonywanie dodatkowych testów identyfikacji z pomarańczowych kolonii.

PIŚMIENNICTWO

1. Ruoff, K.L., R.A. Whaley, and D. Beighton. *Streptococcus*. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenen (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. Tenen (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. Dane w archiwum. 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. Appl. Environm. Microbiol. 72: 6367-6370.

PAKOWANIE/DOSTĘPNOŚĆ

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

REF 257079 Gotowe podłoża na płytkach hodowlanych, 20 płytek

DODATKOWE INFORMACJE

W celu uzyskania dodatkowych informacji należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy 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