



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

### UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O meio **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (Ágar diferencial para estreptococos do grupo B) é utilizado para o isolamento e identificação de *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* do Grupo B) de amostras clínicas.

### PRINCÍPIOS E EXPLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO

Método microbiológico.

*Streptococcus agalactiae* é uma causa de infecções graves em recém-nascidos, incluindo septicemia, meningite e infecções de múltiplos órgãos.<sup>1-3</sup> O recém-nascido é infectado através da mãe, que pode ser portadora assintomática do organismo na flora vaginal. A incidência é cerca de 1,5 por 1000 nascimentos vivos, com uma mortalidade de cerca 8,7 %.<sup>3</sup> Foi demonstrado que a detecção adequada do agente na flora vaginal de mulheres grávidas, seguida de uma terapia correcta do recém-nascido, pode reduzir significativamente o risco de infecção.<sup>2,3</sup> A técnica de isolamento padrão para amostras vaginais é a utilização de ágar de sangue ou ágar de sangue selectivo e detecção da beta-hemólise característica, seguida por identificação bioquímica ou serológica.<sup>1</sup> Investigações recentes demonstraram também que baixos números de *S. agalactiae* na flora vaginal podem colocar o recém-nascido em risco de ser infectado. Logo, têm sido recomendadas técnicas de enriquecimento como LIM Broth.<sup>4</sup> No entanto, este meio de enriquecimento não é totalmente selectivo para *S. agalactiae* e outros organismos gram-positivos poderão também ser enriquecidos por este método, ocultando possivelmente o *S. agalactiae*.

Em anos recentes, modificações do meio Islam, descrito em 1977, têm sido testadas quanto a adequação para detecção e isolamento do organismo.<sup>5,6</sup> Nestes meios, como o meio New Granada, que é uma modificação recente do meio Islam, as estirpes beta-hemolíticas do *S. agalactiae* produzem colónias cor-de-laranja a salmão.<sup>7,8</sup> A coloração da colónia deve-se ao pigmento próprio do organismo, granadaene, um ornithine rhamno-polyene.<sup>16</sup>

A pigmentação é muito específica e não ocorre com estreptococos diferentes do grupo B ou outros organismos. No entanto, a estabilidade do meio New Granada é limitada.<sup>9,10</sup>

**BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**, que é uma modificação do meio New Granada com melhor estabilidade e selectividade; Proteose Peptone no. 3 é uma fonte de proteína e fornece precursores necessários para a produção e crescimento de pigmentos. O amido é um nutriente que funciona como estabilizador do pigmento. Glucose, piruvato e cisteína são nutrientes. Magnésio é um elemento vestigial. A combinação de MOPS e de fosfato funciona como um tampão de pH. O cristal violeta inibe os estafilococos. Foram adicionados inibidores e indutores para suprimir a flora acompanhante, como bactérias gram-negativas e anaeróbios estritos, e para aumentar a formação de pigmentos.

### REAGENTES

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

Fórmula\* por litro de água purificada

|                                                         |        |                                 |        |
|---------------------------------------------------------|--------|---------------------------------|--------|
| Peptona Proteose No. 3                                  | 25,0 g | Fosfato dissódico de hidrogénio | 10,7 g |
| Amido de milho                                          | 14,0   | Violeta cristal                 | 0,0005 |
| Glucose                                                 | 2,5    | Inibidores e indutores          | 0,021  |
| Sal sódico do ácido pirúvico                            | 1,0    | Ágar                            | 15,2   |
| Cloridrato de cisteína                                  | 0,1    |                                 |        |
| Sulfato de magnésio                                     | 0,3    |                                 |        |
| MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfónico), Sal hemisódio | 11,0   |                                 |        |

pH 7,4 ± 0,2

\*Ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho.

## PRECAUÇÕES

**IVD** . Apenas para uso profissional. 

Não utilizar as placas que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secura, fissuras ou outros sinais de deterioração.

Consultar as **INSTRUÇÕES GERAIS DE UTILIZAÇÃO** para informação sobre os procedimentos de manuseamento asséptico, os riscos biológicos e os procedimentos de eliminação do produto usado.

## ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE

Após recepção das placas, conservar no escuro a uma temperatura entre 2 e 8 °C, dentro do invólucro original, até ao momento da utilização. Evitar congelar e aquecer excessivamente. As placas podem ser inoculadas até terminar o prazo de validade (ver a etiqueta da embalagem) e incubadas durante o tempo de incubação recomendado.

As placas são fornecidas em pilhas de 10 e, quando uma destas pilhas é aberta, as respectivas placas terão de ser utilizadas no prazo máximo de uma semana, se forem conservadas em local limpo a uma temperatura entre 2 e 8 °C.

## CONTROLO DE QUALIDADE PELO UTILIZADOR

Inocular amostras representativas com as seguintes estirpes (para mais detalhes, consultar as **INSTRUÇÕES GERAIS DE UTILIZAÇÃO**). Incubar em condições anaeróbias durante 18 a 24 horas, a  $35 \pm 2$  °C.

| Estirpes                                   | Resultados de crescimento                                                                                       |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386 | Crescimento bom a excelente; colónias cor-de-laranja de dimensão pequena a média, com ou sem rebordos incolores |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615   | Crescimento; colónias muito pequenas incolores a cinzentas                                                      |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212    | Crescimento; colónias incolores a cinzentas de tamanho médio                                                    |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923    | Inibição completa                                                                                               |
| <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285     | Inibição parcial a completa                                                                                     |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071        | Inibição parcial a completa, proliferação completamente inibida, colónias incolores                             |
| Sem inoculação                             | Branco a acinzentado claro, opaco                                                                               |

## PROCEDIMENTO

### Material fornecido

**BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (placas de 90 mm **Stacker**). Microbiologicamente controlado.

### Material não fornecido

Meios de cultura auxiliares, reagentes e equipamento laboratorial, conforme necessário.

### Tipos de amostras

O meio **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** pode ser utilizado para o isolamento de *S. agalactiae* (estreptococos do grupo B) de todos os tipos de amostras clínicas humanos. As amostras frequentes incluem zaragatoas do tracto genital feminino ou zaragatoas e outras amostras de recém-nascidos. Aplique técnicas aprovadas para a colheita e transporte de amostras.<sup>1,11</sup>

### Procedimento do teste

Isolar a amostra o mais rapidamente possível após recepção no laboratório, no meio **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. A placa para cultura é usada principalmente para isolar culturas puras provenientes de amostras que contêm flora mista. Em alternativa, se o material estiver a ser cultivado directamente de uma zaragatoa, fazer rolar a zaragatoa sobre uma pequena área da superfície, na extremidade; em seguida, espalhar a partir desta área inoculada, para obter o isolamento.

Incubar anaerobicamente durante 18 a 24 horas a  $35 \pm 2$  °C. Se for negativo, as placas podem ser incubadas durante 18 a 24 horas adicionais, embora não seja geralmente necessário. Para recuperar todos os patógenos envolvidos numa infecção ou colonização, a amostra deve também ser isolada numa placa de ágar de sangue, p. ex. **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** que deve ser incubado numa atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> durante 18 a 48 horas a  $35 \pm 2$  °C. Se forem utilizados meios de pré-enriquecimento líquido como Lim Broth, podem ser repicados no meio **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** com uma ansa cheia de líquido após 18 a 24 horas de incubação e incubado em conformidade com a descrição acima.

## Resultados

Após a incubação, as estirpes beta-hemolíticas de *S. agalactiae* irão produzir colónias pequenas e médias, com cor entre pálida e cor-de-laranja viva, ou colónias salmão-cor-de-laranja, que poderão ou não estar delineadas por rebordos incolores. Para detectar estirpes debilmente pigmentadas, as placas devem ser lidas numa superfície branca. Qualquer intensidade da pigmentação cor-de-laranja é considerada positiva. Não segure as placas em frente de uma fonte de luz para a leitura! Os estafilococos, bastonetes gram-negativos e anaeróbios estritos serão geralmente completamente inibidos neste meio. A maioria dos outros estreptococos e enterococos irá crescer sem inibição, mas produzirá colónias incolores a cinzentas. As estirpes não hemolíticas de *S. agalactiae* também irão produzir colónias cinzentas a cinzentas-azuis. A sua ocorrência é rara (até 4% em grávidas).

Para diferenciar os estreptococos não hemolíticos do grupo B de enterococos ou estreptococos que não do grupo B, pode ser realizado um teste PIR (utilize o kit **BD DrySlide PYR, n.º de cat. 231747**) directamente a partir de colónias cinzentas a cinzentas-azuis no **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**: os enterococos, *Streptococcus pyogenes* e muitos outros estreptococos são positivos para PIR (=cor vermelha a roxa passado 1 min.), enquanto o *S. agalactiae* e um conjunto de outros estreptococos são negativos para PIR (=amarelado a incolor).<sup>15</sup> Os isolados com resultados negativos para PIR de colónias cinzentas ou cinzentas-azuis devem ser adicionalmente testados para se confirmar a presença de uma estirpe *S. agalactiae* não hemolítica, p. ex., por tipagem serológica.

A pigmentação cor-de-laranja neste meio é muito específico para *S. agalactiae*, e a identificação serológica ou bioquímica não é necessária para a confirmação. No entanto, a tipagem serológica pode ser realizada directamente a partir do **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** sem ripagem posterior. O **BBL Streptocard Enzyme Latex Test Kit** (n.º de cat. 240950) pode ser utilizado para este fim.

Assim, a placa **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** deve ser inspeccionada tendo em vista a presença de estirpes não hemolíticas de *S. agalactiae* e patógenos adicionais.

## CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O meio **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** é utilizado para o isolamento e identificação de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos do grupo B) de todos os tipos de amostras clínicas humanas. A coloração cor-de-laranja da colónia neste meio é altamente específica de *S. agalactiae* (consultar **Características do desempenho**); assim, não são necessários testes confirmatórios. Em caso de dúvida ou com estirpes mal pigmentadas, pode realizar-se agrupamento serológico e/ou um teste PIR directamente a partir da placa de isolamento.

Segundo alguns estudos, os genes responsáveis pela produção de pigmentos e pela produção de hemólise do *S. agalactiae* estão relacionados geneticamente.<sup>12,13</sup> Cerca de 1 a 2% das estirpes de *S. agalactiae* são não hemolíticas<sup>14</sup> e, por isso, poderão não ser pigmentadas no **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. No entanto, tem sido determinado internamente que os produtores fracos de hemólise que se apresentam não hemolíticos na maioria dos meios de ágar de sangue poderão ser ainda produtores fracos de pigmentos. A hemólise foi indicada como um dos principais factores de patogenicidade do *S. agalactiae*.<sup>12,13</sup>

Para detectar todos os patógenos envolvidos numa infecção, incluindo estirpes não hemolíticas dos estreptococos do grupo B, também deve ser inoculado com a amostra um meio de ágar de sangue como o **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**.

O meio **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** não é adequado ao isolamento de estreptococos diferentes do *S. agalactiae* ou de outros patógenos que possam produzir infecções semelhantes (p. ex., *Listeria monocytogenes*).

O desempenho deste meio com amostras veterinárias não foi determinado.

### Características do desempenho

Foi realizada uma avaliação de desempenho com 151 amostras clínicas (zarcas vaginais e cervicais, várias amostras de recém-nascidos) que se determinaram ser positivas para o *S. agalactiae* através de colocação convencional numa placa de Ágar de sangue seguida de tipagem serológica dos isolados.<sup>15</sup> Destas 151 amostras, 148 revelaram-se positivas na segunda cultura com **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** e produziram um isolado não hemolítico e 147 isolados beta-hemolíticos.

No meio **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**, incubado anaerobicamente durante 18 a 24 horas, 149 das 151 amostras produziram crescimento de estreptococos do grupo B; destas, 148 produziram um tipo qualquer de colónias cor-de-laranja (sensibilidade de 98%) que foram todas identificadas serologicamente como estreptococos do grupo B. Destas 148 culturas, três foram classificadas como “cor-de-laranja muito claro”. Se se subtraírem estas três culturas, obtém-se uma sensibilidade de 96%.

Neste estudo, as placas inoculadas de **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** foram também incubadas numa atmosfera aeróbia enriquecida com dióxido de carbono. Sob estas condições de incubação, a sensibilidade foi de 96,8%. Nestas placas, 14 culturas foram classificadas como “cor-de-laranja muito claro”. Se se subtraírem estas culturas, obtém-se uma sensibilidade de 87,4%.

Quando incubadas anaerobicamente, obtiveram-se muitos mais isolados com uma coloração de colónia cor-de-laranja viva após a incubação numa atmosfera aeróbia enriquecida com dióxido de carbono ( $P < 0,005$ ). Adicionalmente, as colónias de muitas estirpes eram maiores quando incubadas anaerobicamente. **Logo, a incubação anaeróbica melhora significativamente a detecção de colónias cor-de-laranja.**

Nesta avaliação, incluíram-se 52 amostras que tinham sido determinadas negativas para *S. agalactiae*. Não se obtiveram falsos positivos quando cultivados no meio **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (especificidade = 100%).

A utilização do meio **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** melhora e acelera o diagnóstico de estreptococos do grupo B, reduzindo os custos e o tempo de execução, uma vez que não são necessários testes de identificação suplementares das colónias cor-de-laranja.

### BIBLIOGRAFIA

1. Ruoff, K.L., R.A. Whaley, and D. Beighton. *Streptococcus*. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Tenover, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8<sup>th</sup> 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  $\beta$ -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. Dados em arquivo. 2003; 2010. BD Diagnostic Systems Europe. Heidelberg, Alemanha.
16. Rosa-Fraile, M., et al. 2006. Granadaene: proposed structure of the Group B Streptococcus polyenic pigment. Appl. Environm. Microbiol. 72: 6367-6370.

## **EMBALAGEM/APRESENTAÇÃO**

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

**REF** 257079      Meios em placas prontos a usar, 20 placas

## **INFORMAÇÕES ADICIONAIS**

Para obter mais informações, contacte o representante local da 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