

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

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) (Diferenčná pôda pre streptokoky skupiny B – pôda Granada) sa používa na izoláciu a identifikáciu *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* skupiny B) z klinických vzoriek.

PRINCÍPY A VYSVETLENIE METÓDY

Mikrobiologická metóda.

Streptococcus agalactiae spôsobuje vážne infekcie u novorodencov vrátane septikémie, meningitídy a viacerých orgánových infekcií.¹⁻³ Novorodenec sa infikuje od matky, u ktorej sa tento organizmus môže asymptomaticky nachádzať vo vaginálnej flóre. Výskyt je približne 1,5 na 1000 živých novorodencov a úmrtnosť je približne 8,7 %.³ Preukázalo sa, že správna detekcia látky vo vaginálnej flóre u tehotných žien a následná vhodná liečba novorodencov môže riziko infekcie výrazne znížiť.^{2,3} Štandardnou izolačnou technikou na izoláciu z vaginálnych vzoriek je použitie krvného agaru alebo selektívneho krvného agaru a detekcia charakteristickej beta hemolýzy, po ktorej nasleduje biochemická alebo sérologická identifikácia.¹ Najnovšie výskumy preukázali, že aj nízky počet organizmov *S. agalactiae* vo vaginálnej flóre môže predstavovať riziko, že dôjde k infikovaniu novorodenca. Preto sa odporúča použiť obohatené techniky, napríklad bujón LIM Broth.⁴ Táto obohatená pôda však pre *S. agalactiae* nie je úplne selektívna a pri tejto metóde môžu byť obohatené aj iné grampozitívne organizmy, ktoré môžu prekryť *S. agalactiae*.

V posledných rokoch boli testované modifikácie pôdy Islam, opísanej v roku 1977, na schopnosť detegovať a izolovať tento organizmus.^{5,6} Na týchto pôdach, ako je napríklad pôda New Granada, ktorá je najnovšou modifikáciou pôdy Islam, beta-hemolytické kmene *S. agalactiae* vytvoria oranžové až lososovo sfarbené kolónie.^{7,8} Sfarbenie kolónií závisí od vlastnej pigmentácie organizmu, granadaénu, ornitín ramno-polyénu.¹⁶

Táto pigmentácia je veľmi špecifická a neobjavuje sa pri streptokokoch iných ako skupiny B ani pri iných organizmoch. Stabilita pôdy New Granada je však obmedzená.^{9,10}

V modifikovanej pôde New Granada so zlepšenou stabilitou a selektivitou **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** je proteózový peptón č. 3 zdrojom proteínu a poskytuje prekursor nutný na vytvorenie pigmentov a rast. Škrob dodáva živiny a funguje ako stabilizátor pigmentu. Glukóza, pyruvát a cysteín sú výživné látky. Magnézium je stopový prvok. Kombinácia MOPS a fosfátu funguje ako pufer pH. Kryštálová violet inhibuje stafylokoky. Prídavok inhibítorov a induktorov potláča sprievodnú flóru, napríklad gramnegatívne baktérie a striktné anaeróby, a zvyšuje vznik pigmentu.

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

Zloženie* na jeden liter purifikovanej vody

Proteózový peptón č. 3	25,0 g	Stredný fosforečnan sodný	10,7 g
Kukurličný škrob	14,0	Kryštálová violet	0,0005
Glukóza	2,5	Inhibítory a induktory	0,021
Sodná soľ pyruvátnej kyseliny	1,0	Agar	15,2
Cysteín hydrochlorid	0,1		
Síran horečnatý	0,3		
MOPS (3-morfolinopropánová kyselina sulfónová), hemisodná soľ	11,0		

pH 7,4 ± 0,2

* Upravené alebo doplnené podľa potreby tak, aby boli splnené kritériá účinnosti.

UPOZORNENIA

IVD . Len na profesionálne použitie. ②

Misky nepoužívajte, ak sú na nich viditeľné známky mikrobiálnej kontaminácie, zmeny farby, vysušenia, prasknutia alebo iné známky poškodenia.

Informácie o aseptických postupoch pri manipulácii, o biologických rizikách a likvidácii použitého produktu nájdete v dokumente **VŠEOBECNÉ POKYNY NA POUŽÍVANIE**.

USKLADNENIE A ŽIVOTNOSŤ

Dodanéisky s pôdou skladujte na tmavom mieste pri teplote 2 až 8 °C v pôvodnom obale. Z obalu ich vyberte až bezprostredne pred použitím. Nezmrazujte ani nevystavujte nadmernej teplote. Pôda v miskách sa môže očkovať až do dátumu použiteľnosti (uvedeného na obale) a inkubovať podľa odporúčania.

Misky z otvorených balení po 10 kusov sa môžu používať jeden týždeň, ak sú uskladnené na čistom mieste pri teplote 2 až 8 °C.

KONTROLA KVALITY UŽÍVATEĽOM

Reprezentatívne vzorky naočkujte nasledujúcimi kmeňmi (podrobnosti nájdete v dokumente **VŠEOBECNÉ POKYNY NA POUŽÍVANIE**). Inkubujte anaeróbne pri teplote 35 ± 2 °C počas 18 až 24 hodín.

Kmene	Výsledky rastu
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	Rast dobrý až výborný, malé až stredné oranžové kolónie s bezfarebnými okrajmi alebo bez nich
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Rast; veľmi malé, bezfarebné až sivé kolónie
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Rast; stredné, bezfarebné až sivé kolónie
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Úplná inhibícia
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	Čiastočná až úplná inhibícia
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Čiastočná až úplná inhibícia, plazenie úplne inhibované, bezfarebné kolónie
Nenaočkované	Biele až svetlosivasté, nepriehľadné

POSTUP

Dodávaný materiál

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) (90 mm Petriho misky **Stacker**). Mikrobiologicky kontrolované.

Nedodávaný materiál

Pomocné kultivačné pôdy, činidlá a potrebné laboratórne vybavenie.

Typy vzoriek

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) sa používa na izoláciu *S. agalactiae* (streptokoky skupiny B) zo všetkých typov ľudských klinických vzoriek. Medzi časté typy vzoriek patria výtery z genitálneho traktu alebo výtery a iné vzorky od novorodencov. Na odber a prenos vzoriek použite vhodné techniky.^{1,11}

Postup testu

Keď dostanete vzorku do laboratória, čo najskôr ju očkujte na pôdu **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Naočkovaná pôda sa používa predovšetkým na izoláciu čistých kultúr zo vzoriek obsahujúcich zmiešanú flóru. Ak sa materiál kultivuje priamo z vatového tampónu, obtrite tampón o malú časť povrchu pôdy na okraji misky a potom rozočkujte.

Inkubujte anaeróbne 18 až 24 hodín pri teplote 35 ± 2 °C. V prípade negatívneho výsledku možno misky inkubovať ďalších 18 až 24 hodín, aj keď to obvykle nie je nutné. Na izoláciu všetkých patogénov prítomných v infekcii alebo kolonizácii je nutné vzorku naočkovať aj na krvný agar, napríklad **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**, ktorý sa bude inkubovať v prostredí obohatenom o CO₂ 18 až 48 hodín pri teplote 35 ± 2 °C. Ak sa používa tekutá vopred obohatená pôda, napríklad bujón Lim Broth, možno ich subkultivovať na pôde **BD**

Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) kľučkou s týmto bujónom po 18 až 24 hodinách inkubácie a inkubovať podľa opisu vyššie.

Výsledky

Po inkubácii beta-hemolytické kmene *S. agalactiae* vytvoria malé až stredné, svetlé až výrazne oranžové alebo lososovooranžové kolónie, ktoré môžu byť obklopené bezfarebnými okrajmi. Na detekciu slabo pigmentovaných kmeňov je nutné výsledky odčítať oproti bielemu pozadiu. Každá intenzita oranžovej pigmentácie sa považuje za pozitívny výsledok. Nedržte misky pri odčítavaní pred zdrojom svetla! Stafylokoky, gramnegatívne paličky a striktné anaeróby budú na pôde obvyčajne úplne inhibované. Väčšina iných streptokokov a enterokokov bude rásť bez inhibície, vytvorí však bezfarebné až sivé kolónie. Nehemolytické kmene *S. agalactiae* budú vytvárať aj sivé až sivomodré kolónie. Ich výskyt je zriedkavý (do 4 % u tehotných žien). Na diferenciaciu nehemolytických streptokokov skupiny B od enterokokov alebo streptokokov iných ako skupiny B možno vykonať test PYR (použite súpravu **BD DrySlide PYR kit, kat. č. 231747**) priamo zo sivých až sivomodrých kolónií na pôde **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**: enterokoky, *Streptococcus pyogenes* a niekoľko ďalších streptokokov sú pozitívne v teste PYR (= červená až fialová farba do 1 min.), zatiaľ čo *S. agalactiae* a množstvo ďalších streptokokov sú negatívne v teste PYR (= žltasté až bezfarebné).¹⁵ Izoláty s negatívnymi výsledkami v teste PYR zo sivých alebo sivomodrých kolónií sa musia ďalej testovať, aby sa potvrdila prítomnosť nehemolytického kmeňa *S. agalactiae*, napr. prostredníctvom sérologickej klasifikácie.

Oranžová pigmentácia je na tejto pôde veľmi špecifická pre *S. agalactiae* a na potvrdenie nie je nutná sérologická ani biochemická identifikácia. Sérologickú klasifikáciu však možno vykonať priamo na pôde **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** bez ďalšej subkultúry. Na tento účel možno použiť súpravu **BBL Streptocard Enzyme Latex Test Kit** (kat. č. 240950).

Na zistenie prítomnosti nehemolytických kmeňov *S. agalactiae* a ďalších patogénov je nutné skontrolovať aj pôdu **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**.

VLASTNOSTI A OBMEDZENIA POSTUPU

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) sa používa na izoláciu a identifikáciu *Streptococcus agalactiae* (streptokoky skupiny B) zo všetkých typov ľudských klinických vzoriek. Oranžové sfarbenie kolónií na tejto pôde je vysoko špecifické pre *S. agalactiae* (pozri časť **Vlastnosti postupu**), preto nie je nutné podporné testovanie. V prípade pochybností alebo ak sú kmene slabo pigmentované, vykonajte sérologické stanovenie čeladi a/alebo test PYR priamo z izolačnej misky.

Bolo zistené, že gény zodpovedné za vytvorenie pigmentu a produkciu hemolýzínu v *S. agalactiae* sú geneticky spojené.^{12,13} Približne 1 až 2 % kmeňov *S. agalactiae* sú nehemolytické¹⁴, preto na pôde **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** nemôžu byť pigmentované. Interne však bolo stanovené, že organizmy produkujúce slabý hemolýzín, ktoré sa na väčšine krvných agarov javia ako nehemolytické, môžu vytvárať slabý pigment. Zistilo sa, že hemolýzín je jedným z hlavných faktorov patogenity *S. agalactiae*.^{12,13}

Na detekciu všetkých patogénov prítomných v infekcii vrátane nehemolytických kmeňov streptokokov skupiny B je nutné naočkovať vzorkou aj pôdu, napríklad **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**.

Pôda BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) nie je vhodná na izoláciu streptokokov iných ako *S. agalactiae* alebo iných patogénov, ktoré môžu vytvárať podobné infekcie (napríklad *Listeria monocytogenes*).

Testovanie veterinárnych vzoriek na tejto pôde nebolo stanovené.

Vlastnosti postupu

Hodnotilo sa 151 klinických vzoriek (vaginálne a cervikálne výtery, rôzne vzorky od novorodencov) stanovených ako pozitívne na *S. agalactiae* štandardnou kultiváciou na pôdu Blood Agar s následnou sérologickou klasifikáciou izolátov.¹⁵ Z týchto 151 vzoriek bolo

148 pozitívnych po druhej kultúre na pôde **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** a vykázalo 1 nehemolytický a 147 beta-hemolytických izolátov.

Na pôde **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** inkubovanej anaeróbne 18 až 24 hodín vykázalo 149 vzoriek zo 151 rast streptokokov skupiny B, z tohto počtu 148 vzoriek vykázalo niektorý typ oranžových kolónií (citlivosť 98 %), kde všetky boli sérologicky identifikované ako streptokoky skupiny B. Z týchto 148 kultúr tri boli ohodnotené ako „veľmi svetlooranžové“. Po odpočítaní týchto troch kultúr sa získala citlivosť 96 %.

V tejto štúdii boli misky s pôdou **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** inkubované aj v aeróbnom prostredí obohatenom o oxid uhličitý. Pri týchto inkubačných podmienkach bola citlivosť 96,8 %. Na tejto pôde bolo 14 kultúr ohodnotených ako „veľmi svetlooranžové“. Po ich odpočítaní sa stanovila citlivosť 87,4 %.

Pri anaeróbnej inkubácii sa získalo omnoho viac izolátov s výrazne oranžovým sfarbením kolónií ako po inkubácii v aeróbnom prostredí obohatenom o oxid uhličitý ($P < 0,005$). Kolónie mnohých kmeňov boli navyše väčšie pri anaeróbnej inkubácii. **Z toho vyplýva, že anaeróbna inkubácia výrazne zlepšuje detekciu oranžových kolónií.**

V tomto hodnotení bolo zahrnutých aj 52 vzoriek, ktoré boli predtým stanovené ako negatívne na *S. agalactiae*. Na pôde **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** neboli zaznamenané žiadne nepravé pozitívne výsledky (špecificita = 100 %).

Použitie pôdy **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** zlepšuje a zrýchľuje diagnostiku streptokokov skupiny B a znižuje náklady a čas dosiahnutia výsledkov, pretože nie sú potrebné ďalšie identifikačné testy z oranžových kolónií.

LITERATÚRA

1. Ruoff, K.L., R.A. Whaley, and D. Beighton. *Streptococcus*. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Tenover, 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. Tenover, 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. Dáta v súbore. 2003; 2010. Diagnostické systémy BD Európa. Heidelberg, Nemecko.
16. Rosa-Fraile, M., et al. 2006. Granadaene: proposed structure of the Group B Streptococcus polyenic pigment. Appl. Environm. Microbiol. 72: 6367-6370.

BALENIE/DOSTUPNOSŤ

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

REF 257079 Pôda v Petriho miskách pripravená na použitie, 20 misiek

ĎALŠIE INFORMÁCIE

Ďalšie informácie získate od miestneho zástupcu spoločnosti 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