# BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

## ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Диференциращият **BD Group B Streptococcus Agar (Granada Medium)** (Granada среда) се използва за изолиране и идентифициране на *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*) от клинични материали.

## ПРИНЦИПИ И ОБЯСНЕНИЕ НА ПРОЦЕДУРАТА

Микробиологичен метод.
*Streptococcus agalactiae* е причина за тежки инфекции у новородени, включително септицемия, менингит и множество органни инфекции.[1-3] Новородените се заразяват от майката, която може безсимптомно да носи организма във вагиналната флора. Инцидентността е около 1,5 на 1000 живородени, а смъртността е около 8,7%. [3] Установено е, че съответното откриване на агента във вагиналната флора на бременни жени, последвано от подходяща терапия за новороденото може значително да намали риска от инфекция.[2,3] Стандартната техника за изолиране от вагинални материали е използване на кръвен агар или селективен кръвен агар и откриване на характерна бета-хемолиза, последвано от биохимично или серологично идентифициране.[1] Неотдавнашни изследвания установиха също, че ниско съдържание на *S. agalactiae* във вагиналната флора може да изложи на риск от инфекция новороденото. Поради това се препоръчват техники за обогатяване, като LIM бульон.[4] Въпреки това, тази обогатена среда не е изцяло селективна за *S. agalactiae*, като и други Грам-положителни организми могат да бъдат обогатени чрез този метод, възможно скривайки *S. agalactiae*.

Доскоро пригодността за откриване и изолиране на организма се тестуваше с модификации на средата Islam, описани през 1977 г.[5,6] В тези среди, както и в New Granada среда, която представлява модификация на средата Islam, бета-хемолитични щамове *S. agalactiae* произвеждат оранжеви до оранжево-розови колонии.[7,8] Оцветяването на колониите е резултат от собствения пигмент на организма, гранаден, орнитин рамно-полиен.[16] Пигментацията е много специфична и не се появява при различни от група B стрептококи или други организми. Въпреки това, стабилността на средата New Granada е ограничена.[9,10] **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**, която представлява модификация на средата New Granada с подобрена стабилност и селективност, протеоза пептон № 3 е източник на протеини и осигурява необходимите за производството на пигмент и растеж прекурсори. Нишестето е хранително вещество и действа като стабилизатор на пигмента. Глюкоза, пируват и цистеин са хранителни вещества. Магнезият е проследяващ елемент. Комбинацията от MOPS и фосфат действа като pH буфер. Кристално виолетовото инхибира стафилококи. Добавени са инхибитори и индуктори за потискане на придружаваща флора, като Грам-отрицателни бактерии и стриктни анаероби за подобряване на образуването на пигмент.

## РЕАГЕНТИ

**BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**
Формула* на литър пречистена вода

| | | | |
|---|---|---|---|
| Протеоза пептон № 3 | 25,0 g | Двунатриев хидроген фосфат | 10,7 g |
| Царевично нишесте | 14,0 | Кристал виолет | 0,0005 |
| Глюкоза | 2,5 | Инхибитори и индуктори | 0,021 |
| Натриева сол на пируватна киселина | 1,0 | Агар | 15,2 |
| Цистеин хидрохлорид | 0,1 | | |
| Магнезиев сулфат | 0,3 | | |
| MOPS (3-морфолинопропан сулфонова киселина), хеминатриева сол | 11,0 | | |

pH 7,4 ± 0,2
*Коригирана и/или допълнена за постигане на съответните работни характеристики.

## ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

IVD . Само за професионална употреба.

Не използвайте петритата, ако имат признаци на микробно замърсяване, обезцветяване, изсушаване, пукнатини или други признаци на увреждане.

Направете справка в **ДОКУМЕНТА ОБЩИ ИНСТРУКЦИИ ЗА УПОТРЕБА** относно асептичните манипулационни процедури, биологичните опасности и изхвърлянето на използвания продукт.

## СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ

След получаване съхранявайте петритата на тъмно, при температура от 2 до 8°C, в оригиналната им маншетна опаковка до момента на непосредствената им употреба. Не допускайте замразяване и прегряване. Петритата могат да бъдат инокулирани до изтичане на срока на годност (виж етикета на опаковката) и инкубирани според препоръчваните инкубационни периоди.

Отворените комплекти от 10 чашки могат да се използват в продължение на една седмица при съхранение на чисто място при температура от 2 до 8° C.

## ПОТРЕБИТЕЛСКИ КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

Инокулирайте представителните образци със следните щамове (за подробности вижте документа **ОБЩИ ИНСТРУКЦИИ ЗА УПОТРЕБА** ). Инкубирайте анаеробно за 18 до 24 часа при 35 ± 2° C.

| **Щамове** | **Резултати на растежа** |
|---|---|
| *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386 | Добър до отличен растеж, малки до средни оранжеви колонии със или без безцветни граници |
| *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 | Растеж; много малки безцветни до сиви колонии |
| *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 | Растеж; средноголеми безцветни до сиви колонии |
| *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 | Пълно инхибиране |
| *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 | Частично до пълно инхибиране |
| *Proteus mirabilis* ATCC 43071 | Частично до пълно инхибиране, изцяло инхибирано роене, безцветни колонии |
| Неинокулирани | Бели до светлосивкави, непрозрачни |

## ПРОЦЕДУРА

### Предоставени материали

**BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (90 mm **Stacker** плаки). Микробиологично проверени.

### Непредоставени материали

Допълнителна културална среда, реагенти и лабораторно оборудване според нуждите.

### Видове материали за изследване

**BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** може да се използва за изолиране на *S. agalactiae* (група B стрептококи) от всички видове човешки клинични проби. Често използваните материали включват намазки от женски полови органи или намазки и други материали от новородени. Прилагайте съответните техники за събиране и транспортиране на материали.[1,11]

### Методика на тестване

Посейте материала възможно най-бързо след получаването му в лабораторията в **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Плаката с инокулата се използва главно за изолиране на чисти култури от образци, съдържащи смесена флора. Като алтернатива, ако материалът е култивиран непосредствено от намазка, потрийте намазката върху неголям участък в края; след това направете посявка от тази повърхност.

Инкубирайте анаеробно за 18 до 24 часа при 35 ± 2° C. При отрицателен резултат чашките могат да се инкубират допълнително за 18 до 24 часа, въпреки че това

обикновено не е необходимо. За отделяне на всички патогени, включени в инфекция или колонизация, материалът трябва също да бъде посят в плака с кръвен агар, например агар **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**, която трябва да се инкубира в обогатена с $CO_2$ атмосфера за 18 до 48 часа при 35 ± 2° C. Ако се използва течна предварително обогатена среда, като Lim Broth, те могат да бъдат повторно посяти в **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** с бримка след 18 до 24 часа инкубиране и да се инкубират както е посочено по-горе.

**Резултати**
След инкубиране, бета-хемолитичните щамове на *S. agalactiae* ще произведат малки до средноголеми бледи до силно оранжеви, или оранжево-розови оцветени колонии, които могат да са обкръжени или не от безцветни граници. За откриване на слабо пигментирани щамове чашките трябва да се отчитат върху бяла повърхност. Всяка интензивност на оранжева пигментация се отчита като положителен резултат. Не отчитайте данните от чашките пред източник на светлина! Стафилококи, грамотрицателни пръчици и стриктни анаероби обикновено ще бъдат инхибирани изцяло в тази среда. Повечето други стрептококи и ентерококи ще растат без инхибиране, но ще произведат безцветни до сиви колонии. Нехемолитичните щамове на S. agalactiae също ще дадат сиви до сиво сини колонии. Тяхната поява е рядкост (до 4% при бременни жени).
За да се диференцират B стрептококи от ентерокики или не група B стрептококи, може да се проведе PYR тест (използвайте **BD DrySlide PYR kit, кат. No. 231747**) пряко от сивите до сиво-сините колонии върху **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**: ентерококи, *Streptococcus pyogenes* и някои други стрептококи са PYR позитивни (=червен до пурпурен цвят до 1 минута), докато *S. agalactiae* и различни други стрептококи са PYR негативни (=жълтеникав до безцветен).[15] Изолатите с PYR-негативни резултати от сивите до сиво-сините колонии трябва да се тестват допълнително, за да се потвърди наличието на нехемолитичен щам на *S. agalactiae*, като например посредством серологично типизиране.

Оранжевата пигментация в тази среда е много специфична за *S. agalactiae* и за потвърждение не се изисква серологично или биохимично идентифициране. Въпреки това, серологично типиране може да бъде извършено директно от **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** без допълнително вторично посяване. **BBL Streptocard Enzyme Latex Test Kit** (кат. No. 240950) може да се използва за тази цел. Също така, плака с **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** трябва също да се инспектира за наличието на нехемолитични щамове на *S. agalactiae* и на други патогени.

## РАБОТНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОЦЕДУРАТА

**BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** се използва за изолиране и идентифициране на *Streptococcus agalactiae* (Група B стрептококиі) от всички видове човешки клинични проби. Оцветяването на колониите в оранжево в тази среда е изключително специфично за *S. agalactiae* (виж **Работни характеристики**); следователно не се изискват потвърждаващи тестове. При случаи на съмнение или слабо пигментирани щамове, серологично групиране и/или PYR тест може да се извърши непосредствено от изолиращата плака.
Докладвано е, че отговарящите за производството на пигмент и хемолизин гени на *S. agalactiae* са генетично свързани.[12,13] Около 1-2% от щамовете на S. agalactiae са нехемолитични[14] и следователно могат да не бъдат пигментирани в **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Въпреки това, вътрешно бе установено, че слабите производители на хемолизин, появяващи се като нехемолитични в повечето среди с кръвен агар, могат да са слаби производители на пигмент. Хемолизинът е докладван като един от главните фактори за патогенността на *S. agalactiae.*[12,13]
За откриване на всички включени в инфекцията патогени, в това число нехемолитични щамове на B стрептококи, материалът трябва да бъде инокулиран също и в среда с кръвен агар, като **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**.

**BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** не е подходящ за изолиране на различни от *S. agalactiae* стрептококи или други патогени, които могат да предизвикат подобни инфекции (като например, *Listeria monocytogenes*).
Функционирането на тази среда с ветеринарни материали не е определяно.

**Работни характеристики**
Функционална оценка бе проведена със 151 клинични материали (вагинални и цервикални намазки, различни материали от новородени), определени като положителни за *S. agalactiae* чрез стандартно посяване на плака с кръвен агар, последвано от серологично типиране на изолатите.[15] От тези 151 материала 148 бяха положителни след вторично посяване в агар **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** и произведоха един нехемолитичен и 147 бета-хемолитични изолата.
Върху **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium),** , инкубирана анаеробно за 18 до 24 часа, 149 от 151 материала показаха растеж на B стрептококи; от тях 148 проявиха какъвто и да е тип оранжеви колонии (чувствителност 98%), всички от които бяха идентифицирани серологично като B стрептококи. От тези 148 култури три бяха оценени като „много бледооранжеви“. Ако тези три култури се извадят, постигната бе 96% чувствителност.
В това изследване инокулираните плаки с **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** бяха също така инкубирани в аеробна атмосфера, обогатена с въглероден двуокис. При тези инкубационни условия чувствителността бе 96,8%. В тези чашки 14 култури бяха оценени като „много бледооранжеви“. Ако те се извадят, чувствителността е 87,4%.
При анаеробно инкубиране се получават значително повече изолати със силно оранжево оцветяване на колониите, отколкото след инкубиране в аеробна атмосфера, обогатена с въглероден двуокис ($P < 0,005$). Освен това, колониите на много щамове бяха по-големи при анаеробно инкубиране. **Следователно, анаеробната инкубация значително подобрява откриването на оранжеви колонии.**

В тази оценка бяха включени също и 52 материала, предварително определени като отрицателни за *S. agalactiae* . Не бяха получени фалшиви положителни резултати при посяването в **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (специфичност = 100%).

Употребата на **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** подобрява и ускорява диагностицирането на B стрептококи и намалява разходите и времето, тъй като допълнителни тестове за оранжевите колонии не са необходими.

## СПРАВОЧНА ЛИТЕРАТУРА


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. Yolken (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. Infeción 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 diaease: 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. Yolken (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 IS*S1* transposition. J. Bacteriol. 181: 3212-3219.
13. Pritzlaff, C.A., et al. 2001. Genetic basis for the ß-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. Файлови данни. 2003; 2010. BD Diagnostic Systems Европа. Heidelberg, Германия.
16. Rosa-Fraile, M., et al. 2006. Granadaene: proposed structure of the Group B Streptococcus polyenic pigment. Apppl. Environm. Microbiol. 72: 6367-6370.

## ОПАКОВКА/СЪДЪРЖАНИЕ

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

REF 257079 Готова за употреба среда в плака, 20 плаки

## ДОПЪЛНИТЕЛНА ИНФОРМАЦИЯ

За допълнителна информация, моля свържете се с местния представител на 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