



BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

USO PREVISTO

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) (agar para diferenciación de estreptococos del grupo B [medio Granada]) se utiliza para el aislamiento y la identificación de *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B) a partir de muestras clínicas.

PRINCIPIOS Y EXPLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Método microbiológico.

Streptococcus agalactiae causa graves infecciones en recién nacidos, tales como septicemia, meningitis e infecciones multiorgánicas¹⁻³. El recién nacido contrae la infección de la madre, quien puede ser portadora asintomática del microorganismo en la flora vaginal. La incidencia es de 1,5 por cada 1.000 nacidos vivos y la mortalidad de un 8,7% aproximadamente³. Se ha demostrado que la detección adecuada del agente en la flora vaginal de la mujer embarazada, seguida del tratamiento adecuado del recién nacido, puede reducir de forma significativa el riesgo de infección^{2,3}. La técnica estándar para el aislamiento de especies vaginales consiste en el uso de agar sangre o agar sangre selectivo y la detección de la beta-hemólisis característica, seguida de la identificación bioquímica o serológica¹. Investigaciones recientes han demostrado también que cantidades reducidas de *S. agalactiae* en la flora vaginal pueden constituir un riesgo de infección para el recién nacido. Por tanto, se han recomendado técnicas de enriquecimiento tales como LIM Broth (caldo Lim)⁴. Sin embargo, este medio de enriquecimiento no es totalmente selectivo para *S. agalactiae*, además de que otros microorganismos gram positivos pueden enriquecerse mediante este método, ocultando posiblemente la presencia de *S. agalactiae*.

En los últimos años, se ha comprobado la idoneidad de modificaciones del medio Islam, descritas en 1977, para la detección y el aislamiento del microorganismo^{5,6}. En estos medios, como en el medio New Granada, que es una modificación reciente del medio Islam, cepas beta-hemolíticas de *S. agalactiae* producen colonias de color naranja a salmón^{7,8}. La coloración de las colonias se debe al pigmento propio del microorganismo, granadaeno, un polieno asociado a rhamnosa y ornitina¹⁶.

La pigmentación es muy específica y no ocurre con estreptococos que no sean del grupo B ni con otros microorganismos. Sin embargo, la estabilidad del medio New Granada es limitada^{9,10}.

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) es una modificación del medio New Granada con estabilidad y selectividad mejoradas. La Proteosa peptona N° 3 es una fuente de proteínas y proporciona precursores necesarios para la producción y el crecimiento del pigmento. El almidón es un nutriente y actúa como estabilizador del pigmento. La glucosa, el piruvato y la cisteína son nutrientes. El magnesio es un elemento traza. La combinación de MOPS y fosfato actúa como tampón de pH. El cristal violeta inhibe el crecimiento de los estafilococos. Se han añadido inhibidores e inductores del crecimiento para suprimir la flora acompañante, como bacterias gram negativas y anaerobios estrictos, y mejorar la formación del pigmento.

REACTIVOS

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

Fórmula* por litro de agua purificada

Proteosa peptona N° 3	25,0 g	Fosfato disódico de hidrógeno	10,7 g
Almidón de maíz	14,0	Cristal violeta	0,0005
Glucosa	2,5	Inhibidores e inductores	0,021
Sal sódica de ácido pirúvico	1,0	Agar	15,2
Hidrocloruro de cisteína	0,1		
Sulfato de magnesio	0,3		
MOPS (ácido 3-morfolinpropanosulfónico), sal hemisódica	11,0		

pH 7,4 ± 0,2

*Ajustada y/o complementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

PRECAUCIONES

IVD . Solamente para uso profesional. 

No utilizar las placas si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, grietas o cualquier otro signo de deterioro.

Consultar los procedimientos de manipulación aséptica, riesgos biológicos y eliminación del producto en el documento **INSTRUCCIONES GENERALES DE USO**.

ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

Al recibir las placas, almacenarlas en un lugar oscuro a una temperatura de 2 a 8 °C en su envase original hasta justo antes de su uso. Evitar la congelación y el sobrecalentamiento. Las placas pueden inocularse hasta la fecha de caducidad (véase la etiqueta del paquete) e incubarse durante los tiempos de incubación recomendados.

Las placas de pilas abiertas de 10 unidades almacenadas en un área limpia a una temperatura de 2 a 8 °C pueden utilizarse durante una semana.

CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO

Inocular muestras representativas con las cepas siguientes (para obtener más datos, véase el documento **INSTRUCCIONES GENERALES DE USO**). Incubar en atmósfera anaerobia durante 18 a 24 horas a 35 ± 2 °C.

Cepas	Resultados del crecimiento
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de pequeñas a medianas de color naranja con o sin bordes incoloros
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Crecimiento; colonias muy pequeñas de incoloras a color gris
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Crecimiento; colonias medianas de incoloras a color gris
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inhibición completa
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	Inhibición de parcial a completa
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Inhibición de parcial a completa, proliferación completamente inhibida, colonias incoloras
Sin inocular	De blancas a color grisáceo claro, opacas

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) (placas **Stacker** de 90 mm). Con control microbiológico.

Materiales no suministrados

Medios de cultivo auxiliares, reactivos y el equipo de laboratorio que se requiera.

Tipos de muestras

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) puede utilizarse para el aislamiento de *S. agalactiae* (estreptococos del grupo B) a partir de todo tipo de muestras clínicas humanas. Las muestras frecuentes incluyen torundas del aparato genital femenino o

torundas y otras nuestras de recién nacidos. Emplear las técnicas apropiadas para la recogida y el transporte de muestras^{1,11}.

Procedimiento de análisis

Después de recibir la muestra en el laboratorio, sembrarla en estrías tan pronto como sea posible en **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. La placa sembrada en estrías se utiliza principalmente para aislar los cultivos puros de las muestras con flora mixta.

Si, por el contrario, el material se cultiva directamente empleando una torunda, hacerla girar en una sección pequeña cercana al borde; realizar luego la siembra en estrías a partir de este área inoculada.

Incubar en atmósfera anaerobia durante 18 a 24 horas a 35 ± 2 °C. En caso de resultado negativo, se pueden incubar las placas durante 18 a 24 horas más, aunque esto normalmente no es necesario. Para recuperar todos los patógenos involucrados en una infección o colonización, la muestra debe sembrarse también en estrías en una placa de agar sangre como, por ejemplo, **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** (agar Columbia con sangre de carnero al 5%), la cual debe incubarse en una atmósfera enriquecida con CO₂ durante 18 a 48 horas a 35 ± 2 °C. Si se utilizan medios líquidos de enriquecimiento previo como Lim Broth, estos se pueden subcultivar en **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** con un asa llena de caldo tras una incubación de 18 a 24 horas, para luego incubarse de la manera descrita anteriormente.

Resultados

Después de la incubación, cepas beta-hemolíticas de *S. agalactiae* producirán colonias de pequeñas a medianas, de color naranja pálido a fuerte o de color naranja-salmón, que pueden o no presentar bordes incoloros. A fin de detectar las cepas con pigmentación débil, las placas deben leerse sobre una superficie blanca. Se considera positiva una pigmentación naranja de cualquier intensidad. ¡No mantenga las placas delante de una fuente de luz para leerlas! El crecimiento de estafilococos, bacilos gram negativos y anaerobios estrictos normalmente se inhibirá por completo en el medio. La mayoría de los demás estreptococos y enterococos crecerán sin inhibición, pero producirán colonias de incoloras a color gris. Las cepas no hemolíticas de *S. agalactiae* también producirán colonias de color gris a azul grisáceo. Su aparición es infrecuente (hasta el 4% en mujeres embarazadas).

Para diferenciar los estreptococos B no hemolíticos de los enterococos o los estreptococos diferentes del grupo B, se puede realizar una prueba PYR (utilice el **BD DrySlide PYR kit, N° de cat. 231747** [equipo PYR BD DrySlide, n° de cat. 231747]) directamente a partir de colonias de color gris a azul grisáceo en **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**: los enterococos, *Streptococcus pyogenes* y varios otros estreptococos son positivos a PYR (=color de rojo a morado al cabo de 1 minuto), mientras que *S. agalactiae* y una variedad de otros estreptococos son negativos a PYR (=color amarillento a incoloro)¹⁵. Las cepas aisladas con resultados negativos a PYR de colonias de color gris o azul grisáceo deben someterse a pruebas adicionales para confirmar la presencia de una cepa de *S. agalactiae* no hemolítica, por ejemplo, mediante determinación de serotipos.

La pigmentación naranja en este medio es muy específica para *S. agalactiae* y para la confirmación no es necesaria una identificación serológica o bioquímica. Sin embargo, la determinación de serotipos puede realizarse directamente desde **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** sin subcultivos adicionales. The **BBL Streptocard Enzyme Latex Test Kit** (equipo de látex de la prueba enzimática) (N° de cat. 240950) se puede utilizar con esta finalidad.

Además, debe examinarse la placa **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** para observar la presencia de cepas no hemolíticas de *S. agalactiae* y de patógenos adicionales.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) se utiliza para el aislamiento y la identificación de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) a partir de todo tipo de muestras clínicas humanas. La coloración naranja de las colonias en este medio es muy específica para *S. agalactiae* (véase **Características de rendimiento**), por lo que no son necesarias pruebas de confirmación. En caso de duda o de cepas con pigmentación débil, debe realizarse una determinación del grupo serológico y/o una prueba PYR directamente de la placa de aislamiento.

Se ha reseñado que los genes responsables de la producción de pigmento y de la producción de la hemolisina de *S. agalactiae* están relacionados^{12,13}. Aproximadamente el 1 – 2% de las cepas de *S. agalactiae* son no hemolíticas¹⁴ y, por lo tanto, puede que no se pigmenten en **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Sin embargo, se ha determinado internamente que los productores de hemolisina débil que parecen no hemolíticos en la mayoría de los medios de agar sangre sí pueden ser productores de pigmento débil. Se ha informado que la hemolisina es uno de los principales factores de patogenicidad de *S. agalactiae*^{12,13}.

A fin de detectar todos los patógenos implicados en una infección, incluidas las cepas no hemolíticas de estreptococos B, debe inocularse también un medio de agar sangre como **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** con la muestra.

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) no es adecuado para el aislamiento de estreptococos distintos de *S. agalactiae* u otros patógenos que pueden producir infecciones similares (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*).

No se ha determinado el rendimiento de este medio con muestras veterinarias.

Características de rendimiento

Se realizó una evaluación de rendimiento con 151 muestras clínicas (torundas vaginales y cervicales, diversas muestras de recién nacidos) determinadas positivas para *S. agalactiae* mediante el uso de placas estándar en agar sangre, seguido de determinación de serotipos de las cepas aisladas¹⁵. De estas 151 muestras, 148 dieron positivo en el segundo cultivo en **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** y produjeron una cepa aislada no hemolítica y 147 cepas aisladas beta-hemolíticas.

En **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**, incubado en atmósfera anaerobia durante 18 a 24 horas, 149 de las 151 muestras produjeron crecimiento de estreptococos B; de ellas, 148 produjeron colonias de algún tipo de color naranja (sensibilidad del 98%), todas las cuales se identificaron mediante pruebas serológicas como estreptococos B. De estos 148 cultivos, tres dieron como resultado un color "naranja muy pálido". Si se restan estos tres cultivos, se obtiene una sensibilidad del 96%.

En este estudio, las placas inoculadas de **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** se incubaron también en atmósfera aerobia enriquecida con dióxido de carbono. En estas condiciones de incubación, la sensibilidad fue del 96,8%. En estas placas, 14 cultivos dieron como resultado un color "naranja muy pálido". Restados estos, se obtiene una sensibilidad del 87,4%.

Al incubarse en atmósfera anaerobia, se obtuvieron muchas más cepas aisladas con colonias de coloración naranja fuerte que tras la incubación en atmósfera aerobia enriquecida con dióxido de carbono ($P < 0,005$). Además, las colonias de numerosas cepas fueron de mayor tamaño al incubarse en atmósfera anaerobia. **Por tanto, la incubación en atmósfera anaerobia mejora significativamente la detección de colonias de color naranja.**

En esta evaluación se incluyeron también 52 muestras determinadas previamente negativas para *S. agalactiae*. No se obtuvieron falsos positivos con el cultivo en **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (especificidad = 100%).

El uso de **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** mejora y acelera el diagnóstico de estreptococos B, además de reducir los costes y el tiempo de respuesta gracias a que las colonias de color naranja no requieren la realización de pruebas de identificación adicionales.

REFERENCIAS

1. Ruoff, K.L., R.A. Whiley, 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. Datos disponibles en los archivos. 2003; 2010. BD Diagnostic Systems Europe. Heidelberg, Alemania.
16. Rosa-Fraile, M., et al. 2006. Granadaene: proposed structure of the Group B Streptococcus polyenic pigment. Appl. Environm. Microbiol. 72: 6367-6370.

ENVASE/DISPONIBILIDAD

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

REF 257079 Medios en placa listos para usar, 20 placas

INFORMACIÓN ADICIONAL

Para obtener más información, póngase en contacto con su representante local de 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