BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

APPLICATION

La **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (gélose différentielle pour streptocoques du groupe B - milieu Granada) est utilisée pour l'isolement et l'identification des *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* du groupe B) à partir d'échantillons cliniques.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.

Streptococcus agalactiae est l'un des agents responsables d'infections graves chez le nouveau-né, notamment la septicémie, la méningite et plusieurs autres infections au niveau des organes.[1-3] Le nouveau-né est infecté par la mère qui, bien qu'elle ne présente aucun symptôme, porte la forme latente du microorganisme dans sa flore vaginale. La fréquence d'apparition de cette infection est d'environ 1,5 cas pour 1 000 naissances d'enfants vivants, et le taux de mortalité avoisine 8,7 %. [3] Il a été montré qu'une détection appropriée de la présence de l'agent dans la flore vaginale de la femme enceinte, si elle est suivie par la mise en place d'une thérapie appropriée pour le nouveau-né, peut réduire les risques d'infection de manière significative.[2,3] La technique d'isolement standard pour effectuer un isolement à partir d'échantillons vaginaux repose sur l'utilisation d'une gélose au sang ou d'une gélose au sang sélective et sur la détection de la bêta-hémolyse caractéristique, suivies d'une identification biochimique ou sérologique.[1] Des recherches récentes ont montré que la présence de *S. agalactiae* dans la flore vaginale, même en faible nombre, est susceptible de présenter des risques d'infection pour le nouveau-né. C'est pourquoi le recours à des techniques d'enrichissement comme le LIM Broth (bouillon de Lim) est recommandé.[4] Ce milieu d'enrichissement n'est cependant pas entièrement sélectif pour *S. agalactiae* ; avec cette méthode, d'autres microorganismes à Gram positif peuvent également être enrichis et dissimuler les *S. agalactiae*.

Ces dernières années, diverses formulations du milieu Islam, décrit en 1977, ont fait l'objet de tests afin d'évaluer ses capacités de détection et d'isolement du microorganisme.[5,6] Sur ces milieux, tout comme sur le milieu New Granada qui est une modification récente du milieu Islam, les souches bêta-hémolitiques de *S. agalactiae* produisent des colonies de couleur orange à saumon.[7,8] La coloration de la colonie provient du pigment de ce microorganisme, la granadaene, un polyène-rhamno ornithine.[16]

La pigmentation est très spécifique et n'apparaît ni avec les streptocoques autres que ceux du groupe B ni avec d'autres microorganismes Toutefois, la stabilité du milieu New Granada est limitée.[9,10]

Dans la **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** est une modification du milieu New Granada qui se caractérise par une stabilité et une sélectivité améliorées. La peptone de protéose nº 3 est source de protéines et fournit les précurseurs nécessaires à la production et au développement de pigments. L'amidon est une substance nutritive qui stabilise le pigment Le glucose, le pyruvate et la cystéine sont des substances nutritives. Le magnésium est un oligo-élément. La combinaison d'acide 3-(morpholin-4-yl) propane-1-sulfonique et de phosphate fait office de tampon de pH. Le cristal violet inhibe les staphylocoques. L'ajout d'inhibiteurs et d'inducteurs vise à éliminer les flores associées telles que les bactéries à Gram négatif et les anaérobies stricts, et facilite la formation de pigments.

RÉACTIFS

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

Formule* par litre d'eau purifiée

Peptone de protéose nº 3	25,0 g	Phosphate d'hydrogène disodique	10,7 g
Fécule de maïs	14,0	Cristal violet	0,0005
Glucose	2,5	Inhibiteurs et inducteurs	0,021
Acide pyruvique sel de sodium	1,0	Gélose	15,2
Hydrochlorure de cystéine	0,1		
Sulfate de magnésium	0,3		
Acide 3-(morpholin-4-yl) propane-1-sulfonique, sel hémi-sodium	11,0		

pH 7,4 ± 0,2

*Ajustée et/ou complétée en fonction des critères de performance imposés.

PRECAUTIONS

IVD . A usage professionnel uniquement.

Ne pas utiliser de boîte de Pétri présentant des signes de contamination microbienne, de décoloration, de dessiccation ou de fissure ou d'autres signes de détérioration.

Consulter le document **MODE D'EMPLOI GENERAL** pour plus d'informations concernant les procédures de manipulation aseptique, les risques biologiques et l'élimination des produits usagés.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les boîtes de Pétri dans l'obscurité entre 2 et 8 °C, dans leur emballage d'origine, jusqu'au moment de leur utilisation. Ne pas les congeler ni les surchauffer.

Les boîtes peuvent être ensemencées jusqu'à la date de péremption indiquée (voir l'étiquette de l'emballage) et incubées pendant les durées recommandées.

Les boîtes provenant de piles de 10 peuvent être utilisées pendant une semaine, dans la mesure où elles sont conservées dans un endroit propre entre 2 et 8 °C.

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Ensemencer des échantillons représentatifs avec les souches suivantes (pour plus d'informations, voir le document **MODE D'EMPLOI GENERAL**). Incuber en conditions aérobies pendant 18 à 24 heures, à 35 ± 2 °C.

Souches	**Croissance**
Streptococcus agalactiae ATCC 12386	Croissance bonne à excellente ; colonies orange de taille petite à moyenne, parfois incolore en périphérie
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	Croissance ; très petites colonies incolores à grises
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Croissance ; colonies de taille moyenne incolores à grises
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Inhibition totale
Bacteroides fragilis ATCC 25285	Inhibition partielle à totale
Proteus mirabilis ATCC 43071	Inhibition partielle à totale, essaimage totalement inhibé, colonies incolores
Sans ensemencement	Colonies blanches à grisâtres, opaques

METHODE

Matériaux fournis

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) (boîtes de Pétri **Stacker** de 90 mm). Produits contrôlés microbiologiquement.

Matériel non fourni

Milieux de culture, réactifs et matériel de laboratoire auxiliaires requis.

Types d'échantillons

La **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** peut être utilisée pour l'isolement des *S. agalactiae* (streptocoques du groupe B) à partir de tout type d'échantillon clinique humain. Les échantillons les plus courants sont les écouvillons provenant de l'appareil

génital féminin ou les écouvillons et autres échantillons prélevés chez des nouveaux-nés. Il convient d'observer des techniques appropriées lors du prélèvement et du transport des échantillons.[1,11]

Mode opératoire du test
Strier l'échantillon sur une **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** sans attendre, dès réception au laboratoire. La boîte d'étalement sert principalement à isoler des cultures pures à partir d'échantillons contenant une flore mixte.
Ou bien, si le prélèvement est mis en culture directement à partir d'un écouvillon, rouler celui-ci sur une petite partie de la gélose au niveau du bord de la boîte, puis strier la gélose à partir de cette zone ensemencée.
Incuber en conditions anaérobies pendant 18 à 24 heures à 35 ± 2 °C. Si le résultat est négatif, les boîtes peuvent être incubées pendant 18 à 24 heures supplémentaires mais cela n'est, en général, pas nécessaire. Pour mettre en évidence la totalité des pathogènes impliqués dans une infection ou une colonisation, l'échantillon doit également être strié sur une gélose au sang, telles qu'une **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** p. ex., qu'il conviendra d'incuber en atmosphère enrichie en CO_2 pendant 18 à 48 heures à 35 ± 2 °C. Si des milieux de pré-enrichissement liquides (tels que le bouillon de Lim) sont utilisés, ceux-ci peuvent être repiqués sur une **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** au moyen d'une pleine anse du bouillon âgé de 18 à 24 heures, puis incubés comme décrit ci-dessus.

Résultats
Après incubation, les souches bêta-hémolytiques de *S. agalactiae* produisent des colonies petites à moyennes, de couleur orange pâle à orange foncé ou de couleur saumon-orange. Ces colonies sont parfois incolores en périphérie. Les résultats doivent être lus sur une surface blanche de manière à mettre en évidence les souches faiblement pigmentées. Toute pigmentation orange, indépendamment de son intensité, doit être interprétée comme une réaction positive. Ne pas placer les boîtes devant une source lumineuse lors de la lecture des résultats ! Les staphylocoques, les bâtonnets à Gram négatif et les anaérobies stricts sont, en général, complètement inhibés sur le milieu. La plupart des autres streptocoques et entérocoques se développent sans présenter d'inhibition mais produisent des colonies incolores à grises. Des souches de *S. agalactiae* non hémolytiques produisent également des colonies gris à gris-bleu. Leur fréquence est rare (jusqu'a 4 % chez les femmes enceintes).
Pour différentier des streptocoques du groupe B non hémolytiques des entérocoques ou des streptocoques n'appartenant pas au groupe B, il est possible d'effectuer un test PYR (utiliser le kit **BD DrySlide PYR kit, réf. 231747**) directement à partir des colonies gris à gris-bleu sur une **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** : les entérocoques, *Streptococcus pyogenes* et plusieurs autres streptocoques sont positifs au test PYR (=couleur rouge à violet pendant 1 min), alors que les *S. agalactiae* et plusieurs variétés d'autres streptocoques sont négatifs au test PYR (=jaunâtre à incolore).[15] Les isolats avec résultats négatifs au test PYR provenant de colonies gris à gris-bleu doivent être de nouveau testés pour confirmer la présence de souche *S. agalactiae* non hémolytique, par ex. par typage sérologique.

L'apparition d'une pigmentation orange présente sur ce milieu est très spécifique aux *S. agalactiae* et aucune identification sérologique ou biochimique n'est nécessaire pour obtenir confirmation. Cependant, il est possible d'effectuer un typage sérologique directement à partir d'une **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** sans repiquage supplémentaire. Le **BBL Streptocard Enzyme Latex Test Kit** (kit de test enzymatique au latex) (réf. 240950) peut être utilisé à cette fin.
De même, il est nécessaire de rechercher la présence de souches non hémolytiques de *S. agalactiae* ainsi que celles d'autres pathogènes dans la boîte de **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE
La **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** est utilisée pour l'isolement et l'identification des *Streptococcus agalactiae* (streptocoques du groupe B) à partir de tout type d'échantillon clinique humain. La coloration orange de la colonie présente sur ce

milieu est très spécifique aux *S. agalactiae* (voir la rubrique **Caractéristiques de performances**), ce qui rend inutile l'exécution de tests de confirmation. Toutefois, en cas de doute, ou lorsque les souches ne sont que faiblement colorées, il est possible d'effectuer un groupage sérologique et/ou un test PYR directement sur la boîte de Pétri d'isolement.
Il a été rapporté que les gènes responsables de la production des pigments et de l'hémolysine de *S. agalactiae* appartiennent à la même famille génétique.[12,13] Environ 1 à 2 % des souches de *S. agalactiae* sont non hémolytiques[14] et sont donc susceptibles de ne pas apparaître pigmentées sur la **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Néanmoins, il a été déterminé en interne que les faibles producteurs d'hémolysine, qui apparaissent non hémolytiques sur la plupart des géloses au sang sont également de faibles producteurs de pigments. Il a été rapporté que l'hémolysine est l'un des principaux facteurs de pathogénicité de *S. agalactiae.*[12,13]
Pour détecter tous les pathogènes impliqués dans une infection, y compris les souches non hémolytiques de streptocoques du groupe B, une gélose au sang telle que la **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** doit aussi être ensemencée avec l'échantillon.

La **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** ne convient pas à l'isolement de streptocoques autres que *S. agalactiae* ou d'autres pathogènes susceptibles de provoquer des infections similaires (par ex. *Listeria monocytogenes*).
Les performances de ce milieu avec des échantillons vétérinaires n'ont pas été évaluées.

Caractéristiques de performances
Une évaluation des performances a été effectuée sur 151 échantillons cliniques (écouvillons vaginaux et cervicaux, plusieurs échantillons prélevés chez des nouveaux-nés) positifs à la présence de *S. agalactiae* au moyen d'une procédure d'ensemencement standard sur une boîte de gélose au sang, suivie d'un typage sérologique des isolats.[15] Parmi ces 151 échantillons, 148 se sont révélés positifs lors de la seconde culture sur une **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** et ont produit un isolat non hémolytique et 147 isolats bêta-hémolytiques.
Sur la **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium),** incubée en conditions anaérobies pendant 18 à 24 heures, 149 échantillons sur 151 ont développé des streptocoques de groupe B ; parmi ces 149 échantillons, 148 ont produit des colonies orange (sensibilité à 98 %), toutes identifiées sérologiquement comme étant des streptocoques du groupe B. Trois de ces 148 cultures ont été évaluées comme étant de couleur « orange très pâle ». Ces cultures mises à part, le taux de sensibilité obtenu est de 96 %.
Dans cette étude, les boîtes de Pétri de **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** ensemencées ont également été incubées en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone. Dans ces conditions d'incubation, la sensibilité était de 96,8 %. 14 des cultures contenues dans ces boîtes de Pétri ont été évaluées comme étant de couleur « orange très pâle ». Ces cultures mises à part, le taux de sensibilité obtenu est de 87,4 %.
Lorsque les boîtes sont incubées en conditions anaérobies, le nombre d'isolats présentant une coloration orange soutenue est beaucoup plus important que lorsque l'incubation se déroule en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone ($P < 0,005$). De plus, les colonies de nombreuses souches sont plus importantes lorsque l'incubation a lieu en conditions anaérobies. **L'incubation en conditions anaérobies améliore donc considérablement la mise en évidence des colonies orange.**

Dans cette évaluation, 52 échantillons identifiés au préalable comme négatifs à la présence de *S. agalactiae* ont également été inclus. Aucun résultat faux positif n'a été obtenu sur une **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (spécificité = 100 %).

L'utilisation de la **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** permet d'améliorer et d'accélérer le diagnostic des streptocoques du groupe B et de réduire les coûts et le temps d'exécution associés puisque les colonies orange ne nécessitent aucune identification supplémentaire.

RÉFÉRENCES

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. Données disponibles. 2003; 2010. BD Diagnostic Systems Europe. Heidelberg, Allemagne.
16. Rosa-Fraile, M., et al. 2006. Granadaene: proposed structure of the Group B Streptococcus polyenic pigment. Apppl. Environm. Microbiol. 72: 6367-6370.

CONDITIONNEMENT

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

REF 257079 Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 20 unités par carton

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Pour plus d'informations, contacter le représentant 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