



BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

USO PREVISTO

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) (agar differenziale per streptococco di gruppo B) è usato per l'isolamento e l'identificazione dello *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* di gruppo B) da campioni clinici.

PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodica microbiologica.

Lo *Streptococcus agalactiae* provoca infezioni neonatali gravi, incluse setticemia, meningite e infezioni a carico di più organi.¹⁻³ Il neonato viene infettato dalla madre, che può essere portatrice asintomatica dell'organismo nella flora vaginale. L'incidenza di infezione è di circa 1,5 ogni 1000 nati vivi e la mortalità è dell'8,7% circa.³ È stato dimostrato che l'opportuna rilevazione dell'agente nella flora vaginale delle donne in gravidanza, seguita dal corretto trattamento del neonato, può ridurre in modo notevole il rischio di infezione.^{2,3} La tecnica standard per l'isolamento da campioni vaginali è basata sull'uso di agar sangue o di agar sangue selettivo e sulla rilevazione della beta-emolisi caratteristica, seguita dall'identificazione biochimica o sierologica.¹ Recenti ricerche hanno dimostrato che anche bassi livelli di *S. agalactiae* nella flora vaginale possono mettere il neonato a rischio di infezione. Sono quindi consigliate tecniche di arricchimento come il LIM Broth.⁴ Questo terreno di arricchimento non è tuttavia completamente selettivo per *S. agalactiae*, ed è quindi possibile che altri organismi Gram-positivi vengano arricchiti da questo metodo, con possibile conseguente occultamento di *S. agalactiae*.

Negli ultimi anni, sono state esaminate modificazioni del terreno Islam, descritto nel 1977, per determinarne l'idoneità per la rilevazione e l'isolamento dell'organismo.^{5,6} Su questi terreni, come sul terreno New Granada (una recente modificazione del terreno Islam), i ceppi beta-emolitici di *S. agalactiae* producono colonie di colore da arancio a salmone.^{7,8} La colorazione della colonia è dovuta al pigmento proprio dell'organismo: granadaene, un'ornitina rhamno-poliene).¹⁶

La pigmentazione è altamente specifica e non si verifica con streptococchi non appartenenti al gruppo B o con altri organismi. Tuttavia, il terreno New Granada ha una stabilità limitata.^{9,10}

In **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**, una modificazione del terreno New Granada con migliore stabilità e selettività, il peptone proteosico n. 3 è una fonte proteica e fornisce i precursori necessari per la produzione e la crescita dei pigmenti. L'amido è una sostanza nutriente e agisce come stabilizzatore del pigmento. Il glucosio, il piruvato e la cisteina sono sostanze nutrienti. Il magnesio è un micronutriente. La combinazione di MOPS e di fosfato agisce come un tampone del pH. Il cristalvioletto inibisce gli stafilococchi. Inibitori e stimolatori sono stati aggiunti per sopprimere la flora associata, come i batteri Gram-negativi e gli anaerobi stretti e per migliorare la formazione del pigmento.

REAGENTI

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

Formula* per litro di acqua purificata

Peptone proteosico n. 3	25,0 g	Idrogenofosfato disodico	10,7 g
Amido di granoturco	14,0	Cristalvioletto	0,0005
Glucosio	2,5	Inibitori e stimolatori	0,021
Acido piruvico, sale sodico	1,0	Agar	15,2
Cloridrato di cisteina	0,1		
Solfato di magnesio	0,3		
MOPS (acido 3-morfolino propansulfonico), sale semisodico	11,0		

pH 7,4 ± 0,2

*Formulazione aggiustata e/o supplementata per soddisfare i criteri prestazionali.

PRECAUZIONI

IVD . Solo per uso professionale. 

Non usare le piastre se presentano segni di contaminazione microbica, discromia, essiccamento, crepe o altri segni di deterioramento.

Per dettagli su procedure di manipolazione asettica, biorischi e smaltimento di prodotti usati, consultare le **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**.

CONSERVAZIONE E VITA UTILE

Alla consegna, conservare le piastre al buio a 2 – 8 °C nella confezione originale fino al momento dell'uso. Evitare congelamento e surriscaldamento. Le piastre possono essere inoculate sino alla data di scadenza (vedere l'etichetta della confezione) e incubate per i tempi di incubazione raccomandati.

Le piastre prelevate da confezioni da 10 già aperte possono essere usate per una settimana, se conservate in luogo pulito a 2 – 8 °C.

CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

Inoculare i campioni rappresentativi con i ceppi di seguito elencati (per informazioni più dettagliate, vedere il documento **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**). Incubare in anaerobiosi per 18 – 24 h a 35 ± 2 °C.

Ceppi	Risultati della crescita
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	Crescita da buona a eccellente, colonie piccole-medie colore arancio, con o senza bordi incolori
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Crescita; colonie piccolissime da incolori a grigie
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Crescita; colonie medie da incolori a grigie
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inibizione completa
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	Inibizione da parziale a completa
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Inibizione da parziale a completa, sciamatura completamente inibita, colonie incolori
Non inoculati	Da bianco a grigiastro chiaro, opaco

PROCEDURA

Materiali forniti

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) (piastre **Stacker** da 90 mm). Microbiologicamente controllato.

Materiali non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Tipi di campioni

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) può essere usato per l'isolamento di *S. agalactiae* (streptococchi di gruppo B) da tutti i tipi di campioni clinici umani. Campioni comuni includono tamponi del tratto genitale femminile o tamponi e altri campioni provenienti da neonati. Per il prelievo e il trasporto dei campioni, adottare le tecniche adatte.^{1,11}

Procedura del test

Strisciare il campione appena pervenuto in laboratorio su **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. La piastra con lo striscio viene prevalentemente usata per isolare colture pure da campioni contenenti flora mista.

In alternativa, se il materiale viene posto in coltura direttamente da un tampone, passare il tampone su una piccola area del bordo e strisciare dalla zona inoculata per isolare le colonie. Incubare in anaerobiosi a 35 ± 2 °C per 18 – 24 h. Se le piastre risultano negative, possono essere incubate per un ulteriore periodo di 18 – 24 h, sebbene ciò non sia generalmente necessario. Allo scopo di rilevare tutti i patogeni associati a un'infezione o a una colonizzazione, il campione va anche strisciato su una piastra di agar sangue, come **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**, che va quindi incubata in atmosfera arricchita con CO₂ per 18 – 48 h a 35 ± 2 °C. Se si usano terreni di prearricchimento in forma liquida come il Lim Broth, è possibile

eseguire la subcoltura su **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** con un'ansata di brodo dopo 18 – 24 h di incubazione e quindi incubarli come sopra descritto.

Risultati

Dopo l'incubazione, i ceppi beta-emolitici di *S. agalactiae* producono colonie da piccole a medie, di colore arancio da chiaro a intenso o di colore salmone-arancio con possibili bordi incolori. Per rilevare i ceppi con pigmentazione debole, è necessario leggere le piastre su fondo bianco. Una pigmentazione di colore arancio, di qualsiasi intensità, deve essere considerata positiva. Per la lettura, non porre le piastre di fronte a una sorgente luminosa. Gli stafilococchi, i bacilli Gram-negativi e gli anaerobi stretti vengono generalmente completamente inibiti sul terreno. Altri streptococchi ed enterococchi crescono per lo più senza essere inibiti, ma producono colonie da incolori a grigie. Ceppi non emolitici di *S. agalactiae* producono anche colonie da grigie a grigio-blu. La loro incidenza è bassa (fino a 4% in donne in gravidanza).

Per differenziare gli streptococchi di gruppo B non emolitici dagli enterococchi o dagli streptococchi di altri gruppi, un test PYR (utilizzare **BD DrySlide PYR kit, n. di cat. 231747**) può essere eseguito direttamente da colonie grigie a colonie grigio-blu su **BD Group B**

Streptococcus Differential Agar (Granada Medium): enterococchi, *Streptococcus pyogenes* e diversi altri streptococchi sono PYR-positivi (=colore da rosso a viola entro 1 min), mentre *S. agalactiae* e una gamma di altri streptococchi sono PYR-negativi (=da giallastro a incolore).¹⁵ Gli isolati con risultati PYR-negativi da colonie grigie o grigio-blu devono essere sottoposti a ulteriori test per confermare la presenza di un ceppo non emolitico di *S. agalactiae*, ad es. mediante la tipizzazione sierologica.

La pigmentazione colore arancio su questo terreno è altamente specifica per *S. agalactiae* e l'identificazione sierologica o biochimica non è necessaria per la conferma. È tuttavia possibile eseguire la tipizzazione sierologica direttamente da **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** senza ulteriori subcolture. A questo scopo, è possibile utilizzare il **BBL Streptocard Enzyme Latex Test Kit** (n. di cat. 240950).

Inoltre, è necessario esaminare la piastra **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** per rilevare l'eventuale presenza di ceppi non emolitici di *S. agalactiae* e di ulteriori patogeni.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) è usato per l'isolamento e l'identificazione dello *Streptococcus agalactiae* (streptococco di gruppo B) da tutti i tipi di campioni clinici umani. La colorazione arancio della colonia su questo terreno è altamente specifica per *S. agalactiae* (vedere **Caratteristiche prestazionali**): test di conferma non sono quindi necessari. In caso di dubbio o nel caso di ceppi con pigmentazione debole, è possibile eseguire la tipizzazione sierologica e/o un test PYR direttamente dalla piastra di isolamento.

È stato riportato che i geni responsabili per la produzione dei pigmenti e per la produzione dell'emolisina di *S. agalactiae* sono geneticamente correlati.^{12,13} L'1 – 2% circa dei ceppi di *S. agalactiae* non è emolitico¹⁴ e, di conseguenza, può non produrre alcuna pigmentazione su **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Tuttavia, è stato determinato internamente che i produttori deboli di emolisina che sembrano non emolitici sulla maggior parte dei terreni agar sangue possono essere produttori deboli di pigmenti. L'emolisina è stata giudicata come uno dei principali fattori di patogenicità di *S. agalactiae*.^{12,13}

Per rilevare tutti i patogeni associati a un'infezione, inclusi i ceppi non emolitici di streptococchi di gruppo B, è anche necessario inoculare con il campione un terreno agar sangue come **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**.

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) non è idoneo per l'isolamento degli streptococchi diversi da *S. agalactiae* o di altri patogeni in grado di causare infezioni simili (ad es. *Listeria monocytogenes*).

Le prestazioni di questo terreno con i campioni di origine animale non sono state determinate.

Caratteristiche prestazionali

Una valutazione delle prestazioni è stata eseguita con 151 campioni clinici (tamponi vaginali e cervicali, vari campioni provenienti da neonati) giudicati positivi per *S. agalactiae* mediante inoculazione standard su piastra di agar sangue seguita dalla tipizzazione sierologica degli

isolati.¹⁵ Di questi 151 campioni, 148 sono risultati positivi con la seconda coltura su **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** e hanno prodotto un isolato non emolitico e 147 isolati beta-emolitici.

Su **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**, incubato in anaerobiosi per 18 – 24 h, 149 dei 151 campioni hanno riportato crescita di streptococchi di gruppo B; di questi, 148 hanno riportato vari tipi di colonie colore arancio (sensibilità del 98%) che sono state tutte identificate sierologicamente come streptococchi di gruppo B. Di queste 148 colture, tre sono state classificate come “arancio molto chiaro”. Se si sottraggono queste tre colture, si ottiene una sensibilità del 96%.

In questo studio, le piastre di **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** inoculate sono anche state incubate in atmosfera aerobica arricchita con anidride carbonica. In queste condizioni di incubazione, la sensibilità è risultata del 96,8%. Su queste piastre, 14 colture sono state classificate come “arancio molto chiaro”. Se si sottraggono queste colture, si ottiene una sensibilità dell'87,4%.

Quando le piastre sono state incubate in anaerobiosi, si sono ottenuti molti più isolati con colonie di colore arancio intenso rispetto all'incubazione in atmosfera aerobica arricchita con anidride carbonica ($P < 0,005$). Inoltre, le colonie di molti ceppi sono risultate di dimensioni maggiori quando incubate in anaerobiosi. **Quindi, l'incubazione in anaerobiosi migliora notevolmente la rilevazione delle colonie colore arancio.**

In questa valutazione sono stati anche inclusi 52 campioni precedentemente classificati come negativi per *S. agalactiae*. Con la coltura su **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** non si sono ottenuti falsi positivi (specificità = 100%).

L'uso di **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** migliora e rende più rapida la diagnosi di streptococchi di gruppo B e riduce i costi e i tempi di esecuzione rendendo inutili ulteriori test per l'identificazione delle colonie colore arancio.

BIBLIOGRAFIA

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. 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. 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 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. Dati in archivio. 2003; 2010. BD Diagnostic Systems Europe. Heidelberg, Germania.
16. Rosa-Fraile, M., et al. 2006. Granadaene: proposed structure of the Group B Streptococcus polyenic pigment. Appl. Environm. Microbiol. 72: 6367-6370.

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)

REF 257079 Terreni su piastra pronti per l'uso, confezioni da 20

ULTERIORI INFORMAZIONI

Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante BD di zona.



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