

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

### **AVSEDD ANVÄNDNING**

**BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (differentierande agar för grupp B-streptokock (Granada-medium)) används för isolering och identifiering av *Streptococcus agalactiae* (grupp B-streptokock) från kliniska prover.

### **PRINCIPER FÖR OCH FÖRKLARING AV METODEN**

Mikrobiologisk metod.

*Streptococcus agalactiae* orsakar svåra infektioner hos nyfödda, inklusive sepsis, meningit och multipla organinfektioner.<sup>1-3</sup> Den nyfödda infekteras av modern som asymtomatiskt kan vara bärare av organismen i den vaginala floran. Incidensen är cirka 1,5 per 1 000 levande födda och mortaliteten är cirka 8,7 %.<sup>3</sup> Det har visats att tillämplig detektion av agenten i den vaginala floran hos gravida kvinnor följt av tillämplig behandling av den nyfödda avsevärt kan minska risken för infektion.<sup>2,3</sup> Standardtekniken för isolering från vaginala prover är användning av blodagar eller selektiv blodagar och detektion av den karakteristiska betahemolysen, följt av biokemisk eller serologisk identifiering.<sup>1</sup> Nyligen undersökningar har visat att även små mängder av *S. agalactiae* i den vaginala floran kan utgöra en risk för att den nyfödda smittas. Därför har berikningstekniker som LIM-buljong rekommenderats.<sup>4</sup> Detta berikningsmedium är dock inte helt selektivt för *S. agalactiae*, och andra grampositiva organismer kan också berikas med den här metoden och därmed eventuellt dölja *S. agalactiae*.

Under de senaste åren har modifieringar av Islam-mediet, som beskrevs 1977, testats för lämplighet i att detektera och isolera organismen.<sup>5,6</sup> I dessa media, precis som i New Granada-mediet som är en nylig modifikation av Islam-mediet, producerar betahemolytiska stammar av *S. agalactiae* orange till laxrosa kolonier.<sup>7,8</sup> Kolonins färg beror på organismens egna pigment, granadaene, en ornitintrhamnopolyen.<sup>16</sup>

Pigmenteringen är mycket specifik och förekommer inte med andra streptokocker än grupp B, eller andra organismer. Stabiliteten i New Granada-mediet är dock begränsad.<sup>9,10</sup>

**BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** är en modifiering av New Granada-mediet med förbättrad stabilitet och selektivitet. Proteospepton nr 3 är en proteinkälla och tillhandahåller nödvändiga prekursorer för pigmentproduktion och tillväxt. Stärkelse är ett näringsämne och har en stabiliserande verkan på pigmentet. Glukos, pyruvat och cystein är näringsämnen. Magnesium är ett spårämne. Kombinationen av MOPS och fosfat verkar som pH-buffert. Kristallviolett inhiberar stafylokocker. Inhiberare och inducerare har lagts till för att hämma åtföljande flora som gramnegativa bakterier och strikta anaerobier, och för att främja pigmentbildning.

### **REAGENSER**

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

Sammansättning\* per liter aqua purif.

|                                                        |        |                           |        |
|--------------------------------------------------------|--------|---------------------------|--------|
| Proteospepton nr 3                                     | 25,0 g | Dinatriumvätefosfat       | 10,7 g |
| Majsstärkelse                                          | 14,0   | Kristallviolett           | 0,0005 |
| Glukos                                                 | 2,5    | Inhiberare och inducerare | 0,021  |
| Natriumsalt från pyrodrusyra                           | 1,0    | Agar                      | 15,2   |
| Cysteinhydroklorid                                     | 0,1    |                           |        |
| Magnesiumsulfat                                        | 0,3    |                           |        |
| MOPS (3-morfolinopropansulfonsyra),<br>heminatriumsalt | 11,0   |                           |        |

pH 7,4 ± 0,2

\*Justerad och/eller kompletterad efter behov för att uppfylla prestandakriterierna.

## FÖRSIKTIGHETSBEAKTANDEN

**IVD** . Endast för professionellt bruk. ②

Plattorna får inte användas om de visar tecken på mikrobiell kontamination, missfärgning, uttorkning, sprickbildning eller annan försämring.

Se dokumentet **ALLMÄNNA INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDNING** för information om aseptiska förfaranden vid hantering, biologisk risk och kassering av använd produkt.

## FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

Förvara plattorna mörkt vid 2 till 8 °C i originalomslaget efter mottagandet fram till dess de skall användas. Undvik överhettning och nedfrysning. Plattorna kan inokuleras fram till utgångsdatum (se etiketten på förpackningen) och inkuberas under rekommenderad inkubationsperiod.

Plattor från öppnade förpackningar med 10 plattor kan användas i en vecka om de förvaras i ren miljö vid 2 till 8 °C.

## KVALITETSKONTROLL UTFÖRD AV ANVÄNDAREN

Inokulera representativa prover med följande stammar (för närmare information hänvisas till dokumentet **ALLMÄNNA INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDNING**). Inkubera aerobt i 18 – 24 timmar vid 35 ± 2 °C.

| Stammar                                    | Växtresultat                                                                               |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386 | God till utmärkt växt, små till mellanstora orange kolonier med eller utan färglösa kanter |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615   | Växt; mycket små färglösa till grå kolonier                                                |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212    | Växt; mellanstora färglösa till grå kolonier                                               |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923    | Fullständig inhibition                                                                     |
| <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285     | Partiell till fullständig inhibition                                                       |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071        | Partiell till fullständig inhibition, fullständigt inhiberad svärmning, färglösa kolonier  |
| Inte inokulerad                            | Vit till ljus gråaktig, opak                                                               |

## FÖRFARANDE

### Material som medföljer

**BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (90 mm **Stacker**-plattor). Mikrobiologiskt kontrollerade.

### Material som inte medföljer

Extra odlingsmedier, reagenser och laboratorieutrustning efter behov.

### Provtyper

**BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** kan användas för isolering av *S. agalactiae* (grupp B-streptokocker) från alla typer av kliniska humanprover. Frekventa prover omfattar pinnprov från det kvinnliga genitalområdet eller pinnprov och andra prover från nyfödda. Använd tillämplig teknik för provtagning och transport.<sup>1,11</sup>

### Testförfarande

Stryk provet så snart som möjligt efter mottagandet i laboratoriet på **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Plattan med utstryket används primärt för isolering av renkulturer från prover med blandflora.

Vid odling direkt från pinnprov rullas istället pinnen med provet över ett litet område av ytan nära kanten, varefter plattan stryks från det inokulerade området för isolering.

Inkubera anaerobt i 18 till 24 timmar vid 35 ± 2 °C. Om negativt kan plattorna inkuberas i ytterligare 18 till 24 timmar, men detta är vanligen inte nödvändigt. För att påvisa alla patogener som ingår i en infektion eller kolonisering måste provet även strykas på en blodagarplatta, t.ex.

**BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** (Columbia Agar med 5 % fårblod) som ska inkuberas i en CO<sub>2</sub>-berikad miljö i 18 till 48 timmar vid 35 ± 2 °C. Om flytande förberikningsmedia som LIM-buljong används, kan de subkultiveras på **BD Group B**

**Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** med en full ögla av buljongen efter 18 till 24 timmars inkubering och inkuberas så som beskrivs ovan.

### Resultat

Efter inkubering producerar betahemolytiska stammar av *S. agalactiae* små till mellanstora, bleka till starkt orange eller laxrosa kolonier som eventuellt omges av färglösa kanter. För att kunna detektera svagt pigmenterade stammar måste plattorna läsas av mot en vit bakgrund. Eventuell intensitet av orange pigmentering betraktas som positivt. Håll inte plattorna framför en ljuskälla vid avläsning! Stafylokocker, gramnegativa stavar och strikta anaerober inhiberas vanligen fullständigt på mediet. De flesta andra streptokocker och enterokocker växer utan inhibition men producerar färglösa till grå kolonier. Icke-hemolytiska stammar av *S. agalactiae* producerar också grå till gråblå kolonier. Förekomsten av dessa är ovanlig (upp till 4 % av gravida kvinnor).

För att skilja mellan icke-hemolytiska B-streptokocker och enterokocker eller icke-grupp B-streptokocker kan ett PYR-test utföras (använd **BD DrySlide PYR kit, kat. nr. 231747**) direkt från grå till gråblå kolonier på **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**: enterokocker, *Streptococcus pyogenes* och flera andra streptokocker är PYR-positiva (=röd till lila färg inom 1 min), medan *S. agalactiae* och en rad andra streptokocker är PYR-negativa (=gulaktiga till färglösa).<sup>15</sup> Isolat med PYR-negativa resultat från grå eller gråblå kolonier måste testas ytterligare för att bekräfta förekomst av icke-hemolytisk stam av *S. agalactiae*, t.ex. genom serologisk typbestämning.

Den orange pigmenteringen på detta medium är mycket specifik för *S. agalactiae*, så serologisk eller biokemisk identifiering är inte nödvändig för bekräftelse. Serologisk typbestämning kan dock göras direkt från **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** utan vidare subkultivering. **BBL Streptocard Enzyme Latex Test Kit** (kat. nr. 240950) kan användas till detta.

**BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**-plattan måste också inspekteras för förekomst av icke-hemolytiska stammar av *S. agalactiae* och ytterligare patogener.

### KLINISKA PRESTANDA OCH PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR

**BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** används för isolering och identifiering av *Streptococcus agalactiae* (grupp B-streptokocker) från alla typer av kliniska humanprover. Den orange kolonifärgningen på detta medium är högst specifik för *S. agalactiae* (se **Kliniska prestanda**), så bekräftelsetest är inte nödvändiga. Om tvivel föreligger eller om stammarna är svagt pigmenterade kan serologisk gruppindelning och/eller ett PYR-test utföras direkt från isoleringsplattan.

Det har rapporterats att generna som svarar för pigment- och hemolysinproduktionen från *S. agalactiae* har en genetisk koppling.<sup>12,13</sup> Cirka 1 till 2 % av *S. agalactiae*-stammar är icke-hemolytiska<sup>14</sup> och pigmenteras därför eventuellt inte på **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)**. Det har dock konstaterats internt att svaga hemolysinproducenter som förefaller icke-hemolytiska på de flesta blodagarmedier ändå kan vara svaga pigmentproducenter. Hemolysinet har rapporterats vara en av de största patogenicitetsfaktorerna för *S. agalactiae*.<sup>12,13</sup>

För att kunna detektera alla patogener som förekommer vid en infektion, inklusive icke-hemolytiska stammar av grupp B-streptokocker, måste även ett blodagarmedium som **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** inokuleras med provet.

**BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** är inte lämpligt för isolering av andra streptokocker än *S. agalactiae* eller andra patogener som kan orsaka liknande infektioner (t.ex. *Listeria monocytogenes*).

Prestanda för detta medium med veterinärmedicinska prover har inte fastställts.

### Kliniska prestanda

En prestandautvärdering utfördes med 151 kliniska prover (vaginala och cervikala pinnprover, diverse prover från nyfödda) som faststälts som positiva för *S. agalactiae* genom standardstrykning på en blodagarplatta följt av en serologisk typbestämning av isolaten.<sup>15</sup> Av

dessa 151 prover var 148 positiva vid en andra odling på **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** och gav ett icke-hemolytiskt och 147 beta-hemolytiska isolat.

På **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** som inkuberats anaerobiskt i 18 till 24 timmar gav 149 av de 151 proven växt av grupp B-streptokocker; av dessa gav 148 någon form av orange kolonier (känslighet 98 %), som alla identifierades serologiskt som grupp B-streptokocker. Av dessa 148 odlingar bedömdes tre som "mycket ljus orange". Om man undantar dessa tre odlingar uppnås 96 % känslighet.

I den här studien inkuberades även inokulerade plattor med **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** i en aerobisk miljö berikad med koldioxid. Under dessa inkuberingsförhållanden var känsligheten 96,8 %. På dessa plattor bedömdes 14 odlingar som "mycket ljus orange". Om man undantar dessa är känsligheten 87,4 %.

Vid anaerobisk inkubering erhöles många fler isolat med en starkt orange kolonifärgning jämfört med efter inkubering i en aerobisk miljö berikad med koldioxid ( $P < 0,005$ ). Dessutom var kolonier av flera stammar större vid anaerobisk inkubering. **Anaerobisk inkubering förbättrar därför avsevärt detektion av orange kolonier.**

I den här utvärderingen ingick också 52 prover som tidigare fastställts som negativa för *S. agalactiae*. Inga falskt positiva erhöles vid odling på **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** (specificitet = 100 %).

Användning av **BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium)** förbättrar och påskyndar diagnosen av grupp B-streptokocker och minskar kostnader och hanteringstid eftersom vidare identifieringstest från orange kolonier är onödiga.

## REFERENSER

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, 8<sup>th</sup> 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  $\beta$ -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. Data på fil. 2003; 2010. BD Diagnostic Systems Europe. Heidelberg, Tyskland.
16. Rosa-Fraile, M., et al. 2006. Granadaene: proposed structure of the Group B Streptococcus polyenic pigment. Appl. Environm. Microbiol. 72: 6367-6370.

## FÖRPACKNINGAR/TILLGÄNLIGHET

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

**REF** 257079 Färdiga odlingsplattor, 20 plattor

## YTTERLIGARE INFORMATION

Kontakta närmaste BD-representant för ytterligare information.



### **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