

Pregledni prispevek

## LABORATORIJSKI POSTOPKI ZA DOLOČANJE KOLONIZACIJE NOSEČNIC Z BAKTERIJO *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

ASSESSMENT OF LABORATORY PROCEDURES FOR GROUP B STREPTOCOCCI SCREENING IN PREGNANT WOMEN

Petra Vovko

Mikrobiološki laboratorij, Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto, Mej vrti 5, SI-8000 Novo mesto

---

### Izvleček

**Izhodišča** *Streptokoki skupine B (SSB) ali Streptococcus agalactiae so med vodilnimi povzročitelji sepse in meningitisa pri novorojencih. Okužbo pri novorojencu povzročijo SSB, ki kolonizirajo porodni kanal matere. Prikazane so možnosti laboratorijske obravnave kužnin za določitev SSB pri nosečnicah, saj v zadnjih letih ugotavljajo, da lahko neprimerna laboratorijska obravnava veliko prispeva k lažno negativnim rezultatom presejalnih kužnin za SSB.*

**Zaključki** *Najbolj uporabljane smernice za preprečevanje okužb, ki jih povzročajo SSB, so smernice ameriških centrov za nadzor bolezni (CDC). Te smernice predvidevajo odvzem brisa v 35.–37. tednu nosečnosti za ugotavljanje kolonizacije in zasejevanje na osnovna mikrobiološka gojišča. Raziskave kažejo, da so med gojišči velike razlike v zmogljivosti, zato je izbira gojišča zelo pomembna. Postopek z novim gojiščem Granada ima izmed mikrobioloških gojišč največjo dokazano razliko v občutljivosti nad postopkom CDC. Vendar pa bodo te zamudne gojitvene postopke v prihodnosti gotovo nadomestili hitri mikrobiološki testi tik pred porodom. Največja prednost testiranja v času tik pred porodom je, da odkrijejo tiste novorojenčke in ženske, pri katerih gre za resnično tveganje.*

**Ključne besede** *Streptococcus agalactiae; streptokoki skupine B; kolonizacija; nosečnost; laboratorijske tehnike in postopki*

---

### Abstract

**Background** *Group B streptococci (GBS) are the leading cause of sepsis and meningitis in newborns. The infection in the newborn is caused by GBS that colonize the birth canal. This review of possibilities for laboratory work-up of swabs for GBS screening in pregnant women was precipitated by findings that inappropriate laboratory procedures can significantly contribute to false negative results.*

**Conclusions** *Most widely used guidelines for prevention of group B streptococcal disease are the guidelines from the US Centers for Disease Control. These guidelines include collection of cultures between 35 and 37 weeks' gestation and use of basic microbiological media. Research showed that there are significant differences in media performance, therefore media selection is crucial. Data show that Granada agar has a better sensitivity than the CDC procedure. Nevertheless, in the future all culture-based screening methods will be replaced by rapid in-labor tests. Their biggest advantage is identifying newborns and mothers that are truly at risk.*

**Key words** *Streptococcus agalactiae; streptococcus group B; carrier state; pregnancy; laboratory techniques and procedures*

---

## Uvod

Streptokoki skupine B (SSB) ali *Streptococcus agalactiae* so med vodilnimi povzročitelji invazivnih okužb pri novorojencih. Okužba je zelo pogosta v prvem tednu življenja, t. i. zgodnji pojav okužbe. Najpogosteje se okužba pojavi kot sepsa ali meningitis.<sup>1,2</sup> Okužba s SSB je lahko usodna, lahko pa povzroči nevrološke posledice ali kasnejše povratne okužbe.

Vir okužbe novorojenca so SSB, ki kolonizirajo porodni kanal matere. V Sloveniji je bila leta 2001 opravljena raziskava v primorski regiji, kjer so ugotovili, da je koloniziranih 22,3–25,8 % nosečnic.<sup>3</sup> Med porodom se kolonizira polovica otrok, ki se rodi koloniziranim materam, zbolijo pa 1–2 % koloniziranih.<sup>2</sup> Pri nas incidenca boleznih SSB pri novorojenčkih še ni bila natančno ovrednotena. V Porodnišnici Ljubljana se v zadnjih letih stopnja zgodnjega pojava bolezni giblje okoli 3,4/1000 do 4,9/1000 živorojenih otrok.<sup>4</sup>

Ugotavljanje prisotnosti SSB v porodnem kanalu je pomembno, ker lahko zgodnji pojav okužbe preprečimo tako, da materi damo intrapartalno profilakso z antibiotiki.<sup>1</sup> S protimikrobno profilakso lahko zmanjšamo incidenco bolezni za 70 %.<sup>2</sup> Ameriški centri za nadzor bolezni (CDC) so izdali priporočila za presejalno testiranje vseh nosečnic v 35.–37. tednu nosečnosti.<sup>5</sup> Prenovljene smernice iz leta 2002 dajejo velik poudarek uporabi selektivnih gojišč (bujon po Toddu in Hewittu in kolumbijski krvni agar z dodatkom antibiotikov), ne omenjajo pa drugih možnosti določanja kolonizacije s SSB pri nosečnicah.

V tem prispevku želimo prikazati možnosti laboratorijske obravnave kužnin za določitev SSB z vidika mikrobiološkega laboratorija. V zadnjih letih ugotavljajo, da lahko neprimerna laboratorijska obravnava veliko prispeva k lažno negativnim rezultatom presejalnih kužnin za SSB.<sup>5</sup>

## Odvzem in transport kužnin

Nožnična kolonizacija s SSB pri materi je pogoj za zgodnjo kolonizacijo novorojenčka in pojav bolezni.<sup>6</sup> Odvzem brisa za SSB se razlikuje glede na to, kdaj v nosečnosti bris jemljemo. Če imamo na voljo klasične mikrobiološke postopke, je priporočen odvzem presejalnega brisa v 35.–37. tednu nosečnosti. Če pa imamo na voljo hitre diagnostične postopke, je smiselno jemati bris ob začetku popadkov.

Pri presejanju v 35.–37. tednu nosečnosti odzame mo bris spodnje tretjine nožnice in bris rektuma skozi analni sfinkter. Vzorec iz anorektuma odzame mo zato, ker je kolonizacija v nožnici lahko prehodna – črevesje pa naj bi bilo rezervoar za naselitev porodne poti.<sup>6,7</sup> Brisi sečnice, forniksa, materničnega vratu oz. odvzem brisa s spekulumom niso primerni za določanje kolonizacije s SSB.<sup>5,6</sup>

Za bris za presejanje v 35.–37. tednu je treba uporabiti bris s transportnim gojiščem (gojišče po Stuartu ali Amiesu brez oglja), ki se dostavi v laboratorij na hladnem ali pri sobni temperaturi. SSB bi preživeli 4 dni pri sobni temperaturi ali v hladilniku.<sup>5</sup>

Če so porodnišnici dostopne preiskave s hitro diagnostiko (optični imunski test – OIA, verižna reakcija

s polimerazo – PCR), se bris lahko odzame ob začetku popadkov. V tem primeru nas zanima le nožnična kolonizacija, saj je nožnična kolonizacija ob porodu povezana z razvojem zgodnjega pojava bolezni pri novorojencu z razmerjem obolevnosti 204.<sup>6</sup> Za ta namen odzame mo bris spodnje tretjine nožnice, vendar z dakronskim, rajonskim ali poliuretanskim brisom na plastični palčki brez transportnega gojišča.<sup>8,9</sup>

## Laboratorijske metode za določanje kolonizacije nosečnic s streptokoki skupine B

Opisujemo različne postopke laboratorijske obdelave presejalnih kužnin za določevanje SSB. Teste smo primerjali po ceni, delovni obsežnosti in parametrih učinkovitosti (Razpr. 1).

### Postopek po CDC

Po smernicah CDC bris nacepimo v selektivno tekoče gojišče. To gojišče je bujon po Toddu in Hewittu s kolistinom (10 µg/mL) in nalidiksično kislino (15 µg/mL) ali z gentamicinom (8 µg/mL) in nalidiksično kislino (15 µg/mL). Bujon inkubiramo pri 35 do 37 °C za 18 do 24 ur v običajni atmosferi ali v atmosferi s 5-odstotnim CO<sub>2</sub>. Hkrati lahko bris nacepimo še na krvni agar ali kolumbijski krvni agar z dodatkom kolistina in nalidiksične kisline (CNA). Bujon po inkubaciji precepimo na krvni agar.<sup>5</sup>

Sumljive izolate potrjujemo s testom lateksne aglutinacije (dokaz antigena skupine B) ali reakcijami, kot so reakcija Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP), test hidrolize hipurata in test pirilidonil arilamidaze (pirilidonil aminopeptidaze, test PYR). Če na agarski plošči po 24 h ni SSB, inkubacijo podaljšamo še za 18 do 24 ur.<sup>5</sup>

Postopek nacepljanja brisa v tekoče gojišče izvira iz zgodnjih raziskav, pri katerih so ugotovili, da je nacepitev na selektivno tekoče gojišče nujno potrebna, saj lahko pri nacepiti samo na selektivno ali samo na neselektivno trdno gojišče izgubimo od 7,8 do 46,8 % izolatov. Vendar so v teh raziskavah preučevali le nožnične brise.<sup>19–21</sup> V nedavnih raziskavah ugotavljajo, da je pri uporabi nožničnih in rektalnih brisov zelo priporočljivo kužnino nacepiti bujon in selektivno trdno gojišče.<sup>11</sup>

Odkrili so, da v nožnično-rektalnih brisih z uporabo samo selektivnega bujona izgubimo približno 1,4–2,3 % izolatov. Vzrok naj bi bil medsebojno zaviralen učinek med SSB in *Enterococcus faecalis*.<sup>17,22</sup> Mehanizem zaviranja rasti SSB s strani *E. faecalis* ni znan, najbrž pa ni posledica specifičnih učinkov, ampak tekmovalnosti pri izrabi hranil.<sup>11</sup>

V inkubiranih selektivnih bujonih lahko tudi neposredno dokazujemo antigen skupine B. Bujoni, ki vsebujejo antigen skupine B, po precepitvi na ploščo pa ne dajejo rasti, po navadi odkrijemo obsežno rast *E. faecalis*, kar potrjuje teorijo antagonističnega delovanja.<sup>17</sup> V našem laboratoriju opažamo tudi, da kljub selektivnosti bujona po Toddu in Hewittu s kolistinom

## Razpr. 1. Primerjava cen, delovne obsežnosti, trajanja in zmogljivosti opisanih testov.

Table 1. Cost, labour intensity, duration and performances of described assays.

Bris	Postopek	Cena izvedbe/preiskavo	Obseg dela	Minimalni čas do poročanja pozitivnega rezultata	Maksimalni čas do poročanja pozitivnega rezultata	Razlika v občutljivosti	Razlika v pozitivni napovedni vrednosti*	Razlika v negativni napovedni vrednosti*	Reference
Swab	Procedure	Cost per test	Work-load	Minimum time to reporting of positive result	Maximum time to reporting of positive result	Sensitivity difference	Positive predictive value difference*	Negative predictive value difference*	References
N+R	Postopek po CDC (STG, ki se precepi na KA, potrditev sumljivih kolonij z LA) CDC procedure (STG transferred on BPA, confirmation of presumptives with LA)	●○○○○	●●●○○	18 h	72 h	–	–	–	(6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18)
N+R	– STG, ki se precepi na KA, potrditev sumljivih kolonij z LA – STG transferred on BPA, confirmation of presumptives with LA – CNA agar, potrditev sumljivih kolonij z LA – CNA agar, confirmation of presumptives with LA	●○○○○	●●●●●	18 h	72 h	+2,5 %†	0,0 %	+1,1 %†	(11, 12, 13)
N+R	Granada agar Granada agar	●○○○○	●○○○○	10 h	48 h	+14,1 %†	0,0 %†	+2,3 %†	(13, 14)
N+R	– NNA agar, potrditev sumljivih kolonij z LA – NNA agar, confirmation of presumptives with LA – STG, ki se precepi na KA, potrditev sumljivih kolonij z LA – STG transferred on BPA, confirmation of presumptives with LA	●○○○○	●●●●●	18 h	72 h	+6,7 %	–	–	(11, 12)
N+R	STG, izvedba LA po inkubaciji STG, LA performed after incubation	●○○○○	●●○○○	18 h	24 h	+5,7 %	+2,2 %	0,0 %	(17)
N	Strep B OIA Strep B OIA	●●○○○	●●○○○	21 min	21 min	–43,0 %†	–3,5 %	–25,9 %†	(6, 10, 15, 18)
N	PCR v realnem času Real-time PCR	●●●●●	●●●○○	45 min	45 min	+4,4 %	0,0 %	+1,1 %	(16)

N – nožnični bris; R – ano-rectalni bris; STG – selektivno tekoče gojišče; KA – krvni agar; LA – test lateksne aglutinacije; NNA – krvni agar z neomicinom in nalidiksično kislino; CNA – kolumbijski krvni agar s kolistinom in nalidiksično kislino; \* V primerjavi s postopkom po CDC; † Povprečje rezultatov več raziskav.

N – vaginalni swab; R – anorectal swab; STG – selective liquid medium; BPA – blood agar plate; LA – latex agglutination test; NNA – neomycin-nalidixic acid agar; CNA – Columbia blood agar plate with colistin and nalidixic acid; \* Compared to CDC procedure; † Average result of multiple studies.

in nalidiksično kislino vrste iz rodu *Proteus* še vedno lahko prerastejo nacepljene plošče in onemogočijo identifikacijo drugih bakterij v kulturi.

Slabost postopka, priporočenega s strani CDC, je tudi potreba po potrjevanju izolatov z biokemičnimi ali antigenski testi.<sup>23</sup>

## CNA agar in NNA agar

Najpogosteje opisani selektivni trdni gojišči za neposredno nacepljanje nožničnih in nožnično-rectalnih brisov sta CNA agar in NNA agar.

CNA agar je kolumbijski krvni agar z dodatkom kolistina (10 µg/mL) in nalidiksične kisline (15 µg/mL). Na podlagi 580 brisov iz nožnice in rektuma so za CNA agar dokazali občutljivost 64,2 %, v kombinaciji s selektivnim tekočim gojiščem po CDC pa 76,8 %. Občutljivost NNA agarja je bila 77,9 %, občutljivost kombinacije NNA s selektivnim tekočim gojiščem po CDC pa 90,5 %. Razlika med gojiščema je bila statistično pomembna.<sup>12</sup>

NNA agar je krvni agar z dodatkom neomicina (30 µg/mL) in nalidiksične kisline (15 µg/mL). Po nacepiti brisa iz transportnega gojišča se inkubira preko noči

pri 35 °C v atmosferi s 5-odstotnim CO<sub>2</sub>. Po sestavi je nekoliko cenejši od gojišča CNA agar.<sup>12</sup>

Gojišče NNA agar sta Dunne in Holland-Staleyeva prikazala kot enakovredno alternativo postopku, priporočenemu s strani CDC, v smislu občutljivosti in negativne napovedne vrednosti. Vendar ugotavljata, da z uporabo samo NNA agarja ali samo postopka po CDC zgrešimo 15,3–16,2 % izolatov.<sup>11</sup> Neposredno nacepljanje na selektivni agar ob nacepiti selektivnega tekočega gojišča je po ugotovitvah raziskovalcev nujno, da dosežemo večjo občutljivost.<sup>11,22</sup> Pomen neposrednega nacepljanja na selektivno gojišče je tudi v krajšem trajanju preiskave. Ugotavljajo, da gojišče NNA agar samo po sebi odkrije do 84,7 % vseh izolatov večinoma več kot 24 ur pred postopkom po CDC.<sup>11</sup>

## Dokazovanje v selektivnem tekočem gojišču

V nekaterih laboratorijih so ugotovili, da se s testom lateksne aglutinacije iz selektivnega tekočega gojišča lahko izognemo padcu občutljivosti testa zaradi tekmovanja med enterokoki in SSB v tekočih gojiščih.<sup>17,24</sup>

Pri nožnično-rektalni kolonizaciji 20,6 % so ugotovili, da je pozitivna napovedna vrednost metode samo z dokazovanjem antigena 99,5 %. Pozitivna napovedna vrednost postopka po CDC pa 97,3 %. Metoda dokazovanja antigena v selektivnem tekočem gojišču je prikazala tudi večjo občutljivost kot postopek po CDC (98,8 % proti 93,1 %).<sup>17</sup>

Poleg boljše občutljivosti pa ima opisan postopek še dodatne prednosti, saj se postopek skrajša na vsega 24 h, zaradi manjše delovne intenzivnosti obdelave pa se zmanjša cena preiskave.<sup>17, 24</sup>

V omenjeni raziskavi je bilo 17 izolatov od 247 pozitivnih v testu lateksne aglutinacije iz selektivnega tekočega gojišča in negativnih po subkultivaciji istega bujona na krvni agar (postopek po CDC). V večini primerov so ugotovili, da je neujemanje posledica obsežne rasti *E. faecalis*, kar pomeni, da se s testom lateksne aglutinacije iz selektivnega tekočega gojišča dobro izognemo temu antagonističnemu učinku.<sup>17</sup>

## Granada agar

Gojišče Granada agar je eno izmed gojišč, ki za odkrivanje SSB izrablja njihovo sposobnost tvorbe oranžnega pigmenta. Zaradi svoje lastnosti selektivnosti in diferencialnosti naj bi omogočal hitrejšo in enostavnejšo izolacijo SSB iz zelo kontaminiranih kužnin.<sup>13, 14, 25</sup>

O tem gojišču se strokovna razprava vleče že iz začetka 80. let, ko so gojišče prvič opisali. Od takrat se je gojišče spremenilo do optimalne sestave, hkrati pa smo spoznali razna pravila, ki se jih moramo držati pri uporabi tega gojišča.<sup>13, 14, 25, 26</sup>

Največjo težavo pri razvoju gojišča Granada je predstavljala zelo neotipljiva narava tvorbe pigmenta pri SSB. Tvorbo pigmenta pri SSB je opisala že Lancefieldova leta 1934, vendar do danes vemo le malo o pigmentu samem in o pogojih, ki so potrebni za njegovo izražanje. Vemo, da tvorbo pigmenta pospešijo specifični rastni pogoji (npr. anaerobna inkubacija itn.). Ugotavljajo, da je tvorba pigmenta povezana s tvorbo hemolize pri SSB (najbrž na ravni genetskega uravnavanja).<sup>25, 26</sup> Sevi SSB, ki so nehemolitični na krvnem agarju, tudi ne tvorijo pigmenta. Med človeškimi izolati naj bi bilo nehemolitičnih približno 0,5–2,3 % izolatov SSB in teh ne moremo odkriti na gojišču Granada agar.<sup>7, 13, 23, 27</sup>

Raziskave kažejo, da je najboljši pristop uporaba brisa iz transportnega gojišča, ki se z razmazovanjem nacepi na agarske plošče Granada ali pa se vstavi v epruveto z agarskim gojiščem Granada. Inkubacijo izvedemo v anaerobni atmosferi. Vsa gojišča inkubiramo za 18 ur pri 36 °C.<sup>14</sup>

V raziskavi, v kateri so primerjali gojišče Granada z gojišči, ki jih priporoča CDC, so ugotovili, da se občutljivosti teh dveh naborov gojišč pomenljivo ne razlikujeta za brise nožnice. Če pa primerjamo občutljivost v nožnično-rektalnih brisih, so agarske plošče Granada in epruvete Granada bolj občutljive ( $p < 0,01$ ). Občutljivost agarja Granada je bila 95,5 %, občutljivost selektivnega bujona in krvnega agarja po smernicah CDC pa 82,0 %. Pri prevalenci nožnične koloni-

zacije 13,5 % in prevalenci nožnično-rektalne kolonizacije 19,8 % je bila negativna napovedna vrednost agarja Granada 98,9 %, negativna napovedna vrednost postopka po smernicah CDC pa 95,8 %.<sup>14</sup>

Ugotavljajo tudi, da dajo vse kužnine rezultat v 18 urah.<sup>13, 14</sup>

Velika prednost uporabe gojišča Granada agar je torej, da z zelo visoko občutljivostjo dobimo dokončne rezultate v 18 urah ter da ni potrebno precepljanje ali potrjevanje, saj je tvorba oranžnega pigmenta specifična za SSB.

Gojišče Granada agar ima patentirano sestavo in proizvajalec je le eden (Biomedics, Madrid, Španija, www.biomedics.es). Gojišče je na voljo v klasični dehidrirani obliki. Če pa laboratorij želi uporabljati razlite plošče in epruvete, pa je potrebna pazljivost zaradi izjemne občutljivosti gojišča na temperaturo.<sup>26</sup> Nedavno je bila objavljena študija, ki je dokazala slabo občutljivost Granada agarja, kasneje pa se je izkazalo, da so slabi rezultati posledica neprimernega transporta razlitega gojišča do laboratorija in neprimernega hranjenja v laboratoriju.<sup>26, 28</sup>

## Strepto B ID agar

Najnovije gojišče za določanje SSB je Strepto B ID agar (bioMerieux, Francija). To gojišče je prvo, pri katerem so uporabili koncept kromogenih substratov za določanje SSB. Kromogena gojišča so se izkazala kot zelo učinkovito orodje za klasične mikrobiološke postopke. Doslej sta bili opravljeni le dve primerjavi z obstoječim naborom gojišč za nožnične brise. V primerjavi z Granada Biomedics agarjem so za Strepto B ID v prvi raziskavi odkrili nekoliko višjo občutljivost (razlika 3,9–6,6 %), vendar nekoliko slabšo pozitivno napovedno vrednost (razlika 4,5–7,7 %).<sup>29</sup> V drugi raziskavi z majhnim številom vzorcev pa niso pokazali statistično pomembnih razlik med gojiščema.<sup>30</sup> Primerjav, ki bi obsegale tudi rektalne brise, še ni. Ker vsa priporočila za presejanje za SSB v nosečnosti predvidevajo tudi preiskavo rektalnih brisov, postopka s tem gojiščem še ne moremo neposredno primerjati z obstoječimi postopki (Razpr. 1). Gojišče Strepto B ID za razliko od Granada agarja inkubiramo aerobno, vendar pa moramo vse sumljive kolonije na gojišču Strepto B ID potrjevati še s testom lateksne aglutinacije.

## Testiranje ob začetku popadkov

Testiranje v predporodnem obdobju se je uveljavilo, čeprav je najboljši napovednik bolezni kolonizacija porodnega kanala v času poroda. Vzrok za to je, da klasične gojitvene tehnike ne zagotovijo rezultata prej kot 18 ur po odvzemu brisa, bolezen pa se najpogosteje pojavi v prvih urah po porodu.<sup>2, 5</sup> Z novimi tehnologijami pa lahko preiskavo izvedemo v manj kot uri in premaknemo testiranje za kolonizacijo s SSB na čas po nastopu popadkov. Takšna testa sta OIA in PCR v realnem času.<sup>8, 9, 31, 32</sup>

S testiranjem tik pred porodom odkrijemo nosečnice z resnično kolonizacijo porodne poti, s testiranjem 35.–37. teden pa to kolonizacijo le napovedujemo. Pri

testiranju 35.–37. teden moramo vzeti v zakup časovno variacijo kolonizacije, čemur se poskušamo izogniti z vključitvijo vzorca rektuma. Zaradi te naravne variacije se zmanjša občutljivost nožnično-rektalne brisa.<sup>6</sup>

## Optično-imunski test

Optično-imunski test Strep B OIA (Thermo Electron/Biostar, Louisville, ZDA) je hitri test za dokaz antigena SSB v nožničnih brisih.

Kot je običajno pri imunskih hitrih testih iz kužnine, najprej kemično ekstrahiramo polisaharidni antigen. Nato raztopini dodamo kunčja protitelesa, specifična za antigen SSB, ki so označena s hrenovo peroksidazo. Raztopino po inkubaciji nanese na inertni nosilec, na katerem so nanese lovilna kunčja protitelesa, specifična za antigen SSB. Če je antigen prisoten, ga protitelesa vežejo na nosilec v t. i. »sendvič«. Po dodatku substrata za peroksidazo se začne na nosilcu razvijati vijoličnomodro obarvan produkt. Nosilec je silicijeva rezina, ki se zlato blešči. Če se začne na nosilcu razvijati barvilo, postane površina vijoličnomodra. Če antigena v kužnini ni, ostane površina nosilca bleščeče zlata. Na nosilcu je tudi področje s pozitivno kontrolo (antigenom SSB). Pozitiven rezultat testa pomeni dokončno identifikacijo (če interna kontrola da ustrezen rezultat). Celotna izvedba testa traja 21 min.<sup>8</sup>

Testa ne ovirajo niti pogosti moteči dejavniki (mikroorganizmi in biološke snovi), ki jih najdemo v nožnici.<sup>8</sup>

Ideja, da bi tveganje, ki ga predstavljajo SSB za novorojenčka in nosečnice, ugotavljali s cenovno ugodnim hitrim testom ob začetku poroda, je privlačna, vendar je potrebno rešiti najmanj tri težave. Test OIA trenutno še ne ponuja dovolj dobre občutljivosti.<sup>33,34</sup> Test bi moral biti na voljo 24 ur na dan in 7 dni na teden, to pa je težko, ker lahko ta test izvaja le usposobljeno in izkušeno laboratorijsko osebje. Ta test pa tudi ne ugotavlja morebitne odpornosti proti eritromicinu oz. klindamicinu.

## PCR v realnem času

Za določevanje SSB v času neposredno pred porodom je primerna različica PCR s pomnoževanjem v kapilari in fluorescentnim spremljanjem pridelka v realnem času ter v zaprtem sistemu. Takšen je npr. sistem LightCycler™ (Roche Molecular Systems, Alameda, ZDA). Za razliko od drugih izpeljank reakcije PCR ta tehnologija omogoča izvedbo 45 ciklov reakcije v približno 30 min. Preiskava skupaj s pripravo vzorca in računalniško analizo rezultatov traja približno 45 min.<sup>9,16</sup>

Za dokazovanje prisotnosti SSB uporabljamo zapis, ki ga imajo skoraj vsi SSB – to je gen *cfb*, kateri zapisuje faktor CAMP. To zaporedje je zelo ohranjeno med serotipi SSB.<sup>9,16</sup> Tehnologija omogoča spremljanje količine pridelka v realnem času (kvantifikacija).<sup>9,16</sup> V primerjavah PCR v realnem času s klasičnim gojitvenim postopkom (po CDC) so rezultati preiskave s

PCR odlično korelirali z rezultati klasičnega postopka.<sup>9,16,34</sup>

Primerjava koristnosti presejanja s PCR v času poroda s presejanjem v 35.–37. tednu je pokazala, da se v populaciji nosečnic s povprečno kolonizacijo (22,8 % nožnično-rektalno, 14,7 % nožnično) na podlagi preiskav s PCR prepreči več zgodnjih pojavov boleznih, smrti novorojencev in trajnih posledic pri otrocih. Vendar koristnost preiskave s PCR ni večja od stroškov te preiskave.<sup>35</sup>

## Razpravljanje

Najbolj uporabljane smernice za preprečevanje okužb, ki jih povzročajo SSB, so smernice CDC. Te smernice predvidevajo odvzem brisa v 35.–37. tednu nosečnosti za ugotavljanje kolonizacije s SSB v nožnici in anorektumu. Po teh smernicah se koloniziranim nosečnicam ob porodu za preprečevanje prenosa SSB na novorojenca daje antibiotična profilaksa.<sup>5</sup>

Ta pregled možnosti za laboratorijsko obravnavo presejalnih kužnin za SSB so sprožile najnovejše smernice CDC, ki dajejo velik poudarek pravilni laboratorijski obdelavi kužnin.<sup>5</sup>

Številne raziskave kažejo, da med klasičnimi gojitvenimi postopki v/na gojiščih protokol, priporočen s strani CDC, ni najboljši, vendar so njegova osnova gojišča, ki so na voljo v vsakem medicinskem mikrobiološkem laboratoriju. S tem je zagotovljena višja raven kakovosti obdelave kužnine, kot če bi priporočili različna in manj dostopna gojišča.

Slabosti protokola po CDC so dolgotrajnost, potreba po potrjevanju in obsežnost dela, ki je pomemben dejavnik skupnih stroškov preiskave.<sup>17,23</sup>

Razširjeno je mnenje, da je selektivni bujon bolj občutljiv za brise za SSB, kar pa velja le za nožnične brise. Pri nožnično-rektalnih brisih pa se ugotavlja, da lahko prisotnost tekmujočih organizmov v bujonu zmanjša njegovo sposobnost podpore rasti SSB. Veliko raziskovalcev je dokazalo, da je selektivni bujon manj občutljiv za nožnično-rektalne vzorce kot nacepljanje na trdna gojišča, zato je potrebno kužnine nacepljati vsaj še na trdno gojišče.

Neposredno nacepljanje kužnine na selektivno trdno gojišče (v kombinaciji z nacepljanjem selektivnega bujona) lahko skrajša čas do identifikacije SSB tudi za 48 ur, ima večjo občutljivost v primerjavi z nacepljanjem samo v tekoče selektivno gojišče in prepreči zaviralno delovanje tekmujočih organizmov.

Odlične lastnosti je pokazala nova formulacija gojišča Granada agar. Postopek s tem gojiščem ima največjo dokazano razliko v občutljivosti nad postopkom CDC. Izmed primerjanih metod je najenostavnejši in od gojitvenih metod najhitrejši. Nekateri raziskovalci so imeli težave z občutljivostjo zaradi neustreznih pogojev transporta razlite oblike gojišča Granada do laboratorija.<sup>26</sup> Za dehidrirano obliko gojišča Granada poročil o težavah ni. Izgleda, da bo zelo dobra izbira tudi Strepto B ID agar, vendar moramo počakati še na študije njegove zmogljivosti z nožničnimi in rektalnimi brisi, ki jih predvidevajo vse smernice za presejanje za SSB.

Hitri testi tik pred porodom bodo v prihodnosti gotovo nadomestili zamudne gojitvene postopke. Največja prednost testiranja v času tik pred porodom je, da z določanjem kolonizacije v tem obdobju odkrijemo tiste novorojenčke in ženske, ki so v resničnem tveganju (oz. nosečnice z dejansko kolonizacijo v času poroda). To nam omogoči, da izključimo lažno pozitivne oz. lažno negativne primere, pri katerih bi prišlo do nepotrebnega dajanja antibiotikov oz. odtegnitve le-teh.<sup>35</sup>

Čeprav je PCR najpogosteje uporabljana tehnologija v molekularni diagnostiki mikroorganizmov, za SSB do danes ni preskušanih veliko protokolov. Pričakujemo lahko dodatna preskušanja protokolov za PCR in njihovo optimizacijo. PCR v realnem času in OIA sta izvedena v zelo kratkem času v primerjavi s trajanjem popadkov in povprečnim časom od poroda do pojava bolezni, zato je ena od možnosti za izboljšanje občutljivosti tudi nekajurna obogatitev v tekočem gojišču pred izvedbo PCR oz. OIA.

Za najboljšo uporabnost pa je potrebno rešiti še težavo z izvedbo PCR in OIA pri porodih pozno popoldne in ponoči ter neugodno visoko ceno preiskav s PCR.

Po našem mnenju je za medicinsko-mikrobiološki laboratorij v Sloveniji najprimernejši postopek obdelave presejalnih kužnin za SSB pri nosečnicah nacepljanje na gojišče Granada agar.

Ker je naročnik preiskave za določevanje kolonizacije s SSB ginekolog v času predporodnih obiskov, rezultat preiskave pa potrebuje porodničar, lahko pride do težav pri komunikaciji. Slovenski mikrobiološki laboratoriji že uporabljajo sisteme elektronskega dostopanja do rezultatov preiskav, ki omogočajo vpogled vanje 24 ur na dan. To pomeni, da lahko v porodnišnici kadarkoli preverijo SSB status porodnice, če je ginekolog odvezel bris v času nosečnosti.

## Literatura

- Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 497-513.
- Schuchat A. Group B streptococcal disease: from trials and tribulations to triumph and trepidation. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 751-6.
- Fišer J, Špacapan S, Prinčič D, Freljih T. Odkrivanje kolonizacije nosečnic z bakterijo *Streptococcus agalactiae* v severnoprimerjski regiji. *Zdrav Vestn* 2001; 70: 623-6.
- Mole H, Štucin-Gantar I, Kornhauser-Cerar L, Babnik J. Okužbe z bakterijo *Streptococcus agalactiae* pri novorojenčkih. *Med Razgl* 2004; 43 Suppl 2: 107-13.
- Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51: 1-22.
- Benitz WE, Gould JB, Druzin ML. Risk factors for early-onset group B streptococcal sepsis: estimation of odds ratios by critical literature review. *Pediatrics* 1999; 103: e77.
- Anthony B, Okada D, Hobel C. Epidemiology of group B *Streptococcus*: longitudinal observations during pregnancy. *J Infect Dis* 1978; 137: 524-30.
- Thermo Electron Corporation/Biostar. Strep B OIA® (rapid test) laboratory procedure (navodila za uporabo). 2003.
- Ke D, Menard C, Picard FJ, Boissinot M, Ouellette M, Roy PH, et al. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clin Chem* 2000; 46: 324-31.
- Carroll KC, Ballou D, Varner M, Chun H, Traver R, Salyer J. Rapid detection of group B streptococcal colonization of the genital tract by a commercial optical immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 206-10.
- Dunne WM, Jr., Holland-Staley CA. Comparison of NNA agar culture and selective broth culture for detection of group B streptococcal colonization in women. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2298-300.
- Dunne WM, Jr. Comparison of selective broth medium plus neomycin-nalidixic acid agar and selective broth medium plus Columbia colistin-nalidixic acid agar for detection of group B streptococcal colonization in women. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3705-6.
- Gil EG, Rodriguez MC, Bartolome R, Berjano B, Cabero L, Andreu A. Evaluation of the Granada agar plate for detection of vaginal and rectal group B streptococci in pregnant women. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2648-51.
- Rosa-Fraile M, Rodriguez-Granger J, Cueto-Lopez M, Sampedro A, Gaye EB, Haro JM, et al. Use of Granada medium to detect group B streptococcal colonization in pregnant women. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2674-7.
- Song J, Lin L, Shott S, Kimber N, Tangora J, Cohen A, et al. Evaluation of the Strep B OIA test compared to standard culture methods for detection of group B streptococci. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999; 7: 202-5.
- Bergeron MG, Ke D, Menard C, Picard FJ, Gagnon M, Bernier M, et al. Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery. *N Engl J Med* 2000; 343: 175-9.
- Park CJ, Vandel NM, Ruprai DK, Martin EA, Gates KM, Coker D. Detection of group B streptococcal colonization in pregnant women using direct latex agglutination testing of selective broth. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 408-9.
- Thinkhamrop J, Limpongsanurak S, Festin MR, Daly S, Schuchat A, Lumbiganon P, et al. Infections in International Pregnancy Study: performance of the optical immunoassay test for detection of Group B *Streptococcus*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5288-90.
- Baker CJ, Goroff DK, Alpert SL, Hayes C, McCormack WM. Comparison of bacteriological methods for the isolation of group of B *Streptococcus* from vaginal cultures. *J Clin Microbiol* 1976; 4: 46-8.
- Baker CJ, Goroff DK, Alpert S, Crockett VA, Zinner SH, Evrard JR, et al. Vaginal colonization with group B streptococcus: a study in college women. *J Infect Dis* 1977; 135: 392-7.
- Szilagyi G, Mayer E, Eidelman A. Rapid isolation and identification of group B streptococci from selective broth medium by slide co-agglutination test. *J Clin Microbiol* 1978; 8: 410-2.
- Elsayed S, Gregson DB, Church DL. Comparison of direct selective versus nonselective agar media plus LIM broth enrichment for determination of group B streptococcus colonization status in pregnant women. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 718-20.
- Votava M, Tejkalova M, Drabkova M, Unzeitig V, Braveny I. Use of GBS media for rapid detection of group B streptococci in vaginal and rectal swabs from women in labor. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 120-2.
- DPC. PathoDx® Strep grouping kit: navodila za uporabo. 2002.
- De la RM, Villareal R, Vega D, Miranda C, Martinezbrocal A. Granada medium for detection and identification of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 779-85.
- Rosa-Fraile M. Granada agar sensitivity and detection of group B streptococcus. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4007.
- Noble MA, Bent JM, West AB. Detection and identification of group B streptococci by use of pigment production. *J Clin Pathol* 1983; 36: 350-2.
- Overman SB, Eley DD, Jacobs BE, Ribes JA. Evaluation of methods to increase the sensitivity and timeliness of detection of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4329-31.
- Roure C, Fiary V, Gilles Y, Salord H, Tigaud S. Prevention of perinatal group B streptococcal infections: evaluation of a new chromogenic medium STREPTO B ID. abstr. P798 (Abstracts of the 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases). *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 Suppl 4. doi:10.1111/j.1470-9465.2006.12\_4\_1428.x.
- Perry JD, Oliver M, Nicholson A, Wright J, Gould FK. Evaluation of a new chromogenic agar medium for isolation and identification of Group B streptococci. *Lett Appl Microbiol* 2006; 43: 615-8.

31. Benitz WE, Gould JB, Druzin ML. Preventing early-onset group B streptococcal sepsis: strategy development using decision analysis. *Pediatrics* 1999; 103: e76.
32. Infectio Diagnostic. IDI-Strep B™ Navodilo za uporabo. 2003.
33. Aziz N, Baron EJ, D'Souza H, Nourbakhsh M, Druzin ML, Benitz WE. Comparison of rapid intrapartum screening methods for group B streptococcal vaginal colonization. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005; 18: 225-9.
34. Honest H, Sharma S, Khan KS. Rapid tests for group B Streptococcus colonization in laboring women: a systematic review. *Pediatrics* 2006; 117: 1055-66.
35. Haberland C, Benitz W, Sanders G, Pietzsch J, Yamada S, Hguyen L, et al. Perinatal screening for group B streptococci: cost-benefit analysis of rapid polymerase chain reaction. *Pediatrics* 2002; 110: 471-80.

---

Prispelo 2006-07-17, sprejeto 2006-12-06