

## Ugotavljanje nosilstva bakterije *Streptococcus agalactiae* v nosečnosti – ali moramo v diagnostiki narediti naslednji korak?

Detection of *Streptococcus agalactiae* colonisation in pregnancy – do we need to take a step forward in diagnostics?

Samo Jeverica<sup>1</sup>, Eva Kotnik<sup>1</sup>, Miha Lučovnik<sup>2</sup>, Nataša Tul Mandić<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška ulica 4, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Ginekološka klinika Ljubljana, Klinični oddelek za perinatologijo, Univerzitetni Klinični center Ljubljana, Štajmerjeva 3, 1000 Ljubljana, Slovenija

### Korespondenca/ Correspondence:

asist. dr. Samo Jeverica, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Zaloška ulica 4, 1000 Ljubljana  
e: samo.jeverica@mf.uni-lj.si

### Ključne besede:

nosečnost; neonatalne okužbe; *Streptococcus agalactiae*; diagnostične metode; molekularna diagnostika; nosilstvo

### Key words:

pregnancy; neonatal

### Izvleček

**Izhodišča:** *Streptococcus agalactiae* je najpogostejši infekcijski povzročitelj obolevnosti novorojenčkov. Večino zgodnjih neonatalnih okužb lahko preprečimo z antibiotično profilakso med porodom. Nosilstvo v nosečnosti prepoznamo z uporabo različnih diagnostičnih metod. V raziskavi smo primerjali diagnostične značilnosti dveh uveljavljenih metod za ugotavljanje nosilstva *S. agalactiae*.

**Metode:** V raziskavo smo vključili 101 zaporedni bris nožnice oz. nožnice in danke nosečnic in nenosečnic, ki so bile v letu 2014 poslane v laboratorij za opredelitev nosilstva *S. agalactiae* ali za opredelitev povzročiteljev kolpitisu. Vzorce smo sočasno testirali z metodo obogatene kulture in molekularnim testom *illumigene GBS*. Vzorce, pri katerih smo ugotovili ponovljivo neujemanje rezultatov, smo dodatno testirali z drugim molekularnim testom. Za obe metodi smo izračunali občutljivost, specifičnost, negativno in pozitivno napovedno vrednost.

**Rezultati:** Povprečna starost preiskovank je bila 33 let. Z obogateno kulturo, testom *illumigene GBS* in kombinacijo obeh testov smo odkrili 19,8 %, 22,7 % in 23,8 % nosilk. Občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost za obogateno kulturo je znašala 83,3 %, 100 %, 100 % in 95,1 %; za test *illumigene GBS* pa 95,8 %, 100 %, 100 % in 98,7 %. Z uporabo kombinacije obeh testov smo odkrili 20 % več nosilk, kakor z uporabo obogatene kulture samostojno.

**Zaključki:** S kombinacijo obogatene kulture in testa *illumigene GBS* smo odkrili več nosilk *S. agalactiae* kakor z metodo obogatene kulture, ki se trenutno večinoma uporablja v rutinski diagnostiki. Potrebno je sprejeti celovit program preprečevanja invazivnih neonatalnih okužb s *S. agalactiae* v Sloveniji.

### Abstract

**Background:** *Streptococcus agalactiae* is the leading infectious cause of morbidity among neonates. A majority of early onset neonatal infections can be prevented using antimicrobial prophylaxis during labour. Different diagnostic procedures can be employed to detect maternal colonization during pregnancy and labour. In the present study we analysed diagnostic characteristics of two common methods for detection of *S. agalactiae*.

**Methods:** One hundred and one consecutive vaginal or combined vaginal-rectal swabs were included in this prospective study. All samples were tested with enrichment culture and molecular *illumigene GBS* assay. The results of repeatedly discordant samples were retested and confirmed

infections; *Streptococcus agalactiae*; diagnostic methods; molecular detection; colonization

**Citirajte kot/Cite as:**

Zdrav Vestn 2016;  
85: 15–23

Prispelo: 29. maj 2015,  
Sprejeto: 13. jan. 2016

by a different molecular assay. Sensitivity, specificity, positive and negative predicted values were determined for both assays.

**Results:** Mean age of women was 33 years. Positivity rates using enrichment culture only, *illumigene* GBS assay only and a combination of both assays were 19.8 %, 22.7 % and 23.8 %, respectively. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were 83.3 %, 100 %, 100 % and 95.1 % for enrichment culture, and 95.8 %, 100 %, 100 % and 98.7 % for *illumigene* GBS assay, respectively. Combining both methods, 20 % more colonized women were detected compared to using enrichment culture alone.

**Conclusions:** With a combination of enrichment culture and *illumigene* GBS assay we can detect substantially more colonized women compared to currently the most frequently used method of enrichment culture. A comprehensive evaluation of the current strategies for prevention of *S. agalactiae* early neonatal infection is warranted in Slovenia.

## Uvod

Bakterija *Streptococcus agalactiae* (streptokok skupine B) je najpogostejši povzročitelj invazivnih neonatalnih okužb v državah razvitega sveta.<sup>1–3</sup> Incidenca okužb v Evropi po nedavni oceni znaša 0,57/1000 porodov.<sup>2</sup> Smrtnost zaradi okužb s *S. agalactiae* se je v zadnjih desetletjih bistveno znižala, vendar še vedno znaša okoli 10 %.<sup>4,5</sup> Glede na začetek nastanka bolezni ločimo dva tipa okužbe. Zgodnja neonatalna okužba se pojavi v prvih sedmih dneh starosti (tj. najpogosteje 24–48 ur po porodu) in se najpogosteje kaže kot pljučnica ali sepsa. Pozna neonatalna okužba običajno nastane do 3. meseca starosti in se večinoma kaže kot meningitis.<sup>3,6</sup>

Patogeneza zgodnjega tipa okužbe je v primerjavi s pozno obliko bolj pojasnjena. *S. agalactiae* je oportunistični patogen, ki kolonizira črevo, nožnico ali mehur 10–30 % nosečnic.<sup>7,8</sup> Novorojenček se okuži pri prehodu skozi porodni kanal, pri čemer za zgodnjo obliko bolezni zbolijo 2–6 % novorojenčkov koloniziranih nosečnic.<sup>6,9</sup> Prenos in nastanek bolezni pri otroku lahko uspešno preprečimo z obporodno antibiotično profilakso.<sup>10</sup> Izbira nosečnic, ki naj prejmejo obporodno antibiotično profilakso, poteka na podlagi dejavnikov tveganja za nastanek bolezni pri novorojenčku (tj.  $\geq 18$  h od razpoka amnijske mem-

brane, telesna temperatura  $\geq 38$  °C med porodom, porod  $< 37$ . tednu nosečnosti, dokazana bakteriurija s *S. agalactiae* v času nosečnosti, okužba otroka s *S. agalactiae* ob prejšnjem porodu) ali na podlagi ugotavljanja nosilstva med 35. in 37. tednom nosečnosti.<sup>3,11</sup> Na podlagi obsežne primerjave obeh načinov preprečevanja zgodnje neonatalne okužbe so ugotovili, da je aktivno ugotavljanje nosilstva s pomočjo mikrobiološke diagnostike povezano s polovico manjšim tveganjem za nastanek zgodnje bolezni pri otroku v primerjavi s preprečevanjem na podlagi dejavnikov tveganja.<sup>12</sup> Kljub temu velja poudariti, da s presejanjem nosečnic v 35.–37. tednu nosečnosti ne uspemo preprečiti vseh zgodnjih okužb pri novorojenčkih. V okolju z uveljavljenim presejanjem tako ugotavljajo, da se je večina zbolelih donošenih otrok rodila materam z negativnim presejalnim testom.<sup>13</sup>

Mikrobiološka diagnostika ugotavljanja nosilstva *S. agalactiae* temelji na obogateni kulturi, pri kateri bris nožnice oz. nožnice in danke najprej kultiviramo v selektivnem tekočem gojišču (tj. Todd-Hewitt bujon z dodatkom 10 mg/L kolistina in 15 mg/L naldiksikne kisline), ki ga po 16–24 urah precepimo na enega od trdnih gojišč – krvni agar, Columbia krvni agar z dodatkom kolistina in na-

lidiksične kisline (CNA agar) ali katero od komercialnih kromogenih gojišč.<sup>3,14</sup> Občutljivost in specifičnost testiranja v 35.–37. tednu nosečnosti za napoved nosilstva v času poroda znaša 87 % in 96 %.<sup>15,16</sup> Zaenkrat je samo z uporabo obogatene kulture možno testirati občutljivost *S. agalactiae* za antibiotike, kar je pomembno predvsem v primerih preobčutljivosti na beta-laktamske antibiotike. Antigenski testi imajo v primerjavi z obogateno kulturo bistveno slabšo občutljivost, ki znaša 15–74 %<sup>17</sup>, in jih zato za ugotavljanje nosilstva ne priporočajo.<sup>3,11</sup> Na drugi strani uporaba molekularnih testov za ugotavljanje nosilstva pridobiva na pomenu. Trenutno komercialno dostopni molekularni testi so registrirani za uporabo neposredno iz kužnine ali po obogatitvi (tj. po 18- do 24-urni inkubaciji v tekočem gojišču). Namenjeni so ugotavljanju nosilstva v času poroda ali kot možna izboljšava ugotavljanja nosilstva z obogateno kulturo med 35. in 37. tednom nosečnosti. V prvem primeru izkoriščamo predvsem hitrost, enostavnost in zadovoljivo občutljivost molekularnega testiranja, saj so rezultati nekaterih od teh testov na voljo že v

1 uri od odvzema, za uporabo pa so tako enostavni, da jih lahko uporabimo tudi ob »postelji nosečnic« v času poroda. V drugem primeru izkoriščamo predvsem izboljšano občutljivost kombinacije obogatitve v bujonu in molekularnega testa. S tem načinom tudi skrajšamo čas testiranja za najmanj 24 ur.<sup>11,18-20</sup>

Namen raziskave je bil primerjati diagnostične značilnosti dveh uveljavljenih metod za ugotavljanje nosilstva *S. agalactiae*, obogatene kulture in molekularnega testa *illumigene GBS*.

## Metode

**Preiskovani vzorci.** V raziskavo smo vključili 101 zaporedni bris nožnice oz. bris nožnice in danke nosečnic in nenosečnic, ki so bile v letu 2014 poslane na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (IMI MF UL) za določitev nosilstva *S. agalactiae* ali opredelitev povzročiteljev kolpitisa. Brise smo obdelali z rutinsko metodo obogatene kulture. Po 18–24 urah inkubacije smo 1 mL obogatitvenega bujona najprej shranili na -20 °C za največ 2 meseca, nato smo

**Tabela 1:** Rezultati obogatene kulture in molekularnega testa *illumigene GBS* v primerjavi s skupnim standardom.<sup>1</sup>

Metoda		Skupni standard <sup>1</sup>		
		Pozitivno	Negativno	Skupaj
Obogatena kultura <sup>2</sup>	Pozitivno	20	0	20
	Negativno	4	77	81
	Skupaj	24	77	101
test <i>illumigene GBS</i> <sup>3</sup>	Pozitivno	23	0	23
	Negativno	1	77	78
	Skupaj	24	77	101

<sup>1</sup> Skupni rezultat obeh testov, potrjen z neodvisnim molekularnim testom GeneXpert GBS (Cepheid, Sunnyvale, California).

<sup>2</sup> Izvedena po priporočilih ameriškega Centra za preprečevanje in nadzor bolezni (angl. CDC).

<sup>3</sup> Test *illumigene GBS* (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio).

zbrane vzorce testirali z molekularnim testom *illumigene GBS* (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio). Vzorce, pri katerih se rezultati obeh testov ponovljivo niso ujemale, smo razreševali z uporabo drugega molekularnega testa *GeneXpert GBS* (Cepheid, Sunnyvale, California).

**Obogatena kultura.** Test smo izvedli po izpeljanki priporočil ameriškega Centra za nadzor in preprečevanje bolezni (*angl. CDC*)<sup>3</sup>, in sicer smo brise najprej nacepili na dve trdni gojišči, kolumbijski agar z dodatkom 10 mg/L kolistina, 15 mg/L nalidiksične kisline in 5 % ovčje krvi (CNA agar, bioMerieux, Marcy L'Étoile, Francija) ter chromID Strepto B agar (STRB agar, bioMerieux, Marcy L'Étoile, Francija), kromogeno in selektivno gojišče za detekcijo *S. agalactiae*, nato pa v bujon Todd-Hewitt z dodatkom 10 mg/L kolistina in 15 mg/L nalidiksične kisline (THBS bujon, Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija). Obe trdni gojišči smo nacepili tako, da smo kužnino odložili v prvem kvadrantu, nato smo z 12 potegi kovinske bakteriološke zanke kužnino raznesli na preostale tri kvadrante. Vsa tri gojišča smo inkubirali 18–24 ur pri temperaturi 35–37 °C v običajni atmosferi, nato smo z umerjeno bakteriološko zanko (Sarsted, Nümbrecht, Nemčija) 10 µL THBS bujona prenesli na STRB agar in vsa gojišča inkubirali dodatnih 18–24 ur pri enakih pogojih. Količino bakterij smo ovrednotili polkvantitativno glede na njihovo rast v prvem kvadrantu ali po obogatitvi (1+), drugem kvadrantu (2+) in tretjem ali četrtem kvadrantu (3+). Vse sumljive izolate, ki so izražali bodisi beta hemolizo na CNA agarju bodisi so bile kolonije tipične roza barve na agarju STRB, smo identificirali z lateksno aglutinacijo in masno spektrometrijo (MALDI Biotyper, Bruker Daltonik, Bremen, Nemčija).

**Test *Illumigene GBS*** temelji na metodi LAMP (*angl. loop-mediated is-*

*othermal DNA amplification*), z zanko posredovanem izotermalnem pomnoževanju DNA. Pri pomnoževanju nastaja magnezijev pirofosfat, ki tvori bel precipitat in spremeni absorbcijo reakcijske mešanice, ki jo merimo z aparatom Illumipro-10 (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio). Test je ameriška Agencija za nadzor zdravil in hrane (*angl. FDA*) odobrila za testiranje brisov po predhodni 18- do 24-urni obogatitvi. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca, in sicer smo na -20 °C shranjen vzorec najprej odtalili, ga dobro pretresli in nato 50 µL vzorca zmešali z 200 µL kontrolnega reagenta, ki vsebuje DNA bakterije *Staphylococcus aureus* in ga segrevali 10 minut pri 95 °C. Petdeset µL toplotno obdelanega vzorca s kontrolnim reagentom smo zmešali z reakcijskim pufrom in 50 µL mešanice nanesli v testni nosilec, sestavljen iz dveh vdolbinic, ki vsebujeta začetne oligonukleotide za detekcijo *S. agalactiae* (testna vdolbinica) in začetne oligonukleotide za detekcijo *S. aureus* (kontrolna vdolbinica). Aparat Illumipro-10 poda rezultat v roku 1 ure in omogoča sočasno merjenje 10 vzorcev v dveh samostojnih komorah.

**Test *GeneXpert GBS*** je molekularni test, ki temelji na metodi verižne reakcije s polimerazo v realnem času in ga je FDA odobrila za detekcijo nosilstva bakterije *S. agalactiae* pri nosečnicah neposredno iz kužnine. Procesiranje vzorca poteka v testnih kartušah, ki vsebujejo vse potrebne reagente za izvedbo testa in dve notranji kontroli, ki potrđita ustreznost obdelave vzorca (SPC kontrola) in pomnoževanja DNA (IC kontrola). Poleg končnega rezultata omogoča sistem tudi polkvantitativno oceno količine DNA v vzorcu, tako da poda cikel pomnoževanja DNA, pri katerem fluorescenca reakcijske mešanice preseže fluorescenco ozadja (vrednost Ct). Test smo izvedli po izpeljanki navodil proizvajalca z uporabo 100 µL oboga-

tenega bujona z vzorcem po 18–24 urni inkubaciji.

**Statistična analiza rezultatov.** Rezultate smo obdelali z metodami opisne statistike: povprečno vrednostjo, razponom vrednosti, deležem in 95-odstotnim intervalom zaupanja. Občutljivost, specifičnost, pozitivno in negativno napovedno vrednost smo izračunali po ustreznih formulah iz literature. Diagnostične teste smo med seboj primerjali z uporabo McNemarovega testa za primerjavo deležev v odvisnih vzorcih. Pri računanju testnih statistik smo si pomagali z uporabo programskih orodij Microsoft Excel, GraphPad in VassarStats.

## Rezultati

Povprečna starost 101 preiskovank v vzorcu je bila 33 let (razpon starosti od 5 do 81 let). Med preiskovanimi ženskami je bilo 34,6 (n = 35) nosečih s povprečno gestacijsko starostjo 30 tednov (razpon: 8–38 tednov). Med prejetimi vzorci za preiskavo je bilo 85,2 % (n = 86) brisov nožnic, 8,9 % (n = 9) brisov maternič-

nega vratu in 5,9 % (n = 6) kombiniranih brisov nožnice in danke. Z najmanj enim opravljenim testom je bilo pozitivnih 23,8 % (n = 24) vzorcev, z obogateno kulturo je bilo pozitivnih 19,8 % (n = 20) vzorcev, s testom *illumigene GBS* po predhodni obogatitvi pa 22,7 % (n = 23) vzorcev (Tabela 1).

Delež ponovljivo neujemajočih vzorcev je bil 5,0 % (n = 5), in sicer so bili 4 vzorci pozitivni samo s testom *illumigene GBS*, 1 vzorec pa samo z obogateno kulturo. Vse neujemajoče vzorce smo dodatno testirali z molekularnim testom *GeneXpert GBS*, s katerim je bilo vseh 5 neujemajočih vzorcev pozitivnih. Vrednost Ct vzorca, ki je bil pozitiven po obogateni kulturi in ponovljivo negativen s testom *illumigene GBS* (B1/11513), je bila 37,9 cikla (tj. nizka vsebnost tarčne DNA v obogatenem bujonu po 18- do 24-urni inkubaciji). Za dodatno razreševanje smo pri vzorcu B1/11513 izvedli osamitev DNA z avtomatiziranim sistemom MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics, Basel, Švica) iz obogatenega bujona in vzorec ponovno testirali s te-

**Tabela 2:** Vzorci, pri katerih je prišlo do neujemanja med rezultati testiranja z obogateno kulturo in molekularnim testom *illumigene GBS*. Razreševalno testiranje smo izvedli z molekularnim testom *GeneXpert GBS*.

ID vzorca	Obogatena kultura	Test <i>illumigene GBS</i> <sup>1</sup>	Test <i>GeneXpert GBS</i> <sup>2</sup> (Ct <sup>3</sup> )	Skupni standard <sup>4</sup>	Opomba
B1/11381	Neg.	Poz.	Poz. (29,8)	Poz.	
B1/11437	Neg.	Poz.	Poz. (30,6)	Poz.	
B1/11486	Neg.	Poz.	Poz. (20,2)	Poz.	
B1/11645	Neg.	Poz.	Poz. (33,0)	Poz.	
B1/11513	Poz. <sup>5</sup>	Neg.	Poz. (37,9)	Poz.	Po izolaciji DNA test <i>illumigene GBS</i> postane pozitiven

ID – identifikacijska številka vzorca, Poz.-pozitivno, Neg.-negativno

<sup>1</sup>Test *illumigene GBS* (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio).

<sup>2</sup>Test *GeneXpert GBS* (Cepheid, Sunnyvale, California).

<sup>3</sup>Cikel, pri katerem je vzorec postal pozitiven.

<sup>4</sup>Skupni rezultat obeh testov, potrjen z molekularnim testom *GeneXpert GBS*.

<sup>5</sup>*S. agalactiae*, prisoten samo na primarnih agarških ploščah. Preraščanje z enterokoki po obogatitvi.

stom *illumigene GBS*, pri čemer je vzorec postal pozitiven (Tabela 2).

Pri računanju občutljivosti in specifičnosti smo za »zlati standard« upoštevali skupni in razrešeni rezultat obeh metod (tj. »skupni standard«). Občutljivost in specifičnost obeh testiranih metod sta znašali 83,3 % in 100 % za obogateno kulturo in 95,8 % in 100 % za test *illumigene GBS*. Negativna in pozitivna napovedna vrednost sta ob upoštevanju izračunane prevalence 23,8 % znašali 95,1 % in 100 % za obogateno kulturo in 98,7 % in 100 % za test *illumigene GBS* (Tabela 3).

S testom *illumigene GBS* smo odkrili 15 % ( $n = 3$ ) več nosilk v primerjavi z obogateno kulturo. Z uporabo kombinacije obogatene kulture in testa *illumigene GBS* pa smo odkrili 20 % ( $n = 4$ ) več nosilk v primerjavi s trenutno uporabljeno metodo obogatene kulture. Čeprav sta bili občutljivost in negativna napovedna vrednost s testom *illumigene GBS* višji, razlika med obema ni dosegla statistične pomembnosti ( $p = 0,06$ ).

## Razpravljanje

*S. agalactiae* je najpogostejši povzročitelj invazivnih neonatalnih okužb, ki jih z uporabo dobre diagnostike v nosečnosti in ustrezne antibiotične profilakse v času poroda preprečimo pri 80–90 % novorojenčkov.<sup>3,10</sup> V naši raziskavi smo z uporabo obogatene kulture, ki velja za »zlati standard« ugotavljanja nosilstva *S. agalactiae*, odkrili samo 80 % vseh nosilk bakterije, medtem ko smo s kombinacijo obogatene kulture in enega od molekularnih testov novejšje generacije odkrili dodatnih 20 % vseh nosilk.

Molekularne metode predstavljajo naslednji korak pri ugotavljanju nosilstva *S. agalactiae* v nosečnosti, saj po eni strani izboljšajo občutljivost obogatene kulture, po drugi strani pa s hitrostjo in enostavnostjo izvedbe omogočajo testiranje v času poroda. Rezultati naše razi-

skave, v kateri smo preverjali značilnosti molekularnega testa *illumigene GBS* v primerjavi z obogateno kulturo, potrjujejo odlične značilnosti novega molekularnega testa. Občutljivost testa *illumigene GBS* je bila 95,8 %, občutljivost obogatene kulture pa 83,3 %. Obe metodi sta imeli 100-odstotno specifičnost in pozitivno napovedno vrednost. Negativna napovedna vrednost je bila višja pri testu *illumigene GBS* in je v primerjavi z obogateno kulturo znašala 98,7 % proti 95,1 %. Dobre lastnosti različnih molekularnih metod so potrdili tudi drugi raziskovalci.<sup>18,21-23</sup> Couturier *s sod.* je v primerjalni analizi treh molekularnih testov po obogatitvi ugotovil dobro medsebojno ujemanje in visoko občutljivost (97–98 %) vseh treh, med katerimi je bil tudi test *illumigene GBS*, ki smo ga uporabili v naši raziskavi. V tej raziskavi je imela obogatena kultura v primerjavi z molekularnimi testi občutljivost 67–73 %. Podobno je ugotovil El Aila *s sod.* izboljšanje detekcije *S. agalactiae* z nekomercialnim molekularnim testom po predhodni obogatitvi za 27–33 %.<sup>22</sup> Na drugi strani Berg *s sod.* z uporabo dveh molekularnih testov v enakem diagnostičnem okviru ni uspel dokazati izboljšanja detekcije bakterije v primerjavi z obogateno kulturo.<sup>21</sup>

Z uporabo molekularnega testiranja v kombinaciji z obogateno kulturo lahko čas do končnega rezultata testiranja skrajšamo za 24 ur. Čas inkubacije v obogatitvenem bujonu pa je moč tudi dodatno skrajšati. V raziskavi Couturiera *s sod.* so molekularne teste uporabili po standardni (18–24 ur) in skrajšani (4–8 ur) inkubaciji obogatitvenega bujona in ugotovili, da skrajšana inkubacija zgolj minimalno zmanjša občutljivost (21,7 %) v primerjavi s standardno inkubacijo (23,0 %). Takšno procesiranje vzorcev s skrajšano predinkubacijo bi omogočilo rezultat testiranja v enem delovnem dnevu.

Obogatena kultura je enostaven test z dobro občutljivostjo, ki pa ima poleg dolgega časa izvedbe tudi nekatere druge slabosti. Ena glavnih težav, zaradi katerih lahko pride do lažno negativnih rezultatov, je preraščanje agarških plošč z enterokoki, ki pogosto kolonizirajo nožnico in danko. Tako se redko (< 5 %) zgodi, da *S. agalactiae* osamimo samo na primarnih agarških ploščah, po obogatitvi pa ga ne zaznamo več.<sup>11,15</sup> V raziskavi smo za primarno nacepitev obogatene kulture uporabili agar CNA in kromogeno gojišče STRB, ki ima v primerjavi z agarjem CNA nekatere prednosti, predvsem to, da na njem lažje opazimo kolonije, ki se obarvajo rožnato; poleg tega barvo spremenijo tudi kolonije nehemolitičnih sevov *S. agalactiae*, ki jih je po podatkih iz literature 1–4 % in jih na CNA agarju ne moremo ločiti od enterokokov.<sup>22,25</sup>

Preprečevanje zgodnje neonatalne okužbe, ki temelji na ugotavljanju nosilstva z obogateno kulturo v času nosečnosti, ni popolno. V raziskavi van Dyka *s sod.* so presenetljivo ugotovili, da je bilo med zbolelimi otroki kar 61,4 % takšnih, ki so se rodili materam z negativnim rezultatom obogatene kulture med 35. in 37. tednom nosečnosti.<sup>13</sup>

Tak rezultat si lahko razlagamo na dva načina. Bodisi je prišlo do spremembe statusa nosilstva v času med testom in porodom, bodisi je bil test obogatene kulture lažno negativen. Predvsem v slednjem primeru bi testiranje z zelo občutljivo molekularno metodo izboljšalo detekcijo nosilk in izbiro nosečnic za obporodno antibiotično profilakso. Najboljši čas za ugotavljanje prisotnosti *S. agalactiae* je v času poroda, saj le takrat lahko odkrijemo resnično kolonizacijo porodne poti, medtem ko pri testiranju v 35.–37. tednu nosečnosti kolonizacijo le napovedujemo.<sup>26</sup> Z razvojem tehnologije se pojavljajo metode, ki omogočajo testiranje v času poroda. Ena od metod, primerna za takšno testiranje, je tudi molekularni test *GeneXpert GBS*, ki smo ga v naši raziskavi uporabili za razreševanje neujemanj. Metoda je zelo hitra in enostavna, a precej draga. Poleg tega se lahko analitična občutljivost in specifičnost bistveno znižata, kadar test uporablja nelaboratorijsko osebje.<sup>27</sup>

Prikazani rezultati so prvi tovrstni v Sloveniji in osvetljujejo diagnostični vidik v razpravi o smiselnosti in načinih uvedbe programa za preprečevanja

**Tabela 3:** Izračunane značilnosti obogatene kulture in molekularnega testa illumigene GBS v primerjavi s skupnim standardom<sup>1</sup>.

Testna karakteristika	Obogatena kultura	illumigene <sup>2</sup>
	% (95 % IZ <sup>3</sup> )	% (95 % IZ <sup>3</sup> )
Število testiranih vzorcev	101	101
Občutljivost	83,3 (61,8–94,2)	95,8 (76,9–99,8)
Specifičnost	100 (94,1–100)	100 (94,1–100)
Pozitivna napovedna vrednost <sup>4</sup>	100 (80,0–100)	100 (82,2–100)
Negativna napovedna vrednost <sup>4</sup>	95,1 (87,2–98,4)	98,7 (92,1–99,9)

<sup>1</sup> Skupni rezultat obeh testov, potrjen z neodvisno molekularnim testom *GeneXpert GBS* (Cepheid, Sunnyvale, California).

<sup>2</sup> Test *illumigene GBS* (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio).

<sup>3</sup> 95-odstotni interval zaupanja.

<sup>4</sup> Za izračun smo upoštevali prevalenco nosilstva v vzorcu (23,8 %).

zgodnjih neonatalnih okužb pri novorojenčkih.

Omejitev raziskave je majhen vzorec, kar je najverjetnejši vzrok, da razlike med obema metodama niso bile statistično pomembne. Tudi sestava vzorca ni bila optimalna, saj smo testirali brise nosečih in nenosečih žensk. Vendar to dejstvo na samo občutljivost testa *illumigene GBS* najverjetneje ni bistveno vplivalo.

## Zaključek

Za ugotavljanje nosilstva bakterije *S. agalactiae* se poleg standardne metode obogatene kulture vse pogosteje uporabljajo različne molekularne metode, ki dosegajo višjo občutljivost in dajejo hitrejša rezultata. S kombinacijo obeh metod lahko dosežemo pomembno izboljšanje občutljivosti detekcije nosilstva bakterije v nosečnosti.

## Literatura

- Okike IO, Johnson AP, Henderson KL, Blackburn RM, Muller-Pebody B, Ladhani SN, et al. Incidence, etiology, and outcome of bacterial meningitis in infants aged. *Clin Infect Dis*. 2014; 59: e150–7.
- Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AKM, Cousens S, et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2012; 379: 547–56.
- Verani JR, McGee L, Schrag SJ, Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010; 59: 1–36.
- Weston EJ, Pondo T, Lewis MM, Martell-Cleary P, Morin C, Jewell B, et al. The burden of invasive early-onset neonatal sepsis in the United States, 2005–2008. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30: 937–41.
- Bizzarro MJ, Raskind C, Baltimore RS, Gallagher PG. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928–2003. *Pediatrics* 2005; 116: 595–602.
- Sheehy A, Davis D, Homer CSE. Assisting women to make informed choices about screening for group B streptococcus in pregnancy: a critical review of the evidence. *Women Birth* 2013; 26: 152–7.
- Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD. Early-onset neonatal sepsis. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27: 21–47.
- Fišer J, Špacapan S, Prinčič D, Frelig T. Odkrivanje kolonizacije nosečnic z bakterijo *Streptococcus agalactiae* v severnoprimorski regiji. *Zdrav Vestn* 2001; 70: 623–6.
- Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Kliucinskaskas M, Maleckiene L, Nadisauskiene R. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87: 260–71.
- Boyer KM, Gotoff SP. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. *N Engl J Med* 1986; 314: 1665–9.
- Di Renzo GC, Melin P, Berardi A, Blennow M, Carbonell-Estrany X, Donzelli GP, et al. Intrapartum GBS screening and antibiotic prophylaxis: a European consensus conference. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015; 28: 766–82.
- Schrag SJ, Zell ER, Lynfield R, Roome A, Arnold KE, Craig AS, et al. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. *N Engl J Med* 2002; 347: 233–9.
- van Dyke MK, Phares CR, Lynfield R, Thomas AR, Arnold KE, Craig AS, et al. Evaluation of universal antenatal screening for group B streptococcus. *N Engl J Med* 2009; 360: 2626–36.
- Vovko P. Assessment of laboratory procedures for group B streptococci screening in pregnant women. *Zdrav Vestn* 2007; 76: 33–9.
- Platt MW, McLaughlin JC, Gilson GJ, Wellhoner MF, Nims LJ. Increased recovery of group B streptococcus by the inclusion of rectal culturing and enrichment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 21: 65–8.
- Yancey MK, Schuchat A, Brown LK, Ventura VL, Markenson GR. The accuracy of late antenatal screening cultures in predicting genital group B streptococcal colonization at delivery. *Obstet Gynecol* 1996; 88: 811–5.
- Yancey MK, Armer T, Clark P, Duff P. Assessment of rapid identification tests for genital carriage of group B streptococci. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 1038–47.
- Couturier BA, Weight T, Elmer H, Schlaberg R. Antepartum screening for group B streptococcus by three FDA-cleared molecular tests and effect of shortened enrichment culture on molecular detection rates. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 3429–32.
- Block T, Munson E, Culver A, Vaughan K, Hryciuk JE. Comparison of carrot broth- and selective Todd-Hewitt broth-enhanced PCR protocols for real-time detection of *Streptococcus agalactiae* in prenatal vaginal/anorectal specimens. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3615–20.
- Goodrich JS, Miller MB. Comparison of culture and 2 real-time polymerase chain reaction assays to detect group B streptococcus during antepartum screening. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59: 17–22.
- Berg BR, Houseman JL, Garrasi MA, Young CL, Newton DW. Culture-based method with performance comparable to that of PCR-based methods for detection of group B streptococcus in screening samples from pregnant women. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1253–5.



22. Aila El NA, Tency I, Claeys G, Verstraelen H, Deschaght P, Decat E, et al. Comparison of culture with two different qPCR assays for detection of rectovaginal carriage of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) in pregnant women. *Res Microbiol* 2011; 162: 499–505.
23. Munson E, Napierala M, Munson KL, Culver A, Hryciuk JE. Temporal characterization of carrot broth-enhanced real-time PCR as an alternative means for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* from prenatal anorectal and vaginal screenings. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4495–500.
24. Verhoeven PO, Noyel P, Bonneau J, Carricajo A, Fonsale N, Ros A, et al. Evaluation of the new brilliance GBS chromogenic medium for screening of *Streptococcus agalactiae* vaginal colonization in pregnant women. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 991–3.
25. Morita T, Feng D, Kamio Y, Kanno I, Somaya T, Imai K, et al. Evaluation of chromID strepto B as a screening media for *Streptococcus agalactiae*. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 46.
26. Horváth B, Grasselly M, Bödecs T, Boncz I, Bódis J. Screening pregnant women for group B streptococcus infection between 30 and 32 weeks of pregnancy in a population at high risk for premature birth. *Int J Gynaecol Obstet* 2013; 122: 9–12.
27. Mueller M, Henle A, Droz S, Kind AB, Rohner S, Baumann M, et al. Intrapartum detection of Group B streptococci colonization by rapid PCR-test on labor ward. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; 176: 137–41.