

DIAGNOSI MICROBIOLOGICA

Lucilla Baldassarri, Roberta Creti

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La messa in evidenza della colonizzazione materna nelle ultime settimane di gravidanza è estremamente importante poiché da essa dipenderà la somministrazione del trattamento profilattico al momento del parto e quindi la protezione del bambino da una possibile infezione.

I campioni che possono essere inviati al Laboratorio per indagini relative all'infezione neonatale sono vari: tampone vaginale/rettale materno, urine della madre per urinocoltura in gravidanza, tamponi superficiali (auricolare, ombelicale, ecc.) del neonato, prelievi neonatali profondi (sangue, liquor), e latte materno nelle infezioni tardive.

Purtroppo l'emocoltura di un neonato con infezione non ha una elevata percentuale di positività, sia per i possibili trattamenti ricevuti durante il parto sia per l'esiguità del campione. Per questo l'utilizzazione di metodiche molecolari, quando affidabili, porterebbe senz'altro ad un miglioramento nella diagnosi microbiologica.

Collezione, trasporto e conservazione dei campioni

Sono disponibili delle linee guida elaborate dai *Centers for Diseases Control* degli Stati Uniti (2), che forniscono indicazioni per il trattamento ottimale dei campioni da analizzare per sospetta presenza di GBS. Specificamente, per il rilevamento dello stato di portatore anogenitale in donne in gravidanza, i campioni dovrebbero essere prelevati alla 35^a-37^a settimana di gestazione, con un tampone ottenuto a livello vaginale ed un secondo a livello ano-rettale.

Il tampone va raccolto a livello del terzo inferiore della vagina. Anziché usare due tamponi è generalmente ammesso che si possa usare un solo tampone procedendo ad un primo prelievo vaginale, seguito poi dal prelievo rettale; la doppia sede di prelievo anziché il solo prelievo vaginale aumenta notevolmente la sensibilità del metodo. I tamponi dovrebbero essere posti in terreno di trasporto non-nutritivo (e.g. terreno di Amies, terreno di Stuart senza carbone). In questo mezzo di trasporto GBS mantiene la vitalità fino a 4 giorni, sia a temperatura ambiente che a 4 °C. Tuttavia, è stato osservato come microorganismi quali *Pseudomonas spp*, *Escherichia coli*, o *Enterococcus spp*, frequentemente presenti in tamponi vagino-rettali, possano proliferare durante il trasporto fino ad inficiare il risultato colturale. Alcuni dati indicano come, già dopo 24 ore a 4 °C, si possa rilevare una diminuzione significativa della positività colturale, particolarmente dopo subcoltura su agar sangue (3). È quindi fortemente consigliata la coltura in tempi brevi dal prelievo. I campioni devono sempre essere etichettati chiaramente e dovrebbe essere specificata, ove necessario, la richiesta di valutazione della resistenza a clindamicina ed eritromicina in caso di sospetta o accertata allergia alla penicillina della paziente.

Urinocoltura

In caso di sospetta infezione delle vie urinarie deve essere richiesta l'urinocoltura per la ricerca specifica di GBS, utilizzando terreni specifici (agar sangue 5% con CNA o terreno cromogeno).

Il campione deve essere mantenuto rigorosamente refrigerato fino al momento della semina, per evitare la moltiplicazione di altri microrganismi che potrebbero mascherare la presenza di GBS.

Si devono quindi preparare sei diluizioni in ragione 10, utilizzando acqua peptonata (1g peptone/L acqua), brodo o tampone fosfato a pH 7,00, come diluente.

Per ogni diluizione, a partire dalla prima, seminare con 500 microlitri ognuna, 2 piastre di agar Columbia/CNA con sangue di pecora 5%, provvedendo a distribuire uniformemente il campione sulla superficie della piastra con un gomito di plastica sterile o con l'ansa. Le piastre devono essere incubate per 18-24 ore a 35-37 °C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Per aumentare la percentuale di positività, si possono prelevare 5 mL dal campione di urina, addizionala con 0,05 mL di CNA e incubarla a 35-37 °C per 3-4 ore, provvedendo poi alla diluizione e alla semina sui terreni solidi abituali.

La presenza di GBS deve essere ritenuta significativa e notificata nella risposta **qualsiasi** sia il numero delle colonie trovate.

Analisi del latte materno

Questo tipo di esame può essere richiesto soprattutto in caso di infezione tardiva dato che, in caso di meningite neonatale, il latte materno analizzato può risultare positivo per un ceppo del medesimo sierotipo.

Per la raccolta del latte materno, il seno e le mani devono essere lavati accuratamente con acqua sterile e asciugati con garze sterili. La raccolta va effettuata con spremitura manuale in un recipiente sterile per urinocoltura eliminando le prime gocce raccolte. Se il latte non viene seminato immediatamente, deve essere conservato a 4 °C ed esaminato nel più breve tempo possibile.

Per la conta delle CFU il latte deve essere rimescolato con agitazione manuale senza aprire il contenitore in modo da ripartire i microrganismi il più uniformemente possibile cercando di evitare la formazione di schiuma. Si devono quindi preparare 6 diluizioni in ragione 10 utilizzando acqua peptonata (1g peptone/L H₂O) o tampone fosfato a pH 7,00 come diluente.

A partire dalla prima diluizione, seminare 500 microlitri di campione per ogni diluizione sulla superficie di 2 piastre di Agar Columbia/CNA con sangue di pecora 5% e su 2 piastre di agar sangue senza CNA, provvedendo a distribuire uniformemente il campione sulla superficie della piastra con un gomito di plastica sterile o con l'ansa.

I terreni devono essere incubati per 24 ore in atmosfera al 5% di CO₂ (come usualmente si procede per gli streptococchi) ed in aerobiosi.

Per la conta si prendono in considerazione le piastre che contengano 10-300 colonie.

Anziché 500 microlitri per piastra può essere più agevole usare 100 microlitri per piastra. In questo caso per facilitare i calcoli deve essere fatta una media del numero di colonie cresciute sulle due piastre e il risultato finale deve essere poi moltiplicato per 10 per avere il numero delle colonie in 1 millilitro alla diluizione letta.

Per una migliore visualizzazione delle colonie e per utilizzare un solo terreno per identificazione sia di GBS che di altri microrganismi, può essere usato un terreno commerciale cromogeno, sul quale le colonie di GBS appaiono di colore rosso-aranciato.

Norme specifiche per la conta delle CFU nel latte sono quelle riportate per i prodotti lattiero-caseari (ISO 6610/1992 e ISO 4833/2002), qui adattate per le esigenze dell'esame del latte materno da parte di un Laboratorio ospedaliero.

Isolamento

La metodica standard per la diagnosi di GBS è quella della coltivazione su terreni specifici. La ricerca di GBS nel tratto genitale di donne in gravidanza è attuato mediante inoculazione del tampone di raccolta in brodo Todd-Hewitt addizionato con colistina (10mg/L) e acido nalidixico (15mg/L) o gentamicina (8mg/L) e acido nalidixico (15mg/L) ed incubazione per 18-24 ore a 35-37 °C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Sono disponibili in commercio anche terreni selettivi pronti quali il brodo LIM o SMB; l'uso di un terreno liquido selettivo che inibisca la crescita degli altri microrganismi presenti nel tampone aumenta la sensibilità del metodo del 60-90% (2). Le colture in terreno selettivo dovrebbero essere incubate per 18-24 ore a 35°-37 °C e successivamente reinoculate su agar Columbia con sangue di montone al 5%. Le piastre di agar sangue sono incubate in atmosfera modificata al 5% di CO₂.

Sulle piastre di agar sangue, GBS forma colonie grigio-bianche del diametro di 3-4 mm, circondate da una stretta zona di beta-emolisi, di spessore variabile da un ceppo all'altro. In generale, la zona di beta-emolisi è più limitata rispetto di quella osservabile con streptococchi di gruppo A, C o G, e una piccola percentuale di GBS può risultare non emolitica (4). L'incubazione delle piastre dovrebbe essere prolungata a 48 ore, se non si evidenzia crescita dopo le prime 24 ore.

GBS cresce in brodo contenente sodio cloruro al 6,5%, su agar con sali biliari al 40%, su agar tellurito 0,04%, a 10 °C (molto lentamente se confrontato con gli enterococchi), mentre una piccola percentuale di ceppi (ca. 12%) cresce anche a 45 °C.

Esistono in commercio terreni solidi cromogeni, sui quali GBS dà luogo a colonie pigmentate che ne facilitano il differenziamento rispetto ad altri microorganismi. Alcuni terreni sfruttano la capacità di GBS di formare un pigmento arancione, dando luogo a colonie dalla colorazione arancio intenso. Altri terreni utilizzano una miscela di substrati cromogeni sui quali GBS sviluppa colonie da rosa pallido a rosso, mentre altri microrganismi sviluppano colonie incolori, viola, blu, ecc. Sono inoltre disponibili terreni liquidi, anch'essi basati sulla capacità di GBS di produrre un pigmento carotenoidale, sebbene in tal caso non sia possibile confortare il risultato con l'osservazione della colonia, né avere un'idea della carica batterica presente nel campione.

Identificazione

Identificazione fenotipica

L'identificazione presuntiva di colonie emolitiche e non emolitiche può essere effettuata mediante il CAMP test. In questo saggio, un tempo molto usato anche perchè poco costoso, l'ipotetico ceppo di streptococco viene seminato perpendicolarmente ad uno striscio di uno *Staphylococcus aureus* produttore di beta-emolisina. Dopo incubazione per 18 ore a 35-37 °C, il

test era definito positivo se si osservava una zona di emolisi completa a forma di freccia nell'area dove avevano diffuso sia la beta-emolisina che il fattore CAMP.

È molto importante poter distinguere GBS dagli enterococchi (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) spesso presenti negli stessi campioni clinici, poiché sia la morfologia delle colonie che, limitatamente, quella cellulare, possono essere molto simili. Il CAMP test risultava molto utile proprio in questa circostanza, dato che gli enterococchi erano negativi contro il 99% di positività osservabile nel caso del GBS. Altri test che venivano utilizzati erano l'idrolisi dell'esculina (GBS è negativo) e la capacità di idrolizzare l'ippurato (GBS è positivo).

Attualmente l'identificazione di GBS viene solitamente effettuata mediante test disponibili in commercio, costituiti da gallerie miniaturizzate in grado di fornire un quadro degli zuccheri e altri substrati utilizzati dal microrganismo in esame e identificabili mediante un codice.

Anche la produzione di pigmento arancione può essere utilizzata per l'identificazione; i terreni che sfruttano questa caratteristica (terreni cromogeni) quindi servono sia per l'isolamento che per l'identificazione presuntiva di GBS (5).

Recentemente sono inoltre stati sviluppati saggi basati sul principio della PCR Real Time che, mediante l'utilizzo di sonde fluorescenti, consentono di monitorare in tempo reale la formazione dell'amplificato (2). Attualmente è disponibile in commercio un kit che permette l'identificazione di GBS da campione clinico in 30-45 minuti (6, 7). Esiste inoltre in commercio un sistema rapido per mettere in evidenza GBS direttamente dal tampone, che non necessita di personale addestrato e permette l'analisi *in situ* (l'apparecchiatura necessaria può essere collocata presso la sala parto) in tempi molto brevi.

Identificazione sierologica

L'identificazione definitiva di GBS è quella sierologia che identifica il polisaccaride di gruppo.

Un tempo veniva effettuata mediante estrazione a caldo a pH acido del polisaccaride, che veniva poi messo in evidenza con varie tecniche (precipitazione su capillare, immunodiffusione)

Attualmente viene effettuata mediante l'individuazione del polisaccaride B, dopo estrazione rapida dell'antigene con kit commerciali e agglutinazione su vetrino.

A scopi epidemiologici, può risultare utile l'identificazione del sierotipo capsulare dell'isolato, che viene solitamente effettuata nei centri di riferimento. In breve, i polisaccaridi capsulari estratti con HCl vengono analizzati in immunodiffusione di Ouchterloney con antisieri specifici (8). Esiste anche un saggio di agglutinazione su vetrino (StrepB latex) messo a punto e commercializzato dallo *Statens Serum Institut* di Copenhagen, che viene eseguito direttamente sulla colonia. Ove non fosse possibile la sierotipizzazione con la tecnica descritta (ceppi non tipizzabili, NT) può risultare utile effettuare un passaggio preliminare in animale (infezione i.p. in topo), utilizzare la reazione di polimerizzazione a catena (PCR) per la identificazione dei geni *cps* (9) o determinare il polimorfismo dell'operone per il polisaccaride mediante restriction fragment length polymorphism (RFLP) (10).

Un'ulteriore caratterizzazione a scopi epidemiologici e/o per l'identificazione di possibili fattori di virulenza, viene dalla identificazione dei geni codificanti per le proteine di superficie. Tale ricerca viene effettuata mediante PCR multiplex per l'identificazione simultanea delle proteine Alfa, Alp1, Alp2, Alp3, Alp4 (11). La determinazione dell'espressione del complesso proteico C o R avviene tramite saggi di immuno-diffusione su agar dell'estratto acido del batterio con il siero C oppure R. Il siero C viene preparato adsorbendo il siero di coniglio, ottenuto infettando l'animale con il ceppo di riferimento Ia/c con un ceppo di riferimento Ia. Il siero R viene preparato infettando il coniglio con il ceppo di riferimento produttore dell'antigene proteico R (NCTC9828).

Bibliografia

1. Manning SD, Neighbors K, Tallman PA, Gillespie B, Marrs CF, Borchardt SM, Baker CJ, Pearlman MD, Foxman B. Prevalence of group B streptococcus colonization and potential for transmission by casual contact in healthy young men and women. *Clin Infect Dis* 2004;39:380-8.
2. Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. *MMWR* 2002;51:2-18.
3. Rosa-Fraile M, Camacho-Munoz E, Granger-Rodriguez J, Liebana-Martos C. Specimen storage in transport medium and detection of group B streptococci by culture. *J Clin Microbiol* 2005;43:928-30.
4. Gibbs RS, Schrag S, Schuchat A. Perinatal infections due to group B streptococci. *Obstet Gynecol* 2004;104: 1062-76.
5. Rosa-Fraile M, Granger-Rodriguez J, Cueto.Lopez M, Sanpedro A, Biel-Gaye E, Haro JM, Andrei A. Use of Granada medium to detect group B streptococcal colonization in pregnant women. *J Clin Microbiol* 1999;37:2674-7.
6. Bergeron MG, Ke D, Menard C, Picard FJ, Gagnon M, Bernier M, Ouellette M, Roy PH, Marcoux S, Fraser WD. Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery. *N Eng J Med* 2000;343:175-9.
7. Bergeron MG, Ke D. New DNA-based approaches for rapid real time detection and prevention of group B streptococcal infections in newborns and pregnant women. *Reprod Med Rev* 2004;11:25-41.
8. Johnson DR, P. Ferrieri. Group B streptococcal Ib protein antigen: distribution of two determinants in wild type strain of common serotypes. *J Clin Microbiol* 1984;19:506-10.
9. Kong F, Gowan S, Martin D, James G, Gilbert GL. Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol* 2002;40:216-26.
10. Manning SD, Lacher DW, Davies HD, Foxman B, Whittman TS. DNA polymorphism and molecular subtyping of the capsular gene cluster of group B streptococcus. *J Clin Microbiol* 2005;43:6113-6.
11. Creti R, Fabretti F, Orefici G, von Hunolstein C. Multiplex PCR assay for direct identification of group B streptococcal alpha-protein-like protein genes. *J Clin Microbiol* 2004;42:1326-9.