

Prevenzione delle infezioni neonatali da GBS: esperienza di 5 anni

Sin dagli inizi degli anni '70, lo Streptococco di Gruppo B (GBS) è stato identificato come la prima causa di sepsi neonatale. La maggior parte di queste infezioni, associata con alta mortalità e morbilità, potrebbe essere prevenuta da profilassi antibiotica intrapartum somministrata alla madre a rischio. Allo scopo di valutare l'entità del problema nella nostra realtà operativa e di giungere ad una rapida individuazione dei casi colonizzati, onde attuare una prevenzione efficace delle EOGBS, presentiamo i dati raccolti dopo applicazione del nostro protocollo dal 1 Gennaio 1997 al 31 Dicembre 2001. Dalla revisione della nostra casistica emerge un'incidenza della colonizzazione materna del 13% con percentuale di screening delle gravide dell'81%. L'EOGBS, intesa come sepsi accertate, sono risultate pari allo 0,07% e in nessun caso era stata eseguita profilassi intrapartum. La colonizzazione neonatale risulta del 5,5%. La profilassi antibiotica intrapartum alle donne colonizzate riduce le infezioni neonatali da GBS. E' necessario definire nuove strategie per evidenziare la colonizzazione materna da GBS e approfondire le conoscenze dei fattori di rischio materni e neonatali nelle diverse popolazioni.

Group B Streptococcus neonatal infection: a 5-year study

Summary

By the early 1970's, Group B Streptococci (GBS) had been identified as the primary cause of neonatal infection. Most of these infections, associated with high mortality and morbidity, could be prevented through intrapartum chemoprophylaxis given to at-risk mothers. In order to understand the extent of this problem, a study of infants born to women assessed for GBS colonisation 3-4 weeks prior to admission for delivery was performed between January 1997 and December 2001 at Carate Hospital in Italy. Colonised women were treated with intrapartum prophylaxis 4 hours prior to delivery. To isolate GBS throat and buccal cultures were then obtained from 24-48 hour-old infants. During the course of the study period a total of 6,895 women were admitted for delivery, and 5,795 screened for Group B (81%). Vaginal colonization GBS was detected in 975 women (13%). Vertical transmission of GBS in newborn infants was significantly reduced (0.07%), where the mother was given intrapartum antibiotics. Colonisation with GBS, meanwhile, was found in 5.5% of cases. Intrapartum antibiotic treated colonised women reduced the incidence of GBS neonatal infection. Elective strategies for detecting maternal colonisation with GBS, and improved data on maternal risk factors and neonatal GBS infection in different populations continue to be required.

Colli R, Bertolozzi G, Sterpa A. Group B Streptococcus neonatal infection: a 5-years study. *Trends Med* 2003; 3(2): 231-236.

© 2003 Pharma Project Group srl

Rosella Colli, Giuseppe Bertolozzi, Andrea Sterpa

U.O. Neonatologia e Pediatria
Presidio Complesso Carate Brianza - Giussano A.O.
"Ospedale Civile" di Vimercate

Key words:

**group B Streptococcus
colonization
early onset Group B Streptococcus**

Ricevuto il 7-1-2003

Accettato con modifiche il 15-2-2003



Rosella Colli

Via Ugo Foscolo 3 - 23876 Monticello Brianza -LC-
Tel 0399205733 Fax 0362984235
e-mail: collirosella@katamail.com

Introduzione

Sin dagli inizi degli anni '70 lo Streptococco di Gruppo B (GBS) è stato identificato come la prima causa di sepsi neonatale mortale. Questo batterio è generalmente presente in vagina e/o nel retto e negli USA dal 15 al 40% delle donne in età fertile sono portatrici del germe e circa il 50-70% dei loro neonati risultano colonizzati. Di questi, l'1-2% sviluppa la malattia neonatale precoce. In Italia la prevalenza dello stato di portatrice si aggira intorno al 10-20%. La "Early onset disease" rappresenta 1-3 /1000, la "late onset" 1-1,7/1000. L'insorgenza avviene nel primo caso entro il settimo giorno e nel secondo dopo il settimo gior-

no. Il tempo medio di insorgenza è di 20 ore nel primo e di 24 giorni nel secondo. La trasmissione nelle "early" è verticale e le manifestazioni cliniche sono rappresentate da 1/3 sepsi, 1/3 meningite e 1/3 polmonite con mortalità del 15%, nelle "late" la trasmissione è orizzontale e le manifestazioni cliniche sono rispettivamente 2/3 meningite, artrite settica e osteomielite con mortalità intorno al 10%¹.

Negli ultimi 10 anni, l'introduzione negli Stati Uniti di Linee-Guida per la prevenzione della morbosità neonatale secondaria all'infezione da GBS ha portato ad una importante riduzione dei casi di sepsi e di morte neonatale. Il trattamento ottimale è risultato essere la profilassi con Penicillina G intrapartum.

L'aumentato riconoscimento delle donne colonizzate, l'individuazione dei fattori di rischio e il trattamento "aggressivo" dei neonati infetti hanno portato ad una riduzione della mortalità. Da valori del 15-25% agli inizi anni '80, si è passati al 4-6% agli inizi anni '90. Sono proposte due opzioni:

- 1) usare fattori di rischio per determinare la necessità di trattamento preventivo
- 2) eseguire lo Screening Universale con colture vagino-rettali e trattare tutte le portatrici².

Valutando la diversa distribuzione del tasso di malattia neonatale in rapporto ai fattori di rischio (5/1000 malattia in nati da donne colonizzate senza fattori di rischio e 70/1000 in nati da donne colonizzate con fattori di rischio) si individua un primo approccio basato sui fattori di rischio. Questi ultimi includono: 1) Parto <37 settimane; 2) PROM >12 ore; 3) Febbre in travaglio >38°; 4) Precedente figlio con sepsi neonatale; 5) Batteriuria da GBS durante la gravidanza.

L'altro approccio è basato sullo screening universale e consiste:

- esecuzione di colture vagino-rettali di tutte le donne tra la 35-37 settimane di gravidanza
- trattamento di tutte le positive
- trattamento delle negative ma con fattori di rischio.

Protocollo consigliato dal CDC Atlanta 18 luglio 1996.

La riduzione del tasso di malattia neonatale nel primo gruppo che utilizza trattamento per fattori di rischio è dal 41% al 18%, mentre nello screening universale dal 78% al 27%. La forma tardiva, "late onset", rimane invariata³.

Da un'analisi dei dati emerge la considerazione

che il GBS non è un problema solo americano ma anche europeo. In Europa solamente negli ultimi anni si osserva un incremento delle donne colonizzate da GBS ed una correlata incidenza di mortalità e morbosità neonatali. Gli studi riportano tassi di colonizzazione materna e di malattia neonatale identici a quelli americani^{4,8}.

A monte di un notevole incremento del numero dei parti negli ultimi 20 anni, allo scopo di valutare l'entità del problema nella nostra realtà operativa e di giungere ad una rapida individuazione dei casi colonizzati, onde attuare una prevenzione efficace delle EOGBS, presentiamo i dati raccolti dal 1 Gennaio 1997 al 31 Dicembre 2001 dopo applicazione del nostro protocollo che prevede lo screening universale e trattamento antibiotico intrapartum in presenza di fattori di rischio.

Materiali e metodi

A partire dal 1 Gennaio 1997 dopo una riunione congiunta con il personale dell'UO di Ostetricia e Pediatria Neonatologia è stato definito un protocollo di intervento relativo alla prevenzione delle infezioni connatali da GBS.

Il Protocollo ostetrico ginecologico prevede l'esecuzione del tampone vagino-rettale a 34 settimane se gravidanza fisiologica, prima della 34ma settimana in caso di minaccia di parto prematuro. Nessun trattamento in corso di gravidanza in assenza di sintomi o di urinocoltura positiva. In presenza di tamponi positivi o sconosciuti all'inizio del travaglio si procede a trattamento con ampicillina 2 gr e.v. di attacco seguiti da 1 g ogni 4 ore fino all'espletamento del parto o in caso di allergia alle penicilline eritromicina per os 1 g ogni 8 ore.

L'algoritmo individuato per il trattamento del nato da madre GBS positiva o sconosciuta prevede l'individuazione di fattori di rischio e l'esecuzione di profilassi intrapartum IAP.

Fattori di rischio sono stati considerati i seguenti:

- 1) parto <37 sett.
- 2) PROM >12 ore
- 3) febbre in travaglio >38° C
- 4) precedente figlio con sepsi neonatale
- 5) batteriuria da GBS durante la gravidanza.

La IAP è stata considerata completamente adeguata in presenza di almeno due dosi prima del parto. Nel protocollo applicato si è considerato un livello di adeguatezza accettabile una latenza di oltre 3 ore dalla prima dose. In assenza di fat-

tori di rischio, se IAP adeguata (>4 ore), ci si limita all'esecuzione di tamponi di superficie (tampone faringeo, biauricolare); in assenza di IAP adeguata, si procede all'esecuzione di sepsi screening (emocromo, proteina C reattiva, tamponi di superficie e emocoltura) e all'osservazione clinica per 24 ore. In presenza di fattori di rischio, se IAP adeguata, si procede all'osservazione e a sepsi screening. In assenza di IAP adeguata si procede dopo sepsi screening all'inizio di terapia empirica (ampicillina+netilmicina). Il dosaggio dell'ampicillina è di 100 mg/kg/die in 2 dosi e per la netilmicina 5mg/kg/die in 2 dosi per via parenterale intramuscolare o endovenosa.

La terapia con ampicillina e netilmicina è prevista nel neonato sintomatico o infetto (PCR e/o emocoltura positiva) e nel neonato colonizzato (ampicillina/amoxicillina). Non si inizia nessuna terapia per 48 ore se tampone negativo. L'algoritmo individuato per il trattamento del nato da madre GBS positiva o sconosciuta prevede l'individuazione di fattori di rischio e l'esecuzione di IAP. In assenza di fattori di rischio, se IAP adeguata (>4 ore) ci si limita all'esecuzione di tamponi di superficie, in assenza di IAP adeguata si procede all'esecuzione di sepsi screening (emocromo, proteina C reattiva, tamponi faringeo-biauricolare BA e emocoltura) e all'osservazione clinica per 24 ore. In presenza di fattori di rischio, se IAP adeguata si procede all'osservazione e a sepsi screening e in assenza di IAP adeguata, si procede dopo sepsi screening all'inizio di terapia antibiotica empirica con ampicillina e netilmicina con i dosaggi prima citati.

Nel neonato sintomatico o infetto (PCR e/o emocoltura o urinocoltura o rachicentesi o tamponi faringeo-biauricolare positivi) è prevista terapia con ampicillina e netilmicina; in questo caso entrambi gli antibiotici vengono somministrati per via endovenosa e l'ampicillina viene utilizzata a dosaggi di 150 mg/kg/die in 3 dosi. Nel neonato colonizzato si utilizza ampicillina 100 mg/kg/die nelle prime 24-48 ore poi amoxicillina al dosaggio di 50mg/kg/die fino al 10°giorno.

Dal 1 Gennaio 1997 al 31 Dicembre 2001 abbiamo proceduto ad una raccolta dati analizzando su appositi file/schede le cartelle ostetriche, i partogrammi per quanto concerne la colonizzazione materna, la presenza dei fattori di rischio e l'esecuzione della profilassi intrapartum. Nella raccolta dei dati neonatali sono state utilizzate le cartelle cliniche, ambulatoriali e per le forme late sono stati individuati i rientri in regime di ricovero.

Risultati

Lo screening delle gravide è stato effettuato nell'81% (5795/6895) e la percentuale della colonizzazione da GBS è risultata del 13% degli screening effettuati (975/5795). La profilassi intrapartum adeguata è stata effettuata nel 31% dei casi (2120/6895), mentre risulta inadeguata nel 2,7% dei casi (191/6895).

La tabella 1 indica la distribuzione negli anni dello screening alle gravide, della colonizzazione materna da GBS e della attuazione della profilassi intrapartum adeguata o inadeguata.

Nei tamponi vagino-rettali positivi per GBS si è

Tabella 1. Distribuzione negli anni dello screening alle gravide, della colonizzazione materna da GBS e della attuazione della profilassi intrapartum adeguata o inadeguata.

Anno	Donne	Screenate GBS	GBS positive	IAP adeguata	IAP inadeguata
1997	1152	873	123	328	38
		75%	14,3%	28,4%	3,2%
1998	1244	998	174	446	41
		80%	17,4%	35%	3,2%
1999	1428	1221	211	505	46
		85%	17,2%	35%	3,2%
2000	1571	1381	244	479	39
		87%	17,6%	30%	1,9%
2001	1500	1322	205	362	27
		88%	13,6%	27%	1,8%
TOTALE	6895	5795	975	2120	191
		81%	13%	31%	2,7%

IAP= Intrapartum profilassi

Tabella 2. Resistenza ai macrolidi del GBS.

GERME GBS	Ampicillina resistenti	Macrolidi resistenti (eritromicina-claritromicina)	
Tamponi vagino-rettali materni	0	8/975	0,8%
Tamponi faringeo-BA neonatale	0	3/129	2,3%
Totale	0	11/1104	0,9%

BA=biauricolare

proceduto all'esecuzione di antibiogramma per valutare eventuali resistenze ai macrolidi o alla penicillina. L'isolamento del GBS dai vari tamponi evidenzia una sensibilità nel 100% dei casi all'ampicillina, mentre resistenza ai macrolidi emerge nello 0,9% dei casi (tabella 2).

L'EOGBS, intese come sepsi accertate (sintomi con rialzo di indici di flogosi e/o emocoltura, urinocoltura, rachicentesi o tamponi faringeo - biauricolare positivi) sono risultate 5/6934 pari allo 0,07%. Si tratta di soggetti sintomatici, che hanno eseguito accertamenti. Un caso appartiene a madre GBS positiva con IAP inadeguata al parto, gli altri 4 sono da madre GBS negativa. Il trattamento antibiotico con terapia empirica è stato iniziato o per rialzo indici di flogosi in assenza di sintomi o per presenza di fattori rischio in assenza di IAP adeguata nello 0,2% dei casi. Nei 4 soggetti nati madre con tamponi negativi gli esami colturali hanno evidenziato la presenza di GBS in emocolture e tamponi in 3 soggetti e urinocoltura positiva per GBS nel quarto. Nel quinto soggetto nato da madre GBS positiva con IAP inadeguata si sono evidenziati tamponi positivi con un grave distress respiratorio. In nessun caso è stata eseguita rachicentesi

L'incidenza della colonizzazione neonatale da GBS (calcolata sui nati da madre GBS positiva o sconosciuta sottoposti a tamponi) è risultata del 5,5%.

La tabella 3 riassume la distribuzione delle EO-GBS, della colonizzazione neonatale e dei neonati con aumento della proteina C reattiva, che hanno ricevuto trattamento antibiotico in assenza di sintomi o esami colturali positivi.

I dati delle infezioni precoci da GBS riguardano 5 neonati con un'incidenza dello 0,07% nella casistica, la mortalità negli anni in esame è risultata assente e nessun caso di infezione tardiva da GBS è stato registrato negli anni in esame.

Discussione

I risultati dello screening per GBS attuato dal 1997-2001 sono legati alla compliance dei medici e delle donne. Nella nostra casistica la percentuale delle donne screenate ha rilevato una buona compliance. L'incidenza della colonizzazione materna da GBS si assesta sui valori italiani.

La profilassi intrapartum dell'infezione da GBS, utilizzando sia lo "screening universale" che i "fattori di rischio" è associata ad una riduzione significativa della mortalità neonatale ad essa correlata, se confrontata con i casi non profilassati. Lo "screening universale" porta ad una riduzione della morbosità, se comparato con il trattamento dei soli fattori di rischio. L'incidenza di EOGBS del 0,07% dimostra l'efficacia dello screening universale.

L'analisi del protocollo utilizzato in questo quinquennio ci ha permesso di migliorare le strategie

Tabella 3. Distribuzione dell'EOGBS e della colonizzazione da GBS.

Anno	Nati	EOGBS Sepsi	Neonati Colonizzati	Neonati con aumento PCR e trattamento antibiotico
1997	1168	0	23 (6%)	3 (0,2%)
1998	1249	2 (0,1%)	27 (6%)	3 (0,2%)
1999	1432	2 (0,1%)	31 (6%)	4 (0,2%)
2000	1576	0	28 (5,7%)	3 (0,1%)
2001	1509	1 (0,06%)	18 (4,3%)	2 (0,1%)
Totale	6934	5 (0,07%)	127 (5,5%)	15 (0,2%)

di intervento, per altro supportati dai dati della letteratura, e di razionalizzare l'utilizzo di esami colturali e di interventi terapeutici.

La segnalazione di 3 casi di EOGBS nati da madre GBS negativa in assenza di fattori di rischio ci ha posto delle riflessioni circa la possibilità di falsi negativi. La data di esecuzione dello screening a 34 settimana di gestazione nella nostra realtà ci ha indotto a valutare il differimento dello screening alla 37 settimana per evitare una contaminazione tardiva da GBS. La negatività del tampone vagino-rettale non ha permesso né una profilassi intrapartum né un trattamento precoce. Solo la comparsa dei sintomi ha determinato l'inizio della terapia e l'attribuzione della forma a GBS è stata correlata alla positività delle colture.

La valutazione dell'adeguatezza dell'IAP ci ha permesso di attuare una maggior sensibilizzazione del personale ostetrico all'esecuzione di una profilassi adeguata con inizio tempestivo dell'utilizzo della profilassi in travaglio, onde poter garantire il massimo dell'efficacia. Nel nuovo protocollo abbiamo diversificato due diversi livelli di adeguatezza di IAP:

- in assenza di fattori di rischio in caso di IAP con due dosi ci siamo limitati all'osservazione clinica senza eseguire accertamenti, in presenza di IAP con oltre 3 ore dalla prima dose eseguiamo tamponi di superficie;
- in presenza di fattori di rischio in caso di IAP con due dosi eseguiamo tamponi e osservazione clinica e in presenza di IAP con oltre 3 ore dalla prima dose eseguiamo tamponi di superficie e PCR in XII ora procedendo ad ulteriori accertamenti in caso di rialzo della PCR e/o sintomi.

In casi di rialzo degli indici di flogosi o di neonati sintomatici ci è apparso importante di fronte al riscontro di casi infetti senza eziologia documentata un irrigidimento del protocollo includendo prima dell'inizio della terapia l'esecuzione di urino-coltura e di rachicentesi oltre che di tamponi e emocoltura.

Nel neonato colonizzato viene utilizzata la terapia parenterale con ampicillina per le prime 24-48 ore seguita da proseguimento della terapia con

amoxicillina per os. In alcuni casi il trattamento è stato eseguito unicamente con amoxicillina per necessità di dimettere il neonato o per risultato tardivo degli esami colturali. Esistono segnalazioni a favore dell'utilizzo di amoxicillina per os in età neonatale nella letteratura francese e scandinava negli anni '80⁹⁻¹¹ e addirittura alcune segnalazioni indicano come preferibile il trattamento orale rispetto a quello intramuscolare, in quanto dotato di effetto eradicante soddisfacente^{12,13}. Recenti esperienze condotte nel Nord Italia sembrano confermare la capacità di eradicazione del germe del trattamento orale con amoxicillina in assenza di effetti collaterali¹⁴. Nella nostra casistica tutti i neonati colonizzati trattati con amoxicillina sono risultati negativi ai controlli eseguiti dopo trattamento.

Problemi da risolvere sono da considerarsi la violazione dei protocolli, resistenze ai macrolidi dal momento che dai nostri dati non sono emerse resistenze all'ampicillina. Non è stata segnalata nella nostra casistica un'aumentata incidenza delle infezioni neonatali non-GBS - early onset¹⁵.

Conclusioni

Ulteriori strategie devono essere messe a punto per individuare la colonizzazione materna da GBS al momento del parto, aumentando la percentuale delle donne screenate e evitando falsi negativi o colonizzazioni tardive. Utili potrebbero essere test rapidi per l'identificazione del GBS nei tamponi materni o neonatali¹⁶. Sarebbe auspicabile una migliore definizione dei fattori di rischio di colonizzazione materna e di infezione neonatale nelle varie popolazioni.

Strategie preventive con screening universale appaiono sicuramente più efficaci nel prevenire le infezioni, ma implicano un incremento dei costi di ospedalizzazione ed un notevole aumento della proporzione delle donne che ricevono antibiotici durante il parto, che taluno considera ingiustificato in una patologia con bassa incidenza¹⁷⁻²⁰. Sono in corso studi su vaccini coniugati a polisaccaridi di membrana compatibili con vari serotipi da somministrarsi prima della gravidanza che potrebbero risolvere il problema^{21,22}.

Bibliografia

1. **Consensus Conference** Hospital based policies for prevention perinatal Group B streptococcal disease-United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Res* 2000; 49:936-940.
2. **American academy of Pediatrics**. Revised guidelines for prevention of early onset group B streptococcal infection. *Pediatrics* 1997; 99:489-496.
3. **Schuchat A**. Group B streptococcus. *Lancet* 1999; 353:51-56.
4. **Beardsall K, Thompson MK, Mulla RJ**. Neonatal group B streptococcal infection in South Bedfordshire 1993-1998. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;

- 82:F205-F207.
5. **Embleton N, Wariyar U, Hey E.** Mortality from early onset group B streptococcal infection in the United Kingdom. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000; 80: F139-F141.
 6. **Kieran E, Matheson M, Mann AG, et al.** Group B streptococcus (GBS) colonization among expectant Irish mothers. *Ir Med J* 1998; 91:21-22.
 7. **Juncosa T, Bosch J, Dopico E.** Neonatal infection by streptococcus agalactiae. Multicenter study in the area of Barcellona, Spain. *Enferm Infec Microbiol Clin* 1998; 16:312-315.
 8. **Schuchat A.** Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:497-513.
 9. **Autert E, Breteau M, Jonville AP, et al.** Blood concentrations of amoxicillin after 4 orally administered doses of 25mg/kg/day in newborn infants *Arch Fr Pediatr* 1989; 46:549.
 10. **Squinazi F, Huraux Rendu CC, Souларыrol M, et al.** Effectiveness, tolerability, and pharmacokinetic aspects of oral amoxicillin in the newborn infant. *Ann Pediatr* 1983; 30:528-532.
 11. **Lonnerholm G, Bengtsson S, Ewal U.** Oral pivampicillin and amoxicillin in newborn infants. *Scand J Infect Dis* 1982; 14:127-130.
 12. **Vanclaire JM, Battisti O, Francois A.** Infectious par streptococque B en periode neonatale, epemiologie et prevention. *Arch Fr Pediatr* 1993; 50:30.
 13. **Aujard Y.** Infections par streptocoque B en periode neonatale. *Arch Pediatr ...*;1:308.
 14. **Della Morte MA, Ratti E, Sala MR, et al.** Della colonizzazione da streptococco beta emolitico di gruppo B (SGB) in gravidanza. Note di prevenzione e terapia dell'infezione materno-neonatale. *Casistica. Ped Med Chir* 1996; 18:433-450.
 15. **Baltimore RS, Huie SM, Meek JI, et al.** Early-onset neonatal sepsis in the era of group B streptococcal prevention. *Pediatrics* 2001; 108:1094-1098.
 16. **Votava M, Tejkalova M, Drabkova M, et al.** Use of GBS media for rapid detection of group B streptococcus in vaginal and rectal swabs from women in labor. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20:120-122.
 17. **Stan CM, Boulvain M, Bovier PA, et al.** Choosing a strategy to prevent neonatal early-onset group b Streptococcal sepsis : economical evaluation. *BJOG* 2001; 108:840-847.
 18. **Gilson GJ, Christensen F, Romero H, et al.** Prevention of group B streptococcus early-onset neonatal sepsis. Comparison of the Center for Disease Control and Prevention screening based protocol to a risk-based protocol in infant at greater 37 weeks' gestation. *J Perinatol* 2000; 20:491-495.
 19. **Benitz WE, Gould JB, Druzin ML.** Antimicrobial prevention of early-onset group B streptococcal sepsis: estimates of risk reduction based on critical literature review. *Pediatrics* 1999; 103:78.
 20. **de Cueto M, Sanches MJ, Sampedro A, et al.** Timing of intrapartum ampicillin and prevention of vertical transmission of group B streptococcus. *Obstet Gynecol* 1998; 91:112-114.
 21. **Schuchat A.** Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:497-513.
 22. **Kong F, Gowan S, Martin D, et al.** Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol* 2002; 40:216-226.