

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA  
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA  
DOTTORATO DI RICERCA  
INFEZIONI IN CHIRURGIA GENERALE, IN  
CHIRURGIA GERIATRICA ED IN OSTETRICIA  
E GINECOLOGIA  
XXXIII CICLO**

---

**DOTT. ANTONINO GIOVANNI CAVALLARO**

**STREPTOCOCCUS AGALACTIAE E  
COLONIZZAZIONE MATERNA:  
VALUTAZIONE DEI MECCANISMI DI  
VIRULENZA E CHEMIOPROFILASSI**

**- TESI DI DOTTORATO -**

**COORDINATORE**

**Chiar.ma Prof.ssa A. Speciale**

**TUTOR**

**Chiar.mo Prof. A. Cianci**

---

**ANNO ACCADEMICO 2009/2010**

## ***INDICE***

<b><i>CAPITOLO 1</i></b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>5</b>
<b><i>CAPITOLO 2</i></b> .....	<b>7</b>
<b>2.1 GLI STREPTOCOCCHI</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2 CLINICA</b> .....	<b>12</b>
2.2.1 INFEZIONI MATERNE .....	12
2.2.2 INFEZIONI NEONATALI .....	17
<b><i>CAPITOLO 3</i></b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 EPIDEMIOLOGIA</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2 COLONIZZAZIONE</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3 TRASMISSIONE</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4 PATOGENESI</b> .....	<b>32</b>
3.4.1 FATTORI DI VIRULENZA .....	32
3.4.1.1 POLISACCARIDI CAPSULARI .....	32
3.4.1.2 PROTEINE DI SUPERFICIE .....	35
3.4.1.3. ALTRI FATTORI DI VIRULENZA .....	37

<b><i>CAPITOLO 4</i></b> .....	<b>40</b>
<b>4.1 FATTORI DI RISCHIO SUPPLEMENTARI PER LA MALATTIA PERINATALE DA GBS</b> .....	<b>40</b>
<b><i>CAPITOLO 5</i></b> .....	<b>45</b>
<b>5.1 PREVENZIONE</b> .....	<b>45</b>
5.1.2 SCREENING COLTURALE.....	49
<b><i>CAPITOLO 6</i></b> .....	<b>54</b>
<b>6.1 INDICAZIONI ALLA CHEMIOPROFILASSI</b> .....	<b>54</b>
<b>6.2 LA CHEMIOPROFILASSI E LE SUE COMPLICANZE</b> .....	<b>57</b>
<b><i>CAPITOLO 7</i></b> .....	<b>66</b>
<b>7.1 NUOVE PROSPETTIVE</b> .....	<b>66</b>
<b><i>CAPITOLO 8</i></b> .....	<b>74</b>
<b>8.1 SCOPO DEL LAVORO</b> .....	<b>74</b>
<b>8.2 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>74</b>
<b>8.3 RISULTATI</b> .....	<b>78</b>
8.3.1 EPIDEMIOLOGIA .....	78
8.3.2 SIEROTPIZZAZIONE.....	78
8.3.3 IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE DI MEMBRANA .....	79
8.3.4 ASSOCIAZIONE SIEROTIPO/PROTEINE DI SUPERFICIE .....	80

8.3.5 CORRELAZIONE TRA I DATI MATERNI E QUELLI DI GBS .....	81
8.3.6 VALUTAZIONE DELLA CHEMIOSENSIBILITA' .....	82
<b>8.4 DISCUSSIONE.....</b>	<b>83</b>
<b><i>BIBLIOGRAFIA.....</i></b>	<b>89</b>

## CAPITOLO 1

### 1.1 INTRODUZIONE

Le infezioni rimangono un'importante causa di morbilità e mortalità neonatale nonostante i progressi compiuti sia in campo diagnostico che terapeutico e nel corso degli anni si è assistito ad una variabilità dei microrganismi maggiormente coinvolti. Benché il problema delle infezioni dovute agli streptococchi di gruppo A sia stato eliminato, l'ostetrico si trova di fronte oggi ad una nuova sfida rappresentata dagli streptococchi di gruppo B che sono diventati la più importante causa di morbilità e mortalità fetale, neonatale e materna, anche se non va dimenticata la possibilità di infezioni dell'adulto, al di fuori del puerperio, dove si comportano come opportunisti nei pazienti debilitati.

Dagli anni '70 lo Streptococco di gruppo B (GBS) ha assunto un ruolo prioritario nel determinismo della sepsi neonatale (1-4), con un tasso di mortalità del 50%.

Diversi studi clinici, a partire dagli anni '80, hanno dimostrato l'efficacia della somministrazione degli antibiotici *intrapartum*,

alle donne a rischio di trasmettere l'infezione da GBS, nella prevenzione della malattia neonatale ad esordio precoce (5).

Tuttavia, malgrado le strategie di prevenzione si siano dimostrate efficaci, queste non sono state adottate ampiamente e costantemente e quindi la malattia neonatale da GBS non ha subito alcuna riduzione dell'incidenza (6).

Vista l'efficacia della profilassi antibiotica e data la necessità di applicarla in modo diffuso, costante e razionale nel 1996 dall'*American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) (7) e dai *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (6) e nel 1997 dall'*Accademia Americana della Pediatria* (8) sono state formulate le linee guida sulla profilassi antibiotica *intrapartum* per la prevenzione della malattia perinatale da GBS.

Alla luce dei dati emersi negli anni successivi alla formulazione delle prime linee guida, nel Novembre del 2001, la CDC ha emanato le nuove linee guida modificando ed aggiornando le precedenti.

## CAPITOLO 2

### 2.1 GLI STREPTOCOCCHI

Tutti gli streptococchi possono dare origine a gravi infezioni, ma particolare importanza, in campo ostetrico, hanno gli streptococchi di gruppo A e di gruppo B che pongono rilevanti problemi clinici (9).

Gli streptococchi Beta emolitici di gruppo B sono batteri noti in medicina veterinaria fin dal secolo scorso in quanto erano già allora considerati responsabili della mastite contagiosa dei bovini. Nel 1935 Lancefield e Hare isolarono per la prima volta un ceppo con le stesse caratteristiche anche sull'uomo e lo inclusero nel gruppo B del loro schema classificativo, di cui ne costituisce l'unica specie. Nel 1938 Fry riporta tre casi di febbre puerperale fatale da SGB e da allora sono state segnalate, con sempre maggiore frequenza, infezioni in vari organi od apparati ma, soprattutto, severe infezioni neonatali che hanno attirato l'interesse dei microbiologi.

Gli streptococchi sono dei microrganismi aerobi-anaerobi facoltativi, con preferenza a crescere in anaerobiosi, in quanto capaci di un metabolismo energetico di tipo fermentativo. Sono

dei batteri Gram-positivi, sferici con cellule del diametro di 1-1,5  $\mu\text{m}$  disposti a coppie, capsulati, immobili, asporigeni, ossidasi e catalasi negativi.

Essi costituiscono la gran parte della popolazione microbica del cavo orale e faringeo e possono essere rinvenuti lungo tutto il tratto intestinale, nonché a livello vaginale e cutaneo.

Alcune specie, come *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* sono dotate di un notevole potere patogeno, mentre altre specie, frequentemente commensali dell'organismo umano, presenti soprattutto nel cavo orale dove svolgono un ruolo essenziale nella patogenesi della carie dentale, possono essere occasionalmente causa di processi morbosi in seguito alla penetrazione accidentale nel torrente circolatorio e la successiva localizzazione in particolari distretti dell'organismo (10).

Gli streptococchi sono classificati secondo due criteri: sulla base del tipo di emolisi prodotta in piastre di agar-sangue ed in rapporto alle caratteristiche antigeniche di alcuni polisaccaridi della parete cellulare, denominati globalmente antigene C.

La classificazione che valuta il tipo di emolisi prodotta in piastre di agar-sangue li distingue in tre gruppi e precisamente:

- $\alpha$  emolitici o viridanti
- $\beta$  emolitici
- $\gamma$  emolitici o non emolitici.



Lo streptococco beta emolitico di gruppo B, classificato come *Streptococcus agalactiae*, cresce facilmente sui terreni al sangue e di norma viene impiegato l'agar Columbia con sangue di montone al 5%, nel quale si ha un'ottima crescita e si apprezza bene la beta emolisi, che risulta meno intensa di quella prodotta dagli streptococchi di gruppo A.

Lo *Streptococcus pyogenes* e lo *Streptococcus agalactiae* sono  $\beta$ -emolitici ma è da dire che l'azione emolitica di quest'ultimo è accentuata dall'incubazione in anaerobiosi mentre lo *Streptococcus pneumoniae* e la maggior parte degli streptococchi presenti nel cavo orale sono viridanti.

Secondo la classificazione di Lancefield, che si basa sul tipo di antigene del polisaccaride C estraibile dalle cellule batteriche mediante l'idrolisi acida a caldo ed identificabile in prove di precipitazione con sieri immuni specifici, gli streptococchi sono distinti in una ventina di gruppi identificati con lettere dell'alfabeto.

Lo *Streptococcus pyogenes* appartiene al gruppo A, lo *Streptococcus agalactiae* appartiene al gruppo B mentre lo *Streptococcus pneumoniae* non possiede un antigene polisaccaridico estraibile (10).

Gli streptococchi di gruppo A sono gli agenti patogeni di molte faringo-tonsilliti, di affezioni cutanee, di infezioni

cellulitiche. In era preantibiotica erano gli agenti causali di sindromi post-streptococciche, quali la malattia reumatica acuta e la glomerulonefrite. Essi producono numerose esotossine, fra le quali le tossine pirogeniche A, B e C denominate complessivamente tossina eritrogenica perché causa della scarlattina.

Gli *S. pyogenes*, produttori di tossina A, possono causare una forma distruttrice che comprende la fascite necrotizzante ed una forma denominata “sindrome da shock tossico streptococcico” con gravi ripercussioni generali ed esito sovente mortale.

Lo *Streptococcus agalactiae* possiede l'antigene polisaccaridico di Lancefield di gruppo B e si possono osservare, in percentuale oscillanti dall'1 al 4% (con punte fino al 36%), stipiti non emolitici od, in rari casi, ceppi con beta emolisi molto pronunciata, sul tipo di quella dello Streptococco di gruppo A. In base ad altri antigeni polisaccaridici e proteici lo *Streptococcus agalactiae* è ulteriormente suddivisibile in dieci sierotipi differenti (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX), identificati mediante test di precipitazione (test di Lancefield) o metodo di agglutinazione (11).

Sebbene la maggiore parte degli streptococchi di gruppo B sia classificabile come appartenente ad uno dei sierotipi noti, il 4-7% dei GBS (12-15) non è tipizzabile a causa della mancata

espressione del polisaccaride capsulare o perché il polisaccaride prodotto non reagisce con gli antisieri disponibili, comunque, grazie allo sviluppo di nuove tecnologie molecolari (PCR), è stato possibile assegnare uno dei nove noti sierotipi ad alcuni, ma non a tutti, i GBS precedentemente identificati come non classificabili.

Nel Settembre del 2007 Hans-Christian Slotved et al. (11) hanno proposto l'introduzione, nella classificazione di GBS, basata sul fenotipo capsulare, di un nuovo sierotipo: il sierotipo IX. Infatti, nel loro lavoro è messa in evidenza la presenza di caratteristiche genotipiche comuni tra otto GBS non tipizzabili, ragion per cui gli autori hanno proposto l'introduzione del nono sierotipo (IX) nella classificazione di GBS. Dall'analisi degli studi molecolari è verosimile supporre che il sierotipo IX sia il risultato di mutazioni e/o ricombinazioni tra il sierotipo Ib e il sierotipo V e/o IV. Questi otto GBS, che apparterrebbero al nuovo sierotipo, determinano una reazione immunologica simile con un nuovo antisiero, inoltre, il sierotipo IX ha una vasta distribuzione geografica e sembra esistere da meno di venti anni.

Tra i diversi sierotipi il III sembra essere quello dotato di maggiore patogenicità e i cui antigeni di superficie sono molto simili all'antigene capsulare K1 presente anche negli stiptipi di *E. coli* responsabili di meningiti neonatali.

Gli streptococchi di gruppo B (*agalactiae*) sono tra i microrganismi endogeni quelli che più frequentemente si rendono virulenti e danno origine a manifestazioni cliniche molto gravi.

Lo *Streptococcus agalactiae* è presente, assai spesso come componente della popolazione microbica commensale dell'uretra maschile e della vagina e può essere trasmesso per via sessuale. Esso è divenuto, inoltre, nell'ultimo trentennio, uno dei più importanti agenti di infezioni neonatali sia per la frequenza sia per la gravità (10).

## 2.2 CLINICA

Lo *Streptococcus agalactiae* (GBS), inizialmente noto come agente della mastite bovina e come causa non frequente di infezioni urinarie, è divenuto uno dei più importanti agenti di infezioni neonatali, in particolare di infezioni respiratorie, sepsi e meningite, secondo per frequenza solo a *Escherichia coli*.

Tale microrganismo è spesso causa di infezioni anche negli adulti, particolarmente negli anziani e in pazienti con malattie croniche, nei quali può causare infezioni della pelle (ulcere diabetiche), delle articolazioni, batteriemia, infezioni delle vie urinarie, polmoniti e peritoniti (16).

## 2.2.1 INFEZIONI MATERNE

Nella donna gravida, GBS può causare infezioni clinicamente manifeste, ma la maggior parte delle donne non ha sintomi connessi alla colonizzazione del tratto genitale.

Lo *Streptococcus agalactiae* è responsabile, durante la gravidanza e nel periodo post-partum, di infezioni dell'apparato urinario, per lo più batteriuria asintomatica (che complica il 2-4% delle gravidanze), rottura prematura delle membrane (PROM), amnioite ed infezioni puerperali (17).

In tutti gli studi sulla batteriuria asintomatica, nella donna in gravidanza *E. Coli* è risultato il più comune microrganismo responsabile di batteriuria (80%), ma anche altri Gram negativi e alcuni microrganismi Gram positivi sono stati occasionalmente isolati; GBS è un inusuale agente etiologico della batteriuria asintomatica nella donna, indipendentemente dallo stato gravidico (18).

Per batteriuria asintomatica si intende la presenza all'urinocoltura di una batteriuria significativa ma non associata a sintomi di infezione. La diagnosi è esclusivamente microbiologica e può essere stabilita con buona specificità, solo se lo stesso microrganismo viene isolato almeno due volte con

carica batterica elevata, ovvero  $\geq 100.000$  colonie formatesi in coltura (*Colony Forming Units*, CFU) per ml di urina (19).

Sebbene l'incidenza della batteriuria asintomatica sia simile tra le donne incinte e quelle non incinte, ben diversa è l'evoluzione. Infatti, mentre normalmente il decorso della batteriuria asintomatica è benigno, la gravidanza, inducendo dei fisiologici cambiamenti nell'apparato urinario e nello stato ormonale, facilita l'evoluzione della batteriuria verso la pielonefrite (18).

Durante la gravidanza gli elevati livelli di progesterone sono responsabili dell'ipotonia muscolare, la quale determina una diminuzione dell'attività peristaltica nell'uretere distale, inoltre, la compressione uterina sulla vescica determina la comparsa di reflusso vescico-ureterale ed infine le preurine hanno un ridotto potere antibatterico a causa dell'aumento degli aminoacidi, dei glucidi nel contenuto del filtrato glomerulare (19).

Lo streptococco di gruppo B, insieme ad altri microrganismi è frequentemente indicato come agente etiologico della rottura prematura delle membrane (PROM) che si realizza in un'area in cui le resistenze meccaniche delle stesse sono minori .

In Italia attualmente si stima che il 10% di tutte le gravidanze della popolazione presentino una rottura prematura delle membrane, ossia avvenuta prima dell'inizio del travaglio.

L'integrità delle membrane amniocoriali è mantenuta dall'ordinata coesistenza di fattori che regolano la sintesi e la degradazione delle fibre e della sostanza fondamentale del tessuto connettivo presente nelle membrane stesse. Quando si instaura un'infezione, l'azione combinata degli enzimi proteolitici prodotti direttamente dai microrganismi e degli enzimi proteolitici attivati dalla reazione infiammatoria, facilmente diventa intensa al punto da superare la capacità dei meccanismi antiproteasici della gestante e produrre così nelle membrane amniocoriali un luogo di minore resistenza più o meno circoscritto. A questo punto è sufficiente una modesta sollecitazione meccanica per provocarne la rottura, infatti, nella rottura prematura ricoprono un ruolo importante sia i fattori meccanici (sollecitazioni perpendicolare e tangenziali) sia i fattori infiammatori, che potenziano l'effetto o addirittura ne rappresentano il momento scatenante (9).

Lo *Streptococcus agalactiae* è uno degli agenti etiologici della patologia puerperale infettiva la quale, sebbene abbia perso gran parte delle caratteristiche che in passato la rendevano uno dei principali fattori di mortalità materna, ancora oggi rappresenta un rischio da non sottovalutare, data l'emergenza di ceppi antibiotico-resistenti.

Per infezione puerperale o sepsi puerperale si intendono tutte quelle forme settiche che iniziano durante il parto o in puerperio partendo dagli organi genitali.

Una delle definizioni più usate è quella proposta dal “*Joint Committee on Maternal Welfare*” degli Stati Uniti, che considera colpite da infezione puerperale tutte le donne in cui si verifica un’elevazione termica ad almeno 38° C in due giorni qualunque dei primi 10 giorni di puerperio, ad esclusione delle prime 24 ore dopo il parto.

Lo streptococco insieme ad altri microrganismi (Stafilococco, *E. coli*, *Proteus* spp., *Pseudomonans* spp., *Klebsiella* spp., *Aerobacter* spp., *Bacteroides* spp.) è un agente etiologico delle infezioni puerperali, ma l’insorgenza di queste è favorita anche da alcuni fattori predisponenti: presenza di tessuto necrotico, azione contemporanea di altri microrganismi patogeni più aggressivi, perdita di sensibili quantità di sangue, il trauma meccanico del parto, esecuzioni di manipolazioni endouterine, PROM, ritenzione di frammenti placentari, anemia e malnutrizione.

Le infezioni puerperali si possono distinguere in forme localizzate e forme diffuse.

Le prime includono infezioni di lacerazioni e contusioni vulvari, vaginali, perineali e cervicali e l’endometrite. La sintomatologia



delle infezioni localizzate in corrispondenza di lesioni vulvo-perineali o vaginali nella maggior parte dei casi è limitata al dolore locale e a disturbi minzionali, la febbre compare solo se si forma una raccolta purulenta o se si instaura pielonefrite. Nelle lesioni infette del collo dell'utero la sintomatologia è limitata alla lochiazione purulenta. Nell'endometrite si osserva per lo più febbre di tipo intermittente accompagnata da brividi e subinvoluzione uterina con utero dolente alla palpazione.

Queste forme localizzate possono generalizzarsi successivamente per l'estensione del processo infettivo lungo le vie linfatiche o per continuità nel tessuto connettivo del paracolpo, del parametrio e delle fosse ischio-rettali.

Le forme diffuse più comuni dell'infezioni puerperali sono invece: cellulite pelvica, tromboflebite settica, peritonite, sepsi o setticemia (9).

### 2.2.2 INFEZIONI NEONATALI

Nel neonato l'infezione da GBS ha distribuzione bimodale: una ad insorgenza precoce (*early-onset*) ed un'altra ad insorgenza tardiva (*late-onset*) (16).

La malattia ad esordio precoce (*early-onset*) da GBS si trasmette per via verticale e si presenta entro 24 ore dalla nascita

nel 60-80% dei casi, nel 90% entro le 72 ore ma può manifestarsi in qualsiasi momento durante la prima settimana di vita (20, 21); ad ogni modo i quadri clinici si evidenziano più precocemente rispetto a quelli sostenuti da altri agenti patogeni (22). Raramente viene acquisita dal neonato per via transplacentare, la modalità di trasmissione è perciò generalmente ascendente, per aspirazione di liquido amniotico contaminato ed esiste una relazione fra la durata della rottura delle membrane e il rischio di infezione. Più raramente l'infezione può manifestarsi a membrane integre, probabilmente a seguito di micro rotture prima del parto. Infine il neonato può infettarsi mediante il contatto con secrezioni vagino-anali infette nel canale del parto.

I tre più comuni quadri clinici della forma precoce sono: setticemia senza focolaio, polmonite e meningite. I segni respiratori (apnea, difficoltà respiratoria, tachipnea, cianosi) sono le manifestazioni iniziali in più dell'80% dei neonati, l'ipotensione compare nel 25%, altri segni clinici sono rappresentati da letargia, scarsa alimentazione, ipotermia o febbre, distensione addominale, pallore, tachicardia e ittero, che non sono tipici di GBS, potendosi presentare in altre infezioni batteriche (22, 23).

Nella sintomatologia iniziale dei neonati affetti da meningite, raramente è presente il colpo apoplettico che può svilupparsi in seguito, entro le prime 24 ore dall'infezione (23).

La mortalità è stimata essere del 2-5% nei bambini a termine e subisce un incremento del 25% nei nati pretermine (20).

La malattia ad esordio tardivo (*late-onset*), che si manifesta nel periodo successivo alla prima settimana di vita fino alla fine del terzo mese (dai 7 ai 90 giorni di vita) con un acme alla fine del primo mese, non ha la stessa forte associazione con la colonizzazione materna. La sorgente dell'infezione può non essere la madre al momento del parto e l'infezione può essere acquisita in seguito per contatto con persone affette sia nel nido ospedaliero sia in casa (16).

La malattia ad insorgenza tardiva si manifesta principalmente sotto forma di meningite e/o setticemie (24, 25) o più raramente a infezioni focali (a carico delle ossa, delle articolazioni, dei tessuti molli, ecc) ed ha un tasso di mortalità più basso rispetto alla forma ad esordio precoce (26, 27). L'unico fattore di rischio fino ad oggi ipotizzato è la prematurità.

L'infezione ultra tardiva (*late-late onset*) è quella che esordisce dopo il 90° giorno di vita. Costituisce circa il 20% delle infezioni tardive e si manifesta con batteriemie senza focus, sepsi

o infezioni focali. Colpisce generalmente nati con infezione da HIV o grandi pretermine a lungo ospedalizzati.

I diversi sierotipi noti hanno una differente importanza nel causare la malattia perinatale. I sierotipi III, Ia e V sono più comunemente causa della malattia ad esordio precoce, mentre il sierotipo III è quello maggiormente responsabile della malattia ad esordio tardivo (20).

È possibile correlare la principale manifestazione clinica presentata dal neonato ad uno specifico sierotipo, infatti i pazienti che sono infettati da GBS del tipo III hanno un maggior tasso di meningite, mentre il sierotipo V è responsabile di una maggiore mortalità (28-30).

La prevalenza di un determinato sierotipo è stata esaminata in differenti studi e tra questi anche in lavoro di Campbell et al. (31) che, arruolando 3307 donne incinte in un periodo compreso dall'Ottobre 1992 al Gennaio 1995 negli ospedali di Houston e Seattle, ha evidenziato che tra i GBS isolati in 856 donne colonizzate (26%), i sierotipi più comuni erano Ia (26,3%) e III (21,4%), mentre il sierotipo V era solo terzo in frequenza (20,9%).

Nelle altre donne colonizzate sono stati isolati nel 7,5% il sierotipo Ib, nel 18% II, nello 0,2% VI e nell'1,3% sierotipi non tipizzati.

In questo studio si è concluso, inoltre, che la distribuzione dei diversi sierotipi tra le partecipanti non è influenzato dalla razza, dalla etnia o dal luogo di studio.

## CAPITOLO 3

### 3.1 EPIDEMIOLOGIA

Nonostante le prime pubblicazioni del 1930 e del 1940, che collegavano GBS con le infezioni post partum e le meningiti neonatali, lo *Streptococcus agalactiae* è stato raramente menzionato come causa di sepsi neonatale fino al 1964, quando Eickhoff et al. pubblicarono il loro studio sull'infezione perinatale da GBS (32).

Successivamente dal 1970, GBS è emerso come la principale causa di infezione neonatale con un tasso di mortalità del 20-50% (33), valore che ha subito un'imponente riduzione (mortalità 4%) negli anni '90 grazie all'avanzamento delle cure neonatali (34).

Prima dell'uso diffuso della profilassi antibiotica *intrapartum*, l'incidenza della malattia invasiva da GBS variava entro il *range* di 2-3 casi per 1000 nati vivi (35, 36).

Diversi studi rivelano infatti che, nel 1990 negli Stati Uniti, quando la prevenzione per GBS era effettuata raramente, l'incidenza dei casi perinatali di malattia era di 1,8 casi per 1000 nati vivi ( per la malattia ad esordio precoce: 1,5/1000; per quella ad esordio tardivo: 0,35/1000) (35).

Dopo il 1996, anno in cui furono promulgate le prime linee guida per la prevenzione della malattia da GBS, da più autori è stato sottolineato il declino dell'incidenza della malattia neonatale ad esordio precoce: Schrag et al. (34) nel loro lavoro hanno rilevato che, nel 1998 negli Stati Uniti, l'incidenza della malattia ad esordio precoce è stata pari a 0.6 per 1000 nati vivi, stimando che, con l'applicazione della profilassi antibiotica *intrapartum*, erano stati prevenuti nello stesso anno 3900 casi di malattia ad esordio precoce e 200 casi di morte neonatale.

Nel 1999 l'incidenza della malattia da GBS ad esordio precoce ha dimostrato un declino del 70% rispetto agli anni '90, arrivando ad un'incidenza di 0.5 su 1000 nati vivi, avendo in tal maniera prevenuto l'insorgenza di 4500 casi di malattia e 225 morti neonatali, tutto ciò è quindi espressione di una grande efficacia della prevenzione (17).

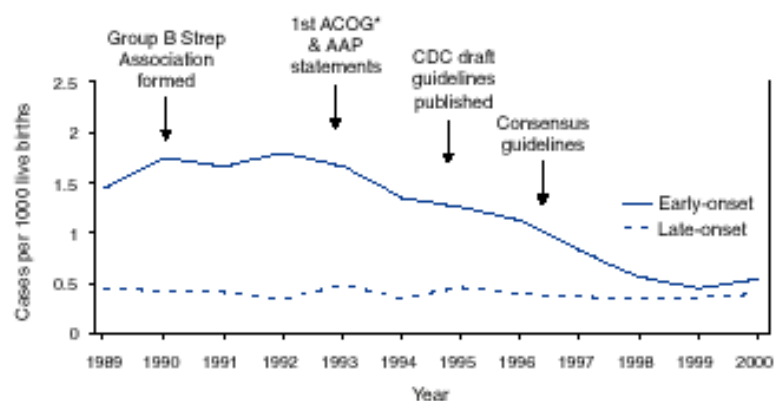
Altri paesi, che hanno adottato le linee guida del 1996 per la prevenzione della malattia perinatale da GBS in maniera simile agli Stati Uniti, hanno potuto osservare un paragonabile declino dell'incidenza della malattia ad esordio precoce (37-39).

Ulteriore conferma sull'efficacia della profilassi antibiotica *intrapartum* deriva da uno studio condotto da Daley et al. (40), nel quale si evidenzia una riduzione del 50-80% della malattia ad

esordio precoce dopo l'adozione dell'antibioticoterapia *intrapartum* alle donne colonizzate da GBS.

Recenti valutazioni negli Stati Uniti sull'incidenza della malattia ad esordio precoce suggeriscono un leggero aumento nell'incidenza dal 1999 al 2000, espressione probabilmente di un plateau nell'effetto degli sforzi di prevenzione (17).

**FIGURE 1. Incidence of early- and late-onset invasive group B streptococcal disease—selected Active Bacterial Core surveillance areas, 1989–2000, and activities for prevention of group B streptococcal disease**



\* ACOG, American College of Obstetricians and Gynecologists; AAP, American Academy of Pediatrics. **Source:** Adapted from CDC. Early-onset group B streptococcal disease, United States, 1998–1999. *MMWR* 2000;49:793–6; and Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* 2000;342:15–20.



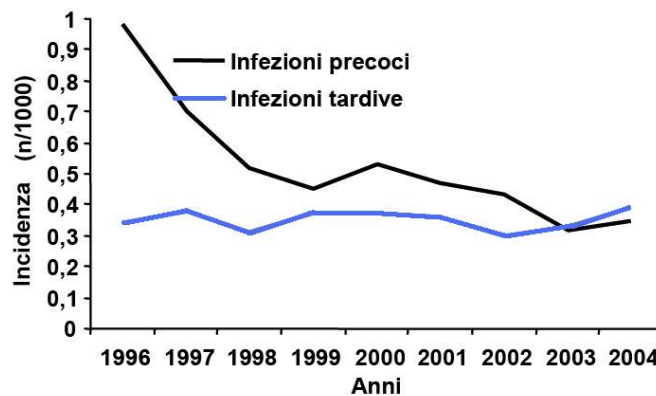


Figura 2. Incidenza di infezioni precoci e tardive da SGB suddivise per anno nelle aree di sorveglianza attiva statunitensi (modificata da CDC 2005)

Dall'analisi dei dati si può concludere che l'utilizzo della profilassi antibiotica *intrapartum* ha ridotto l'incidenza della malattia invasiva da GBS tra le gravide e la malattia ad esordio precoce nel neonato, ma non ha avuto nessun impatto sull'infezione neonatale ad esordio tardivo (34).

Sebbene ci sia un'evidente carenza di dati sull'epidemiologia dell'infezione da GBS in Europa, nonostante la minor diffusione delle strategie preventive, l'infezione precoce sembra meno frequente (41).

Ad esempio in Inghilterra, dove lo screening e/o la profilassi delle gravide sono eseguite occasionalmente, l'incidenza sarebbe di 0,5-1 /1.000 nati. Queste differenze potrebbero essere dovute ad una più bassa frequenza di colonizzazione vaginale o una ridotta stima diagnostica (42).

Comunque la conoscenza dell'intero territorio europeo è nel complesso frammentaria e sono auspicabili ulteriori studi. Alcuni

lavori condotti dimostrano che l'incidenza delle infezioni precoci in Europa è, rispetto agli studi statunitensi pre-profilassi, piuttosto bassa. Anche le infezioni tardive sembrano più rare che negli Stati Uniti (43).

Nel nostro paese non sono mai stati effettuati studi abbastanza ampi per poter calcolare l'incidenza, né una reale e recente valutazione dei sierotipi causa di infezioni.

Sono stati riportati cambiamenti di diffusione dei sierotipi sia per gli Stati Uniti che per l'Inghilterra, ma per l'Italia non si hanno notizie raccolte attraverso una sorveglianza nazionale.

Non si conosce altresì la prevalenza delle infezioni da GBS nelle varie regioni italiane, né quali siano i programmi di sorveglianza e controllo delle diverse strutture ospedaliere (16).

Anche la profilassi antibiotica al momento del parto non è eseguita in tutti gli ospedali secondo gli stessi principi, perché può essere praticata sia sulla base della positività allo screening microbiologico, sia sulla base della valutazione dei fattori di rischio al momento del parto, sistema meno costoso ma, secondo il CDC, meno efficiente (44).

Negli ultimi anni, da un'indagine condotta con la partecipazione di vari ospedali della Regione Emilia-Romagna, dove lo screening viene praticato con molta accuratezza, è stata osservata un'incidenza dello 0,5 per mille nati vivi, un valore

relativamente basso, ma comunque di rilievo dal momento che proviene da un'area dove si è cercato di applicare al meglio tutte le misure per la prevenzione (screening microbiologico e profilassi) e per il rilevamento dei casi.

Non si sa invece nulla dell'incidenza in altre aree italiane e molto poco delle misure di prevenzione applicate.

Se un'indagine retrospettiva venisse effettuata, si otterrebbero presumibilmente dati in difetto, sia per la scarsità di emocolture e rachicentesi effettuate, sia per l'utilizzazione di procedure microbiologiche non sempre ottimali.

Sull'esempio della rete sviluppata con successo in Emilia-Romagna, sta attualmente prendendo l'avvio un progetto finanziato dal Centro Nazionale per la "Prevenzione e il Controllo delle Malattie" (CCM) del Ministero della Salute e coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), per la creazione di una rete nazionale di sorveglianza, che coinvolgerà una serie di ospedali dislocati in varie parti del territorio nazionale. Verranno in un primo momento valutate le procedure correntemente in atto per la sorveglianza e il controllo delle infezioni da GBS, con un'analisi retrospettiva dei casi registrati negli ultimi tre anni, al fine di stabilire l'epidemiologia delle infezioni da GBS in Italia (11).

### 3.2 COLONIZZAZIONE

Lo *Streptococcus agalactiae* può colonizzare sia l'uomo che la donna nella porzione distale dell'intestino e nel tratto genitale potendo così essere trasmesso per via sessuale (16).

Il tratto gastrointestinale funge da serbatoio naturale per GBS ed è la fonte probabile di colonizzazione vaginale, che è insolita nell'infanzia ma diventa più comune nella tarda adolescenza (45).

Un fattore di rischio importante per la malattia neonatale ad esordio precoce è la colonizzazione materna da GBS, che può essere transitoria, cronica o intermittente. Tuttavia la precoce colonizzazione in gravidanza non è predittiva di sepsi neonatale (46).

Di tutti di neonati partoriti da donne colonizzate da GBS, circa 1-2% svilupperà la malattia invasiva ad esordio precoce (21).

Negli Stati Uniti GBS viene isolato nel 10-40% delle donne gravide, mentre in Europa la colonizzazione sembra essere meno frequente (1,5-30%) (47). In Italia, a Modena è stimata essere del 14,4%. La stima della colonizzazione è comunque fortemente influenzata da fattori quali la popolazione esaminata, le modalità di raccolta del tampone e i metodi colturali utilizzati (41).

I tassi di colonizzazione, che non sembrano essere influenzati dallo stato gravidico, possono differire in base all'etnia, a fattori geografici o all'età (6), infatti, alcuni studi statunitensi hanno dimostrato che la frequenza è più alta nelle donne ispaniche, caraibiche od afro-americane rispetto alle bianche o alle asiatiche (41).

Uno studio di Kadanali et al. (48) condotto su 150 donne incinte, presso l'ospedale universitario Erzurum (Turchia) nel periodo che va dal gennaio 2002 al febbraio 2003 ha rilevato un'incidenza di colonizzazione di circa il 32% in tutte le donne arruolate e il 17,3% di tutti i neonati è risultato essere colonizzato da GBS.

Questo studio ha dimostrato che il tasso di colonizzazione è più alto nei paesi industrializzati rispetto a quelli in via di sviluppo ed, inoltre, la colonizzazione è maggiore nelle donne di età inferiore ai 20 anni ( $P < 0,01$ ), tanto che tale età è presa come valore *cut-off* in molti studi.

Un'altra interessante correlazione, individuata anche in altri lavori, è quella esistente tra la parità e la colonizzazione, potendo considerare la multiparità un fattore di protezione (49).

Dallo studio di Kadanali et al. (48) si deduce, inoltre, che l'aumento dell'età e della parità comporta un incremento della

resistenza alla colonizzazione da GBS, anche se è difficile trovare delle spiegazioni non casuali per tali associazioni.

L'etnia e la razza risultano essere altri importanti parametri, in grado di influenzare il tasso di colonizzazione nelle donne gravide, così come è stato evidenziato da Campbell et al. (31).

Tra le donne gravide, di etnia e razza differenti arruolate in questo studio le donne nere hanno dimostrato una maggiore probabilità (37%) e le asiatiche una minore probabilità (15%) di essere colonizzate da GBS rispetto alle donne bianche (25%).

Il tasso di colonizzazione, inoltre, tra le Ispaniche (24%) e le donne native dell'America o dell'Alaska (26%) era simile a quello riscontrato tra le donne bianche.

Sebbene sia possibile spiegare la differente percentuale di colonizzazione tra le donne in funzione del diverso Paese di appartenenza, all'etnia, all'età e alla parità, l'incidenza varia anche da studio a studio. La causa è probabilmente da imputare a differenze nella ricerca del microrganismo al momento dello screening. Infatti, nonostante le linee guida dei *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) sottolineino l'importanza dell'uso di terreni selettivi e dell'aggiunta del tampone rettale a quello vaginale, molti ospedali si limitano alla coltura su terreni non selettivi di tamponi singoli.

Questo fatto, se da un lato rende più difficile calcolare quale dovrebbe essere l'attesa in termini di infezione, ha conseguenze pratiche in quanto le pazienti risultate negative alla screening ovviamente sfuggiranno alla profilassi (16).

La colonizzazione materna è distinta in una colonizzazione ad alta carica, cosiddetta colonizzazione “densa” (*heavy*), ed una a bassa carica (“*light*”) (41).

La colonizzazione *heavy*, svelata con i comuni terreni di coltura in agar-sangue, è associata all'84% circa delle infezioni neonatali precoci, inoltre, influenza l'outcome della gravidanza, con maggiore rischio di rottura di membrane, di parto pretermine o di basso peso neonatale (50).

La colonizzazione *light*, evidenziabile solamente con terreni selettivi, interessa circa 1/3 delle gravide ed è responsabile di circa il 13% delle infezioni precoci (51).

### 3.3 TRASMISSIONE

L'infezione da GBS nel neonato viene acquisita nella maggior parte dei casi in seguito alla trasmissione verticale.

L'infezione intrauterina del feto deriva dalla diffusione ascendente di GBS dalla vagina di una donna colonizzata che è in genere asintomatica.

L'aspirazione fetale di liquido amniotico infetto può condurre a mortinatalità, alla polmonite neonatale o alla sepsi.

I neonati possono infettarsi anche durante il passaggio del canale da parto e approssimativamente il 50% dei nati da madre portatrice di GBS durante il parto sarà colonizzato dallo streptococco sulla pelle e sulle mucose, ma, rimanendo asintomatico, infatti non più dell'1-2% svilupperà la malattia (16, 17, 20).

Il taglio cesareo elimina il rischio di infezione neonatale da GBS nella maggior parte dei casi, purché lo stesso sia effettuato prima dell'inizio delle contrazioni e/o della rottura delle membrane (52).

Tuttavia, poiché GBS può attraversare le membrane amniotiche integre il taglio cesareo non previene la trasmissione dalla madre al feto, inoltre, essendo questo un fattore importante per lo sviluppo di complicanze materne da GBS, ed essendo associato a rischi per la salute del feto, la colonizzazione materna non può diventare un'indicazione allo stesso e quindi il taglio cesareo non può rappresentare un'alternativa alla profilassi antibiotica *intrapartum* per la prevenzione della malattia neonatale (17).



## 3.4 PATOGENESI

### 3.4.1 FATTORI DI VIRULENZA

#### 3.4.1.1 POLISACCARIDI CAPSULARI

Gli studi sul meccanismo patogenetico delle infezioni da GBS si sono rivolti, particolarmente, ai fattori di superficie, in grado di mediare la colonizzazione delle mucose e la penetrazione a livello della barriera emato-encefalica, allo scopo di individuare possibili target di composti vaccinali.

Modelli *in vitro* hanno evidenziato come *S. agalactiae* sia in grado di aderire a cellule dell'epitelio vaginale, buccale, polmonare ed endoteliale (41).

Mediatori di questa capacità adesiva sembrano essere l'acido lipoteicoico (importante per l'adesione precoce alle cellule dell'ospite e per il rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte di monociti) e varie altre strutture proteiche presenti sulla superficie dei GBS.

Alcuni batteri patogeni si rivestono di una spessa capsula di polisaccaridi, simili a quella che si trova sulla superficie delle cellule umane. Nel caso dello *S. agalactiae*, la capsula contiene acido sialico, uno zucchero che si ritrova anche sulla superficie di tutte le cellule del corpo umano. Sembra che GBS utilizzi l'acido sialico come forma di "mimetismo molecolare" con il quale,

assomigliando alle cellule umane, evita il riconoscimento e l'istaurarsi della risposta immunitaria. Utilizzando sofisticate tecniche di analisi, si è visto che l'acido sialico della capsula di GBS è O-acetilato, una modifica chimica in precedenza mai individuata ([www.molecularlab.it](http://www.molecularlab.it)).

La capsula di GBS è, in effetti, il determinante di virulenza meglio caratterizzato. Essa ha proprietà antifagocitarie dovute ai residui di acido sialico, i quali impediscono la deposizione del componente C3 del complemento sulla superficie delle cellule e la formazione di C5a. I polisaccaridi capsulari determinano inoltre la conversione della forma attiva del C3 nella forma inattiva sulla superficie batterica (41).

Variazioni nella struttura del polisaccaride capsulare sono responsabili della divisione degli streptococchi di gruppo B in 10 sierotipi (Ia, Ib e da II a IX) (11, 14, 53, 54,55).

La maggior parte dei GBS isolati è stata sierotipizzata. Solo una piccola percentuale (circa il 7%) è risultata non tipizzabile, o perché non esprime un polisaccaride capsulare, o perché il polisaccaride prodotto non reagisce con gli antisieri tipizzanti disponibili (11).

In generale la capsula dei GBS è composta da unità ripetute di glucosio, galattosio, N-acetil glucosamina e acido sialico. Il sierotipo VIII contiene ramnosio invece di N-acetil glucosamina,

la quale manca anche nel sierotipo IV. I sierotipi Ia, Ib e III hanno come zucchero terminale l'acido sialico. Sembra che la rimozione di questo residuo porti a perdita di virulenza ed aumentata fagocitosi da parte dei neutrofili. È stata dimostrata una stretta relazione tra mancanza di anticorpi materni anticapsulari e sviluppo di infezioni invasive nel neonato (41).

Da studi epidemiologici effettuati in Europa e negli USA è emerso che i sierotipi Ia, II, III e V sono la causa più frequente di infezioni nell'uomo, tra questi i sierotipi Ia, III e V costituiscono la causa più frequente di meningite neonatale e delle infezioni a carico di donne gravide.

Il sierotipo V è la causa più frequente di infezione in tutti i gruppi di età, incluse le donne adulte non in gravidanza, mentre gli altri sierotipi sono isolati solo sporadicamente (53, 66). La distribuzione varia con la regione geografica e il gruppo etnico (57); in Giappone ad esempio sono più frequenti i sierotipi VI e VIII (55).

Ceppi con simile composizione capsulare hanno dimostrato virulenza molto diversa, suggerendo che anche altri fattori di virulenza sono coinvolti nella patogenesi dei GBS (57).

#### 3.4.1.2 PROTEINE DI SUPERFICIE

Tra i fattori di virulenza dei GBS sempre più interesse è rivolto alle proteine di superficie, le quali giocano un ruolo importante nelle diverse fasi dell'infezioni (55).

Tra queste, particolarmente degne di nota, sono le proteine del Complesso C, identificate negli anni '70 e riscontrate per la prima volta nel sierotipo Ic (oggi Ia sottotipo c) (58).

La microbiologa Rebecca Lancefield dimostrò che la somministrazione di anticorpi contro queste proteine conferiva protezione passiva ai topi neonati ai quali erano stati inoculati dosi letali di GBS esprimenti questi antigeni (41).

Successivamente, il complesso C fu caratterizzato biochimicamente e immunologicamente, e si vide che era costituito da 2 componenti proteiche: la componente  $\alpha$ , sensibile a pepsina e tripsina; e la componente  $\beta$ , sensibile alla pepsina ma resistente alla tripsina (55, 41).

Il complesso C è presente soprattutto nei sierotipi Ia, Ib e II. Si trova raramente nel sierotipo III che presenta un complesso proteico differente, il complesso R, anch'esso protettivo in modelli di infezione animale (41).

I ceppi possono esprimere contemporaneamente sia la componente  $\alpha$  che la  $\beta$  dell'antigene C (55), mentre non possono esprimere in contemporanea l'antigene C e quello R.

I componenti dei complessi proteici C e R sono stati purificati e caratterizzati. Si tratta di proteine ancorate alla superficie cellulare (*LPXTG proteins*) aventi ruoli differenti.

La proteina di superficie  $\beta$  interagisce con componenti del sistema immunitario, e più precisamente con il fattore H e la porzione Fc delle IgA, suggerendo un ruolo nell'elusione immunitaria.

La proteina  $\alpha$  e le proteine del complesso R costituiscono una famiglia di proteine di superficie: l'alpha-like protein (alp) family (41). Queste proteine sono caratterizzate da una porzione interna costituita da unità ripetute identiche (53), in numero variabile a seconda del ceppo. In tutte, fuorchè nella proteina Alp2, esiste un solo tipo di modulo ripetuto all'interno della proteina (55). La regione ripetuta, durante il processo infettivo, può ridursi in dimensioni, come meccanismo di evasione dell'immunità dell'ospite (59).

Al momento attuale sono stati identificati 6 membri della famiglia alpha-like: alpha-C, alp2, alp3, alp4, Rib ed alp1, quest'ultima da alcuni autori denominata proteina epsilon ( $\epsilon$ ) (60, 57, 55).

L'espressione di una data proteina della famiglia alpha-like, sembra essere strettamente correlata con il tipo capsulare (14).

Tutte queste proteine sono codificate da geni allelici che presentano una struttura a mosaico (53), generati dalla ricombinazione di moduli nello stesso locus cromosomico (57, 61).

Ogni ceppo esprime solo un membro della famiglia alpha-like, probabilmente all'interno di elementi mobili (53, 41).

Vi è una notevole omologia di sequenza (40-60%) tra i membri della famiglia, ma nonostante ciò le cross-reattività sono limitate. Così ad es., la proteina alpha-C non mostra cross-reattività con la proteina Rib, nonostante ci sia un'omologia del 60% tra le porzioni N-terminali e del 45% tra le unità ripetute (41).

Per quanto riguarda la funzione biologica, le proteine  $\alpha$  sembrano facilitare l'ingresso del batterio nelle cellule epiteliali e attraverso gli strati della cervice umana, legandosi a glicosaminoglicani delle cellule ospiti (53).

Questi antigeni sono studiati quali possibili candidati per la formulazione di vaccini per la prevenzione dell'infezione neonatale (41, 61-63).

#### 3.4.1.3. ALTRI FATTORI DI VIRULENZA

Molte altre proteine contribuiscono alla virulenza dello *S. agalactiae*. Tra esse, notevole interesse è oggi rivolto alle tre

proteine di superficie, FbsA, C5a peptidasi ed Lmb, che interagiscono con il fibrinogeno, la fibronectina e la laminina; nonché alla proteina escretta FbsB, anch'essa interagente con il fibrinogeno.

Tutte queste proteine legano componenti della matrici extracellulare eucariotica e/o della superficie delle cellule ospiti. Attraverso questi legami, il batterio aderisce ed invade i tessuti, causando infezioni (64-66, 55).

FbsA ed FbsB, nonostante leghino entrambe il fibrinogeno, non presentano omologia di struttura.

FbsA è il recettore maggiore per il fibrinogeno e promuove l'adesione alle cellule epiteliali ed endoteliali; FbsB, invece, sembra soprattutto mediare l'invasione delle cellule ospiti (64).

La C5a peptidasi è una serin proteasi di 128 kDa, localizzata sulla superficie, che inattiva il componente chemiotattico del complemento C5a, impedendo il reclutamento dei neutrofili nel sito di iniezione e contribuendo al processo infiammatorio. Essa inoltre, sembra legarsi alla fibronectina, favorendo così il processo di invasione delle cellule ospiti.

È stato dimostrato che il gene che la codifica, *scpB*, ha una forte omologia (98%) con un gene di *S. pyogenes* (55, 41).

Infine, Lmb è una lipoproteina espressa sulla superficie di molti (se non tutti) ceppi di *S. agalactiae*, che mostra omologia

con i membri della famiglia di proteina Lra1, i quali sono implicati nell'adesione e nel trasporto dei metalli nei gram-positivi.

Si è visto che Lmb lega la laminina, e tramite questo legame sembra giocare un ruolo nella colonizzazione ed invasione degli epiteli danneggiati.

Una proteina analoga è stata identificata anche nei ceppi di *S. pyogenes*, la cui sequenza è virtualmente identica nei diversi ceppi delle due specie (55).



## CAPITOLO 4

### 4.1 FATTORI DI RISCHIO SUPPLEMENTARI PER LA MALATTIA PERINATALE DA GBS

Sebbene la colonizzazione materna da GBS sia il prerequisito fondamentale per l'esposizione del bambino al batterio, sono stati identificati altri fattori di rischio supplementari che incrementano la probabilità di sviluppare la malattia perinatale. Approssimativamente il 50-60% dei neonati che sviluppa l'infezione da GBS ha uno o più di questi fattori di rischio (24, 74).

È possibile suddividerli in due categorie: quelli di pertinenza materna e quelli neonatali.

I fattori di rischio materni comprendono:

- ✓ Età gestazionale < 37 settimane
- ✓ Rottura delle membrane >18 h
- ✓ Febbre *intrapartum* (> 38° C)
- ✓ Batteriuria da GBS durante la gravidanza
- ✓ Età < 20 anni
- ✓ Razza afro-americana
- ✓ Etnia ispanica - caraibica

- ✓ Figlio della precedente gravidanza con infezione da GBS
- ✓ Basso livello socio-economico
- ✓ Bassi livelli dell'anticorpo anticapsulare contro GBS

I fattori di rischio neonatali includono:

- ✓ Basso peso alla nascita
- ✓ Importante colonizzazione superficiale (17, 23).

Vari autori, in differenti lavori, hanno evidenziato l'importanza dei fattori di rischio sopra elencati; nel 1985 Bayer (75) ha osservato che la possibilità di avere neonati con malattia da GBS ad esordio precoce era 6,5 volte maggiore nelle donne che partorivano prima della 37<sup>a</sup> settimana, che presentavano una rottura delle membrane > 12 h e che avevano la temperatura *intrapartum* > 37,5° C rispetto al gruppo di controllo.

Dato che il passaggio transplacentare di anticorpi materni al feto incrementa durante l'ultimo trimestre di gravidanza, la nascita pretermine incrementa il rischio di infezioni neonatali da GBS e la fatalità è più alta proprio perchè la competenza immunologica (sia la risposta umorale che cellulare) del prematuro è più bassa comparata a quella dei nati a termine (76).

Un altro fattore rilevante, nel determinare il rischio di malattia perinatale, sembra essere il livello materno degli anticorpi anti-GBS. Tale variabile è stata analizzata nello studio condotto da Campbell et al. (31), sopra citato, mettendo a confronto i livelli

di anticorpi specifici (IgG specifiche anti polisaccaride capsulare) nelle donne portatrici di GBS e nel gruppo di controllo; i dati ottenuti hanno evidenziato che, sebbene le donne colonizzate avessero più alte concentrazioni sieriche di anticorpi specifici per il sierotipo di GBS di cui erano portatrici rispetto ai controlli, più di un terzo di queste aveva comunque livelli non protettivi (0,5 µg/ml).

Sebbene, infatti, non sia nota la concentrazione protettiva di anticorpi per ciascun sierotipo, i livelli evidenziati (0,5 µg/ml) non possono svolgere un ruolo protettivo né nei confronti della madre né tanto meno nei riguardi del nascituro non preservandolo così dalla malattia neonatale (precoce e tardiva) da GBS.

Da questo studio è inoltre emerso che l'età materna possa influenzare i livelli di anticorpi specifici per GBS mentre nessun ruolo è attribuibile alla razza e all'etnia.

È stato infatti osservato che, nelle donne colonizzate di età < 20 anni la concentrazione di anticorpi IgG specifici era di 0,185 µg/ml per i sierotipi Ia, Ib, II, III, V, valore significativamente più basso rispetto a quello riscontrato nelle donne di età compresa tra i 20-29 anni ed ancora più basso rispetto a quelle di età > 30 anni. La concentrazione sierica aumenta quindi con l'aumentare dell'età.

Questa osservazione suggerisce che la colonizzazione sia vaginale che rettale da GBS determina in alcune donne una risposta immune, il cui meccanismo di attivazione non è conosciuto e così come l'intervallo di tempo che intercorre tra la colonizzazione e lo sviluppo della risposta immunitaria.

La colonizzazione materna con GBS tipo III è associata ad un più alto livello di anticorpi specifici ed è proprio la presenza di sufficienti concentrazioni di anticorpi contro tale sierotipo a determinare un rischio ridotto per la malattia neonatale causata da esso.

Questo permette di spiegare la discrepanza tra il tasso di trasmissione verticale da donne colonizzate ai loro bambini (50%) e l'insorgenza di malattia ad esordio precoce tra questi neonati (1%).

L'anamnesi materna positiva per un figlio con malattia invasiva da GBS è un altro fattore di rischio per l'insorgenza della malattia perinatale. Dunque, il riscontro nella storia anamnestica della donna di pregressi casi di malattia perinatale da GBS impone un trattamento antibiotico *intrapartum* indipendentemente dallo stato di colonizzazione presentato nella gravidanza in atto (17).

Approccio diverso, viene mantenuto nei casi di pregressa colonizzazione, infatti, la colonizzazione con GBS in una

precedente gravidanza non è considerata un fattore di rischio, perché trattandosi di un evento del tutto transitorio, molte donne colonizzate durante una gravidanza non lo saranno più in quella successiva e quindi non trova giustificazione la profilassi *intrapartum* nelle gravidanze successive (17).

## CAPITOLO 5

### 5.1 PREVENZIONE

Circa la metà dei casi di malattia invasiva da GBS si presenta nei neonati, ecco perché nella prevenzione della malattia da questi causata, la ricerca ha focalizzato i suoi studi soprattutto sulla malattia perinatale (77).

Studi e dati epidemiologici hanno individuato come migliore strategia preventiva contro la malattia perinatale da GBS la somministrazione di antibiotici, che non può avvenire né nel corso della gravidanza, perché eliminando i batteri per un breve periodo di tempo si lascerebbe il bambino non protetto al momento del parto, né dopo il parto perché generalmente è inefficace in quanto tardiva. Ne risulta che la somministrazione utile è quella effettuata *intrapartum* alle donne individuate a rischio di trasmettere GBS al nascituro (17).

Il CDC, con l'emanazione delle linee guida del 1996, ha proposto due diverse strategie per poter selezionare le donne da sottoporre a profilassi *intrapartum*.

La prima strategia prevede l'applicazione della profilassi antibiotica *intrapartum* alle donne identificate come portatrici di

GBS, basandosi sui risultati ottenuti dallo screening colturale effettuato alla 35<sup>a</sup> – 37<sup>a</sup> settimana di gestazione.

La seconda strategia invece, stabilisce che la profilassi antibiotica *intrapartum* sia effettuata alle donne che hanno uno o più dei seguenti fattori di rischio al momento del parto o della rottura delle membrane (6):

- ✓ Parto pretermine (< 37<sup>a</sup> settimana di gestazione)
- ✓ Rottura prematura di membrane
- ✓ Temperatura *intrapartum* > 38°C
- ✓ Rottura delle membrane > 18h

Sono comunque candidate alla profilassi antibiotica *intrapartum*, per entrambe le strategie, sia le donne con batteriuria da GBS durante la gravidanza in atto, sia coloro le quali hanno precedentemente partorito un bambino che ha sviluppato la malattia ad esordio precoce (17).

Si è dibattuto a lungo su quale fosse il metodo più appropriato per identificare le donne gravide da sottoporre alla chemioprolassi al momento del parto e per entrambe le strategie di selezione, proposte nelle linee guida del 1996 da AAP ed ACOG, si possono evidenziare sia dei vantaggi sia degli svantaggi.

Infatti, il metodo basato sull'esame colturale è sicuramente più costoso, richiede attenzione nell'individuare l'appropriata sede

da cui prelevare il campione e nell'uso di terreni di coltura selettivi, tuttavia offre il vantaggio di una misura quantitativa obiettiva per il monitoraggio dell'efficacia di questa strategia di prevenzione.

Il metodo basato sull'analisi dei fattori di rischio, sebbene sia più economico e teoricamente più semplice, è tuttavia più difficile da controllare perché non dispone di dati oggettivi come una raccolta di tamponi, un'elaborazione o una raccolta di risultati (40).

Nel 2002, in seguito ai risultati ottenuti dallo studio per coorte retrospettivo di Scrag et al., la CDC ha raccomandato il metodo di selezione basato sullo screening colturale. In tale studio, infatti, sono state messe a confronto le due strategie di selezione ed i risultati ottenuti hanno evidenziato che il metodo basato sull'esame colturale è oltre il 50% più efficace nella prevenzione della malattia da GBS ad esordio precoce (0.33/1000 vs 0.59/1000 nati vivi) (78).

È stato, inoltre, osservato che l'ampio utilizzo della chemioprolifassi *intrapartum* non ha determinato, comunque, l'aumento delle resistenze batteriche e delle reazioni allergiche.

Ulteriori conferme derivano da successivi studi, come quello di Smail F. del 2004 che ha affermato che solo il metodo basato



sullo screening colturale ha contribuito a ridurre l'incidenza della colonizzazione ed infezione neonatale da GBS (79).

L'efficacia dello screening colturale alla 35<sup>a</sup>-37<sup>a</sup> settimana di gestazione è stata sostenuta e dimostrata anche da Angstetra et al. (80). Nello studio pubblicato nel 2007 sono state arruolate un totale di 42471 donne pervenute al JHN, Newcastle, Australia, per partorire o per controlli, nel periodo compreso dal 1994 al giugno del 2006 (la demografia non ha subito cambiamenti nell'arco di tempo in cui si è svolto lo studio avendo Newcastle una popolazione abbastanza omogenea).

Per i primi nove anni fu adottato il metodo di selezione basato sull'analisi dei fattori di rischio e durante tale arco di tempo furono partoriti 30978 bambini e tra questi furono riportati 26 casi di malattia ad esordio precoce da GBS e 29 casi di malattia non determinata da GBS.

Quindi l'incidenza della malattia ad esordio precoce è stata pari a 0.84 per 1000 nati vivi (26 su 30978) mentre per la malattia non correlata a GBS l'incidenza è stata di 0.94 per 1000 nati vivi (29 su 30978).

Nel periodo successivo compreso tra il 2004 e il giugno del 2006 fu adottato il protocollo basato sullo screening colturale, sul materiale ottenuto mediante un tampone vaginale ed uno rettale tra la 34<sup>a</sup>-37<sup>a</sup> settimana gestazionale (con prelievo nella parte più

bassa della vagina e nel retto ad un centimetro dall'ano), il numero dei casi di malattia da GBS ad esordio precoce su 8303 bambini è stato pari a 0 mentre si sono verificati 6 casi di malattia non a questi correlata con un'incidenza di 0,72%.

Quindi da tale lavoro appare chiaro che l'utilizzo dello screening colturale, per selezionare le donne da sottoporre alla chemioprophilassi, è nettamente più efficace nel ridurre l'incidenza della malattia neonatale ad esordio precoce. A sostegno di ciò anche altri studi hanno riportato un simile decremento della malattia neonatale da GBS ad esordio precoce dopo l'istituzione di tale metodo di screening (40, 81-84)

### 5.1.2 SCREENING COLTURALE

L'accuratezza dello screening colturale, per identificare le donne che saranno colonizzate al momento del parto, può essere aumentata scegliendo il momento più corretto durante la gravidanza per eseguire il tampone, effettuando il prelievo sui corretti siti anatomici e utilizzando un appropriato metodo microbiologico per la coltura e la rilevazione dei microrganismi (17).

Il momento più corretto, per eseguire i tamponi per valutare lo stato di colonizzazione della donna, è tra la 35<sup>a</sup> e la 37<sup>a</sup> settimana

di gestazione, incrementando la sensibilità e la specificità nel rilevare quelle donne che rimarranno colonizzate al momento del parto (85, 86).

Da uno studio effettuato da Regan et al. (87), infatti, si può dedurre come la precoce identificazione della colonizzazione vaginale da parte di GBS alla 23<sup>a</sup>-26<sup>a</sup> settimana di gestazione sia un cattivo indicatore della colonizzazione al momento del parto. In tale lavoro è stato osservato che nonostante il 53% delle donne rimanga positivo al momento del parto, una parte (13%) di queste può positivizzarsi successivamente e quindi sfuggire alla profilassi.

Da quanto sopradetto è corretto affermare che lo stato di colonizzazione evidenziato alla 35<sup>a</sup>-37<sup>a</sup> settimana è certamente predittivo della colonizzazione al momento del parto (87).

La colonizzazione da GBS può essere cronica ma anche transitoria ed intermittente ed è proprio questo dato che rende possibile la colonizzazione vaginale e/o rettale in alcune donne dopo la 35<sup>a</sup>-37<sup>a</sup> settimana, epoca in cui erano risultate negative allo screening e quindi non candidate alla profilassi.

Questa è una possibile motivazione per spiegare, in parte, la presenza ancora di casi di infezione neonatale nonostante l'applicazione delle linee guida, anche se l'antibiotico-resistenza sembra svolgere un ruolo fondamentale. Ecco perché è

auspicabile in un prossimo futuro la disponibilità di un rapido test diagnostico molecolare per la determinazione della colonizzazione da effettuare al momento del parto, al fine di praticare la profilassi immediatamente (88).

Per aumentare l'accuratezza dello screening colturale è, inoltre, di fondamentale importanza effettuare il prelievo sui corretti siti anatomici.

Lo streptococco di gruppo B si localizza a livello della porzione distale del tratto intestinale, che funge da serbatoio naturale ed è la probabile fonte di colonizzazione vaginale, ecco perché bisogna eseguire il tampone sia a livello vaginale che rettale.

L'esecuzione del tampone vaginale deve essere effettuato nella parte più bassa della vagina, senza l'utilizzo dello speculum, l'associazione del tampone rettale aumenta la sensibilità dello screening rispetto all'analisi microbiologica del solo tampone vaginale (89).

È possibile utilizzare un solo tampone per effettuare il prelievo del materiale da sottoporre ad esame microbiologico, ma, qualora fossero utilizzati due tamponi questi dovrebbero essere posizionati su un unico terreno colturale, ottenendo così una riduzione delle spese di laboratorio, poiché non ha importanza, ai fini del trattamento, se lo streptococco di gruppo B sia isolato dalla vagina o dal retto (17).

Quando è utilizzato un mezzo di trasporto non-nutritivo (ad es. mezzo di *Amies*, terreno di *Stuart* senza carbone), gli streptococchi del gruppo B dei tamponi rettali e vaginali sopravvivono fino a 96 ore alla temperatura ambiente, permettendo che la spedizione dei tamponi ai laboratori di microbiologia possa avvenire senza compromettere il risultato colturale (41).

Tuttavia alcuni dati indicano che, già dopo 24 ore a 4°C, si può rilevare una diminuzione significativa della positività colturale, particolarmente dopo subcultura su agar-sangue (90).

Infatti, è stato osservato che alcuni microrganismi, come *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli* o *Enterococcus spp.*, frequentemente presenti nei tamponi vagino-rettali, possono proliferare durante il trasporto fino ad inficiare il risultato colturale, è quindi fortemente consigliata la coltura in tempi brevi dopo il prelievo (41).

Sia l'ambiente vaginale sia l'ambiente rettale sono normalmente abitati da diversi microrganismi che costituiscono la normale microflora, per cui è necessario utilizzare dei terreni selettivi per aumentare la possibilità di isolamento dello streptococco.

I terreni selettivi sono quei terreni che permettono la crescita esclusiva degli Streptococchi (non solo quelli di gruppo B).

Rispetto alla tradizionale coltura in agar sangue, i terreni selettivi ne raddoppiano l'identificazione; sono addizionati di antimicrobici che inibiscono la crescita competitiva di altri germi (ad esempio i Gram negativi) presenti normalmente nella microflora rettale.

Ne esistono di diversi tipi e dalle linee guida (17) è raccomandato l'utilizzo di un terreno selettivo come il brodo Todd-Hewitt addizionato con gentamicina (8 µg/ml) o con Colistina (10µg/ml) e acido nalidixico (15 µg/ml).

Sono delle appropriate opzioni commerciali il brodo Trans-Vag addizionato con il 5% di sangue di pecora defibrinato e il LIM brodo.

Un altro terreno di coltura è rappresentato dal Granata medium che, pur essendo il più costoso, fornisce una risposta più rapida, attraverso il viraggio colorimetrico.

È chiaro il vantaggio dell'uso di questi terreni se si vuole eseguire uno screening capillare delle donne portatrici.

Se, comunque, vi sono condizioni particolarmente a rischio, quali una corioamnioite o una rottura prematura delle membrane o minaccia di parto pretermine, l'utilizzo di terreni selettivi per la coltura del tampone vaginale rischierebbe di non identificare altri germi, quindi in queste condizioni è necessario coltivare i tamponi anche su terreni non selettivi.

Il brodo selettivo viene incubato per 18-24 ore alla temperatura di 35°-37° C con aria contenente il 5% di CO<sub>2</sub>.

Dopo aver lasciato trascorrere il tempo necessario per la proliferazione batterica si analizza l'eventuale presenza dello GBS attraverso le caratteristiche tipiche:

- ✓ ristretta zona di β emolisi,
- ✓ cocchi gram positivi,
- ✓ catalasi negativo.

A volte la zona di emolisi può essere difficile da identificare, quindi le colonie senza l'alone di emolisi dovrebbero essere testate successivamente.

Dunque, se lo streptococco non è identificato dopo 18-24 ore è necessario reincubare e rianalizzare dopo 48 ore il brodo in modo da ricercare nuovamente il microrganismo.

Per identificare lo streptococco è possibile avvalersi dell'utilizzo di differenti test di agglutinazione o dell'utilizzo di sonde genetiche per una più specifica identificazione o del test cAMP (tossina prodotta dallo GBS che è in grado di completare l'azione emolitica della citolisina β prodotta da *staphylococcus aureus*).

## CAPITOLO 6

### 6.1 INDICAZIONI ALLA CHEMIOPROFILASSI

Per una corretta prevenzione della malattia perinatale da GBS, le linee guida (17) consigliano di effettuare lo screening colturale a tutte le donne tra la 35<sup>a</sup>-37<sup>a</sup> settimana di gestazione, escludendo da tale protocollo le donne che hanno avuto batteriuria da GBS durante la gravidanza in corso o il cui figlio, nato dalla precedente gravidanza ha sviluppato la malattia connessa a GBS perché automaticamente incluse nel programma di profilassi *intrapartum*.

Quindi la profilassi *intrapartum* è indicata alle donne con:

- ✓ precedente figlio con malattia da GBS
- ✓ batteriuria da GBS durante la gravidanza in atto
- ✓ esame colturale di screening positivo durante la gravidanza

corrente

- ✓ risultato dello screening ignoto
- ✓ parto prima della 37<sup>a</sup> settimana
- ✓ temperatura al parto  $\geq 38^{\circ}$  C

L'impiego della chemioprolfassi *intrapartum* alle donne con minaccia di parto pretermine è certamente impegnativo perché il



parto pretermine è un importante fattore di rischio per la malattia perinatale da GBS ed è inoltre difficile calcolare la possibilità di arrestare il parto pretermine.

A questo bisogna aggiungere che spesso non è noto lo stato di colonizzazione della donna, dato che è raccomandata l'esecuzione dello screening tra la 35<sup>a</sup> e la 37<sup>a</sup> settimana di gestazione.

Non è stato elaborato un unico protocollo, vista la carenza di dati sufficienti, tuttavia uno degli algoritmi proposti, valuta la possibilità di somministrare gli antibiotici in relazione alla conoscenza dello stato di colonizzazione della donna.

Nel caso in cui la donna con minaccia di parto pretermine abbia già effettuato lo screening, la chemioprolifassi sarà attuata solo in caso di positività. In tal caso l'antibiotico dovrebbe essere somministrato per un totale di 48 ore (a meno che il parto non avvenga prima), anche se è possibile prolungare la somministrazione oltre tale limite.

Per le donne con esame colturale positivo per GBS è opportuno riprendere la somministrazione di antibiotici al momento del parto.

Nell'eventualità più comune che non si conosca lo stato di colonizzazione della donna è opportuno eseguire i tamponi rettali e vaginali ed iniziare la chemioterapia endovena che verrà

sospesa in caso di negatività dell'esame colturale (mancata crescita batterica nelle 48 ore).

Alcuni lavori hanno evidenziato che la somministrazione di antibiotici *intrapartum* potrebbe essere associata allo sviluppo di reazioni avverse neonatali (ad es. enterocolite necrotizzante), quindi non è consigliata la chemioprolassi qualora il medico ritenga possibile contenere il rischio di parto pretermine fino ad annullarlo o se esista una documentata negatività a GBS fino alle quattro settimane precedenti (17).

La profilassi non è indicata nelle donne con:

- ✓ pregressa gravidanza con positività colturale allo screening per GBS, a meno che anche nell'attuale gravidanza sia positivo,
- ✓ parto cesareo programmato in assenza di doglie del parto o rottura di membrana (indipendentemente dallo stato colturale da GBS delle donne),
- ✓ screening rettale e vaginale negativo effettuato in tarda età gestazionale incurante dei fattori di rischio *intrapartum*.

## 6.2 LA CHEMIOPROFILASSI E LE SUE COMPLICANZE

La profilassi antibiotica è un efficace mezzo per ridurre la possibilità di sviluppare nel nascituro la malattia determinata da

GBS, ma è importante determinare il momento più idoneo per effettuare il trattamento antibiotico durante la gravidanza.

La chemioprolifassi attuata prima dell'inizio del travaglio, è di scarsa utilità, poiché difficilmente sterilizza il serbatoio intestinale, fonte di ricolonizzazione della vagina, infatti se la donna viene trattata in gravidanza dovrà comunque eseguire anche la profilassi *intrapartum*.

Alcuni studi dimostrano che la somministrazione di antimicrobici alle donne incinte prima dell'inizio del travaglio o della rottura delle membrane non sia efficace nell'impedire la malattia neonatale da GBS (17).

In uno di questi lavori, condotto da Hall RT et al. (91), è stato provato che la somministrazione di antibiotici, alle gravide colonizzate da GBS, per una settimana durante il terzo trimestre di gravidanza non ha modificato significativamente il tasso di donne che sono rimaste colonizzate al momento del parto.

Diverso approccio è preso in considerazione per la batteriuria da GBS, che deve essere trattata sia durante la gravidanza che al momento del parto, perché indica colonizzazione densa, a rischio di complicanze materne e parto pretermine.

La chemioprolifassi *intrapartum*, che prevede l'utilizzo degli agenti antimicrobici dopo l'inizio del travaglio o della rottura delle membrane ma prima del parto, è il metodo migliore per

prevenire sia la malattia ad esordio precoce nel bambino sia le manifestazioni materne da GBS.

L'efficacia della profilassi *intrapartum* è stata analizzata da più ricercatori in differenti lavori, come da Boyer et al. (5) che hanno dimostrato come la colonizzazione neonatale e la malattia ad esordio precoce, sia nettamente più bassa nel gruppo di bambini nati da donne colonizzate sottoposte alla chemioprophilassi, rispetto a quelle non trattate ( 9% contro 51%,  $p < 0.001$ ). Inoltre la chemioprophilassi antibiotica è efficace nel ridurre le manifestazioni infettive nel puerperio.

La profilassi dovrebbe essere iniziata quattro ore prima della nascita del bambino (44).

Lijoi D. et al. (88) in un studio recente, hanno dimostrato una significativa differenza ( $p < 0.001$ ) nel tasso di colonizzazione tra i neonati del gruppo delle donne che hanno ricevuto la chemioprophilassi *intrapartum* almeno quattro ore prima della nascita (3,7%) e i neonati di quelle a cui è stata effettuata meno di quattro ore prima (12,3%).

Tuttavia non esistono studi che esaminano esaurientemente la durata della profilassi *intrapartum* (92).

Per la prevenzione della malattia neonatale ad esordio precoce è stata dimostrata in differenti prove cliniche l'efficacia della penicillina (93) e dell'ampicillina (5).

La via di somministrazione consigliata è quella endovenosa, perché le concentrazioni intramniotiche così ottenute sono nettamente più alte rispetto a quelle ottenute con qualsiasi altra via.

Per quanto riguarda la posologia le linee guida del 2002 (17) raccomandano di eseguire la profilassi con Penicillina G, 5 milioni di unità (3 gr.) e.v. come dose iniziale, quindi 2,5 milioni di unità (1,5 gr.) e.v. ogni quattro ore fino al parto.

Una valida alternativa è rappresentata dall'ampicillina e.v. (2 gr. e.v. e poi 1 gr. e.v. ogni quattro ore).

La penicillina è tuttavia da preferire, perché è dotata di un più ristretto spettro di attività antimicrobica e può determinare meno probabilmente lo sviluppo di resistenza antibiotiche.

Sebbene l'utilizzo degli antibiotici abbia avuto un forte impatto positivo sulla prevenzione delle malattie da GBS non è scevro da importanti complicanze, che sono rappresentate dalle reazioni allergiche e dallo sviluppo di resistenze tra i microrganismi.

Le reazioni anafilattiche sono molto rare ed ampiamente compensate dal bilancio rischio/beneficio.

Nonostante la penicillina ed in genere le  $\beta$ -lattamine siano privilegiate da un elevato indice terapeutico, data la tossicità quasi assente, sono tuttavia possibili delle reazioni allergiche

anafilattoidi scatenate dalla struttura chimica della molecola che mima quella di un oligopeptide.

Sebbene il rischio tra le donne e i bambini di sviluppare una reazione anafilattica fatale sia stato stimato essere di 1 su 100.000 (94, 95), molto più alta è la possibilità di sviluppare reazioni anafilattiche meno gravi o altro tipo di reazioni avverse.

Se la donna da sottoporre alla profilassi *intrapartum* fosse allergica alla penicillina, ma non è ad alto rischio di sviluppare una reazione anafilattica, le linee guida del 2002 consigliano l'impiego della Cefazolina, alla dose iniziale di 2 gr. e.v. e di continuare con 1 gr. e.v. ogni 8 ore fino al momento al parto.

Qualora la donna dovesse essere ad alto rischio di sviluppare reazioni anafilattiche i farmaci consigliati dalle linee guida sono: la Clindamicina (900 mg ogni 8 ore fino al parto) o Eritromicina (500 mg ogni 6 ore fino al parto).

Oltre alle reazioni anafilattiche lo sviluppo di resistenze antibiotiche tra i microrganismi rimane una delle complicanze più importanti della profilassi *intrapartum*. In tali casi, quindi, quando i microrganismi sono resistenti alla clindamicina o all'eritromicina o se la sensibilità a questi non è nota, la Vancomicina (1 gr. e.v. ogni 12 ore fino al parto) rappresenta la migliore opzione terapeutica.

Negli Stati Uniti sono segnalate crescenti resistenze verso i macrolidi (10-20% dei casi, soprattutto verso l'eritromicina), mentre non ne sono segnalate verso la penicillina, la cefazolina o la vancomicina. Per tale motivo è bene riportare l'allergia della donna alle penicilline già durante lo screening colturale, in modo che il laboratorio microbiologico testi prima del parto la sensibilità dello *Streptococcus agalactiae* ai macrolidi (eritromicina e claritromicina).

La sensibilità dello streptococco ai macrolidi è quantificata misurando il diametro dell'alone di inibizione (per la claritromicina, diametro:  $\geq 19$  mm = sensibile; 16-18 mm = sensibilità intermedia;  $\leq 15$  mm = resistente; per l'eritromicina, diametro:  $\geq 21$  mm = sensibile; 16-20 mm = sensibilità intermedia;  $\leq 15$  mm = resistente).

Dato l'impatto dell'antibiotico-resistenza, questa è stata studiata da diversi autori e tra questi anche Edwards et al. (96).

Da questo studio è emerso che nonostante l'adozione della profilassi antibiotica *intrapartum*, promossa dalle linee guida, non si è assistito ad una diminuzione della sensibilità di GBS alla penicillina ed ampicillina. Infatti tra gli undici antibiotici testati, la penicillina G rimane uno degli agenti più attivi con una MIC90 di 0,062 µg/ml (range 0,031-0,125).

Lo streptococco risulta sensibile a: penicillina, ampicillina, cefotaxime, cloramfenicolo, vancomicina, cefalozina; inoltre tra gli antibiotici di più recente introduzione sono da ricordare: imipenem, meropenem, cefipime, linezolid, quinupristin-dalfopristin.

I fluorochinoloni sono un'altra classe di antibiotici attiva su GBS, ma a partire dal 2003 sono apparsi i primi casi di resistenza in Giappone, per mutazioni su *gyrA* e *parC* (regioni determinanti la resistenza ai chinoloni).

La resistenza di GBS all'eritromicina e alla clindamicina è emersa da molti anni ed è incrementata raggiungendo nel Nord America valori compresi tra il 7-25% per l'eritromicina e il 3-15% per la clindamicina (96).

Sono state evidenziate variazioni geografiche per l'incidenza della resistenza ai macrolidi, più alta in California rispetto alla Florida, una maggiore resistenza per i sierotipi V ed infine le donne di razza nera sono più frequentemente colonizzate da sierotipi resistenti ai macrolidi.

I meccanismi più frequentemente coinvolti nella resistenza batterica ai macrolidi sono la modifica del sito bersaglio e l'efflusso attivo.

Il meccanismo di efflusso attivo richiede geni multipli (*mrsA*, *smp*, *stp*, *mefA*, *mefB*) ed è dipendente da ATP.



Il meccanismo più importante di resistenza ai macrolidi consiste in una modifica del sito di legame sia nelle proteine ribosomiali che nell'rRNA.

Infatti numerosi isolati clinici resistenti agli antibiotici sintetizzano enzimi che attuano modifiche post-trascrizionali in rRNA 23S attraverso la demetilazione di un residuo specifico di adenina del nucleotide impedendo il legame dell'antibiotico.

La diminuzione dell'incidenza della sepsi ad esordio precoce associata a GBS non è stata accompagnata ad un aumento dei casi di sepsi determinate da altri microrganismi, compresi quelli resistenti agli antibiotici.

Molti lavori (97-99) hanno analizzato il tasso di incidenza delle sepsi a esordio precoce causate da microrganismi diversi da GBS, compreso *E. coli*, durante il periodo in cui è aumentato l'utilizzo della chemioprolassi *intrapartum*, dall'analisi dei dati l'incidenza si è mantenuta stabile o in diminuzione.

Alcuni studi hanno riportato un incremento del numero dei casi di sepsi neonatale causata dall'*E. coli* e da altri microrganismi gram-negativi o resistenti all'ampicillina, tuttavia questo aumento è limitato solo ai neonati pretermine o di basso peso alla nascita (100-102).

Altri lavori hanno evidenziato inoltre, una relazione tra l'utilizzo della profilassi *intrapartum* e sepsi ad esordio precoce

sostenute da *E. coli* o da microrganismi resistenti all'ampicillina (101-105), ed è emerso un legame tra queste e la dose e il tempo di somministrazione dell'antibiotico, tuttavia non è stato possibile trarre delle considerazioni definitive.

## CAPITOLO 7

### 7.1 NUOVE PROSPETTIVE

Sebbene l'introduzione dello screening retto-vaginale alla 35<sup>a</sup>-37<sup>a</sup> settimana di gestazione, seguito dal trattamento *intrapartum* con la penicillina, abbia ridotto l'incidenza della malattia nei neonati e nella donna (5, 52), i bambini prematuri restano ad alto rischio di infezione.

Inoltre lo screening non viene effettuato in tutti i paesi: in Inghilterra ed in parte della Germania la profilassi antibiotica è basata unicamente sui fattori di rischio (41), verosimilmente perché oltre ai costi elevati, si temono le reazioni allergiche individuali e lo sviluppo di ceppi resistenti (106)

Nel 2002 la CDC ha sottolineato infatti l'importanza dello sviluppo di nuove tecnologie di prevenzione, come un test rapido per valutare lo stato di colonizzazione e un vaccino per prevenire la malattia da GBS.

È auspicabile, infatti, un test che valuti, in tempi rapidi, lo stato di colonizzazione da GBS della donna all'inizio del travaglio e al momento della rottura delle membrane, in modo da permettere

l'esecuzione di un'adeguata profilassi *intrapartum* a coloro che sono state identificate portatrici.

Affinché un test rapido si possa considerare efficace è necessario che abbia un'alta sensibilità, comparabile a quello dell'esame colturale, che dia i risultati in breve tempo, in modo da effettuare correttamente la profilassi prima del parto, e che la sua esecuzione possa entrare nella routine di laboratorio.

Anche se il test fosse altamente sensibile e rapido ma non disponibile 24 ore al giorno e 7 giorni la settimana non potrebbe considerarsi adeguato (17).

Sono stati condotti diversi studi (107, 108) che dimostrano l'efficacia del test ma non esistono ancora risultati definitivi e sono necessarie ulteriori ricerche.

Una nuova alternativa è la creazione di un vaccino che, inducendo lo sviluppo di una reazione immunitaria nella donna, sia efficace nella prevenzione della malattia perinatale da GBS (sia quella ad esordio precoce che tardivo) attraverso il passaggio transplacentare degli anticorpi materni (109, 110).

Infatti, molti studi sostengono che la predisposizione alla malattia neonatale da GBS sia causata dalla mancanza dell'anticorpo anticapsulare materno (85, 111), quindi l'immunizzazione attiva materna potrebbe essere efficace

nell'impedire sia la malattia peripartum nella donna sia la malattia neonatale (112).

Tuttavia l'efficacia potenziale del vaccino potrebbe essere limitata sia dal ridotto passaggio transplacentare di anticorpi protettivi prima della 32<sup>a</sup>-34<sup>a</sup> settimana di gestazione, sia dalla difficoltà nella diffusione del vaccino tra le donne incinte (6).

Sono attualmente in fase di studio parecchi vaccini contro il polisaccaride capsulare di GBS (113), ma i primi studi per lo sviluppo di un vaccino contro GBS risalgono agli anni '70, quando Baker e Kasper hanno affermato che il rischio di infezione neonatale invasiva è inversamente proporzionale ai livelli di anticorpi materni diretti contro i polisaccaridi capsulari (CPS) (85).

Pertanto, un primo approccio per la prevenzione dell'infezione perinatale è stato quello di sviluppare un vaccino polisaccaridico (112), tuttavia dai dati ottenuti è emerso che solo il 60% degli individui vaccinati ha mostrato risposte anticorpali significative (112, 113), è infatti noto che i vaccini polisaccaridici sono moderatamente protettivi negli adulti e inefficaci nei neonati (114).

Per questo motivo, gli studi successivi si sono concentrati sullo sviluppo di un vaccino glicoconiugato.

Grazie alla coniugazione dei polisaccaridi con proteine carrier è infatti possibile indurre una risposta immunitaria umorale più efficace e oltretutto in grado di indurre memoria, quindi non solo una protezione a breve termine (115).

Polisaccaridi dei sierotipi di GBS II, III e V coniugati alla tossina tetanica (TT) hanno dimostrato, in fase 1 e 2 dei trials clinici, di essere sicuri e immunogenici negli adulti sani (116, 117).

Nonostante un vaccino costituito dalla combinazione di questi glicoconiugati sia in grado di proteggere dalla maggior parte dei sierotipi di GBS responsabili delle manifestazioni patologiche negli Stati Uniti, esso non offre protezione contro quei sierotipi patogeni che sono prevalenti in altre parti del mondo (ad esempio contro i sierotipi VI e VIII, predominanti in Giappone) (118).

Inoltre, dati di sequenza indicano che nei ceppi di GBS può avvenire un cambiamento di sierotipo per trasferimento orizzontale dei geni codificanti gli enzimi per la sintesi dei vari tipi di capsula (119).

Per ottenere un vaccino universale basato sulla componente polisaccaridica di GBS, sarebbe pertanto necessario combinare in un'unica formulazione i glicoconiugati relativi a tutti e dieci i sierotipi esistenti.

In ogni caso, tale vaccino non coprirebbe i ceppi non tipizzabili, il cui numero è in aumento negli Stati Uniti.

Per questo motivo si è pensato allo sviluppo di un vaccino proteico capace di indurre una protezione a più ampio spettro.

Gli studi volti allo sviluppo di questo tipo di vaccino si sono basati sulla ricerca di proteine esposte sulla superficie del batterio, in quanto più accessibili agli anticorpi.

Dato che, le proteine localizzate sulla superficie sono potenzialmente implicate nei primi stadi dell'infezione, adesione alle cellule epiteliali e interazione con la matrice extracellulare umana, anticorpi specifici diretti contro di esse potrebbero quindi bloccare la colonizzazione e lo sviluppo della patologia (120).

Queste ricerche hanno portato all'identificazione di diversi potenziali antigeni alcuni dei quali sono però molto variabili in sequenza (ad esempio quelli appartenenti alla famiglia Rib, alfa e beta contengono un numero variabile di unità ripetitive) e quindi in grado di indurre anticorpi protettivi contro il ceppo omologo, ma di dare una protezione molto ridotta contro i ceppi eterologhi. Negli ultimi anni si sono aperte nuove prospettive per la ricerca di un vaccino universale contro GBS, grazie alla disponibilità di nuove tecnologie che hanno consentito di decifrare la sequenza genomica di interi microrganismi (41).

Le prime analisi bioinformatiche effettuate sulle sequenze genomiche di due isolati clinici di GBS (119-121), hanno dato indicazione di un'elevata variabilità genetica all'interno di questa specie microbica.

Questo dato è stato confermato dalla successiva analisi di 8 diversi genomi, che ha consentito di identificare, oltre ai 1811 geni presenti in tutti i ceppi di GBS, un gruppo di 765 geni (20% dell'intero genoma), presenti solo in alcuni dei ceppi esaminati (122).

Dall'insieme di queste 2576 proteine conservate e variabili, sono state individuate mediante analisi bioinformatica 589 proteine potenzialmente esposte sulla superficie del microrganismo, 312 delle quali sono state espresse e purificate in *E. coli* ed utilizzate per immunizzare animali di laboratorio.

La selezione dei migliori antigeni è stata effettuata mediante analisi citofluorimetrica dell'effettiva esposizione sulla superficie del batterio, saggi di battericidia in vitro e modelli animali, dove è stata analizzata la capacità di conferire protezione ai neonati da parte di femmine di topo immunizzate prima dell'accoppiamento. Per queste analisi è stato utilizzato un pannello di ceppi rappresentativo della variabilità genetica di GBS.

Questo approccio, che ha rivelato un'elevata variabilità anche a livello di espressione dei singoli antigeni nei diversi ceppi, ha



portato all'identificazione di una combinazione di proteine capaci di indurre protezione contro un largo spettro di isolati clinici, ponendo la base per lo sviluppo di un vaccino universale (123).

La caratterizzazione di tre di questi nuovi antigeni ha consentito di scoprire strutture a forma di pilo che protrudono dalla superficie del batterio, mai osservate in precedenza in GBS (Figura 5).

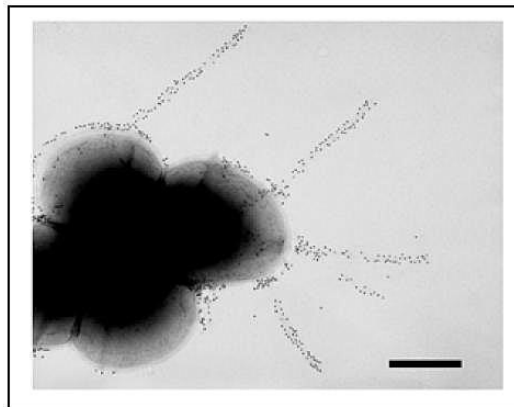


Figura 5. Analisi al microscopio elettronico a trasmissione del ceppo di GBS JM9130013 dopo marcatura *immunogold*; sono visibili le strutture a forma di pilo contenenti antigeni protettivi

Successivi studi hanno dimostrato che queste strutture contenenti antigeni protettivi possono essere trasferite *in toto* nel microrganismo non patogeno *L. lactis*, con la conseguente possibilità di ottenere un vaccino multivalente di tipo mucosale (124).

In definitiva, le prospettive di un vaccino per l'eradicazione dell'infezione causata da questo importante patogeno sono ora più concrete.

Per assicurare lo sviluppo di un vaccino efficace sarà comunque importante monitorare accuratamente la variabilità degli isolati clinici presenti a livello globale, in modo da includere le componenti polisaccaridiche e/o proteiche comuni al maggior numero possibile di varianti del microrganismo.

## **CAPITOLO 8**

### 8.1 SCOPO DEL LAVORO

Il nostro lavoro è stato svolto presso il Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche dell'Università di Catania. Scopo del lavoro è stato quello di valutare in un campione di 60 donne gravide, sottoposte a screening culturale per la prevenzione della malattia da GBS, la frequenza di colonizzazione, la distribuzione sierotipica e l'epidemiologia molecolare di alcuni fattori di virulenza.

In particolare sui ceppi isolati è stato svolto uno studio volto alla ricerca dell'eventuale presenza di geni codificanti per le proteine di superficie "alp", alla valutazione della chemiosensibilità agli antibiotici e alla ricerca di genotipi di resistenza ai macrolidi.

### 8.2 MATERIALI E METODI

Il campione è stato rappresentato da 60 donne gravide, 30 primigravide e 30 multipare, comprese fra la 35<sup>a</sup> e la 37<sup>a</sup> settimana di amenorrea, alle quali, in corso di screening per la

prevenzione della malattia neonatale da GBS, è stato effettuato un doppio tampone: uno vaginale (con prelievo nel terzo inferiore della vagina) ed uno rettale (con prelievo a circa un centimetro dall'orificio anale).

**a. Coltivazione**

I tamponi sono stati seminati, previo arricchimento in THBCN (Todd-Hewitt Broth-Colistina-Nalidixico), su terreno solido cromogeno per GBS (strepto B-Biomerieux), su cui essi danno luogo a colonie pigmentate da rosa pallido a rosso (mentre altri microrganismi sviluppano colonie incolori, viola, blu, ecc).

Ha fatto seguito un'incubazione a 37° C in GAS-PAK per 24 ore.

**b. Identificazione**

Le colonie di colore dal rosa intenso al rosso cresciute entro il tempo di incubazione sono state confermate come appartenenti ai GBS mediante test di agglutinazione al lattice (Strepto-kit-Biomerieux), che è un metodo di estrazione rapida dell'antigene della parete cellulare seguita da una reazione di agglutinazione con l'anticorpo corrispondente. Il test è eseguito direttamente sulla colonia e se si tratta di GBS si vedrà agglutinazione.

Tutti i GBS isolati sono stati conservati a  $-80^{\circ}$  C per le successive indagini.

#### c. Valutazione della chemiosensibilità

Per la valutazione della chemiosensibilità sono stati utilizzati i seguenti antibiotici: eritromicina, josamicina, clindamicina e ampicillina.

La MIC (Minima Concentrazione Inibente) degli streptococchi isolati è stata determinata con il metodo della microdiluizione in piastra, secondo le indicazioni del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (125, 126).

Differenti concentrazioni di ciascun antibiotico usato sono state distribuite in piastre per microtitolazione (Biby-Sterilin,UK), in modo da ottenere undici diluizioni. Ogni ceppo isolato ed ogni antibiotico sono stati saggiati a ripetibilità otto. La minima concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita (visibile ad occhio nudo) è stata definita come MIC.

L'assegnazione alla categoria "sensibile" o alla categoria "resistente" è stata fatta in accordo al CLSI.

#### d. Estrazione del DNA

I microrganismi sono stati fatti crescere in piastre di agar-sangue e una singola colonia è stata inoculata in 50 ml di Todd-

Hewitt broth. Dopo incubazione a 37° C “overnight” sono stati effettuati dei lavaggi con PBS (Phosphate-Buffer saline) e trattamenti con lisozima, SDS (sodio dodecil solfato) e proteinasi K. Il DNA è stato fatto precipitare in etanolo al 70%. (127)

#### e. Ricerca dei genotipi resistenti ai macrolidi

Per ricercare i genotipi di resistenza sono stati impiegati *primers* specifici (128-130). Le condizioni di amplificazione e le modalità di rilevazione della presenza dei geni sono quelle descritte in letteratura.

I primers utilizzati sono i seguenti:

- ✓ *ermA*(forward): 5’CATAAGGAGGAGTTAAATAT- 3’
- ✓ *ermA* (reverse): 5’- GCATGACATAAACCTTCA- 3’
- ✓ *ermB* (forward): 5’ - CTCAACCAAATAATAAAACA- 3’
- ✓ *ermB* (reverse): 5’ – CAAAAGCGACTCATAGAA- 3’
- ✓ *mefA* (forward): 5’ – AGTATCATTAATCACTAGTGC-3’
- ✓ *mefA* (reverse): 5’ – TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG- 3’

#### f. Ricerca del sierotipo e delle proteine alpha

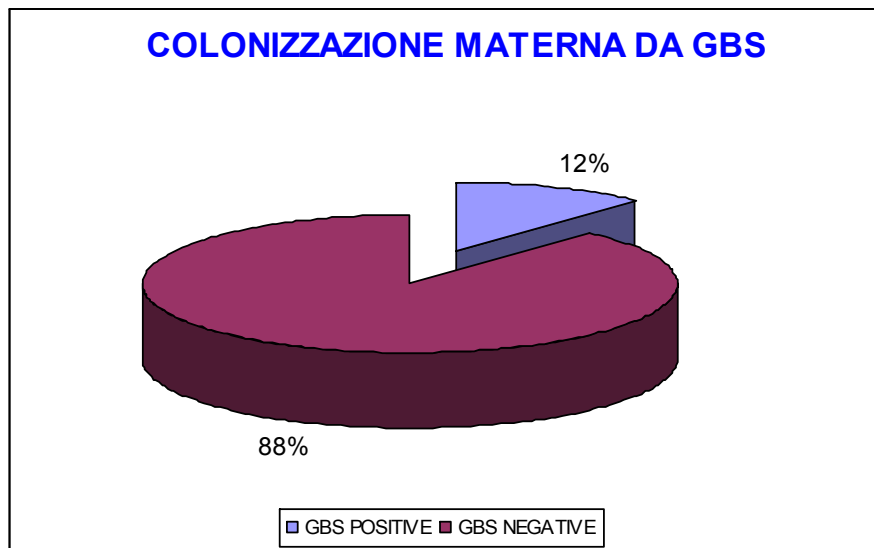
Per la determinazione del sierotipo capsulare e delle proteine “alpha” è stata adottata la metodica della PCR Multiplex come da protocollo presente in letteratura (53, 131-133).

## 8.3 RISULTATI

### 8.3.1 EPIDEMIOLOGIA

Delle 60 donne arruolate nel nostro studio il 12% (n.= 7) è risultato colonizzato da GBS.

**Grafico 1:** Colonizzazione materna da GBS

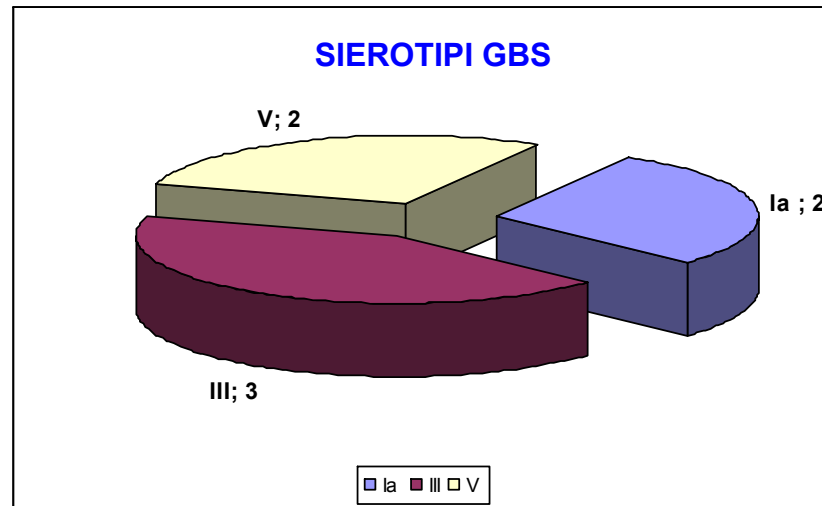


### 8.3.2 SIEROTPIZZAZIONE

Dalla sierotipizzazione dei 7 GBS isolati è emerso che:

- ✓ 2 GBS appartengono al sierotipo Ia.
- ✓ 3 GBS appartengono al sierotipo III.
- ✓ 2 GBS appartengono al sierotipo V.

**Grafico 2: Sierotipi GBS**



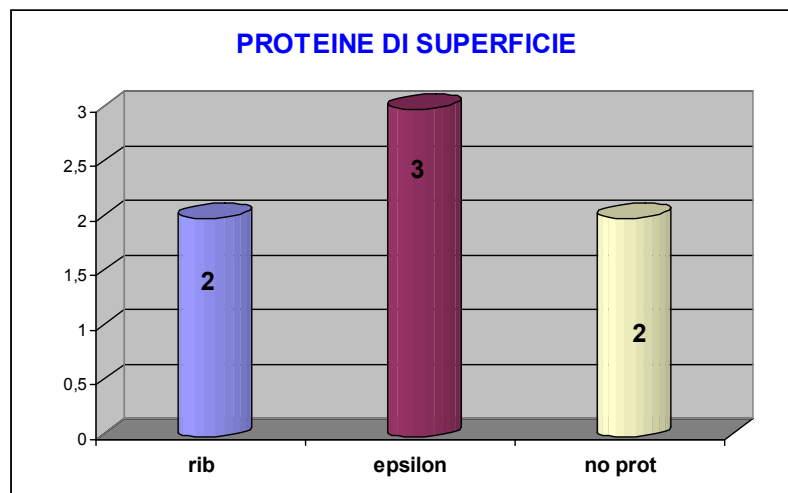
### 8.3.3 IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE DI MEMBRANA

Dall'identificazione delle proteine di membrana è emerso che:

- ✓ 3 GBS esprimono la proteina epsilon = 200 bp
- ✓ 2 GBS esprimono la proteina rib = 298 bp
- ✓ 2 GBS non esprimono alcuna proteina di superficie.



**Grafico 3:** Espressione delle proteine di superficie



#### 8.3.4 ASSOCIAZIONE SIEROTIPO/PROTEINE DI SUPERFICIE

Mettendo insieme i dati ottenuti dalla sierotipizzazione e quelli delle espressione delle proteine di superficie si è giunti alle seguenti associazioni:

**Tabella 1:** associazione sierotipo/proteine di superficie

Sierotipo	Proteine di superficie		
	Epsilon	Rib	No Prot.
Ia	2		
V	1		1
III		2	1

### 8.3.5 CORRELAZIONE TRA I DATI MATERNI E QUELLI DI GBS

Dall'analisi dei dati della donne colonizzate e quelli relativi al GBS isolato è emerso quanto segue:

**Tabella 2.**

<b>N°</b>	<b>età</b>	<b>parità</b>	<b>settimana</b>	<b>sierotipo</b>	<b>prot. superf.</b>
1	22	primigravida	35 <sup>a</sup>	Ia	epsilon
2	25	primigravida	35 <sup>a</sup>	III	/
3	27	pluripara	35 <sup>a</sup>	V	epsilon
4	30	pluripara	36 <sup>a</sup>	Ia	epsilon
5	28	pluripara	35 <sup>a</sup>	III	rib
6	31	primigravida	36 <sup>a</sup>	V	/
7	30	pluripara	35 <sup>a</sup>	III	rib

### 8.3.6 VALUTAZIONE DELLA CHEMIOSENSIBILITA'

Sono state saggiate le MIC dei sette GBS isolati ai seguenti antibiotici:

- ✓ eritromicina
- ✓ josamicina
- ✓ clindamicina
- ✓ ampicillina

Rilevando i seguenti valori:

**Tabella 9: MIC( $\mu\text{g/ml}$ ) GBS**

N°	Sierotipo	Eritromicina	Josamicina	Clindamicina	Ampicillina
1	Ia	<0,125	0,25	<0,125	0,06
2	V	>64	>64	>64	0,03
3	III	0,125	0,25	0,125	/
4	V	>64	>64	>64	0,12
5	III	<0,125	0,25	<0,125	0,06
6	III	<0,125	0,25	<0,125	0,06
7	Ia	<0,125	0,25	<0,125	0,03

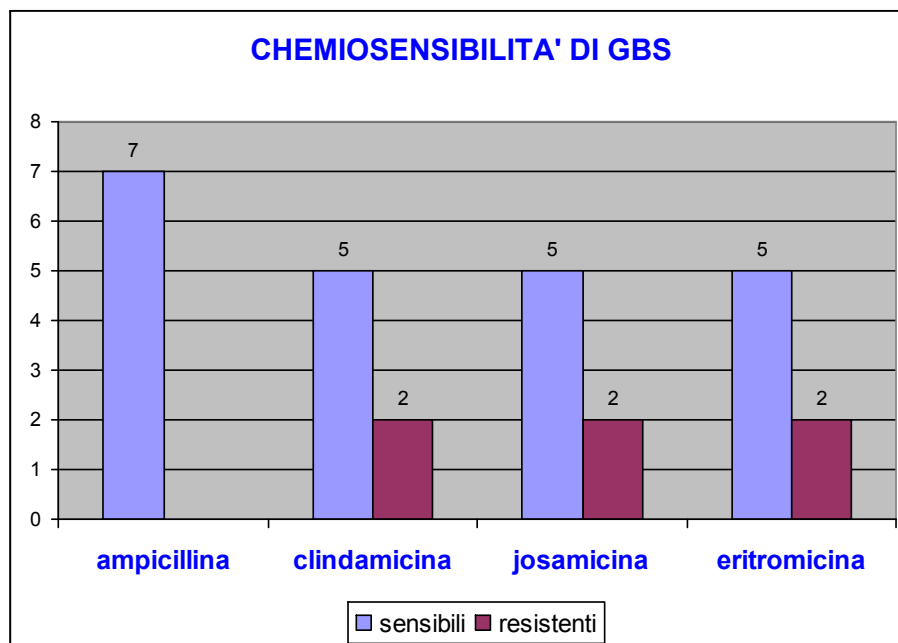
**Tabella 10: MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) di riferimento**

antibiotico	Sensibile	Intermedio	Resistente
Ampicillina	$\leq 0,12$	0,25-2	$\geq 4$
Eritromicina	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
Josamicina	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Clindamicina	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$

Valutando le MIC e mettendole a confronto con i valori di riferimento si evince che:

- ✓ ampicillina: 7 GBS sensibili
- ✓ clindamicina: 5 GBS sensibili e 2 resistenti
- ✓ josamicina: 5 GBS sensibili e 2 resistenti
- ✓ eritromicina: 5 GBS sensibili e 2 resistenti.

**Grafico 5:** Chemiosensibilità di GBS



#### 8.4 DISCUSSIONE

Dai risultati ottenuti sul campione esaminato, il 12% (n. = 7) delle donne gravide arruolate è risultato positivo allo screening colturale per la ricerca dello Streptococco di gruppo B (grafico 1). Il tasso di colonizzazione riscontrato è stato, pertanto, più basso di quello riportato dagli studi epidemiologici statunitensi (10-40%), entro il *range* d'incidenza europea (1,5-30%), ed è paragonabile ai pochi dati italiani (Modena 14%).

Il campione da noi selezionato è risultato piuttosto omogeneo per età (*range* 22-31), razza (bianca), etnia (caucasica) e provenienza geografica, pertanto non è stato possibile trarre

nessuna correlazione tra i sopracitati fattori e la colonizzazione materna. I risultati ottenuti, quindi, non possono né confermare né confutare i dati riportati da alcuni lavori presenti in letteratura, i quali sostengono che l'età materna (< 20 anni), la razza (nera) e l'etnia (ispanica, caraibica e afro-americana) siano in grado di influenzare la colonizzazione.

Premesso che il campione di donne da noi selezionato ha mostrato un ugual numero di primigravide (30) e pluripare (30), si è valutata l'esistenza di un'eventuale correlazione tra la colonizzazione da GBS e il grado di parità. Nel gruppo di donne positive allo screening il numero delle primigravide (3) e quello delle pluripare (4) (tabella 2) è risultato sovrapponibile. Questo potrebbe farci affermare che la parità non sembra essere in grado di influenzare la colonizzazione, a differenza dell'associazione evidenziata da alcuni studi presenti in letteratura (multiparità associata ad una minore incidenza di colonizzazione). Tuttavia il nostro risultato potrebbe derivare dal numero non eccessivamente ampio del campione da noi esaminato.

La distribuzione sierotipica (grafico 2), dei GBS isolati (2 Ia, 2 V e 3 III), concorda con i dati epidemiologici presenti in letteratura, che individuano la maggiore diffusione dei sierotipi Ia, III e V in America ed in Europa e li indicano come i maggiori responsabili delle infezioni nei neonati e nelle donne gravide.

Inoltre, nel nostro lavoro, non sono stati individuati i sierotipi VI e VIII che sono, invece, maggiormente diffusi in Giappone.

Dei sierotipi isolati è stata valutata la presenza delle proteine di membrana (3 *epsilon*, 2 *rib* e 2 non esprimono la proteina) (grafico 3), ed in accordo con i dati riportati in letteratura, si è evidenziata l'associazione per entrambi i sierotipi Ia con la proteina epsilon, l'associazione per uno solo dei due sierotipi V con la proteina di membrana epsilon mentre due dei tre sierotipi III esprimono la proteina di superficie rib; per i rimanenti due ceppi non è stata identificata alcuna proteina di membrana (tabella 1).

Per quanto riguarda la terapia antibiotica il GBS è costantemente sensibile all'ampicillina. Tuttavia qualora non fosse possibile utilizzarla, per la presenza di reazioni allergiche, i macrolidi (eritromicina, josamicina) ed i lincosamidi (clindamicina) rappresentano una valida alternativa. Raramente i GBS sono resistenti alle penicilline, tuttavia, questo è un evento non poco infrequente per le altre classi di antibiotici. Nel nostro lavoro è stata valutata la MIC dei singoli ceppi di GBS, per studiare la chemiosensibilità ai quattro tipi di antibiotici (eritromicina, josamicina, clindamicina, ampicillina). Mettendo a confronto le MIC di riferimento con quelle ottenute nel nostro studio (tabella 9, 10) si è evidenziato che tutti i GBS isolati erano

sensibili all'ampicillina e 5 dei 7 ceppi isolati erano sensibili alle altre tre classi di antibiotici analizzati, mentre 2 GBS, entrambi appartenenti al sierotipo V, mostravano un elevato grado di resistenza per i tre antibiotici saggiati (grafico 7). Per questi due ultimi ceppi di GBS è stato, dunque, effettuato lo studio dei geni che ha mostrato, come prevedibile basandoci sul fenotipo costitutivo (resistenza sia ai macrolidi che ai lincosamidi), la presenza in particolare del gene *erm* (B) associato con *mef* (A), noti per determinare resistenza batterica.

Le sette donne del nostro studio, risultate positive allo screening colturale, hanno partorito spontaneamente, per via vaginale, a termine di gravidanza (39<sup>a</sup>-41<sup>a</sup> settimana). Tutte sono state sottoposte, come da protocollo, alla chemioprolassi *intrapartum* con la somministrazione e.v. dell'ampicillina alla posologia di 2 gr. e.v. e poi 1 gr. e.v. ogni quattro ore cominciando la profilassi dopo l'inizio del travaglio.

Anche per le donne colonizzate da ceppi resistenti ai macrolidi appartenenti al sierotipo V, è stato possibile utilizzare l'ampicillina, grazie all'anamnesi negativa delle donne in esame, per l'allergia alle penicilline. Il decorso fisiologico ed afebrile del puerperio e, soprattutto, la mancanza di manifestazioni da infezione da GBS, sia ad esordio precoce che tardivo dei neonati

delle donne sottoposte a trattamento, dimostra e conferma l'efficacia della profilassi antibiotica *intrapartum*.

In conclusione, nonostante siano in fase di studio nuove metodiche di prevenzione delle infezioni da GBS, come il vaccino, è auspicabile che, nell'immediato futuro, vengano adottate le linee guida su tutto il territorio nazionale per eseguire correttamente sia lo screening colturale sia la chemioprophilassi *intrapartum* per le gravide colonizzate, data l'evidenza della sua efficacia.



## BIBLIOGRAFIA

1. Baker CJ, Barrett FF, Gordon RC, Yow MD. Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants. *J Pediatr* 1973;82:724-9.
2. Barton LL, Feigin RD, Lins R. Group B beta hemolytic streptococcal meningitis in infants. *J Pediatr* 1973;82:719-23.
3. Franciosi RA, Knostman JD, Zimmerman RA. Group B streptococcal neonatal and infant infections. *J Pediatr* 1973;82:707--18.
4. McCracken GH. Group B streptococci: the new challenge in neonatal infections. *J Pediatr* 1973;82:703-6.
5. 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.
6. CDC. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. *MMWR* 1996;45 (RR-7):1-24.
7. American College of Obstetricians and Gynecologists, Committee on Obstetric Practice. Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns [Opinion 173].

- Washington, D. C: American College of Obstetricians and Gynecologists, 1996.
8. American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases/Committee on Fetus and Newborn. Revised guidelines for prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) disease. *Pediatrics* 1997;99:489-96.
  9. G. Pescetto, L. De Cecco, D. Pecorari, N. Ragni. *Ginecologia e Ostetricia*. IV edizione. Società Editrice Universo Roma.
  10. La Placa. *Principi di Microbiologia Medica*. IX Edizione. Società Editrice Esculapio.
  11. Hans-Christian Slotved, Fanrong Kong, Lotte Lambertsen, Susanne Sauer, and Gwendolyn L. Gilbert. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. *Journal of Clinical Microbiology*. Sept 2007, p 2929-2936.
  12. Ferreri P., C. J. Baker, S. L. Hiller, and A. E. Flores. 2004. Diversity of surface protein expression in group B streptococcal colonizing & invasive isolates. *Indian J. Med. Res.* 119 (Suppl.): 191-196.
  13. Ferreri, P., and A. E. Flores. 1997. Surface protein expression in group B streptococcal invasive isolates. In T. Horaud et al. (ed.), *Streptococci and the host*. Plenum Press, New York, NY

14. Ramaswamy, S. V., P. Ferreri, A. E. Flores, and L. C. Paoletti. 2006. Molecular characterization of nontypeable group B streptococcus. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2398-2403.
15. Slotved, H. C., Elliott, T. Thompson, and H. B. Konradsen. 2003. Latex assay for serotyping of group B *Streptococcus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4445-4447.
16. L. Baldassarri, R. Creti, G. Orefici. Le infezioni da streptococco di gruppo B in Italia. Un problema importante per la salute della donna e del bambino. *Not Ist Super Sanità* 2007; 20 (7/8): 8-11
17. MMWR Morbidity and Matality Weekly Report. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC.
18. Fiona Smaill: Asymptomatic bacteriuria in pregnancy Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology Vol. 21, No. 3, pp. 439–450, 2007
19. Raul Raz. Asymptomatic bacteriuria. Clinical significance and management. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22 (2003) S.45-47.
20. Pettersson K. Perinatal infection with Group B streptococci. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* (2007) 12, 193-197.

21. Baker CJ, Edwards MS. Group B streptococcal infections. In: Remington J, Klein JO, eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995:980-1054.
22. Baker, C., & Edwards, M. (1995). *Group B streptococcal infections*. In J. Remington & J. Klein (Eds.), *Infectious diseases of the fetus and newborn infant (4th ed., pp. 980-1054)*. Philadelphia: W.B.Saunders Co.
23. Deborah K. Parks, RN, MSN, PNP, Robert J. Yetman, MD, Virginia Moyer, MD, & Kathleen Kennedy, MD Early-onset Neonatal Group B Streptococcal Infection: Implications for Practice *J Pediatr Health Care*. (2000). 14, 264-269.
24. Law MR, Palomaki G, Alfirevic Z, et al The prevention of neonatal group B streptococcal disease: a report by a working group of the Medical Screening Society. *J Med Screen* 2005; 12: 60-8.
25. Dillon Jr HC, Khare S, Gray BM. Group B streptococcal carriage and disease: a 6-year prospective study. *J Pediatr* 1987; 110: 31-6.
26. Davies HD, Raj S, Adair C, Robinson J, McGeer A. Population-based active surveillance for neonatal group B streptococcal infections in Alberta, Canada: implications

- for vaccine formulation. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 879-84.
27. Jiang JH, Chiu NC, Huang FY, et al. Neonatal sepsis in the neonatal intensive care unit: characteristics of early versus late onset. *J Microbiol Immunol Infect* 2004; 37: 301-6.
28. Fluegge K, Supper S, Siedler A, Berner R. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in infants: results from a nationwide active laboratory surveillance study over 2 years in Germany. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 760-3.
29. Weisner AM, Johnson AP, Lamagni TL, et al. Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. *Clin Infect Dis* 2004; 38:1203-8.
30. Harrison LH, Elliott JA, Dwyer DM, et al. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. Maryland Emerging Infection Program. *J Infect Dis* 1998; 177:998-1002.
31. Judith R. Campbell, MD, Sharon L. Hiller, PhD, Marijanr A. Krohn, PhD, Patricia Ferrieri, MD, Dori F. Zaleznik, MD, and Carol J. Baker, MD Group B Streptococcal

Colonization and Serotype-Specific Immunity in Pregnant Women at Delivery VOL. 96, NO. 4, OCTOBER 2000

32. Eickoff TC, Klein JO, Daly AK, Ingal D, Finland M. Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic streptococci. *New Engl J Med* 1964; **271**: 1221–1228
33. Freedman RM, Ingram DL, Gross, et al: A half-century of neonatal sepsis at Yale: 1928-1978. *Am J Dis Child* 135: 140-144, 1981
34. Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, et al. Group B streptococcal disease in the era of *intrapartum* antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* 2000;342:15-20
35. Zangwill KM, Schuchat A, Wenger JD. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. *MMWR* 1992;41(SS-6):25-32.
36. Baker CJ, Edwards MS. Group B streptococcal infections. In: Remington J, Klein JO, eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990:742-811.
37. Jeffery HE, Lahra MM. Eight-year outcome of universal screening and *intrapartum* antibiotics for maternal group B streptococcal carriers. *Pediatrics* 1998;101:(1).

38. Isaacs D, Royle JA, Australasian Study Group for Neonatal Infections. *Intrapartum* antibiotics and early onset neonatal sepsis caused by group B *Streptococcus* and by other organisms in Australia. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:524-8.
39. Davies HD, Adair CE, Schuchat A, Low DE, Sauve RS, McGeer A. Physicians' prevention practices and incidence of neonatal group B streptococcal disease in 2 Canadian regions. *CMAJ* 2001;164: 479-85.
40. Daley AJ, Garland SM. Prevention of neonatal group B streptococcal disease: Progress, challenges and dilemmas. *J Paediatr Child Health* 2004; 40: : 664–668.
41. L. Baldassari. Infezioni da streptococco di gruppo B. Roma: Istituto Superiore di Sanità (2007). (Rapporti ISTISAN 07/28).
42. Law MR, Palomaki G, Alfirevic Z, Gilbert R, Heath P, McCartney C, Reid T, Schrag S. The prevention of neonatal group B streptococcal disease: a report by a working group of the Medical Screening Society. *J Med Screen* 2005;12:60-8.
43. Edwards MS, Baker CJ. Group B Streptococcal infections. In: Remington JS, Klein JO. (Ed.). *Infectious diseases of*

*the fetus and newborn infant*. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2005. p. 1091-156.

44. Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep* 2002;51: 1-22.
45. Hammerschlag MR, Baker CJ, Alpert S, et al. Colonization with group B streptococci in girls under 16 years of age. *Pediatrics* 1977;60:473-6.
46. Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP, et al. Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1354-60.
47. Trijbels-Smeulders MA, Kollee LA, Adriaanse AH, Kimpen JL, Gerards LJ. Neonatal group B streptococcal infection: incidence and strategies for prevention in Europe. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:172-3.
48. Kadanali A., U. Altoparlak, Kadanali S. Maternal carriage and neonatal colonisation of group B streptococcus in eastern Turkey: prevalence, risk factor and antimicrobial resistance 2005 Blackwell Publishing Ltd *Int J Clin Pract*, April 2005, 59, 4, 437–440



49. Grimwood K, Darlow BA, Gosling IA et al. Early-onset neonatal group B streptococcal infections in New Zealand 1998–99. *J Paediatr Child Health* 2002; 38: 272–7.
50. Edwards MS, Baker CJ. Group B Streptococcal infections. In: Remington JS, Klein JO. (Ed.). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2005. p. 1091-156.
51. Benitz WE. Perinatal treatment to prevent early onset group B streptococcal sepsis. *Semin Neonatol* 2002;7:301-14
52. Gibbs RS, Schrag S, Schuchat A. Perinatal infections due to group B streptococci. *Obstet Gynecol* 2004; 104: 1062-76.
53. G. Gherardi, M. Imperi, L. Baldassarri, M. Pataracchia, G. Alfarone, S. Recchia, G. Orefici, G. Dicuonzo, R. Cheti. Molecular Epidemiology and Distribution of Serotypes, Surface Protein, and Antibiotic Resistance among Group B Streptococci in Italy. *Journal of Clinical Microbiology* Sept. (2007). Vol. 45. N° 9. p. 2909-2916.
54. J. A. Maeland, I. Bevanger, R. V. Lyng. Antigenic Determinants of Alpha-Like Proteins of *Streptococcus agalactiae*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* (2004). Vol. 11 N° 6, p. 1035-1039.

55. Lindahl G, Stalhammar-Carleman M, Areschoug T. Surface proteins of *S. agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:102-27.
56. Harrison LH, Elliott JA, Dwyer DM, Libonati JP, Ferrieri P, Billmann L, Schuchat A. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implication for vaccine formulation. *J Infect Dis* 1998;177:998-1002.
57. 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.
58. Baker CJ, Kasper JL. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N Engl J Med* 1976;753-6.
59. L. C. Madoff, J. L. Michel, E. W. Gong, D. E. Kling, D. L. Kasper. Group B streptococci Escape Host Immunity by Deletion of Tandem Repeat Elements of the Alpha C Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996). Vol. 93, p. 4131-4136.

60. Yueh-Ren Ho, Chien-Ming Li, Hsin-Pi Su, Jein-Hong Wu, Yu-Ching Tseng, Yuh-Jyh Lin, Jiunn-Jong Wu. Variation in the Number of Tandem Repeats and Profile of Surface Protein Genes among Invasive Group B streptococci Correlates with Patient Age. *Journal of Clinical Microbiology* (2007). Vol. 45. N°5, p. 1634-1636.
61. Lachenauer CS, Creti R, Michel JL, Madoff LC. 2000. Mosaicism in the alfa-like protein genes of group B streptococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;97:9630-5.
62. M. J. G. Hughes, J. C. Moore, J. D. Lane, R. Wilson, P. K. Pribul, Z. N. Younes, R. J. Dobson, P. Everest, A. J. Reason, J. M. Redfern, F. N. Greer, T. Paxton, M. Panico, H. R. Morris, R. G. Feldman, J. D. Santangelo. Identification of Major Outer Surface Protein of *Streptococcus agalactiae*. *Infection and Immunity* (2002). Vol. 70, N° 3, p. 1254-1259.
63. Kong F, Gowan S, Martin D, James G, Gilbert GL. Molecular Profiles of Group B Streptococcal Surface Protein Antigen Genes: Relationship to Molecular Serotypes. *J Clin Microbiol* 2002; Vol 40, N° 2, p. 620-262.

- 64.A. Rosenau, K. Martins, S. Amor, F. Gannier, P. Lanotte, N. Van der Mee-Marquet, L. Mereghetti, R. Quentin. Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated from Genital and Neonatal Specimens To Bind to Human Fibrinogen and Correlation with Characteristics of the *fb*sA and *fb*sB Genes. *Infection and Immunity* (2007). Vol. 75, N°3, p. 1310-1317.
- 65.A. Schubert, K. Zakikhany, G. Pietrocola, A. Meinke, P. Speziale, B. J. Eikmanns, D. J. Reinscheid. The Fibrinogene Receptor FbsA Promoter Adherence of *Streptococcus agalactiae* to Human Epithelial Cells. *Infection and Immunity* (2004). Vol. 72, N°. 11, p. 6197-6205.
- 66.H. Gutekunst, B. J. Eikmanns, D. J. Reinscheid. The Novel Fibrinogen-Binding FbsB Promotes *Streptococcus agalactiae* Invasion into Epithelial Cells. *Infection and Immunity* (2004). Vol. 72, N° 6, p. 3495-3504.
- 67.Hakansson S, Kallen K. Impact and risk factors for early-onset group B streptococcal morbidity: analysis of a national, population-based cohort in Sweden 1997-2001. *BJOG* 2006; 113:1452-8.

68. Schuchat A, Wenger JD. Epidemiology of group B streptococcal disease. Risk factors, prevention strategies, and vaccine development. *Epidemiol Rev* 1994; 16:374-402.
69. Kallman J, Schollin J, Schalen C, Erlandsson A, Kihlstrom E. Impaired phagocytosis and opsonisation towards group B streptococci in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998; 78: F46-50.
70. Zangwill KM, Schuchat A, Wenger JD. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. In: CDC surveillance summaries (November 20). *MMWR* 1992;41(No. SS-6):25-32.
71. Schrag SJ, Zell ER, Lynfield R et al. A population-based comparison of strategy to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. *New Engl J Med* 2002; 135: 308–312.
72. Smail F. *Intrapartum* antibiotics for group B streptococcal colonization. Cochrane review. *The Cochrane Library* 2004; Issue 2: Art. No.: CD000115. DOI: 10.1002/14651858. CD000115.
73. Donald ANGSTETRA, John FERGUSON and Warwick B. GILES. Institution of universal screening for Group B streptococcus (GBS) from a risk management protocol

results in reduction of early-onset GBS disease in a tertiary obstetric unit. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2007;47:378–382.

74. Piopolo KM, Madoff LC, Eichenwald EC. Early-onset group B streptococcal in the era of maternal screening. *Paediatrics* 2005; 115 : 1240–1246.

75. Youden L, Downing M, Halperin B, Scott H, Smith B, Halperin SA. Group B streptococcal testing during pregnancy: Survey of postpartum women and audit of current prenatal screening practices. *J Obstet Gynaecol Can* 2005; 27 : 1006–1012.

76. Sutkin G, Krohn M, Heine P, Sweet R. Antibiotic prophylaxis and non-group B, streptococcal neonatal sepsis. *Obstet Gynaecol* 2005; 105 : 581–586.

77. Baltimore RS, Huie SM, Meek JM, Schuchat A, O'Brien KL. Early onset neonatal sepsis in the era of group B streptococcal prevention. *Paediatrics* 2001; 108 : 1094–1098.

78. Baker CJ, Kasper DL. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N Engl J Med* 1976;294:753– 6.

79. Moller M, Thomsen AC, Borch K, Dinesen K, Zdravkovic M. Rupture of fetal membranes and premature delivery

- associated with group B streptococci in urine of pregnant women. *Lancet* 1984;ii:69-70.
- 80.Regan J, Klebanoff, MD, MPH, Nugent R. Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1354-1360.
- 81.Davide Ljioi, Elisa Di Capua, Simone Ferrero, Emanuela Mistrangelo, Alessandro Giannattasio, Sandra Morano, Nicola Ragni. The efficacy of 2002 CDC guidelines in preventing perinatal group B Streptococcal vertical transmission: a prospective study. *Arch Gynecol Obstet* (2007) 275:373-379.
- 82.Badri MS, Zawaneh S, Cruz AC, et al. Rectal colonization with group B streptococcus: relation to vaginal colonization of pregnant women. *J Infect Dis* 1977;135:308--12.
- 83.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.
- 84.Hall RT, Barnes W, Krishnan L, et al. Antibiotic treatment of parturient women colonized with group B streptococci. *Am J Obstet Gynecol* 1976;124:630-4.

85. Illuzzi JL, Bracken MB. Duration of *intrapartum* prophylaxis for neonatal group B streptococcal disease: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2006; 108: 1254-65.
86. Garland SM, Fliegner JR. Group B streptococcus (GBS) and neonatal infections: the case for *intrapartum* chemoprophylaxis. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 1991;31:119--22.
87. Schwartz B, Schuchat A, Oxtoby MJ, Cochi SL, Hightower A, Broome CV. Invasive group B streptococcal disease in adults. A population-based study in metropolitan Atlanta. *JAMA* 1991; 266: 1112-4
88. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, editors. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutic. 9<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 1996
89. Morven S. Edwards, MD. Issues of Antimicrobial Resistance in Group B Streptococcus in the Era of *Intrapartum* Antibiotic Prophylaxis. *Semin Pediatr Infect Dis* 2006, 17: 149-152.
90. Main EK, Slagle T. Prevention of early-onset invasive neonatal group B streptococcal disease in a private hospital setting: the superiority of culture-based protocols. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:1344--54.



91. Baltimore RS, Huie SM, Meek JI, Schuchat A, O'Brien KL. Early-onset neonatal sepsis in the era of group B streptococcal prevention. *Pediatrics* 2001;108:1094--8.
92. Cordero L, Sananes M, Ayers LW. Bloodstream infections in a neonatal intensive-care unit: 12 years' experience with an antibiotic control program. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20:242--6.
93. Levine EM, Ghai V, Barton JJ, Strom CM. *Intrapartum* antibiotic prophylaxis increases the incidence of gram-negative neonatal sepsis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999;7:210--13.
94. Joseph TA, Pyati SP, Jacobs N. Neonatal early-onset *Escherichia coli* disease: the effect of *intrapartum* ampicillin. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1998;152:35—40
95. Towers CV, Carr MH, Padilla G, Asrat T. Potential consequences of widespread antepartal use of ampicillin. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:879--83.
96. Schuchat A, Zywicki S, Dinsmoor MJ, et al. Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: a multicenter case-control study. *Pediatrics* 2000;105:21--6.

97. Mercer BM, Carr TL, Beazley DD, Crouse DT, Sibai BM. Antibiotic use in pregnancy and drug-resistant infant sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:816--21.
98. Terrone DA, Rinehart BK, Einstein MH, Britt LB, Martin JN, Perry KG. Neonatal sepsis and death caused by resistant *Escherichia coli*: possible consequences of extended maternal ampicillin administration. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:1345--8.
99. Moore MR, Schrag SJ, Schuchat A. Effects of *intrapartum* antimicrobial prophylaxis for prevention of group-B-streptococcal disease on the incidence and ecology of early-onset neonatal sepsis. *Lancet Infect Dis* 2003;4:201-13.
100. Davies HD, Miller MA, Faro S, Gregson D, Kehl SC, Jordan JA (2004) Multicenter study of a rapid molecular-based assay for the diagnosis of group B Streptococcus colonization in pregnant women. *Clin Infect Dis* 39:1129–1135.
101. Bergeron MG, Ke D, Menard C, et al. Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery. *N Engl J Med* 2000;343:175--9.
102. Berg S, Trollfors B, Lagergard T, Zackrisson G, Claesson BA. Serotypes and clinical manifestations of group B

- streptococcal infections in western Sweden. *Clin Microbiol Infect* 2000, 6: 9-13.
103. Gilbert GL. Vaccines for other neonatal infections: are group B streptococcal infections vaccine-preventable? *Expert Rev Vaccines* 2004; 3: 371-4.
104. Baker CJ, Edwards MS, Kasper DL. Role of antibody to native type III polysaccharide of group B streptococcus in infant infection. *Pediatrics* 1981;68:544-9.
105. Baker CJ, Rench MA, Edwards MS, Carpenter RJ, Hays BM, Kasper DL. Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B streptococcus. *N Engl J Med* 1988; 319:1180-5.
106. Baker CJ, Kasper DL. Vaccination as a measure for prevention of neonatal GBS infection. *Antibiot Chemother* 1985, 35:281-90.
107. Ada G, Isaacs D. Carbohydrate-protein conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:79-85.
108. Finn A. Bacterial polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Br Med Bull* 2004;31:1-14.
109. Baker CJ, Rench MA, Fernandez M, Paoletti LC, Kasper DL, Edwards MS. Safety and immunogenicity of a bivalent group B streptococcal conjugate vaccine for serotypes II and III. *J Infect Dis* 2003;188:66-73.

110. Baker CJ, Paoletti LC, Rench MA, Guttormsen HK, Edwards MS, Kasper DL. Immune response of healthy women to 2 different group B streptococcal type V capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. *J Infect Dis* 2004;189:1103-12.
111. Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, Ichiman Y, Ohtsuka H, Kaku M, Paoletti LC, Ferrieri P, Madoff LC. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J Infect Dis* 1999;179:1030-3.
112. Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, Wessels MR, Paulsen IT, *et al.* Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12391-6.
113. Wizemann TM, Adamou JE, Langermann S. Adhesins as targets for vaccine development. *Emerg Infect Dis* 1999;5:395-403.
114. Glaser P, Rusniok C, Buchrieser C, Chevalier F, Frangeul L, Msadek T, Zouine M, Couve E, Lalioui L, Poyart C, Trieu-Cuot P, Kunst F. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol Microbiol* 2002;45:1499-513.

115. Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, *et al.* Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pangenome”. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:13950-5.
116. Maione D, Margarit I, Rinaudo CD, Massignani V, Mora M, Scarselli M, *et al.* Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. *Science* 2005;309:148-50.
117. Buccato S, Maione D, Rinaudo CD, Volpini G, Taddei AR, Rosini R, Telford JL, Grandi G, Margarit I. Use of *Lactococcus lactis* Expressing Pili from Group B Streptococcus as a Broad-Coverage Vaccine against Streptococcal Disease. *J Infect Dis* 2006;194:331-40.
118. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement* . CLSI document M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.
119. Comité de Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Statement 1996 CA-MSF. Zone sizes and

- breakpoints for nonfastidious organism. Clin Microbiol Infect 1996; 2 (Suppl 1): S46-9.
120. Sumalee Pruksakorn,<sup>1\*</sup> Nopporn Sitticombut,<sup>1</sup> Charlie Phornphutkul,<sup>2</sup> Chulabhorn Pruksachatkunakorn,<sup>2</sup> Michael F. Good,<sup>3</sup> and Evelyn Brandt<sup>3</sup> Epidemiological Analysis of Non-M-Typeable Group A Streptococcus Isolates from a Thai Population in Northern Thailand. Journal of Clinical Microbiology, Mar. 2000, 38:1250–1254
121. Helena Seppala, Mikael Skurnik, Hanna Soini, Marilyn C. Roberts, and Pentti Huovinen. A novel Erythromycin Resistance Methylase Gene (ermTR) in *Streptococcus pyogenes*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Feb. 1998, 42: 257-262. (modified)
122. Marilyn C. Roberts, Joyce Sutcliffe, Patrice Courvalin, Lars Bogen Jensen, Julian Rood, and Helena Seppala. Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Dec. 1999, 43:2823-2830. (modified)
123. Claire Poyart, Asmaa Tazi, Helene Reglier-Poupet, Annick Billoet, Nicole Tavares, Josette Raymond, and Patrick Trieu-Cuot. Multiplex PCR Assay for Rapid and Accurate

- Capsular Typing of Group B Streptococci. *Journal of Clinical Microbiology*, June 2007, 45:1985-1988.
124. Roberta Creti, Francesca Fabretti, Graziella Orefici, and Christina von Hunolstein. Multiplex PCR Assay for Direct Identification of Group B Streptococcal Alpha-Protein-Like Protein Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar. 2004, 42:1326-1329.
125. Srinivas V. Ramaswamy, Patricia Ferreri, Aurea E. Flores, and Lawrence C. Paoletti. Molecular Characterization of Nontypeable Group B Streptococcus. *Journal of Clinical Microbiology*, July 2006, 44:2398-2403.
126. L. Baldassarri, R. Creti, S. Recchia, M. Imperi, B. Facinelli, E Giovanetti, M. Pataracchia, G. Alfarone and Graziella Orefici. Therapeutic Failures of Antibiotics Used To Treat Macrolide-Susceptible *Streptococcus pyogenes* Infections May Be Due to Biofilm Formation. *Journal of Clinical Microbiology*, Aug. 2006, 44: 2721-2727.
127. William Wiley Navarre and Olaf Schneewind. Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Mar. 1999, 63:174-229.