ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών
ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

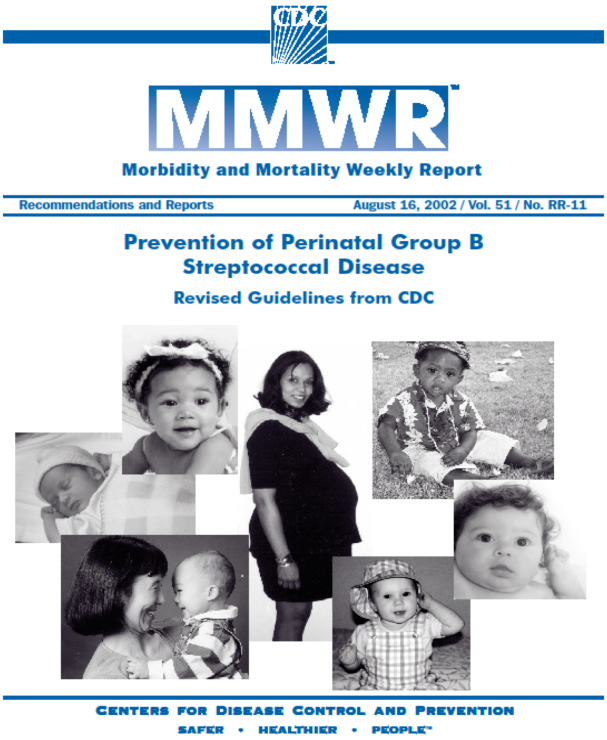
2018

ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ A-LIKE PROTEINS ΚΑΙ B-PROTEIN ΩΣ ΛΟΙΜΟΓΟΝΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΟΥ B-ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΥ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ B, ΣΕ ΕΓΚΥΕΣ ΚΑΙ ΜΗ, ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΕΥΚΑΛΙΩΝ Λ. ΚΑΡΑΚΑΛΠΑΚΗΣ

Μαιευτήρας - Γυναικολόγος



Θέμα Διατριβής

ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ A-LIKE PROTEINS ΚΑΙ B-PROTEIN ΩΣ ΛΟΙΜΟΓΟΝΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΟΥ Β-ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΥ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ Β, ΣΕ ΕΓΚΥΕΣ ΚΑΙ ΜΗ, ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

Αναπληρ. Καθηγήτρια	κ. Καλλιόπη Παππά (Επιβλέπον Μέλος)
Καθηγητής	κ. Γεώργιος Δαΐκος
Επίκ. Καθηγήτρια	κ. Μαρίνα Μαντζουράνη

Μέλη Επταμελούς Επιτροπής

Αναπληρ. Καθηγήτρια	κ. Καλλιόπη Παππά (Επιβλέπον Μέλος)
Καθηγητής	κ. Γεώργιος Δαΐκος
Επίκ. Καθηγήτρια	κ. Μαρίνα Μαντζουράνη
Αναπληρ. Καθηγητής	κ. Γεώργιος Δασκαλάκης
Επίκ. Καθηγητής	κ. Γρηγοριάδης θεμιστοκλής
Επίκ. Καθηγητής	κ. Σαμάρκος Μιχαήλ
Επίκ. Καθηγήτρια	κ. Ψυχογιού Μήνα

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ: 22-07-2013

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 14-07-2014

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 29-10-2014

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: 11-05-2018

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ 31-05-2018

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΟΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ
ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΙΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΙΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΣ. ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ. ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ, ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ , ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΙΗΣ
ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.
Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ, ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟ ΘΕΟ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ ΚΑΙ ΣΤΟ ΘΕΟ ΑΣΚΛΗΠΙΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΤΗ ΜΑΡΤΥΡΙΑ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΘΕΩΝ ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΤΕΛΕΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΤΗ ΣΥΜΦΩΝΙΑ ΑΥΤΗ. ΝΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟ ΜΟΥ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΕΧΝΗΣ ΙΣΟ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΟΙΝΩΝΟ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ. ΚΑΙ ΟΤΑΝ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΧΡΗΜΑΤΑ ΝΑ ΜΟΙΡΑΖΟΜΑΙ ΜΑΖΙ ΤΟΥ ΤΑ ΔΙΚΑ ΜΟΥ. ΝΑ ΘΕΩΡΩ ΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΑΔΕΛΦΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΝΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΑΥΤΗΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ ΧΩΡΙΣ ΔΙΔΑΚΤΡΑ Η ΑΛΛΗ ΣΥΜΦΩΝΙΑ. ΝΑ ΜΕΤΑΔΙΔΩ ΤΟΥΣ ΚΑΝΟΝΕΣ ΗΘΙΚΗΣ, ΤΗΝ ΠΡΟΦΟΡΙΚΗ ΔΙΔΑΣΚΑΛΙΑ ΚΑΙ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΑΛΛΕΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΜΟΥ, ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΤΟΥ ΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΥΣ ΜΑΘΗΤΕΣ ΠΟΥ ΠΗΡΑΝ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟ ΟΡΚΟ, ΑΛΛΑ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑΝ ΑΛΛΟ. ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΓΙΑ ΝΑ ΒΟΗΘΗΣΩ ΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΑΛΛΑ ΠΟΤΕ ΓΙΑ ΝΑ ΒΛΑΨΩ Η ΝΑ ΑΔΙΚΗΣΩ. ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΙΝΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΠΟΙΟΝ ΠΟΥ ΘΑ ΜΟΥ ΤΟ ΖΗΤΗΣΕΙ, ΟΥΤΕ ΘΑ ΤΟΥ ΚΑΝΩ ΜΙΑ ΤΕΤΟΙΑ ΥΠΟΔΕΙΞΗ. ΠΑΡΟΜΟΙΩΣ, ΔΕΝ ΘΑ ΕΜΠΙΣΤΕΥΤΩ ΣΕ ΕΓΚΥΟ ΜΕΣΟ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΕΚΤΡΩΣΗ. ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΑΣΠΙΛΗ ΚΑΙ ΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΔΕΝ ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΝΥΣΤΕΡΙ ΟΥΤΕ ΣΕ ΑΥΤΟΥΣ ΠΟΥ ΠΑΣΧΟΥΝ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΗ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΠΑΡΑΧΩΡΩ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ ΑΥΤΗ ΣΤΟΥΣ ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ. ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΗΓΑΙΝΩ, ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΝΑ ΒΟΗΘΗΣΩ ΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΘΑ ΑΠΕΧΩ ΑΠΟ ΟΠΟΙΑΔΗΠΟΤΕ ΕΣΚΕΜΜΕΝΗ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΦΘΟΡΑ, ΚΑΙ ΙΔΙΩΣ ΑΠΟ ΓΕΝΕΤΗΣΙΕΣ ΠΡΑΞΕΙΣ ΜΕ ΑΝΔΡΕΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΕΣ, ΕΛΕΥΘΕΡΟΥΣ ΚΑΙ ΔΟΥΛΟΥΣ. ΚΑΙ ΟΣΑ ΤΥΧΟΝ ΒΛΕΠΩ Η ΑΚΟΥΩ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ Η ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΥ ΑΣΧΟΛΙΕΣ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΜΟΥ ΖΩΗ, ΑΥΤΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΜΑΘΕΥΤΟΥΝ ΠΑΡΑΕΞΩ ΔΕΝ ΘΑ ΤΑ ΚΟΙΝΟΠΟΙΩ, ΘΕΩΡΩΝΤΑΣ ΤΑ ΘΕΜΑΤΑ ΑΥΤΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΑΝ ΤΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΑΥΤΟ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ, ΑΣ ΧΑΙΡΩ ΠΑΝΤΟΤΕ ΥΠΟΛΗΨΕΩΣ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΓΙΑ ΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΗΣΩ, ΑΣ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα: ***Δευκαλίων***	**Επώνυμο:** ***Καρακαλπάκης***
Ημερομηνία Γέννησης : *17 Μαΐου 1978* **Τοπος Γέννησης :** *Αθήνα, Ελλάδα*	**Υπηκοότητα :** *Ελληνική*
Ειδικότητα: Μαιευτική - Γυναικολογία *(Απόκτηση Τίτλου 22-01-2014)*	**e-mail:** *dkarakalpakis@gmail.com* **Κιν. Τηλ. :** +30 6980601010

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- **Ιούλ. 2014 – Υποψήφιος Διδάκτωρ του Πανεπιστημίου Αθηνών,** Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής
- **Ιαν. 2000 – Οκτ. 2005: Πτυχίο Ιατρικής** απο την Ιατρική σχολή Αλεξανδρούπολης, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
- **Σεπ. 1996 – Ιουλ. 1999: Πτυχίο Βιοχημείας** απο το Πανεπιστήμιο King's College of London, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο (Bachelor's Degree (BSc) Biochemistry, King's College of London, UK).
    - Πτυχιακή Εργασία: Αντιδράσεις του Μονοξειδίου του Αζώτου με Αιμοσφαιρίνες και η σχέση τους με το Σύνδρομο Μπλέ Μωρών.
- **Σεπ. 1993 – Ιουν. 1996: Απολυτήριο Λυκείου** απο τη Σχολή Μωραΐτη, Αθήνα
    - Βαθμός Απολυτηρίου: 16,7/20

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Μαιευτήρας – Χειρουργός – Γυναικολόγος

- **Ιούλιος 2014 – Σήμερα** Συνεργάτης των Γ/Μ Κλινικών ΙΑΣΩ, ΜΗΤΕΡΑ και ΡΕΑ

Ειδικευόμενος Ιατρός Μαιευτικής – Γυναικολογίας

- **05/03/2012 – 16/04/2014** ΓΝΑ Αλεξάνδρα, Α' Πανεπιστημιακή Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική
- **23/09/2008 - 02/05/2011** ΓΝΑ Λαϊκό, Γυναικολογική Κλινική

Ιατρός Υπηρεσίας Υπαίθρου

- **28/06/2011 - 27/12/2011** Περιφερειακό Ιατρείο Κορώνης – Κέντρο Υγείας Μεσσήνης, Μεσσηνία

Ειδικευόμενος Ιατρός Γενικής Χειρουργικής

- **01/ 03/ 2008 – 29/ 08/ 2008** Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών, Χειρουργικός Τομέας
- **04/ 10/ 2007 – 29/ 02/ 2008** Ναυτικό Νοσοκομείο Σαλαμίνας, Χειρουργικό Τμήμα
- **05/ 02/ 2007 - 10/ 07/ 2007** Imperial College London, St Mary's Hospital London, Department of Biosurgery and Surgical Technology, Λονδίνο, Αγγλία
- **14/ 08/ 2006 - 01/ 01/ 2007** ΓΝ Καλύμνου, Χειρουργική Κλινική

Μετεκπαιδευτικά Σεμινάρια

- **10-12/ 11/ 2017 Επιτυχής συμμετοχή στις εξετάσεις θεωρητικής επάρκειας στο Σεμινάριο Πιστοποίησης Στο γυναικολογικό Υπερηχογράφημα,** Πανελλήνιο Συμπόσιο Υπερηχογραφίας στη Γυναικολογία (Ελληνική Εταιρεία Υπερήχων στη Μαιευτική και Γυναικολογία), Αθήνα
- **02-04/ 03/ 2018 Επιτυχής συμμετοχή στις εξετάσεις θεωρητικής επάρκειας στο Σεμινάριο Υπερηχογραφικής Αξιολόγησης εμβρύου 1ου Τριμήνου,** Συμπόσιο Εμβρυομητρικής Ιατρικής - Υπερηχογραφική Αξιολόγηση εμβρύου 1ου Τριμήνου (Ελληνική Εταιρεία Υπερήχων στη Μαιευτική και Γυναικολογία), Αθήνα

- **01/ 2017-04/ 2017 Ενδοσκοπική Γυναικολογική Χειρουργική & Ουρογυναικολογία**, Μαιευτήριο ΜΗΤΕΡΑ, Αθήνα
- **4-5/ 11/ 2016 Advanced Laparoscopic Gynaecological Course,** Minimal Access Therapy Training Unit, Postgraduate Medical School, Royal Surrey County Hospital, UK
- **23-25, 30/ 09/ 2016 Ηλεκτρονική Παρακολούθηση του Εμβρύου στην Κύηση και στον Τοκετό,** ΤΕΙ Αθήνας-Τμήμα Μαιευτικής & Ινστιτούτο Δια Βίου Εκπαίδευσης, Κλινική Ιασώ, Αθήνα
- **5-6/ 05/ 2016 Advanced Hysteroscopic Resection Course,** Minimal Access Therapy Training Unit, Postgraduate Medical School, Royal Surrey County Hospital, UK
- **20-22/ 01/ 2016 Basic Laparoscopic Course Incorporating Intro to Hysteroscopy,** Minimal Access Therapy Training Unit, Postgraduate Medical School, Royal Surrey County Hospital, UK
- **9-10/ 09/ 2015 Early Pregnancy and Gynaecological Ultrasound Course,** Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, London, UK
- **14-16/ 11/ 2012 Basic Practical Skills in Obstetrics and Gynaecology**
  Royal London Hospital, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο (υπό την αιγίδα του Royal College of Obstetricians and Gynaecologists of England)
- **09-10/ 06/ 2011 «Μαιευτικές Κακώσεις Περινέου»** Θεωρητικό και Πρακτικό Σεμινάριο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Αλεξάνδρα, Αθήνα, υπό την αιγίδα της Α' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.
- **09-11/ 07/ 2007 Basic Surgical Skills** Διαπανεπιστημιακό σεμινάριο στο St Mary's Hospital του Πανεπιστημίου του Λονδίνου, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο (υπό την αιγίδα του Royal College of Surgeons of England)

Δημοσιεύσεις

- **Fatal Case of Early Onset Group B Streptococcal Infection in One of the Neonates of a Di-Chorionic/Di-Amniotic Gestastion: is**

Microbiological Screening Enough for Prevention?

Karakalpakis D., Charvalos E., Houhoula D., Pittaras T., Pappa K., Journal of Gynaecology and Neonatal, Science Inquest, Volume 2 Issue 1

- **Antibiotic resistance profiles from isolated bacteria in outpatient infertility clinic in Greece.**

  Karakalpakis D., Kostaras K., Asonitis K., Dimitriadi D., Pittaras T., Charvalos E., Daikos G., Mantzourani M., Pappa K. Hellenic Journal of Obstetrics and Gynecology, 2018, 17 (2), 23-30

- **Endometriosis-associated ovarian cancer. Presentation of a case report and review of the literature**

  Pergialiotis V., Lagkadas A., Oikonomidis P., Natsis S., **Karakalpakis D**., Giannakopoulos K., European Journal of Gynaecological Oncology 2011; 32(6):682-5.

- **Urinary incontinence repair in post-menopausal patients with Trans Obturator Tape, a 2 year experience in a series of 30 patients**

  Pergialiotis V., Lagkadas A., Oikonomidis P., **Karakalpakis D**., Giannakopoulos K. Hellenic Journal of Obstetrics and Gynaecology, vol 9, Issue 3, page 85-89, 2010

Ομιλίες και Posters σε Συνέδρια

- **Κατανομή των Alpha-Like Proteins ως Λοιμογόνων Παραγόντων του Β-Αιμολυτικού Στρεπτοκόκκου της Ομαδας Β σε Έγκυες και μη, Γυναίκες στην Ελλάδα και η Σχέση τους με τις Αντοχές στα Αντιβιοτικά**

  Καρακαλπάκης Δ[1] , Χούχουλα Δ[2], Δημητριάδη Δ[3] , Ασωνίτης Κ[3], Κεχαγιά Μ[3], Παππά Κ[4], Αικ. Χαρβάλου[1, 3] (*1 Ιασώ Μαιευτήριο, 2 ΤΕΙ Αθήνας, 3 InVitroLabs, 4 ΕΚΠΑ)*, 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 26-28 Απριλίου 2018, Μέγαρο Διεθνές Συνεδριακό Κέντρο Αθηνών.

- **Clinical experience with the cell-free DNA testing at IASO Maternity feto-maternal department in Greece**

Karakalpakis D., Asonitis K., Antsaklis P., Kostaras K., Hatzantonaki P., Doulgeraki T., Charvalos E., 16th World Congress in Fetal Medicine, The Fetal Medicine Foundation, Ljubijana,Slovenia, June 25-29 2017

- **ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ STREPTOCOCCUS AGALACTIAE ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ**

  Δ. Δημητριάδη[1] , **Δ. Καρακαλπάκης[2]** , Α. Κωνσταντάρα[1], Τ. Σκαλίδης[2], Θ. Πιτταράς[3], Π. Παπά[3], Α. Βαρβαρέσου[2], Α. Χαρβάλου[2] *(1 InVitroLabs, 2 ΙΑΣΩ Μαιευτική-Παιδιατρική Κλινική, 3 Παν/μιο Αθηνών Ιατρικό Τμήμα)*, 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Πολεμικό Μουσείο, Αθήνα, 25/2/2015 έως 27/2/2015

- **Clinical evaluation of fms-Like Tyrosine Kinase-1 (sflT1) to Placental Growth Factor (PLGF) biomarkers in a cohort of 20 to 34 week pregnant women in Greece: a pilot study.**

  Kostaras K., Tziotis J., **Karakalpakis D.**, Alexiou G., Mantoudis E., Tsitampanis M., Theofanakis P., Anastasaki A., Antsaklis A. and Charvalos E., 13th World Congress in Fetal Medicine, The Fetal Medicine Foundation, Nice, France, 29/06-03/07-2014

- **Streptococcus b and Enterococcus Prevalence and Antibiotic Resistance at IASO: in the Biggest Maternity Hospital in Greece**

  Karakalpakis D., Varvaressou A., Dimitroulea A., Charvalos E., Arab Alliance for the Prudent Use of Antimicrobials, Beirut, Lebanon, 15-17/ 11/ 2012

- **Human Papilloma Virus (HPV) Typing in a Cohort of 200 Women in Greece**

  Trigoni C., Chrysagi A., Chrysagi D., Stamatiou J., **Karakalpakis D**., Charvalos E., 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 27th International Congress of Chemotherapy, Milan, Italy, 7-10/ 05/ 2011

- **Cytomegalovirus Immunity and Infection in First Trimester Pregnant Women in Greece for the IASO Group**

  Katsantoni E., KastriniosN., **Karakalpakis D**., Petropoulos P., Charvalos E., 21st European Congress of Clinical Microbiology and

Infectious Diseases 27th International Congress of Chemotherapy, Milan, Italy, 7-10/ 05/ 2011

- **Η παρουσία του CA-125 σε καλοήθεις παθήσεις σε προεμμηνοπαυσιακές μεταμοσχευμένες ασθενείς**
  Περγιαλιώτης Β., Λαγκαδάς Α., Τριανταφυλλίδου Ο., **Καρακαλπάκης Δ**., Οικονομίδης Π., Γιαννακόπουλος Κ., 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας, 28-31 Μαΐου 2009, Αθήνα, Ελλάδα.
- **Ελάχιστο ορώδες καρκίνωμα του ενδομητρίου**
  Περγιαλιώτης Β., Λαγκαδάς Α., Τριανταφυλλίδου Ο., Οικονομίδης Π., **Καρακαλπάκης Δ.**, Γιαννακόπουλος Κ., 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας, 28-31 Μαΐου 2009, Αθήνα, Ελλάδα.
- **Ενδομητρίωση και καρκίνος ωοθηκών**
  Λαγκαδάς Α., Περγιαλιώτης Β., Τριανταφυλλίδου Ο., Οικονομίδης Π., **Καρακαλπάκης Δ**., Βλαχάδης Ν., Γιαννακόπουλος Κ., 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γυναικολογικής Ογκολογίας, 6-8 Μαρτίου 2009, Αθήνα, Ελλάδα.

Διδακτική Εμπειρία:

- **Οκτώβριος 2017 - Σήμερα Εκπαιδευτής Ιδιωτικού Ινστιτούτου Επαγγελματικής Κατάρτησης «Praxis»,** Διδασκαλία των μαθημάτων: «Ανατομία-Φυσιολογία», «Δερματολογία», «Πρώτες Βοήθειες», «Νευρολογία», «Υγιεινή-Πρόληψη Ατυχημάτων», «Παθολογία-Φαρμακολογία».
- **Ακαδ. Έτος 2016 - 2017 Εκπαιδευτής Δημοσίου Ινστιτούτου Επαγγελματικής Κατάρτησης Αμπελοκήπων,** Διδασκαλία των μαθημάτων: «Ορθοπεδική», «Στατικές Διαταραχές».
- **Ακαδ. Έτος 2016 - 2017 Εκπαιδευτής Δημοσίου Ινστιτούτου Επαγγελματικής Κατάρτησης Περιστερίου,** Διδασκαλία των μαθημάτων: «Στοιχεία Χειρουργικής» και «Στοιχεία Παιδιατρικής».
- **Ακαδ. Έτη 2000 - 2003** συμμετείχα στην οργάνωση, επίδειξη και επίβλεψη, εκπαιδευτικών εργαστηριακών πειραμάτων βιοχημείας για το μάθημα της Βιοχημείας των φοιτητών ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη, Ελλάς (Εθελοντική Εργασία)

Γνώσεις Ξένων Γλωσσών

- **English** (Proficiency, Cambridge University, 1996)
- **French** (**D**iplôme **d' E**tudes en **L**angue **F**rancaise - Unité 1 et 2, 1995).
- **German**(Zertifikat,1995).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τα θεμέλια αυτής της διατριβής τέθηκαν το 2014 όταν και ξεκίνησε η μελέτη με σκοπό να προσεγγίσει και να αναδείξει το μέγεθος του προβλήματος της λοίμωξης απο τον β-Αιμολυτικό Στρεπτόκοκκο Ομάδας Β και να δώσει λύσεις, στο βαθμό του δυνατού, στην πρόληψη της νεογνικής νόσου απο τον εν λόγω μικρόβιο.

Στόχος ήταν να αναδειχθεί το μέγεθος του προβλήματος, διερευνώντας την παθογένεια και τη συσχέτιση της με τις αντοχές στα αντιβιοτικά έναντι του μικροοργανισμού. Επιπλέον η διατριβή αυτή αποτελεί μια προσπάθεια για την ενημέρωση-επαγρύπνηση της ιατρικής κοινότητας και μια πρόταση για τη δημιουργία και εφαρμογή πρωτοκόλλου-οδηγιών καλών πρακτικών στην χώρα μας, με βάση τις υπάρχουσες διεθνείς οδηγίες (RCOG, CDC, European Consensus).

Νιώθω χρέος μου λοιπόν, να ευχαριστήσω τους ανθρώπους εκείνους, χωρίς τη συμβολή των οποίων, η εκπόνηση της διατριβής αυτής θα ήταν αδύνατη.

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κα Καλλιόπη Παππά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας, επιβλέπον μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την πολύτιμη συνεργασία της, τις συμβουλές της, το αμείωτο ενδιαφέρον της και την υποδειγματική εποπτεία της από την έναρξη της εργασίας μέχρι την περάτωση αυτής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Κο Γεώργιο Λ. Δαΐκο, Καθηγητή Παθολογίας-Λοιμωξιολογίας, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις συμβουλές του, το ενδιαφέρον του, τις παρατηρήσεις του σε όλα τα στάδια της διδακτορικής διατριβής, από την έναρξη της εργασίας μέχρι την περάτωσή της.

Ένα μεγάλο και θερμό ευχαριστώ στην Κα Μαρίνα Μαντζουράνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις συμβουλές και παρατηρήσεις της και για το αμείωτο ενδιαφέρον της καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ένα ξεχωριστό και μεγάλο ευχαριστώ στην Κα Αικατερίνη Χαρβάλου, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, για την ανεκτίμητη συμβολή της, την άψογη

συνεργασία μας καθώς και για το άριστο φιλικό κλίμα που δημιουργήθηκε όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την Κα Δήμητρα Χούχουλα, Καθηγήτρια Χημείας, για την πολύτιμη συνεργασία, βοήθεια και φιλοξενία στο εργαστήριο της. Επίσης ευχαριστώ πολύ την Κα Δήμητρα Κασσαβήτα για τη συνεργασία και τη βοήθειά της μέσα στο χώρο του Εργαστηρίου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κα Ευαγγελία Τοπούλου, Βιολόγο, για τη βοήθειά της στη συλλογή των δειγμάτων καθώς και για τις επιδημιολογικές πληροφορίες που μου παρείχε.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τις θυσίες που έχουν κάνει για μένα όλα αυτά τα χρόνια.

Σας ευχαριστώ όλους.
Αθήνα 2018

Στους γονείς μου!

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Μέρος 1
Θεωρητικό Μέρος
Εισαγωγή
1.1 β-Αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος Ομάδας Β, Λοίμωξεις Εγκύων και Νεογνών 2
1.2 Επιδημιολογία Στρεπτόκοκκου Β στις Γυναίκες 7
1.3 Παράγοντες Αποικισμού του Στρεπτόκοκκου Β 9
1.4 Η Σημασία του GBS ως Ανθρώπινου Νεογνικού Παθογόνου ... 12
1.5 Λοιμώξεις της Εγκύου και Ενδομήτριες Επιπλοκές 14
1.6 Μικροβιολογικά Χαρακτηριστικά του GBS 17
1.7 Η παθογένεια του GBS: τι γνωρίζουμε σήμερα?. 20
1.8 Αλληλεπιδράσεις με Επιθηλιακά Κύτταρα 22
1.9 Το Πολυσακχαριδικό Καψίδιο, οι Ορότυποι και η Σημασία στην Παθογένεια 25
1.9.1 Πρωτεϊνες επιφάνειας 26
1.9.2 Ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνων Επιφάνειας 41
1.9.3 Γονιδιωματική Χαρτογράφηση *S. agalactiae* 42
1.10 Μελέτες Ανοσοποίησης και Εμβόλια 48
1.11 Οδηγίες Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (CDC) . 50
1.12 Αποτελεσματικότητα της Χημειοπροφύλαξης Κατά την Κύηση και Προβληματισμοί 54
1.13 Εναλλακτικές Οδοί Αντιμετώπισης Αποικισμού του Κόλπου .. 57
1.14. β-Αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος Ομάδος Β σην Ελλάδα 58
Μέρος 2
Υλικά και μέθοδοι
2.1 Σκοπός 61
2.2 Λήψη-καλλιέργεια και αντιβιόγραμμα 61
2.3 Τεστ ευαισθησίας σε αντιβιοτικά (κατά CLSI, 2013) 66
2.4 Μοριακή διερεύνηση λοιμογόνων παραγόντων
2.4.1 Υλικά και Μέθοδοι 69
2.4.2 Μέθοδος Απομόνωσης DNA 69
2.5 Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης PCR 74
2.6 Μέθοδος Διεξαγωγής της Ηλεκτροφόρησης 79
Μέρος 3
Αποτελέσματα 81
Μέρος 4
Συζήτηση 99
Βιβλιογραφία 121
Παραρτήματα 154

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΡΟΣ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 β-ΑΙΜΟΟΛΥΤΙΚΟΣ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΣ ΟΜΑΔΑΣ Β, ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΕΓΚΥΟΥ ΚΑΙ ΝΕΟΓΝΟΥ

Οι βακτηριακές λοιμώξεις μπορεί να επισυμβούν σε έγκυες γυναίκες, από την στιγμή της εμφύτευσης του γονιμοποιημένου ωαρίου έως και τον τοκετό αλλά και γενικότερα κατά την περιγεννητική περίοδο. Μπορούν επίσης να προσβάλλουν το έμβρυο ή το νεογνό. Σε πολλές περιπτώσεις δεν είναι εμφανείς, και γι' αυτό το λόγο η επιτήρηση και ο τακτικός έλεγχος είναι απαραίτητος.

***Group B Streptococcus* και λοίμωξη εγκύου εμβρύου**

Οι Gram-θετικοί κόκκοι αποτελούν ένα από τα πιο συχνά αίτια λοιμώξεων των ανθρώπων και για αυτόν τον λόγο γίνεται εδώ και χρόνια μεγάλη προσπάθεια ώστε να ανακαλυφθούν νέοι τρόποι πρόληψης και θεραπείας έναντι αυτών των παθογόνων οργανισμών, να αναλυθούν οι παθογενετικοί μηχανισμοί τους και να αναπτυχθούν αποτελεσματικά αντιβιοτικά, εμβόλια ή άλλοι τρόποι πρόληψης. Ο ρόλος των επιφανειακών πρωτεϊνών αυτών των μικροβίων στην παθογένεια και την προοπτική δημιουργίας εμβολίων έχει αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον (Lindahl G et.al., 2005).

Ο **β-αιμολυτικός στρεπτόκοκκος της ομάδας Β** (εναλλακτικά **GBS ή *S. Agalactiae)*** ανήκει στα gram-θετικά βακτήρια και ευθύνεται για μεγάλο αριθμό λοιμώξεων στον άνθρωπο. Όταν η λοίμωξη αφορά εγκύους ή νεογνά είναι ιδιαίτερα κρίσιμη καθώς συνδέεται με σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα (5-20%) κατά την περιγεννητική περίοδο (de Tejada B. M. *et al.*, 2011). Οι Simonsen *et al.* (2014), σημειώνουν ότι η *Escherichia coli* αποτελεί την πιο συχνή αιτία νεογνικού θανάτου, ιδιαίτερα των πρόωρων νεογνών ενώ ο GBS αποτελεί τον πιο συχνό αιτιολογικό παράγοντα νοσηρότητας των νεογνών.

Στα νεογνά ο GBS αποτελεί έναν σημαντικό παθογόνο παράγοντα τόσο **πρώιμης νόσου** (εμφάνιση ασθένειας εντός των πρώτων 7 ημερών της ζωής), όσο και **όψιμης νόσου** (εμφάνιση ασθένειας μετά την πρώτη εβδομάδα της ζωής και μέχρι τις πρώτες 90 ημέρες) (Πίνακας 1.1.1) (Koening JM et al.,

2009). Τα νεογνά γυναικών από τις οποίες απομονώθηκε σε καλλιέργεια ο GBS προγεννητικά, παρουσιάζουν 25 φορές περισσότερες πιθανότητες πρώιμης λοίμωξης από νεογνά γυναικών με αρνητικές καλλιέργειες (Guidelines, on Early onset GBS prevention, CDC, 2010).

Ο GBS αποικίζει το ουρογεννητικό και κατώτερο γαστρεντερικό σύστημα στο 10 με 40% όλων των εγκύων γυναικών και θεωρείται ο κύριος παράγοντας κινδύνου για μόλυνση των νεογνών. Οι πιο συχνές κλινικές μορφές της νεογνικής λοίμωξης από GBS είναι η σήψη, η πνευμονία και λιγότερο συχνά μηνιγγίτιδα (Heath P. T. *et al.*, 2007). Επιπλέον σύμφωνα με διάφορες μελέτες φαίνεται ότι ο αποικισμός γυναικών από GBS έχει συνδεθεί με αυξημένο ποσοστό ουρολοιμώξεων, επιπλοκών της κύησης όπως ενδομητρίτιδα, χοριοαμνιονίτιδα, πρόωρος τοκετός και ενδομήτριος θάνατος του εμβρύου. Αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι και μια στις τρείς γυναίκες είναι φορέας αλλά οι περισσότερες δεν το γνωρίζουν (Yu, H.-W. et al. 2011; Verani, J. R. et al. 2010).

Η μόλυνση του εμβρύου στην ενδομήτρια κοιλότητα γίνεται από βακτήριο προερχόμενο από τον κόλπο, μέσω εισρόφησης αμνιακού υγρού, ενώ μπορεί επίσης να μεταδοθεί κατά την κάθοδο του εμβρύου διαμέσου του γεννητικού καναλιού κατά την διάρκεια του φυσιολογικού τοκετού. Αξίζει να σημειωθεί πως η ενδομήτρια μόλυνση όπως προαναφέρθηκε μπορεί να οδηγήσει σε νεογνική πνευμονία, σηψαιμία μέχρι και ενδομήτριο θάνατο. Κατά τη μετάδοση του GBS κατά τον φυσιολογικό τοκετό συνήθως παρατηρείται αποικισμός του δέρματος ή της βλέννης των νεογνών και σπανιότερα προσβολή συστημάτων (Dermer P. *Et al.*, 2004). Επιπλέον αναφέρεται απο τον Chang, (Chang L.-Y., *et al.*, 2011), πως κατά τον φυσιολογικό τοκετό μια έγκυος θετική στον GBS έχει 40% με 70% πιθανότητες να μεταδώσει το βακτήριο στο νεογνό, αλλά μόνο 1 - 2% από τα προσβληθέντα νεογνά θα εμφανίσουν σοβαρή ασθένεια.

Σύμφωνα με τον Simonsen (Simonsen *et al.*, 2014), επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν μείωση στην συχνότητα εμφάνισης πρώιμης νεογνικής λοίμωξης από GBS κατά 80%. Αυτό θεωρείται ότι οφείλεται στον προγεννητικό έλεγχο και την αντιμικροβιακή χημειοπροφύλαξη κατά τον τοκετό. Παρόλα αυτά σύμφωνα με τον Verani (Verani J. R. *et al.*, 2010), παρατηρείται τα τελευταία χρόνια μια αυξανόμενη τάση στην ανθεκτικότητα του GBS στα διάφορα αντιβιοτικά. Επιπλέον τονίζεται πως η μειωμένη ευαισθησία στην πενικιλλίνη

καθώς και η ανθεκτικότητα στη κλινδαμυκίνη αποτελούν άμεση ανησυχία για τους κλινικούς.

Πίνακας 1.1.1

- Η «**πρώιμη λοίμωξη**» (early-onset) εκδηλώνεται κατά την 1η εβδομάδα της νεογνικής ζωής.
- Η «**όψιμη λοίμωξη**» (Late-onset) εκδηλώνεται μετά την 1η εβδομάδα της νεογνική ζωής και μέσα στους πρώτους τρείς μήνες της ζωής.

Η πρώιμη λοίμωξη είναι και ο πιο συχνός τύπος λοίμωξης στα νεογνά. Σήμερα λόγω της πρόληψης ο επιπολασμός των δύο μορφών εμφανίζεται σε ίδια ποσοστά περίπου που είναι εξ ίσου χαμηλά.

Στην πρώιμη λοίμωξη του β αιμολυτικού στρεπτοκόκκου Β στο νεογνό εμφανίζεται σηψαιμία, πνευμονία και σε μερικές περιπτώσεις μηνιγγίτιδα. Παρόμοια είναι η κλινική μορφή της λοίμωξης στην όψιμη μορφή της. Η μηνιγγίτιδα όμως είναι πιο συχνή στην όψιμη λοίμωξη

Χαρακτηριστικά των δύο τύπων νεογνικής λοίμωξης από στρεπτόκοκκο Β

Πρώιμη και όψιμη ασθένεια.

Πιο αναλυτικά, στην πρώιμη ασθένεια, το νεογνό μολύνεται από την έκθεση στον *S. agalactiae,* πριν ή κατά τη γέννηση (Edwards, M. S et al., 2001). Τα πρόσφατα ποσοστά θνησιμότητας που έχουν αναφερθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι 4 με 6% (Schrag et al., 1996). Κάποιες πρώιμες μολύνσεις μπορεί να συμβούν όταν το νεογνό εκτίθεται στον *S. agalactiae* κατά το πέρασμα μέσω του γεννητικού καναλιού, αλλά οι περισσότερες πρώιμες μολύνσεις προκαλούνται πιθανόν από την ανοδική διασπορά του οργανισμού από τη μητρική γεννητική οδό προς τις διαρρηγμένες μεμβράνες μέσα στο αμνιακό υγρό, στο οποίο τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται, επιτρέποντας τους να αποικίσουν την αναπνευστική οδό του βρέφους. Σε κάποιες περιπτώσεις, η μεταφορά του *S. agalactiae* μέσα στο αμνιακό υγρό μπορεί να συμβεί ακόμα και από άθικτες μεμβράνες. Μετά τη βακτηριακή είσοδο στην αναπνευστική οδό, μπορεί να αναπτυχθεί πνευμονία και τα βακτήρια μπορούν να εξαπλωθούν περαιτέρω στηη κυκλοφορία του αίματος προκαλώντας σηψαιμία. Η διασπορά

στην κυκλοφορία επιτρέπει στα βακτήρια να φτάσουν σε πολλά σημεία του σώματος, όπου η επακόλουθη εισβολή στους ιστούς μπορεί να προκαλέσει εκδηλώσεις μηνιγγίτιδας ή οστεομυελίτιδας (Edwards, M. S et al., 2001, Nizet, V., et al., 1997, Rubens, C. E., et al., 1991). Συνεπώς, για να προκαλέσει ασθένειες, ο *S. agalactiae* πρέπει να προσκολληθεί και να εισβάλλει στα κύτταρα, παρακάμπτοντας πολλά επιθηλιακά/ενδοθηλιακά εμπόδια. Σε μία σημαντική πειραματική μελέτη που προσομοίαζε την πρώιμη ασθένεια, ο *S. agalactiae* χρησιμοποιήθηκε για τον αμνιακό εμβολιασμό πρωτευόντων *Macaca nemestrina* και ακολούθησε ανάλυση των μολυσμένων ιστών (Gibson, R. L., et al., 1993, Rubens, C. E., et al., 1991). Ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι παρατηρήθηκαν βακτήρια στα κενοτόπια των εμβρυικών πνευμονικών επιθηλιακών, ενδοθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών. Σύμφωνα με την παρατήρηση αυτή, φαίνεται ότι ο *S. agalactiae* εισβάλλει στα ανθρώπινα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, ακόμα και στα μακροφάγα, σε ιστικές καλλιέργειες, ενώ τα βακτήρια μπορεί επίσης να επιβιώνουν ενδοκυτταρικά. Συνεπώς, η προσβολή ανθρώπινων κυττάρων μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση. Ωστόσο, όλα τα διαθέσιμα στοιχεία δείχνουν ότι ο *S. agalactiae* πρέπει να θεωρείται ως εξωκυτταρικό παθογόνο, παρόλο που μπορεί να επιβιώνει ενδοκυτταρικά σε συγκεκριμένα στάδια της μόλυνσης. Σε αντίθεση με ένα τυπικό ενδοκυτταρικό παθογόνο όπως η *Listeria monocytogenes*, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι ο *S. agalactiae* μπορεί να πολλαπλασιαστεί ενδοκυτταρικά. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι η ικανότητα εισβολής στα ανθρώπινα κύτταρα σε ιστικές καλλιέργειες *in vitro* μπορεί να μην αντανακλά πάντοτε την *in vivo* κατάσταση. Για παράδειγμα, το στέλεχος *Staphylococcus aureus* εύκολα εισβάλλει σε ανθρώπινα κύτταρα σε μία ιστική καλλιέργεια αλλά δεν είχε ενδοκυτταρική παρουσία σε ένα πειραματόζωο. Ωστόσο, οι παρατηρήσεις στο μοντέλο μαϊμούς που μελετήθηκε από τους Rubens et al. (1991) έδειξε ότι η ικανότητα του *S. agalactiae* να εισβάλλει στα κύτταρα σε μία καλλιέργεια σχετίζεται πράγματι με ανθρώπινες μολύνσεις.

Η όψιμη νεογνική ασθένεια είναι λιγότερο κοινή σε σχέση με την πρώιμη αλλά γίνεται όλο και πιο σημαντική επειδή η εμφάνιση της δεν έχει μειωθεί ως αποτέλεσμα των προφυλακτικών μέτρων που προκάλεσαν αντίστοιχα μείωση

της εμφάνισης μολύνσεων από την πρώιμη ασθένεια. Δεν είναι γνωστά πολλά σχετικά με την παθογένεση των όψιμων μολύνσεων. Ωστόσο, η κάθετη μεταφορά του οργανισμού από τη μητέρα στο βρέφος πιθανόν να εξηγεί τις περισσότερες μολύνσεις κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Σε κάποιες περιπτώσεις, η όψιμη ασθένεια εμφανίζεται ως ενδονοσοκομειακή επιδημία που επηρεάζει κυρίως τα πρόωρα νεογνά, τα οποία πιθανόν αποκτούν το βακτήριο με οριζόντια μεταφορά από το προσωπικό. Οι δύο πιο κοινές κλινικές εκδηλώσεις της όψιμης ασθένειας είναι η μηνιγγίτιδα και η βακτηριαιμία χωρίς εστιασμένη μόλυνση. Τα ποσοστά θνησιμότητας για την όψιμη ασθένεια είναι γενικότερα χαμηλότερα από τα αντίστοιχα για τις πρώιμες μολύνσεις, με αναφορά ενός εύρους 2 έως 6% (Edwards, M. S., and C. J. Baker. 2001, Schrag S et al., 1996)

Σημαντικό είναι το γεγονός ότι ένα μεγάλο ποσοστό νεογνών που επιβιώνουν από τη μόλυνση του *S. agalactiae*, υποφέρουν από παρενέργειες. Σε περιπτώσεις νεογνικών μηνιγγίτιδων, πάνω από το 50% των ατόμων που επιβιώνουν εμφανίζουν νευρολογικά προβλήματα που περιλαμβάνουν νοητική καθυστέρηση, φλοιώδη τύφλωση, κώφωση, ανεξέλεγκτες κρίσεις, υδροκεφαλία, απώλεια ακοής και καθυστέρηση λόγου και γλώσσας.

Επειδή η ασθένεια αναπτύσσεται μόνο σε ένα μικρό τμήμα των νεογνών που αποικίζονται από *S. agalactiae* κατά τη γέννηση, πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να ταυτοποιήσουν τους παράγοντες που θα μπορούσαν να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας. Η διάρρηξη των μεμβρανών πριν την έναρξη της γέννας και το αυξημένο χρονικό διάστημα μεταξύ διάρρηξης των μεμβρανών και γέννησης του βρέφους θεωρούνται βασικοί παράγοντες κινδύνου. Άλλοι παράγοντες προδιάθεσης περιλαμβάνουν την πρόωρη γέννηση, το χαμηλό βάρος γέννησης, η πυκνή κολπική βακτηριακή αποίκηση και η ενδομήτρια λοίμωξη. Η ευαισθησία του βρέφους στη μόλυνση από *S. agalactiae* μπορεί επίσης να ενισχυθεί από τα χαμηλά επίπεδα μητρικών αντισωμάτων ενάντια στο πολυσακχαριτικό καψίδιο ή ενάντια στις επιφανειακές πρωτεΐνες (Luck, S., et al., 2003).

Εμφάνιση της νεογνικής ασθένειας. Η συνολική εμφάνιση της επεμβατικής νεογνικής ασθένειας από *S. agalactiae* εκτιμήθηκε πρόσφατα ως 0,6 με 1,8 περιπτώσεις ανά 1000 γεννήσεις στις Ηνωμένες Πολιτείες και 0,7

περιπτώσεις ανά 1000 γεννήσεις στο Ηνωμένο Βασίλειο και την Ιρλανδία. Τα ποσοστά θνησιμότητας που έχουν αναφερθεί είναι μεταξύ 4 και 6% στις Ηνωμένες Πολιτείες και περίπου 10% στο Ηνωμένο Βασίλειο. Περιέργως, έχει προταθεί ότι η εμφάνιση νεογνικής ασθένειας είναι σημαντικά μεγαλύτερη από ότι αναφέρεται, επειδή η απαίτηση για θετικές καλλιέργειες αίματος ή εγκεφαλονωτιαίου υγρού μπορεί να υποτιμούν το πραγματικό φορτίο της ασθένειας. Να σημειωθεί ότι η νεογνική ασθένεια από *S. agalactiae* είναι πιο κοινή από κάποιες άλλες γνωστές ασθένειες που επηρεάζουν τα νεογέννητα, όπως η ερυθρά και η δισχιδής ράχη. Η εμφάνιση νεογνικής ασθένειας από *S. agalactiae* μειώθηκε σημαντικά στις Ηνωμένες Πολιτείες κατά τη δεκαετία του 1990, πιθανώς λόγω της έναρξης προγραμμάτων παρακολούθησης και ενδομήτριας αντιβιοτικής προφύλαξης. Ωστόσο, η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικής προφύλαξης για την αναστολή της ασθένειας από *S. agalactiae* ίσως αποβεί προβληματική, διότι έχει συνοδευτεί από αύξηση του φαινομένου πρόωρης σήψης που προκαλείται από το *Escherichia coli*, καθιστώντας επιτακτική τη δημιουργία εμβολίου για το *S. Agalactiae* (Heath, P. T., et al., 2004, Luck, S., M et al., 2003).

1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ β-ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΥ ΟΜΑΔΟΣ Β ΣΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ

Το εύρος αποικισμού του γυναικείου κόλπου, κατά την κύηση διεθνώς φαίνεται πως είναι τεράστιο και αυτή η διαφορά οφείλεται στις διαφορετικές περιοχές ή πληθυσμούς των διαφόρων μελετών αλλά και στην μέθοδο λήψης του δείγματος και την καλλιέργεια.

Η πιο πρόσφατη διεθνής μελέτη αποικισμού του κόλπου εκτιμά την επίπτωση σε 18% συνολικά, μετά από εξισορρόπηση της δειγματοληψίας και μεθοδολογίας με το χαμηλότερο ποσοστό στην νότια και ανατολική Ασία (11-13%) και την μεγαλύτερη στην Καραιβική (35%) (Russel et al.,2017).

Παλιότερες διεθνείς μελέτες αναφέρουν εύρος ανάμεσα σε 8-18% (Stoll BJ et al, 1998; Regan JA 1999; Kwatra G, et al., 2016).

Διάφοροι παράγοντες κινδύνου κολπικού αποικισμού έχουν ταυτοποιηθεί, τόσο βιολογικοί όσο και κοινωνικο-οικονομικοί. Βιολογικοί παράγοντες περιλαμβάνουν ιστορικό πρόωρης ρήξης υμένων, (PROM) (Alp F,

et al., 2016), αποικισμό του γαστρεντερικού συστήματος (Le Doare K et al., 2013), και προχωρημένη ηλικία της μητέρας. Σε μία μελέτη, η μεγαλύτερη των 36 ετών ηλικία της μητέρας συνδεόταν με εμμένοντα αποικισμό (Le Doare K et al., 2013; Khan MA, et 2015), ενώ άλλη μελέτη έδειξε υψηλότερα ποσοστά αποικισμού σε γυναίκες άνω των 40 ετών (Manning SD et al., 2008).

Εθνικότητα, παχυσαρκία, χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D στον ορό, χαμηλό επίπεδο υγιεινής και επαγγέλματα παροχής υπηρεσιών υγείας φαίνεται επίσης να συνδέονται με φορεία GBS στον κόλπο (Le Doare et al., 2013; Khan MA et al., 2015; Stapleton RD et al., 2005; AkohC C et al., 2017; Kappan- Messler 2015).

Κατά την κύηση ο αποικισμός του κόλπου μπορεί να είναι συνεχής, διαλείπων ή παροδικός στις γυναίκες, (Brzychczy-Wloch M et al., 2014).

Η πλειοψηφία των θετικών για GBS γυναικών είναι σταθερά αποικισμένες κατά την περιγεννητική περίοδο. Εν τούτοις, έχουν αναφερθεί αλλαγές στον ορότυπο, τους τύπους αλληλούχισης (ST, sequence type) ή ακόμη και απώλεια του τύπου ST (Manning SD et al., 2008).

Σε πολλές μελέτες έχει γίνει ταυτοποίηση των πιο κοινών οροτύπων στην Αμερική, και συμφωνούν πως οι ορότυποι **Ia, III** και **V** είναι οι πιο συνηθισμένοι, με τον ορότυπο **III** να οδηγεί σε επιμένοντα αποικισμό και μάλιστα περισσότερο από τους Ia, V (Manning SD et al., 2008; Ferrieri P, et al., 2004; Edwards MS, et al., 2005; Kwatra G et al., 2014).

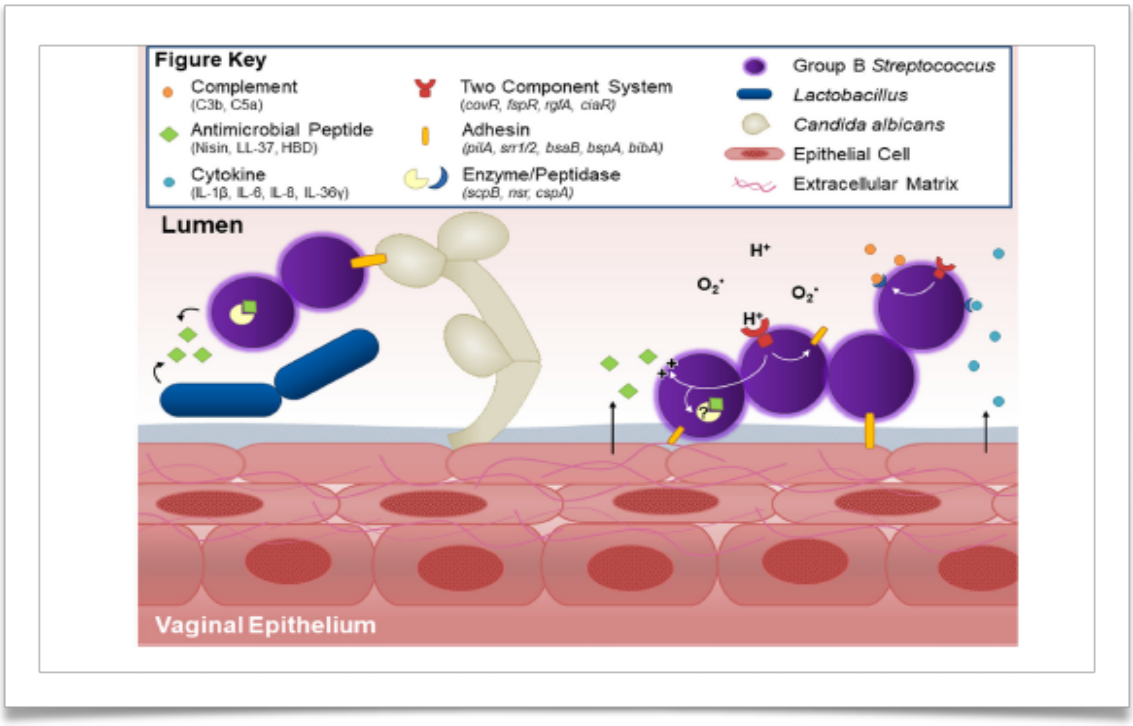
Λόγω της πιθανότητας μεταλλαγών του καψιδίου, νεότερες μελέτες MLST (multilocus sequence typing) επικεντ ρώθηκαν στους τύπους STs 1, 17, 23, και 19 και έδειξαν πως είναι τα πιο διαδεδομένα στελέχη που αποικίζουν την μητέρα (Manning SD et al., 2008; Teatero et al., 2017).

Ισχυρή ένδειξη για δημιουργία βιομεμβρανών (biofilm) συνδέεται με ασυμπτωματική φορεία στον κόλπο σε ένα βαθμό, ενώ όταν πρόκειται για διεισδυτικά στελέχη η δημιουργία biofilm η ένδειξη αυτήν είναι περισσότερο πιθανή (Parker RE et al., 2016).

1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΥ Β

Η παροδική φύση του κολπικού αποικισμού με στρεπτόκοκκο Β αντικατοπτρίζει το συνδυασμό στοιχείων του GBS, ανταγωνισμό με την χλωρίδα του κόλπου, άνοση απόκριση του ξενιστή και διαφορές λόγω της κυήσεως, του pH του κόλπου, του οιστρογονικού κύκλου και άλλων παραγόντων που φαίνονται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 1.3.1).

Σχήμα 1.3.1



Βακτηριακοί παράγοντες και παράγοντες του ξενιστή που συνεισφέρουν στον αποικισμό του κόλπου από GBS. Μέσα στον κόλπο, ο στρεπτόκοκκος Β αλληλεπιδρά με την βακτηριακή χλωρίδα. Ο Lactobacillus και ο GBS παρουσιάζουν ανταγωνιστική δράση ο ένας απέναντι στον άλλο, με την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων και οικολογικού ανταγωνισμού. Ο GBS παράγει αντιρροπιστικούς παράγοντες έναντι αυτών που παράγει ο Lactococcus, όπως η πρωτεάση NSR που λύει το αντιβιοτικό Νισίνη. Αλλά μέλη της χλωρίδας, όπως η C. albicans, διευκολύνουν τον αποικισμό από GBS, μερικώς μέσω της αντεσίνης του GBS, BspA. Ο GBS προσκολλάται στο επιθήλιο του κόλπου και στα εξωκυττάρια στοιχεία μέσω αντεσινών, συμπεριλαμβανομένων και των επίτοπων Srr-1 and Srr-2, BsaB, BspA, and BibA. Κατά την αλληλεπίδραση με το επιθήλιο ο στρπτόκοκκος Β προκαλεί την απάντηση κυτταροκινών του ξενιστή όπως, IL-1β, IL-8, CXCL1, και CXCL2. Οι δύο CXCL1, και CXCL2 μπορεί να αποδομηθούν από την πρωτεάση της σερίνης CspA. Το επιθήλιο του κόλπου μπορεί επίσης να παράγει αντιμικροβιακά πεπτίδια, όπως LL-37 ή β-ντεφεντίνες, τις οποίες ο GBS αποδομεί με

λιποτειχοικά οξέα συνδεδεμένα με d-alanine ή άλλες πεπτιδάσες που δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη. Ο GBS αντικρούει τους μηχανισμούς εγγενούς ανοσίας εμποδίζοντας με στοιχεία του καψιδίου την προσκόλληση του συμπληρώματος C3b μέσω αποδόμησης του C5a διά του ScpB. Επίσης, ο μικροοργανισμός, χρησιμοποιεί συστήματα δύο παραγόντων για να ανιχνεύσει τις περιβαλλοντικές συνθήκες και να ρυθμίσει παράγοντες παθογένειας και επιβίωσης μέσω ρυθμιστών απόκρισης όπως οι CovR και CiaR

Ένα από τα σημαντικότερα βήματα για τον επιτυχή αποικισμό του GBS επιθηλιακών κυττάρων είναι η προσκόλληση στα κύτταρα του αυλού και τις επιφανειακές πρωτεΐνες διαφόρων κυττάρων του ξενιστή. Αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης του GBS στα κολπικά επιθηλιακά κύτταρα κυρίως στα εξωκυττάρια πρωτεινικά τμήματα (extracellular matrix, ECM) με τις πρωτεΐνες έχει παρατηρηθεί *invitro* όταν το pH του κόλπου μεταβάλλεται από όξινο σε ουδέτερο, στοιχειοθετώντας την ροπή του μικροοργανισμού για προσκόλληση στα κύτταρα του κόλπου στο αντίστοιχο pH (Park SE, et al., 2012).

Διάφορα ειδικά **επιφανειακά στοιχεία** στον GBS έχουν αποδειχθεί ότι συνεισφέρουν στον αποικισμό του κόλπου και του τραχήλου. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται πρωτεΐνες, πλούσιες σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες σερίνης **(surface serine-rich repeat, Srr),** και πιο ειδικά τις Srr-1 και Srr-2 (Sheen TR et al., 2015; Wang NY, et al., 2014), τις **alpha-like proteins** (Baron MJ, et al., 2004), την πρωτεΐνη των τριχών **PilA,** που κωδικοποιείται στο νησίδιο παθογένειας του στρεπτοκόκκου **(PI)-2a** (Sheen TR et al., 2015), τις επιφανειακές πρωτεΐνες της κατηγορίας των αντεσινών όπως **BsaB** (Jiang S et al., 2014), **BspA** (Rego S, etal., 2016), και τη **BibA** (Santil L, et al., 2007).

Επί πλέον, τα **ινίδια** (τρίχες, ή τριχίδια) του στρεπτοκόκκου και άλλες επιφανειακές πρωτεΐνες, προωθούν την προσκόλληση στα εξωκυττάρια πρωτεϊνικά τμήματα των κυττάρων του ξενιστή, όπως, κολλαγόνο, ινωδογόνο, φιμπρονεκτίνη, και λαμινίνη, παράγοντες οι οποίοι έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορες μελέτες του πρωτεόματος του κόλπου (Banerjee A et al., 2011; Schubert A, et al., 2002; Dehbashi S, et al., 2016; Devi AS, et al., 2012; Tamura GS, et al., 1995; Hull JR, et al., 2008; Cheng Q, et al., 2002;

Franken C et al., 2001; Spellerberg B, et al., 1999; Zegels G, et al., 2009; Soares GC et al., 2008).

Είναι αξιοσημείωτο, ότι ο στρεπτόκοκκος Β φέρει **μεταλλοπεπτιδάσες**, οι οποίες αποκόπτουν όλες τις πιο πάνω αναφερθείσες ECM πρωτεΐνες, ένα γεγονός που μπορεί να βοηθά στην τοπική εισβολή των ιστών ή εγκατάσταση στη συγκεκριμένη οικολογική φωλιά (Soares GC etal., 2008).

Τα παθογόνα στοιχεία του στρεπτοκόκκου Β εκτός από την προσκόλληση μέσω των ειδικών πρωτεινικών στοιχείων, μπορεί να επηρεάζουν την κολποτραχηλική προσκόλληση ή την επίμονη εγκατάσταση στον κόλπο, μέσω ειδικών **καψιδικών επιτόπων** (ορότυποι προσκόλλησης) (Bodaszewska-Lubas M, et al., 2013; Patras KA et al., 2015), μέσω της έκφρασης της **β-αιμολυσίνης/κυτολυσίνης** (β-hemolysin / cytolysin, β-H /C), μέσω της έκφρασης της **τοξίνης** και του **καροτενοειδούς** (Patras KA, Wang NY, et al., 2014; Carey AJ, et al., 2014), και μέσω του μεταφορέα MntH, ενός μεταφορέα που δρά μέσω αντλίας πρωτονίων (Shabayek S, et al., 2016).

Επίδραση του μικροβιώματος του κόλπου στον αποικισμό από Στρεπτόκοκκο Β

Σε πρόσφατες μελέτες το ανθρώπινο μικροβίωμα του κόλπου, κατατάσσεται σε 5 κατηγορίες, με 5 διαφορετικούς μικροβιακούς πληθυσμούς. Στις τέσσερις κατηγορίες προεξάρχουν τα είδη *Lactobacillus sp*, που πιστεύεται πως χαμηλώνουν το pH μέσω παραγωγής γαλακτικού οξέος βοηθώντας έτσι στην προστασία του ξενιστή από την ανάπτυξη διαφόρων μικροβιακών παθογόνων (Ravel J, et al., 2011). Στη διάρκεια της εγκυμοσύνης επισυμβαίνει μία μείωση των διαφορετικών μικροβίων του κόλπου, με κυριάρχηση ειδών *Lactobacillus* sp και άλλων *Lactobacillales*, και σε μικρότερο βαθμό *Clostridiales*, *Bacteroidales*, και *Actinomycetales*, τα οποία προωθούν στην περαιτέρω μείωση του pH του κόλπου για να προστατευθεί η μητέρα και το έμβρυο από την λοίμωξη (Nuriel-Ohayon M, et al., 2016; Aagaard K, et al., 2012). Το εάν ο GBS θα έπρεπε να θεωρείται μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του κόλπου είναι ακόμη υπό αμφισβήτηση. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την μείωση των πληθυσμών των κολπικών λακτοβακίλλων

σε παρουσία GBS (Kubota T, et al., 2002; Altoparlak U, et al., 2004; Ronnqvist PD, et al., 2006). Αλλες όμως μελέτες δεν κατόρθωσαν να αποδείξουν κάτι τέτοιο (Stapleton RD, et al., 2005; Rick AM, et al., 2017). Επίσης, απουσία λακτοβακίλλων στο γαστρεντερικό σύστημα φαίνεται ότι αποτελεί παράγοντα αποικισμού του κόλπου (LeDoare K, et al., 2013).

1.4 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ GBS ΩΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΝΕΟΓΝΙΚΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ

Στη δεκαετία του '70 ο στρεπτόκοκκος Β ήταν η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας νεογνών, που προκάλεσε περισσότερες από 7000 περιπτώσεις διεισδυτικής νόσου ετησίως στην Αμερική (Verani JR et al., 2010).

Η πρώιμη νόσος από GBS, (Early-onset disease, EOD), προέρχεται από ανιούσα λοίμωξη κατά το δίοδο του νεογνού από το γεννητικό σωλήνα της μητέρας και εκδηλώνεται 0-6 ημέρες από την γέννηση με πνευμονία, ή αναπνευστική δυσχέρεια και συχνά προχωρημένη σηψαιμία.

Η όψιμη νόσος (Late-onset disease, LOD) επισυμβαίνει από 7- 90 ημέρες από την γέννηση και προέρχεται από την μητέρα, νοσοκομειακή ή άλλη πηγή, με πιο συνηθισμένο σύμπτωμα βακτηριαμία και μεγάλη πιθανότητα επιπλοκής με μηνιγγίτιδα (Maisey HC, et al., 2008; Edmond KM, et al., 2012*).* Από τα νεογνά που αναπτύσσουν μηνιγγίτιδα, περίπου 50% παρουσιάζουν εν συνεχεία νευρολογικές διαταραχές (Bedford H, et al., 2001).

Περίπου 4 εκατ νεογνά πεθαίνουν κατ' έτος στις πρώτες 4 εβδομάδες της ζωής παγκοσμίως, και ένα στα 4 από αυτούς τους θανάτους προέρχεται από σοβαρή λοίμωξη ή πνευμονία, με 99% των νεογνικών θανάτων να συμβαίνει στις χώρες με χαμηλό ή μεσαίο κατά κεφαλήν εισόδημα (Lawn JE et al., 2005).

Στις ανεπτυγμένες χώρες ο GBS και η *E. Coli,* από κοινού αποτελούν το αίτιο για το 70% περίπου πρώιμης νεογνικής σήψης και πρόωρου τοκετού (Simonsen KA, et al., 2014).

Νεογνικός αποικισμός συμβαίνει σε περίπου 40-75% των γεννήσεων από μητέρες που αποικίζονται και από αυτές τι περιπτώσεις 1-2% καταλήγει σε διεισδυτική νόσο (Winn HN., 2007; Namavar Jahromi B, et al., 2008; Chan G J, et al., 2015; Boyer KM, 1986).

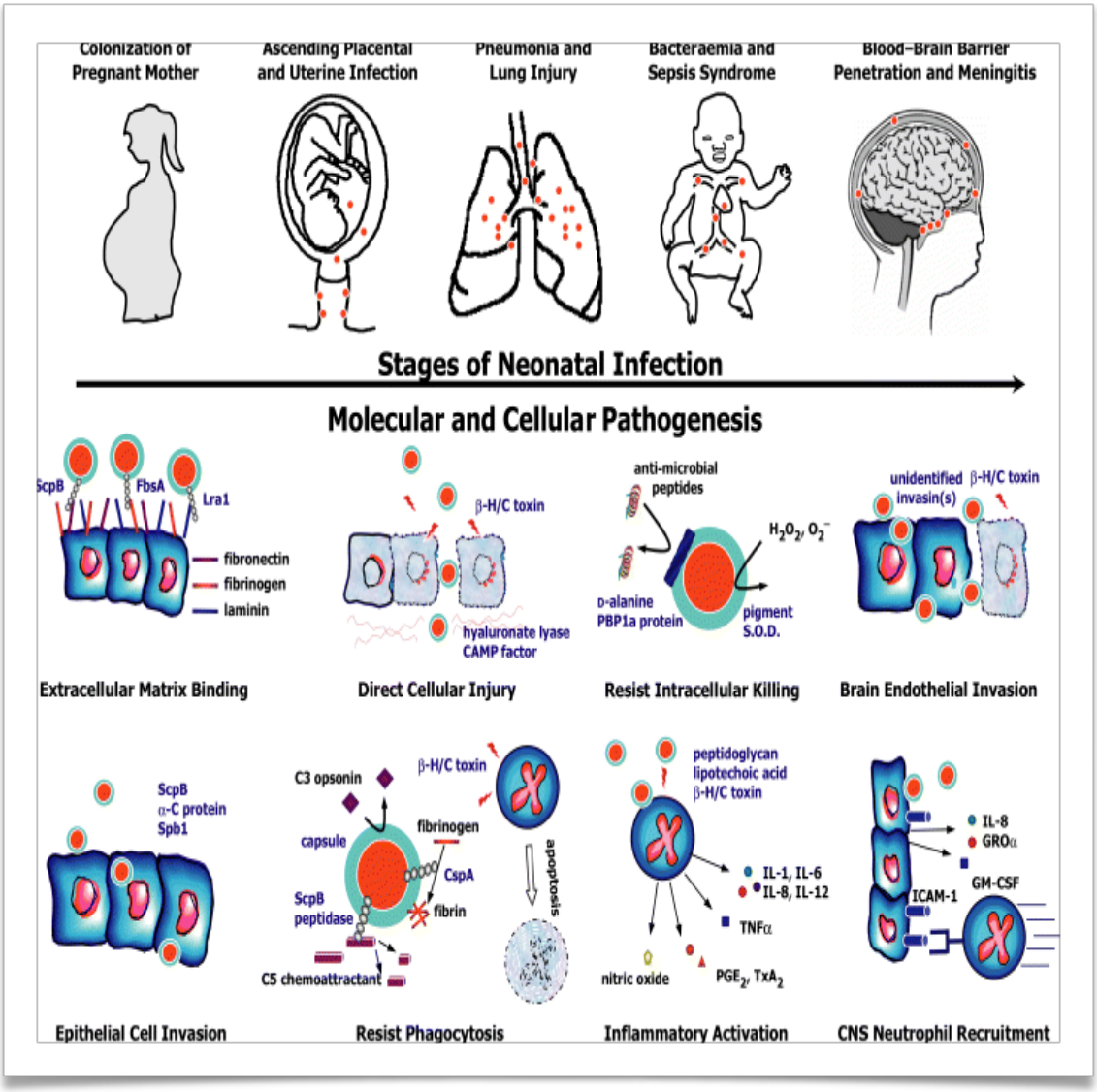
Παράγοντες κινδύνου νεογνικού αποικισμού περιλαμβάνουν πυρετό και μεγάλης συγκέντρωσης αποικισμό της μητέρας, έλλειψη αντιβιοτικής προληπτικής θεραπείας και Αφρικανική υπηκοότητα (Berardi A, et al., 2014).

Παράγοντες κινδύνου για την νεογνική λοίμωξη περιλαμβάνουν πρόωρο τοκετό σε <37 εβδομάδες, παρατεταμένο χρόνο ρήξης υμένων (>18 h), πυρετό της μητέρας κατά την κύηση, από 38°C, προηγούμενη κύηση με παιδί με αποικισμό ή λοίμωξη με GBS, ή έκθεση αλλά όχι λοίμωξη HIV (Schrag S, et al., 1996; Slogrove AL, et al., 20160. Νεογνά που γεννιούνται από GBS-θετική μητέρα παρουσιάζουν τρείς φορές τουλάχιστον πιθανότητα να μεταφερθούν σε μονάδα εντατικής νεογνών (Brigtsen AK, et al., 2015).

Η έκθεση σε **GBS** ή αποικισμός μπορεί επίσης να έχει επίπτωση στην υγεία κατά την παιδική ηλικία αργότερα ενώ ο αποικισμός της μητέρας μπορεί να συνδέεται με υψηλό κίνδυνο παιδικού άσθματος (Wu P, et al., 2016).

Όσον αφορά σήμερα τη λοίμωξη στον ανοσοκατασταλμένο, την κυοφορούσα, το διαβητικό και την τρίτη ηλικία, ο GBS αναγνωρίζεται ως ένα διεισδυτικό παθογόνο με κλινικές εικόνες, όπως σηψαιμία, ουρολοιμώξεις, λοιμώξεις των μαλακών μορίων και μηνιγγίτιδα (Maisey HC, et al., 2008).

Σχήμα 1.4.1



Απεικονίζει τα στάδια και τους πιο καλά διερευνημένους παράγοντες λοιμογονικότητας στο νεογνό

1.5 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΗΣ ΕΓΚΥΟΥ ΚΑΙ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ

Παρότι γνωστός για τις νεογνικές λοιμώξεις, ο GBS επίσης προκαλεί άλλες λοιμώξεις, της μητέρας. Οι έγκυες γυναίκες παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα διεισδυτικής Β στρεπτοκοκκικής λοίμωξης τόσο κατά την κύηση (0.04 περιπτώσεις / 1,000 γυναίκες /έτος) και κατά την λοχεία (0,49 περιπτώσεις / 1000 γυναίκες /έτος) σε σύγκριση με μη εγκύους (0,02 περιπτώσεις/1000 γυναίκες/ έτος) (Deutscher M et al., 2011).

Λοιμώξεις ουροποιητικού

Σε περίπου 3.5% των κυήσεων ο GBS αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα ουρολοίμωξης ή ασυμπτωματικής βακτηριουρίας (Ulett KB, et al., 2009; Wood EG & Dillon HC Jr. 1981). Αν παραμείνει χωρίς θεραπεία η βακτηριουρία μπορεί να δώσει την θέση της σε οξεία πυελονεφρίτιδα. Ο GBS τελικά αποτελεί το σημαντικότερο Gram + παθογόνο του ουροποιητικού που ευθύνεται για το 10% των ουρολοιμώξεων στην κύηση (Hill JB, et al., 2005; Kessous R et al., 2012). Η βακτηριουρία από GBS κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης συνδέεται με υψηλό κίνδυνο για επιλόχειο πυρετό, χοριοαμνιονίτιδα, πρόωρο τοκετό και PROM (Kessous R et al., 2012).

Φορεία στον κόλπο, βακτηριαιμία και χοριοαμνιονίτιδα

Η φορεία του GBS είναι αυξημένη σε γυναίκες με κολπίτιδα (Jensen NE, & Andersen BL., 1979) και σε ορισμένες περιπτώσεις ο στρεπτόκοκκος Β μπορεί να αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα, ή έναν από τους παράγοντες, του κλινικού συνδρόμου (Honig E et al., 1999).

Η βακτηριαιμία από GBS είναι πολύ συχνή κατά την κύηση και την αμέσως μετά τον τοκετό περίοδο, και ευθύνεται για περίπου 75% των περιπτώσεων στις ενήλικες γυναίκες.

Ο αποικισμός του κόλπου ιδιαίτερα με υψηλό βακτηριακό φορτίο έχει συνδεθεί με πρόωρο τοκετό και πρόωρη ρήξη υμένων, σε διάφορους πληθυσμούς γυναικών, αλλά δεν υπάρχει μέχρι τώρα μία νεότερη συστηματική ανασκόπηση στο θέμα (Valkenburg-Vanden Berg Aw et al., 2009).

Η άνοδος του στρεπτοκόκκου Β από το γεννητικό σύστημα κατά την κύηση μπορεί να καταλήξει σε ενδοαμνιακή λοίμωξη, χοριοαμνιονίτιδα, ή νεκρό έμβρυο (Schrag S, et al., 1996; Muller AE et al., 2006; Yancey MK et al., 1994; Krohn MA, et al., 1999; Nan C, 2015). Το βακτηριακό φορτίο GBS είναι συχνά υψηλό σε πλακούντες από εγκύους με πρόωρο τοκετό ή χοριοαμνιονίτιδα. (Prince AL, et al., 2016).

Σε πρόσφατες μελέτες, ένας αριθμός ερευνητών αναφέρει την ανακάλυψη μοντέλων – ζώων για την ανιούσα λοίμωξη της μήτρας ώστε να μελετηθούν οι μηχανισμοί λοίμωξης.

Η β αιμολυσίνη/κυτολυσίνη (β-H/C) του GBS ταυτοποιήθηκε σαν μείζων παράγοντας λοιμογονικότητας ο οποίος φαίνεται να συνεισφέρει σημαντικά στην ενδομήτρια λοίμωξη σε διάφορα από αυτά τα πειραματικά μοντέλα.

Σε μοντέλο ανιούσας λοίμωξης με το άγριο στέλεχος που εκφράζει την αιμολυσίνη Β/κυτολυσίνη σε θηλυκούς ποντικούς σε κύηση, παρατηρήθηκαν περισσότερες πρόωρες γεννήσεις, ενδομήτριοι θάνατοι μαζί με υψηλού βαθμού φλεγμονής του πλακούντα, σε σύγκριση με ισόμορφα στελέχη που προέρχονται από μετάλλαξη του GBS χωρίς το γονίδιο και κατά συνέπεια την έκφραση (β-H/C) (Randis TM, et al., 2014).

Σε μία άλλη μελέτη, στέλεχος του GBS με την αιμολυσίνη, σε μη ανθρώπινο θηλαστικό μοντέλο, προκάλεσε πρόωρο τοκετό πιο γρήγορα από το μη αιμολυτικό στέλεχος κοντρόλ (Boldenow E et al., 2016).

Η υαλουρονιδάση του στρεπτοκόκκου Β αποτελεί έναν άλλο λοιμογόνο παράγοντα που συμβάλλει στην ανιούσα λοίμωξη, πρώιμο τοκετό, θάνατο του εμβρύου, ενώ καταστέλλει επιπλέον την άνοση απάντηση του ενδομήτριου περιβάλλοντος, όταν απομονώνεται από το ενδομήτριο ζωντανός μικροοργανισμός (Vornhagen J, et al., 2016).

Αυτές οι μελέτες σε ζωντανά μοντέλα, συνάδουν με τις κλινικές παρατηρήσεις στον άνθρωπο, σχετικά με τους μηχανισμούς παθογένειας του GBS.

Πρωτογενή αμνιακά επιθηλιακά κύτταρα και ακέραιες χοριοαμνιακές μεμβράνες είναι περισσότερο ευάλωτες στην άμεση προσβολή ή είναι πιο εύκολα προσβάσιμες από υπεραιμολυτικό Δ*covR* μεταλλάκτη, σε σύγκριση με στελέχη που δεν φέρουν το γονίδιο (Whidbey C, et al., 2013). Τέλος, αυξημένη δραστικότητα υαλουρονιδάσης του GBS παρατηρείται σε κλινικά στελέχη προώρων τοκετών σε σύγκριση με διεισδυτικά στελέχη απομονωμένα από νεογνά ή από τον κόλπο των εγκύων (Vornhagen J, et al., 2016).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.4.1

Στις εγκύους ο στρεπτόκκος Β μπορεί να προκαλέσει:

- Ασυμπτωματική βακτηριουρία
- Λοίμωξη του ουροποιητικού
- Χοριοαμνιονίτιδα

Η χοριοαμνιονίτιδα εκδηλώνεται με πυρετό, ευαισθησία στη μήτρα, ταχυκαρδία στη μητέρα και το έμβρυο, πυώδες αμνιακό υγρό και λευκοκυττάρωση της μητέρας.

Κατά τη λοχεία η λοίμωξη μπορεί να προκαλέσει:

- Ενδομητρίτιδα το 1ο 48ωρο μετά τον τοκετό
- Πνευμονία
- Επιλόχεια σήψη
- Βακτηριαιμία χωρίς εστία
- Σπανίως: μηνιγγίτιδα ή ενδοκαρδίτιδα

Άλλες επιπλοκές μπορεί να είναι αυτόματη αποβολή του εμβρύου ή ενδομήτριος θάνατος, προωρότητα, χαμηλό βάρος γέννησης του νεογνού και πρώιμη νεογνική λοίμωξη.

Η λοίμωξη στην έγκυο

1.6 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ GBS

Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του GBS, αντοχή σε αντιβιοτικά και λοιμογόνοι παράγοντες

Περιγραφή-μικροβιολογία

Το γένος *Streptococcus ταξινομείται με βάση την αιμολυτική ιδιότητα σε τρείς τύπους: α, β και μη-αιμολυτικούς. Ο στρεπτόκοκκος Β, ή Streptococcus agalactieae, ή Group B Streptococcus (GBS) είναι ένας από τις τέσσερεις ομάδες β-αιμολυτικών στρεπτοκόκκων που προκαλούν πλήρη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με αποτέλεσμα πλήρη διαύγαση γύρω από τις μικροβιακές αποικίες σε αιματούχο άγαρ (* In Patterson MJ, 1996)

Μορφολογία: Ο *S. agalactiae* είναι διπλόκοκκος (ζεύγη, ή αλυσίδες) gram-θετικός(~2.0μm) χωρίς σπόρους, μη κινητός, και καταλάση (-) [η

καταλάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου]. Διατάσσεται σε ζεύγη ή κοντές αλυσίδες και φέρει το αντιγόνο Β κατά Lancefield. [In Timmoney et al., 1983); (EntrezGenome (a)].

Οικολογία: Ο *S.agalactiae*, αρχικά ανακαλύφθηκε σαν αίτιο της μαστίτιδας των βοοειδών και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου, ενώ μπορεί να αποικίσει και το ουροποιητικό. Εντούτοις μπορεί περιστασιακά να αποβεί παθογόνος με αποικισμό της μήτρας, του κεντρικού νευρικού συστήματος, και να περάσει στην συστηματική κυκλοφορία δημιουργώντας σηψαιμία. Ο μικροοργανισμός είναι αίτιο διεισδυτικής λοιμώξεως σε μη εγκύους αλλά ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, και μπορεί επίσης να προκαλέσει βακτηριαιμία, σηψαιμία, μηνιγγίτιδα και πνευμονία.

Ο αποικισμός του ορθού και του κόλπου με GBS συνδέεται με σηψαιμία στα νεογνά και πρώιμη λοίμωξη (EntrezGenome (a].

Ο *S. agalactiae* τυποποιείται με οροτυπία σε 9 οροτύπους με βάση το πολυσακχαριδικό αντιγόνο της κάψουλας και μεταξύ των εννέα οροτύπων μόνο οι τύποι Ia, Ib, II, III, και V μέχρι στιγμής φαίνεται να συνδέονται με διευσδυτική νόσο στον άνθρωπο. [EntrezGenome (a)]

Απομόνωση-χρώση σε παθολογικά υλικά: Ο *S. Agalactiae* μπορεί να απομονωθεί από λοιμώξεις στον άνθρωπο ή σε εκκρίμματα θηλυκών βοοειδών. Σε κάποια δείγματα αυτά τα βακτήρια ευρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς και εύκολα αναδεικνύονται στις μικροβιολογικές χρώσεις. Σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να ανευρίσκονται σπάνια και δύσκολα να φανούν στο άμεσο δείγμα. Επίσης οι περισσότερες χρώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν αλλά κυρίως η χρώση Gram, επειδή και ο GBS είναι gram-θετικός και με χαρακτηριστική μορφολογία [(EntrezGenome (a)]

Η καλλιέργεια αναδεικνύει αιμολυτικές αποικίες επάνω σε αιματούχο άγαρ, αρνητική δοκιμασία καταλάσης, CAMP + (καλύτερη ανάπτυξη του στρεπτοκόκκου γύρω από σταφυλόκοκκο) και ανάπτυξη σε ειδικά χρωμογόνα υλικά.

Το αντιβιόγραμμα: Το αντιβιόγραμμα του στρεπτοκόκκου Β στην περίπτωση της αντιμικροβιακής χημειοπροφύλαξης για τον αποικισμό πρέπει να περιλαμβάνει: πενικιλλίνη, μία κεφαλοσπορίνη (δυνητικά), κατά προτίμηση α

γενιάς (κεφαζολίνη), ερυθυρομυκίνη, κλινδαμυκίνη, και βανκμομυκίνη. Επίσης είναι σημαντικό να πραγματοποιείται το D -test ώστε να αξιολογείται σωστά τυχόν invitro ευαισθησία της κλινδαμυκίνης η οποία μπορεί να είναι στην πράξη επαγώγιμη αντοχή (βλέπετε υλικά και μέθοδοι). Ο φαινότυπος με αντοχή στην ερυθρομυκίνη και αντοχή ή ενδιάμεση ευαισθησία ή ειασθησία στην κλινδαμυκίνη, μπορεί να αντικατοπτρίζει Invivo αντοχή στην κλινδαμυκίνη ή οποία μπορεί να επιβεβαιωθεί με το D–test (Leclerq R 2002).

Το αντιβιόγραμμα του στρεπτοκόκκου Β πρέπει να πραγματοποιείται με βάση τις εκάστοτε νεότερες οδηγίες του Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) των ΗΠΑ και βάση αξιολόγησης κατά το CDC (Volume 1, Issue 2 December 2016). Θα πρέπει να περιλαμβάνει τα αντιβιοτικά πρώτης και δεύτερης γραμμής έναντι του στρεπτοκόκκου Β, ειδικά για τα στελέχη που απομονώνονται από τον κόλπο της εγκύου (**Σχήμα 1.6.1).** Μόνο ο έλεγχος σε πενικιλλίνη, αμπικιλλίνη, κεφαζολίνη, κλινδαμυκίνη πρέπει να γίνεται για την χημειοπροφύλαξη στην έγκυο. Τα άλλα αντιβιοτικά, (πχ φλουοροκινολόνες) δεν πρέπει να αναφέρονται ώστε να μη δημιουργείται σύγχυση. Η ερυθυρομυκίνη ελέγχεται μαζί με την κλινδαμυκίνη και για την επαγώγιμη αντοχή κλινδαμυκίνης αλλά το αποτέλεσμα για τον ίδιο λόγο δεν πρέπει να αναφέρεται.

Σχήμα 1.6.1

Volume 1, Issue 2 December 2016

Special Considerations for Susceptibility Testing of *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*)
(continued)

- If the laboratory is not aware of a penicillin allergy at the time of testing, options include:
  - **Do not perform susceptibility testing unless the clinician notifies the laboratory that there is a penicillin allergy** (order comments are helpful, such as "Susceptibility testing is not performed on this isolate due to predictable penicillin susceptibility; contact the laboratory for testing if the patient has a severe penicillin allergy."); OR
  - **Test the isolate for inducible clindamycin resistance and report clindamycin. Do not report erythromycin,** as erythromycin is not an effective therapeutic option for intrapartum prophylaxis.

Table 1.
Suggested algorithms for antimicrobial susceptibility testing and reporting for GBS isolates from vaginal-rectal sources (reprinted with permission from College of American Pathologists Proficiency Test Specimen D-12 Final Critique, 2016).

Penicillin Allergy	Recommended Therapy ACOG and CDC Guidelines	Suggested Approach to Susceptibility Testing
No known penicillin allergy	Penicillin	Susceptibility testing is not necessary.
PCN-allergic, low risk for anaphylaxis	Cefazolin	Susceptibility testing is not necessary.
PCN-allergic, high risk for anaphylaxis	Clindamycin (if clindamycin is S) Vancomycin (if clindamycin is R)	Test clindamycin and erythromycin. Report only clindamycin.

PCN = penicillin; **S** = susceptible; **R** = resistant; **ACOG** = American Congress of Obstetricians and Gynecologists; **CDC** = Centers for Disease Control and Prevention

Ειδικές Σκέψεις για τον Έλεγχο της Ευαισθησίας του GBS στα Αντιβιοτικά (κατά CLSI και CDC) *Εαν το εργαστήριο δεν γνωρίζει να υπάρχει κάποια αλλεργία στην πενικιλλίνη: 1. Δεν γίνεται τεστ ευαισθησίας αφού θεωρείται δεδομένη η ευαισθησία στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό και χορηγείται πενικιλλίνη ως θεραπεία. 2. Επί αλλεργίας στην πενικιλλίνη αλλά χωρίς αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση αναφυλαξιας συστήνεται κεφαζολίνη ενώ πάλι δεν συστήνεται τεστ ευαισθησίας. 3. Επί αλλεργίας με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης αναφυλαξίας, συστήνεται Κλινδαμυκίνη ή Βανκομυκίνη αναλόγως με το αποτέλεσμα του τεστ ευαισθησίας.*

1.7 Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ GBS: τι γνωρίζουμε σήμερα?

Οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας Β παρουσιάζουν ποικιλία λοιμογόνων παραγόντων που διευκολύνουν την ικανότητά τους να προκαλέσουν ασθένεια και αρκετοί από αυτούς έχουν πλέον ταυτοποιηθεί (Dutra V. G., *et al.*, 2014). Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται οι πολυσακχαρίτες της κάψας, διάφορες ρυθμιστικές και επιφανειακές πρωτεΐνες και τοξίνες (Al S. R., *et al.*, 2011).

Όπως αναφέρουν οι Lindahl G. *Et al.*, (2005), η κάψα που περιβάλει κάθε κόκκο αποτελεί σημαντικό παράγοντα παθογένειας παρουσιάζοντας αντι-

φαγοκυτταρικές ιδιότητες. Σύμφωνα με τους Ae Yoon *et al.*, (2015), τα στελέχη του GBS μπορούν να ταξινομηθούν σε 10 βασικούς ορότυπους **(Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, και IX)** με βάση την **πολυσακχαριδική κάψα** που τα περιβάλλει. Πρέπει να επισημανθεί ότι στην ίδια έρευνα αναφέρεται πως οι κυρίαρχοι ορότυποι που προκαλούν ασθένεια διαφέρουν από χώρα σε χώρα καθώς επίσης και στην έναρξη της λοίμωξης, πρώιμη ή όψιμη. Επιπλέον ορισμένες από τις επιφανειακές πρωτεΐνες που προαναφέρθηκαν, επιτρέπουν την υποτυποποίηση των στελεχών του GBS (Augusta *et al.*, 2011).

Οι επιφανειακές πρωτεΐνες του GBS πιστεύεται ότι κατά τα διάφορα στάδια μιας λοίμωξης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση του μικροβίου στα επιθηλιακά κύτταρα, στις αλληλεπιδράσεις με τον εξωκυττάριο χώρο και στην αποφυγή της ανοσοποιητικής απάντησης του οργανισμού. Το **C-αντιγόνο** ήταν το πρώτο επιφανειακό, πρωτεϊνικό αντιγόνο του GBS που μελετήθηκε. Έχει αποδειχτεί πλέον ότι το αντιγόνο αποτελείται από 2 ξεχωριστές πρωτεϊνικές υπομονάδες, την ανθεκτική στην τρυψίνη **άλφα-πρωτεΐνη (α protein)** και την ευαίσθητη στην τρυψίνη βήτα-πρωτεΐνη **(β protein).** Κάθε στέλεχος του GBS που εκφράζει το C-αντιγόνο μπορεί να εκφράζει είτε δύο ίδιες υπομονάδες, είτε μια απο κάθε είδος (Lindahl G. et al., 2005).

Οι **Alpha-like proteins** (Alp Family) αποτελούν την καλύτερα μελετημένη ομάδα αυτών των επιφανειακών πρωτεϊνών του GBS μέχρι τώρα. Από αυτές μπορούμε να ξεχωρίσουμε τις **Alp 2, Alp 3, Alp 4, AlphaC, Epsilon** και **Rib** οι οποίες κωδικοποιούνται αντίστοιχα από τα ακόλουθα αλληλόμορφα γονίδια: **alp2, alp3, alp4, bca, epsilon και rib** (Bodaszewska-Lubas M. *et al.*, 2013). Σχεδόν όλα τα στελέχη του GBS φέρουν ένα γονίδιο της οικογένειας των Alp γονιδίων αλλά το 95% επίσης αυτών των στελεχών φέρει μόνο ένα από αυτά τα γονίδια (Maeland J. *Et al.*, 2015).

Το γονίδο bac τέλος, κωδικοποιεί την πρωτείνη Beta-C που όπως προαναφέρθηκε ανήκει στις ευαίσθητες στην τρυψίνη β-proteins (Lindahl G. et al., 2005).

Η γενετική ποικιλία του GBS έχει μελετηθεί με πολλές διαφορετικές μοριακές τεχνικές (π.χ. PCR, RFLPs). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μέθοδος multilocus sequence typing (MLST) (Jones N, *et al.*, 2003). Από

αυτές τις μελέτες έχουν αναγνωριστεί αλληλουχίες νουκλεοτιδίων οι οποίες ονομάζονται νησίδες παθογένειας διότι περιέχουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεια του GBS. Πιο συγκεκριμένα, με την χρήση της μεθόδου MLST έχουν αναγνωριστεί νησίδες λοιμογονικότητας που περιέχουν τα γονίδια bca, rib, alp2, alp3, alp4 και alp1/ alp5 της οικογένειας α-likeproteins (Alp) και το γονίδιο bac της β-protein (Sadowy E., *et al.*, 2010, Springman AC., *et al.*, 2009).

1.8 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η πρωτεΐνη ALP3, που ταυτοποιήθηκε αρχικά από τον *S. pyogenes*, επάγει την πρόσδεση του παθογόνου αυτού στην ανθρώπινη τραχηλική επιθηλιακή κυτταρική σειρά ME-180, δείχνοντας ότι η πρωτεΐνη ALP3 μπορεί να δρα ως πρωτεΐνη προσκόλλησης σε επιθηλιακά κύτταρα. Ωστόσο, προσπάθειες για να δειχθεί ότι και άλλα μέλη της οικογένειας Alp δρουν επίσης ως πρωτεΐνες προσκόλλησης έχουν αποβεί αρνητικές (Sta°lhammar-Carlemalmetal, et al., 1999). Συνεπώς, μια μετάλλαξη του *S. agalactiae* στο οποίο έλειπε η πρωτεΐνη α δεν επηρεάστηκε κατά την πρόσδεση στα κύτταρα ME-180, και παρόμοια αποτελέσματα αποκτήθηκαν με μια Rib-αρνητική μετάλλαξη. Ωστόσο η πρωτεΐνη α μπορεί να προωθεί την εισβολή στα κύτταρα ME-180 του *S. agalactiae*, (Bolduc, G et al., 2002) πιθανών μέσω της αλληλεπίδρασης με τις γλυκοζαμυνογλυκάνες του ξενιστή κυττάρου (Baron et al., 2004**)**. Οι πιο σημαντικοί και κατά κάποιο τρόπο εξερευνημένοι παράγοντες παθογένειας συνοψίζονται παρακάτω (πίνακας 1.8.1).

Πίνακας 1.8.1. Σημαντικοί παράγοντες λοιμογονικότητας του Group B Streptococcus.

Λοιμογόνος παραγοντας	Γενετική βάση	Χημική φύση	Μριακή ή κυτταρική δράση (εις)	Προτεινόμενη συνεισφορά στην παθογένεια της νόσου
Εξωπολυσακχαριδικό αντιγόνο της κάψουλας	*cps*A-L, *neu*A-D	Πολυμερές υψηλού μοριακού βάρους με τελικές αλυσίδες σιαλικών οξέων	Μπλοκάρει την προσκόλληση και ενεργοποίηση του C3	Μπλοκάρει την οψωνοφαγοκυτταρική δράση
			Μειώνει την ανοσολογική αναγνώριση πιθανόν, λόγω μοριακής μίμισης σιαλικών επιτόπων με αυτούς του ανθρώπου	Καθυστερεί την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπυρήνων
β-αιμολυσινη /κυτταρολυσίνη	*cyl*E	CylE protein (79 kD)	Δημιουργεί πόρους στις κυτταρικές μεμρβάνες	Απευθείας ιστική καταστροφή
			Επάγει την απόπτωση	Εισβολή μέσω των επιθηλιακών φραγμών
			Ποράγει την κυταρική εισβολή	Επάγει το σηπτικό σύνδρομο
			Triggers iNOS, cytokine release	Phagocytic resistance
Συνδεόμενη με το καρωτενοειδές	*cyl* τόπος	καροτενοειδές	Μπλοκάρει την δημιουργία ελεύθερου οξυγόνου από H_2O_2,	Μπλοκάρει το μηχανισμό μικροβιακού θανάτου μέσω αδρανοποίησης του οξειδωτικού μηχανισμού
Υαλουρονιδάση	*hyl*B	kD) HylB enzyme (110	Αποκόπτει το υαλουρονικό οξύ και	Μεταφορά του GBS μέσω των ιστών του ξενιστή

Λοιμογόνος παραγοντας	**Γενετική βάση**	**Χημική φύση**	**Μριακή ή κυτταρική δράση (εις)**	**Προτεινόμενη συνεισφορά στην παθογένεια της νόσου**
			τηνθειική χονδροιτίνη	ΙΕμποδίζει τη μεταφορά λευκοκυττάρων
C5a πεπτιδάση	*scp*B	ScpB protein (120 kD)	Αποκόπτει το ανθρώπινο C5a	Εμποδίζει την ενεργοποίηση λευκοκυττάρων
			Προσκόλληση στην φιμπρο-νεκτίνη	Προσκόλληση στο εξωκτυττάριο υλικό
				Προσκόλλησης και εισβολή στο επιθήλιο
CAMP παράγοντας	*cf* b	CAMP protein (24 kD)	CAMP αντίδραση	Απ' ευθείας ιστική καταστροφή
			Προσκόλληση στοFc-IgG, IgM	Αναστολή δράσης των ανοσοσφαιρνών
Λιποτειχοεικό οξύ	Σύμπλεγμα παραγόντων	Αμφιφιλικό γλυκερο-φωσφορικό πολυμερές από σύμπλεγμα λιπιδίων και από κοντές αλυσίδες λιπαρών οξέων	Προσκόλληση σε κυτταρικές επιφάνειες	Προσκόλληση στο επιθήλιο
			Προσκόλληση σε σημεία αναγνώρισης υποδοχέων (TLRs)	Ενεργοποίηση της του σηπτικού συνδρόμου
			Αλανυλοποίηση -αδρανοποιεί τα αντιμικροβιακά πεπτίδια του οργανισμού	Αντοχή στην καταστροφική δράση των λευκοκυττάρων
C-πρωτείνη **(alpha και beta components)**	***bca*(alpha) *cba*(beta)**	**beta:** 84-94kDvariants; **Alpha:**πρωτείν η με πολλαπλά	Προσκόλληση στο επιθήλιο του τραχήλου	Προσκόλληση στο επιθήλιο
			Μπλοκάρει την	Εισβολή στο επιθήλιο

Λοιμογόνος παραγοντας	Γενετική βάση	Χημική φύση	Μριακή ή κυτταρική δράση (εις)	Προτεινόμενη συνεισφορά στην παθογένεια της νόσου
		επαναλαμ-βανόμενα ταυτόσημα τμήματα (14-145kD)	ενδοκυττάρια φονική ικανότητα των λευκοκυττάρων μη επιτρέποντας την προσκόλληση της ofIgA	Αντοχή στην φαγοκυτταρική δράση
Πρωτεάση σερίνης	*cspA*	CspA πρεωτείνη (142 kD)	Αποκόπτει το ινωδογόνο σε κομμάτια	Αντοχή στη φαγοκυτταρική απομάκρυνση(?)
				Προαγωγή της εισβολής στα κύτταρα
Υποδοχέας ινωδογόνου	*fbsA*	FbsA πρωτείνη (44.2 kD)	Προσκόλληση στο ινωδογόνο μέσω επαναλαμβανο-μένων τμημάτων της πρωτείνης αυτής	Προσκόλληση στο εξωκυττάριο υλικό
				Προσκόλληση στο επιθήλιο
				Αντοχή στην οψωνοφαγοκυτταρικ ή δράση

1.9 ΤΟ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΔΙΚΟ ΚΑΨΙΔΙΟ, ΟΙ ΟΡΟΤΥΠΟΙ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Όλα τα κλινικά απομονωμένα στελέχη *S. agalactiae* εκφράζουν ένα πολυσακχαριδικό καψίδιο. Μέχρι τώρα, εννέα διαφορετικοί τύποι καψιδίου έχουν ταυτοποιηθεί (Kogan et al., 1999). Το καψίδιο είναι σημαντικός λοιμογόνος παράγοντας με αντιφαγοκυτταρική λειτουργία (Marques et al., 1992, Rubens C. et al., 1987, Tettelin H. 2001). Σε εξέλιξη βρίσκονται προσπάθειες για την ανάπτυξη ενός εμβολίου πολυδύναμου συμπλέγματος καψιδιακών αντογόνων (Jacobsson, K. 2003, Baker, C. J et al., 2004)

Οι τέσσερις κλασικοί καψιδιακοί ορότυποι, που ταυτοποιήθηκαν από την Lancefield, είναι οι τύποι **Ia, Ib, II και III**. Όταν ο *S. agalactiae* αναδείχθηκε ως σημαντικό νεογνικό παθογόνο, στελέχη του ορότυπου III κυριάρχησαν ως αιτία

των σοβαρών λοιμώξεων, συγκεκριμένα ως αιτία της μηνιγγίτιδας. Ωστόσο σε ορισμένες πρόσφατες έρευνες, τα στελέχη τύπου Ia ήταν κοινά ανάμεσα στα απομονωμένα στελέχη λοιμώξεων, παρόλο που ο τύπος III παραμένει η σημαντικότερη αιτία πρώιμης λοίμωξης και μηνιγγίτιδας (Harrison, L. H, et al., 1997; Kalliola, S., et al., 1999; Lin, F. Y., et al., 1998). Επιπλέον, στελέχη τύπου V πρόσφατα αναδείχθηκαν ως σημαντική αιτία λοίμωξης από *S. agalactiae* και στελέχη τύπου VI και VIII αποτελούν τα πιο κοινά στελέχη που απομονώθηκαν από υγιείς γυναίκες στην Ιαπωνία (Lachenauer, C. S et al., 1999). Το καψίδιο σχετίζεται με τις πρωτεΐνες επιφάνειας για δύο λόγους. Αρχικά, η έκφραση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης επιφάνειας συχνά συσχετίζεται με τον καψιδιακό τύπο. Δεύτερον, το καψίδιο μπορεί να αναμενόταν ότι εμπλέκεται με τη λειτουργία των αντισωμάτων που κατευθύνονται ενάντια στις πρωτεΐνες επιφάνειας, είτε μπλοκάροντας την είσοδο των αντισωμάτων είτε παρεμβαίνοντας στις λειτουργίες των αντισωμάτων. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δε φαίνεται να ισχύει, καθώς τα αντισώματα στις πρωτεΐνες επιφάνειας πράγματι προστατεύουν από τη λοίμωξη, τουλάχιστον στα ζωικά μοντέλα, μία κατάσταση που ενθαρρύνει τις προσπάθειες ανάπτυξης ενός εμβολίου βασισμένο σε πρωτεΐνες (Areschoug, T. Et al., 1999; Johnson, D. R., et al., 1984; Kong, F., et al., 2002; Sta°lhammar-Carlemalm, M et.al., 2003).

1.9.1 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ

Δύο τύποι φερόμενων πρωτεϊνών επιφάνειας μπορούν εύκολα να ταυτοποιηθούν στο γονιδίωμα του *S. agalactiae*: πρωτεΐνες με μοτίβο πρόσδεσης LPXTG και λιποπρωτεΐνες, που διαθέτουν μία χαρακτηριστική αλληλουχία **(lipobox).** Ενώ όλες οι πρωτεΐνες LPXTG θεωρούνται ότι είναι εκτεθειμένες στην επιφάνεια, πολλές λιποπρωτεΐνες μπορεί να μην είναι προσβάσιμες στην επιφάνεια επειδή καλύπτονται από στοιχεία κυτταρικού φακέλου και εκτελούν την κύρια λειτουργία τους ως μέρος του συστήματος μεταφοράς ABC (Tettelin, H., et al., 2002; Chhatwal, G. S. Et al., 2002).

Τα δύο γονιδιώματα του *S. agalactiae* κωδικοποιούν 21 ή 24 πρωτεΐνες LPXTG, αντίστοιχα, και είναι επίσης πιθανό να κωδικοποιούν κάποιες πρωτεΐνες με LPXTG-σχετιζόμενα μοτίβα. Το γονιδίωμα τύπου III κωδικοποιεί 36 λιποπρωτεΐνες, ενώ μέχρι και 51 αναφερόμενες λιποπρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν

στο γονιδίωμα τύπου V. Ανάλυση των δύο γονιδιωμάτων ταυτοποίησε έναν πυρήνα 39 κοινών αναφερόμενων λιποπρωτεϊνών, μαζί με 2 πρωτεΐνες μοναδικές για το στέλεχος τύπου III και 5 πρωτεΐνες μοναδικές για το στέλεχος τύπου V. Για πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες επιφάνειας, μπορούν να προβλεφθούν υποθετικές λειτουργίες από συγκρίσεις με παρόμοιες πρωτεΐνες σε άλλα βακτήρια. Οι προβλεπόμενες LPXTG πρωτεΐνες περιλαμβάνουν παράγοντες προσκόλλησης και ένζυμα, αλλά οι περισσότερες από τις LPXTG πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν από τις γονιδιωματικές αλληλουχίες δεν έχουν προφανή λειτουργία. Οι προβλεπόμενες λιποπρωτεΐνες περιλαμβάνουν συστατικά των συστημάτων μεταφοράς ABC (transporters), παράγοντες προσκόλλησης, πρωτεΐνες κατιονικής πρόσδεσης, ένζυμα και συστατικά που εμπλέκονται στον εντοπισμό και την αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Chmouryguina, I. et al., 1996).

Αναφορικά με τις πρωτεΐνες επιφάνειας που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί, οι πρωτεΐνες με μοτίβο τύπου LPXTG έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα διεξοδικά μέχρι τώρα. Ανάμεσα σε αυτές τις πρωτεΐνες βρίσκονται φερόμενες ή γνωστές πρωτεΐνες προσκόλλησης και πολλά ένζυμα. Πολλές από τις πρωτεΐνες LPXTG του *S. agalactiae* δεν εντοπίζονται στο S. Pyogenes ή το S. Pneumoniae, γεγονός που υποδηλώνει ότι κάθε παθογόνο διαθέτει ένα συγκεκριμένο τύπο πρωτεϊνών LPXTG (Glaser, P et al., 2002; Cossart, P etal., 2000).

Πέρα από τις προβλεπόμενες πρωτεΐνες που περιέχουν LPXTG και τις λιποπρωτεΐνες, που αναφέρθηκαν προηγουμένως, πολλές άλλες πρωτεΐνες μπορεί να εντοπίζονται στην επιφάνεια, όπως υποδηλώνεται από την ανοσολογική ανάλυση καθώς και από τη σύγκριση με γνωστές πρωτεΐνες επιφάνειας που έχουν ταυτοποιηθεί σε άλλα είδη. Πράγματι, μία ανοσολογική ανάλυση που αναφέρθηκε από τους Tettelin et al. (2002), έδειξε ότι το στέλεχος τύπου V που μελετήθηκε εξέφραζε περισσότερες από 55 διαφορετικές πρωτεΐνες επιφάνειας, από τις οποίες μόνο μία μειοψηφία ήταν πρωτεΐνες LPXTG ή λιποπρωτεΐνες. Κάποιες από αυτές τις φερόμενες πρωτεΐνες επιφάνειας μπορεί να είναι προσδεμένες στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα μέσω νέων μηχανισμών. Για παράδειγμα, η ανάλυση του γονιδιώματος τύπου V ταυτοποίησε μία φερόμενη εκκρινόμενη μεταλλοπρωτεϊνάση που

περιείχε τις επονομαζόμενες επαναλήψεις GW, που εμπλέκονται στην πρόσδεση κάποιων πρωτεϊνών επιφάνειας της *Listeria monocytogenes* στο λιποτειχοϊκό οξύ (Jonquieres, R et al., 1999). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι πολλά ένζυμα που συνήθως θεωρούνται ως ενδοκυτταρικά μπορεί επίσης να εκφράζονται στην επιφάνεια του *S. Agalactiae (*Hughes, M. J., et al., 2002). Θα είχε μεγάλο ενδιαφέρον η ανάλυση όλων αυτών των πρωτεϊνών επιφάνειας που έχουν προβλεφθεί ώστε να καθοριστεί ο ρόλος τους στην παθογένεση και να εκτιμηθεί η καταλληλόλητά τους ως πιθανά συστατικά εμβολίων.

Ιστορικά, το πρώτο αντιγόνο πρωτεΐνης επιφάνειας που βρέθηκε στον *S. agalactiae* ήταν το αντιγόνο c, που ανιχνεύθηκε με αντιορό έναντι συνολικών βακτηρίων (Wilkinson, H. W., et al., 1971). Το αντιγόνο c (που ορίζεται επίσης και ως Ibc) έχει βρεθεί σε πολλά στελέχη αλλά όχι στα κλινικά σημαντικά στελέχη τύπου III (Ferrieri, P, et al., 1988). Ο χαρακτηρισμός του αντιγόνου αυτού έδειξε στη συνέχεια ότι αποτελείται από δυο μη σχετιζόμενα πρωτεϊνικά συστατικά, την πρωτεΐνη α με ανθεκτικότητα στην τρυψίνη και την πρωτεΐνη β με ευαισθησία στη τρυψίνη, οι οποίες δεν έχουν χαρακτηριστεί εκτενώς. Ένα στέλεχος που έχει αναφερθεί ότι εκφράζει το αντιγόνο c μπορεί να εκφράζει τη μία ή και τις δύο από τις πρωτεΐνες α και β. Επειδή οι α και β μαζί συνιστούν το αντιγόνο c (ή C), έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί οι ορισμοί alphaC και betaC για τις πρωτεΐνες αυτές. Δεν είναι γνωστό γιατί οι πρωτεΐνες α και β εκφράζονται από κοινού από το ίδιο στέλεχος *S. agalactiae* (Bevanger, L et al., 1983; Johnson, D. R ey al., 1984)

Οι Lancefield et al., (1934), έκαναν τη σημαντική παρατήρηση ότι τα αντισώματα του αντιγόνου c παρέχουν ανοσία ενάντια στη λοίμωξη από *S. agalactiae* σε πειραματόζωα ποντικών, υποδηλώνοντας ότι όχι μόνο το καψίδιο αλλά και οι πρωτεΐνες επιφάνειας μπορεί να επάγουν προστατευτική ανοσία. Όπως έχει επισημανθεί από την Ferrieri, η ανακάλυψη αυτή αγνοήθηκε, πιθανόν επειδή το αντιγόνο c εκφράζεται από μερικά μόνο στελέχη και όχι από τα κλινικά σημαντικά στελέχη τύπου III. Ωστόσο, οι πρώτες έρευνες των Bevanger και Naess (1985) έδειξαν ότι κάθε μία από τις πρωτεΐνες α και β, τα δύο συστατικά του αντιγόνου c, επάγουν προστατευτική ανοσία. Η επακόλουθη έρευνα με τα στελέχη τύπου III ταυτοποίησε την *Rib*, μία νέα πρωτεΐνη επιφάνειας που επάγει προστατευτική ανοσία και εκφράζεται από τα

περισσότερα στελέχη που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη α. Μετά την ανακάλυψη αυτή προτάθηκε ότι θα μπορούσε να σχεδιαστεί ένα εμβόλιο βασισμένο μόνο σε πρωτεΐνες επιφάνειας και να εστιαστεί το ενδιαφέρον στις πρωτεΐνες επιφάνειας για την παθογενετική ανάλυση του *S. agalactiae*. Στη συνέχεια, εντοπίζεται η έρευνα πάνω στις πρωτεΐνες επιφάνειας του *S. agalactiae* που έχουν μέχρι τώρα μελετηθεί πιο αναλυτικά. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις διαφορετικές πρωτεΐνες επιφάνειας είναι κατανεμημένα σε όλη την έκταση του χρωμοσώματος του *S. agalactiae*, εκτός από τα στενά συνδεόμενα γονίδια *scpB* και *lmb*, που εντοπίζονται σε ένα φερόμενο σύνθετο τρανσποζόνιο (Franken, C et al., 2001).

Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *Alp*

Μία οικογένεια υψηλά επαναλαμβανόμενων πρωτεϊνών που επάγουν προστατευτική ανοσία

Η αλληλούχιση της πρωτεΐνης α, ένα από τα δύο συστατικά του αντιγόνου c, αποκάλυψε την ύπαρξη μία περιοχής που αποτελείται από μακρές, πανομοιότυπες επαναλήψεις. Οι επαναλήψεις αυτές βρέθηκε ότι ήταν πανομοιότυπες ακόμα και σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Ο χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης *Rib* έδειξε ότι έχει παρόμοια συνολική δομή και αλληλουχία, ταυτοποιώντας έτσι μία νέα οικογένεια βακτηριακών πρωτεϊνών επιφάνειας. Στην επισκόπηση αυτή υιοθετείται μία ονοματολογία που έχουν χρησιμοποιήσει και άλλοι ερευνητές και αναφέρει την οικογένεια αυτή ως οικογένεια πρωτεϊνών *Alp,* όπου το Alp σημαίνει πρωτεΐνες που μοιάζουν στην πρωτεΐνη α (Michel, J. L et al., 1992, Baron, M. J et al., 2004).

Τέσσερα μέλη της οικογένειας *Alp* έχουν αναγνωριστεί μέχρι τώρα: α, Rib, ALP3 και Alp2. Οι πρωτεΐνες αυτές τραβούν το ενδιαφέρον των ερευνητών όχι μόνο για την ανάπτυξη εμβολίων και τις μελέτες παθογένειας του *S. agalactiae*, αλλά και ως πρότυπες για άλλες επαναλαμβανόμενες πρωτεΐνες που είναι κοινές στα κατά gram- θετικά βακτήρια και στους ανώτερους οργανισμούς. Επειδή οι Alp-σχετιζόμενες πρωτεΐνες έχουν εντοπιστεί σε πολλά βακτηριακά παθογόνα, γίνονται μελέτες στις πρωτεΐνες

της οικογένειας Alp για την ανάλυση παθογενετικών μηχανισμών (Kehoe, M. A et al., 1994).

Τα διαθέσιμα γενετικά και ανοσολογικά δεδομένα δείχνουν ότι οι διαφορετικές *Alp* πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από αλληλόμορφα γονίδια, υποδηλώνοντας ότι ένα στέλεχος *S. agalactiae* εκφράζει μόνο ένα μέλος της οικογένειας. Πράγματι, μελέτες των αμετάφραστων περιοχών σε διάφορα στελέχη έδειξαν ότι οι περιοχές αυτές διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό. Επιπλέον, η ανάλυση των δύο διαθέσιμων γονιδιωματικών αλληλουχιών τα αντίστοιχα μέλη της οικογένειας Alp (Rib και Alp2) κωδικοποιούνται από αλληλόμορφα γονίδια. Αξίζει να σημειωθεί ότι η έκφραση μίας δεδομένης πρωτεΐνης της οικογένειας Alp έχει άμεση σχέση με τον καψιδιακό τύπο (Kong, F., et al., 2002; Lachenauer, C. S et al., 2000).

Η οργάνωση της αλληλουχίας στις πρωτεΐνες της οικογένειας Alp είναι παρόμοια με εκείνη πολλών πρωτεϊνών επιφάνειας των κατά gram-θετικών βακτηρίων. Μία αμινο-τελική σηματοδοτική αλληλουχία ακολουθείται από μία μη επαναλαμβανόμενη αμινο-τελική περιοχή, μία επαναλαμβανόμενη περιοχή, μία περιοχή πρόσδεσης στο τοίχωμα με ένα μοτίβο LPXTG, μία μικρή υδρόφοβη περιοχή γεφύρωσης μεμβράνης και μία φορτισμένη ουρά. Όπως πολλές άλλες πρωτεΐνες επιφάνειας των κατά gram-θετικών βακτηρίων, τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Alp δεν έχουν κατάλοιπα κυστεΐνης. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες αυτές έχουν ιδιαίτερα μακρές σηματοδοτικές αλληλουχίες, 55 με 56 αμινοξικών καταλοίπων, όπως δείχθηκε από την αμινο-τελική αλληλούχιση των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν απευθείας από στρεπτόκοκκους (Navarre, W. W., et al., 1999).

Εκτός από την πρωτεΐνη Alp2 (που είναι σπάνια πρωτεΐνη) υπάρχει μόνο ένας τύπος επανάληψης σε κάθε πρωτεΐνη. Αυτός ο τύπος επανάληψης υπάρχει και στις τέσσερις πρωτεΐνες. Μέσα σε μία δεδομένη πρωτεΐνη, οι επαναλήψεις αυτές είναι πανομοιότυπες ή ουσιαστικά πανομοιότυπες, αλλά διαφέρουν στην αλληλουχία τους ανάμεσα στις διαφορετικές πρωτεΐνες Alp. Η ταυτότητα των καταλοίπων μεταξύ των διαφορετικών επαναλήψεων ποικίλλει από 95% για το ζεύγος Rib-ALP3 μέχρι 40% για το ζεύγος α-Alp2. Οι επαναλήψεις αυτές έχουν μήκος 76 με 82 αμινοξικά κατάλοιπα και ο αριθμός των επαναλήψεων σε μία πρωτεΐνη ποικίλλει ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη.

Η πρωτεΐνη Alp2 διαφέρει από άλλα μέλη της οικογένειας καθώς διαθέτει ένα δεύτερο τύπο διπλής επανάληψης (εδώ ορίζεται ως RN) στο αμινο-τελικό μισό της πρωτεΐνης (Luo, Y. et al., 2000).

Έχει προβλεφθεί ότι οι επαναλήψεις στην οικογένεια πρωτεϊνών Alp διαθέτουν μία δομή που σχετίζεται με την αναδίπλωση Ig, μία δομή που έχει επίσης παρατηρηθεί και σε κάποιες άλλες επαναληπτικές πρωτεΐνες προκαρυωτικών. Σε συμφωνία με αυτή την αλληλουχιακή ανάλυση, η υπολογιστική προσομοίωση της επανάληψης Rib προβλέπει ότι περιέχει τουλάχιστον τέσσερα β-φύλλα σε μία συμπαγή δομή. Επειδή οι περιοχές με αναδίπλωση τύπου Ig χρησιμοποιούνται συχνά στη μοριακή ταυτοποίηση, τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας Alp μπορεί να έχουν μία τέτοια λειτουργία. Εναλλακτικά, η περιοχή επανάληψης μπορεί να δρα ως μοχλός που χρειάζεται για την έκθεση μία μοναδικής περιοχής πρόσδεσης συμπλόκου, σε αναλογία με ότι συμβαίνει με την ιντιμίνη από το *E. coli* και την ινβασίνη από τη *Yersinia*, δύο πρωτεΐνες στις οποίες οι περιοχές επανάληψης διαθέτουν αναδίπλωση τύπου Ig (Hamburger, Z. A et al., 1999).

Τέσσερα μέλη της οικογένειας: οι πρωτεΐνες α, Rib, ALP3 και Alp2

Η μεγάλη πλειοψηφία των στελεχών *S. agalactiae* που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα διαθέτουν το γονίδιο για μία από τις τέσσερις πρωτεΐνες της οικογένειας Alp, όπως έχει δειχθεί από την ανάλυση PCR με εξειδικευμένους εκκινητές, ωστόσο σπάνια στελέχη μπορεί να κωδικοποιούν μία σχετική πρωτεΐνη. Για παράδειγμα, το άτυπο στέλεχος αναφοράς Prague 25/60 μπορεί να εκφράζει μία πρωτεΐνη (δοκιμαστικά ορισμένη ως Alp4), που δε βρέθηκε σε κανένα άλλο στέλεχος ανάμεσα στα 224 στελέχη *S. agalactiae* που αναλύθηκαν. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι κάποια στελέχη εκφράζουν μία Alp-σχετική πρωτεΐνη που έχει οριστεί ως 'έψιλον' ή Alp1. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα γνωστό αν αυτές οι φερόμενες ως Alp-σχετικές πρωτεΐνες εκφράζονται στη βακτηριακή επιφάνεια και στα αντίστοιχα γονίδια έχει γίνει αλληλούχιση μόνο εν μέρει (Creti, R., et al., 2004).

Η πρωτεΐνη α. Η πρωτεΐνη α δε σχετίζεται με την πρωτεΐνη β, το άλλο συστατικό του αντιγόνου c, και βρίσκεται συχνά σε στελέχη των οροτύπων Ia, Ib

και II αλλά σχεδόν ποτέ σε στελέχη τύπου III και πολύ σπάνια σε στελέχη τύπου V. Η πρωτεΐνη α είναι ανθεκτική στην τρυψίνη, μία ιδιότητα που συνέβαλε στην ταυτοποίησή της και έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση στελεχών για έκφραση της α. Οι Bevanger και Naess ανέφεραν ότι η πρωτεΐνη α που απομονώθηκε από στρεπτόκοκκους επάγει αντισώματα που προστατεύουν τα ποντίκια από τη λοίμωξη, ένα αποτέλεσμα που επιβεβαιώθηκε με πειράματα ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (McLean, J. W., et al., 1987).

Το γονίδιο για την α κλωνοποιήθηκε από το στέλεχος A909, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο στέλεχος αναφοράς του οροτύπου Ia. Η αλληλουχιακή ανάλυση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την α, που ονομάζεται ***bca*** (για να μην συγχέεται με το *bac*, το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη β του *S. agalactiae*) αποκάλυψε ότι ένα μεγάλο μέρος (~75%) αποτελείται από 9 διπλές επαναλήψεις 82-καταλοίπων, για τις οποίες η αλληλούχιση ήταν επίσης πανομοιότυπη σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Η μοριακή μάζα της ώριμης πρωτεΐνης (δηλ. η πρωτεΐνη χωρίς τη σηματοδοτική αλληλουχία 56 καταλοίπων) υπολογίστηκε στα 103 kDa. Η επαναληπτική δομή του γονιδίου *bca* κατέστησε δύσκολη την αλληλούχιση, ένα πρόβλημα που αντιμετωπίστηκε επίσης κατά την αλληλούχιση γονιδίων που κωδικοποιούσαν άλλα μέλη της οικογένειας Alp. Επειδή τα γονίδια αυτά που κλωνοποιήθηκαν σε *E.coli* είναι ασταθή, η αλληλούχιση τέτοιων κλωνοποιημένων γονιδίων μπορεί να υποτιμά τον αριθμό των επαναλήψεων. Ωστόσο, ο πραγματικός αριθμός επαναλήψεων μπορεί να εκτιμηθεί από τις ζώνες της PCR(Hede´n, L.-O et al., 1991).

Η πρωτεΐνη Rib. Η πρωτεΐνη Rib ταυτοποιήθηκε ως μία μοναδική υψηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνη σε εκχυλίσματα κυτταρικού τοιχώματος στελεχών τύπου III. Ο χαρακτηρισμός της απομονωμένης πρωτεΐνης έδειξε ότι σχετιζόταν με την α, παρόλο που οι δύο πρωτεΐνες δε εμφάνιζαν διασταυρούμενη αντίδραση σε ανοσολογικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, οι αμινο-τελικές αλληλουχίες των δύο απομονωμένων πρωτεϊνών βρέθηκε ότι σχετίζονται αλλά δεν είναι πανομοιότυπες. Επιπλέον, η Rib ήταν ανθεκτική στην τρυψίνη, εμφάνιζε ποικιλία μεγεθών ανάμεσα στα κλινικά απομονωμένα στελέχη και παρουσίαζε μία μπάντα στο Westernblot, όμοιο με αυτό της πρωτεΐνης α. Το πιο σημαντικό είναι ότι τα αντισώματα στη Rib παρέχουν προστατευτική ανοσία ενάντια στη θανατηφόρα λοίμωξη με στελέχη που εκφράζουν την Rib.

Τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι η Rib εκφράζεται από μία μεγάλη πλειοψηφία των στελεχών οροτύπου III, από πολλά στελέχη τύπου II και από λίγα στελέχη τύπου V (Sta°lhammar-Carlemalm, M et al., 1993, Larsson, C.,et al., 1996).

Η αλληλουχία για την Rib καθορίστηκε στο στέλεχος BM110, ένα μέλος του φερόμενου υψηλής λοιμογόνου δράσης κλώνου τύπου III. Η επεξεργασμένη μορφή της Rib στο στέλεχος αυτό διαθέτει μία αμινο-τελική περιοχή 174 καταλοίπων και 12 πανομοιότυπες επαναλήψεις 79 καταλοίπων, ενώ η μοριακή της μάζα έχει υπολογιστεί στα 123 kDa. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα για την α, οι επαναλήψεις της Rib είναι πανομοιότυπες ακόμα και σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Η ταυτότητα των αμινοξικών καταλοίπων της Rib με την α είναι 61% στην αμινο-τελική περιοχή και 47% στην περιοχή επανάληψης. Συνεπώς, η αλληλούχιση της Rib έδειξε ότι οι Rib και α είναι μέλη μιας οικογένειας πρωτεϊνών επιφάνειας τύπου στρεπτόκοκκου με ιδιαίτερα επαναλαμβανόμενη αλληλουχία. Επίσης, το γονιδίωμα του στελέχους που έχει γίνει αλληλούχιση τύπου V έχει το γονίδιο (*rib*) που κωδικοποιεί για την Rib. Η αλληλουχία που εξάχθηκε για την Rib στο στέλεχος αυτό είναι εντελώς πανομοιότυπη με την αλληλουχία που είχε προηγουμένως καθοριστεί σε ένα στέλεχος τύπου III, μόνο που η πρωτεΐνη του στελέχους τύπου V έχει 14 επαναλήψεις (Tettelin, H., et al 2002).

Η πρωτεΐνη R28 (Alp3). Η πρωτεΐνη Alp3 αναγνωρίστηκε αρχικά σε στελέχη του *S. pyogenes* (στρεπτόκοκκος ομάδας Α) και ο μοριακός χαρακτηρισμός έδειξε ότι είναι μέλος της ίδιας οικογένειας όπως οι Rib και α. Η μη επαναλαμβανόμενη αμινο-τελική περιοχή στην Alp3 είναι ιδιαίτερα μακρύτερη από τις αντίστοιχες περιοχές των πρωτεϊνών α και Rib, ενώ η περιοχή επανάληψης σχετίζεται στενά (95% ταυτότητα) με αυτή της Rib. Αυτή η ομοιότητα μεταξύ των Alp3 και Rib θα μπορούσε να εξηγήσει μία ανοσολογική αντίδραση διασταύρωσης που παρατηρήθηκε στις αρχικές μελέτες. Η πρωτεΐνη ALP3 εκφράζεται όχι μόνο από μερικά στελέχη του *S. pyogenes* αλλά επίσης και από πολλά στελέχη του *S. agalactiae* των οροτύπων V και VIII. Τα στελέχη αυτά του *S. agalactiae* εκφράζουν πρωτεΐνες ALP3 που είναι πανομοιότυπες, εκτός από το γεγονός ότι έχουν διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων. Οι Lachenauer et al., (2000), χρησιμοποίησαν τη νέα ονομασία

Alp3 για την πρωτεΐνη που εκφράζεται από τον *S. agalactiae*, αλλά επειδή οι πρωτεΐνες που εκφράζονται από τον *S. pyogenes* και *S. agalactiae* είναι όμοιες κατά 98%, προτιμάμε να διατηρούμε την αρχική ονομασία ALP3 και για τις δύο πρωτεΐνες. Όπως και τα άλλα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Alp, η ALP3 επάγει προστατευτική ανοσία.

Η πρωτεΐνη ALP3 μπορεί να θεωρηθεί ως χιμαιρική που προέρχεται από τις τρεις πρωτεΐνες του *S. Agalactiae* α, β και Rib. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ALP3 μπορεί να προέκυψε στο *S. agalactiae* και να ακολούθησε οριζόντια γονιδιακή μεταφορά στο *S. pyogenes.*

Υπάρχουν κάποια δεδομένα ότι η πρωτεΐνη ALP3 μπορεί να έχει παίξει έναν παθογενετικό ρόλο στην επιδημιολογία του επιλόχειου πυρετού που προκάλεσε το θάνατο πολλών επίτοκων γυναικών κατά τους προηγούμενους αιώνες και αντιπροσωπεύει ένα κλασικό παράδειγμα νοσοκομειακής λοίμωξης. Οι επιδημίες αυτές οφείλονταν σε λοιμώξεις από *S. pyogenes* και δεν πρέπει να συγχέονται με τις νεογνικές λοιμώξεις που προκαλούνται από *S. agalactiae*, ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις η λοίμωξη ξεκίνησε πιθανόν από βακτήρια που εντοπίζονταν στον κόλπο. Η συζήτηση σχετικά με τον επιλόχειο πυρετό δεν εμπίπτει στα πλαίσια της ανασκόπησης αυτής, ωστόσο η φερόμενη συσχέτιση μεταξύ της ALP3 και των νοσοκομειακών λοιμώξεων μπορεί να αποτελέσει σημαντικό στοιχείο για μελέτες πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ALP3, όπως η Esp των νοσοκομειακών παθογόνων *Enterococcus faecalis* και *E. faecium* (Lachenauer, C. S., et al., 1999, Sta°lhammar-Carlemalm, M et al., 1999 and 2000).

Η πρωτεΐνη Alp2. Η πρωτεΐνη Alp2 ταυτοποιήθηκε σε ένα στέλεχος οροτύπου V και διαθέτει μία αλληλουχία ουσιαστικά όμοια με αυτήν της ALP3 στα αμινοτελικά δύο-τρίτα. Η πρωτεΐνη αυτή είναι πιο σπάνια από τα άλλα μέλη της οικογένειας Alp και βρέθηκε μόνο σε μερικά στελέχη των οροτύπων Ia, III και V. Η Alp2 διαθέτει δύο τύπους διπλών επαναλήψεων, κάτι που τη διακρίνει από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας Alp. Ο ένας τύπος επανάληψης, που ορίζεται εδώ ως RN, αντιστοιχεί σε ένα μη επαναλαμβανόμενο μέρος της ALP3 και περιλαμβάνει την περιοχή της ALP3 που σχετίζεται με την πρωτεΐνη β. Οι παραλλαγές της Alp2 στις οποίες έχει γίνει αλληλούχιση διαθέτουν μία ή δύο τέτοιες επαναλήψεις. Ο δεύτερος τύπος διπλής επανάληψης, που εντοπίζεται

στο καρβοξυ-τελικό μισό της Alp2 και εδώ ορίζεται ως R, αντιστοιχεί στις επαναλήψεις που έχουν βρεθεί και στα άλλα μέλη της οικογένειας Alp. Για την Alp2, ο αριθμός τέτοιων επαναλήψεων ποικίλει μεταξύ δύο και τεσσάρων στα διαφορετικά στελέχη του *S. agalactiae*. Το μεγαλύτερο μέρος του καρβοξυ-τελικού άκρου της Alp2 περιλαμβάνει μία μονή περιοχή που μοιάζει περισσότερο με τις επαναλήψεις της πρωτεΐνης α. Συνεπώς, η οργάνωση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης Alp2 είναι περισσότερο πολύπλοκη από τις άλλες πρωτεΐνες Alp. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το γονιδίωμα του στελέχους τύπου III περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί για την Alp2 (Lachenauer, C. S., et al., 1996; Lancefield, R. C et al., 1975).

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Alp έχουν χιμαιρικές αλλά σταθερές αλληλουχίες. Οι γνωστές πρωτεΐνες της οικογένειας Alp φαίνεται να αντιπροσωπεύουν σταθερές και διακριτές ολότητες. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη Rib που εκφράζεται από δύο στελέχη *S. agalactiae* των οροτύπων III και V έχουν πανομοιότυπες αλληλουχίες εκτός από τον διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων και η πρωτεΐνη ALP3 στην οποία έχει γίνει αλληλούχιση στο *S. pyogenes* είναι όμοια κατά 98% με αυτές σε πολλά στελέχη τύπου V και VIII του *S. agalactiae*. Επιπλέον η μερική αλληλούχιση των τεσσάρων γνωστών μελών της οικογένειας Alp σε πολλά στελέχη του *S. agalactiae* έδειξε ότι οι πρωτεΐνες αυτές διαθέτουν πολύ σταθερές αλληλουχίες. Έτσι, διαφορετικά μέλη της οικογένειας Alp διαφέρουν μόνο λίγο ή και καθόλου στην αλληλουχία τους ανάμεσα στα διάφορα στελέχη, εκτός από την ποικιλότητα που εμφανίζεται όσον αφορά τον αριθμό των επαναλήψεων (Bateman, A et al., 1996).

Παρόλη τη σταθερότητά τους, τα μέλη της οικογένειας Alp φαίνεται να έχουν μία χιμαιρική δομή, όπως παρατηρήθηκε αρχικά για την πρωτεΐνη ALP3, που μπορεί να θεωρηθεί ως χίμαιρα που προέρχεται από τρεις πρωτεΐνες του *S. agalactiae*, τις α, β και Rib. Παρομοίως, η πρωτεΐνη Alp2 μπορεί να θεωρηθεί χιμαιρική που προέρχεται από την ALP3 και άλλα μέλη της οικογένειας Alp. Το πιο απροσδόκητο αποτέλεσμα της ανάλυσης αυτής είναι ότι μία περιοχή στην ALP3 εμφανίζει αλληλουχιακή ομολογία με μία περιοχή της πρωτεΐνης β του *S. agalactiae*, που δεν είναι μέλος της οικογένειας Alp και έχει πολύ διαφορετική αλληλουχική οργάνωση. Η αντίστοιχη περιοχή της πρωτεΐνης

β προβλέπεται ότι σχετίζεται εξελικτικά με τις ευκαρυωτικές πρωτεΐνες και ότι διαθέτει την αναδίπλωση της υπεροικογένειας Ig (IgSF). Η περιοχή της ALP3 που μοιάζει με την πρωτεΐνη β μπορεί επίσης να διαθέτει τη δομή αυτή, υποδηλώνοντας ότι αντιστοιχεί σε μία μετακινούμενη περιοχή με αναδίπλωση IgSF (Bateman, A et al., 1996,Lachenauer, C. S et al., 2000).

Αν και η χιμαιρική δομή των πρωτεϊνών Alp συνεπάγεται ότι τα αντίστοιχα γονίδια μπορούν να ανασυνδυαστούν μεταξύ τους, και πιθανόν και με άλλα γονίδια, η ανάδυση ενός νέου μέλους της οικογένειας φαίνεται να είναι σπάνιο φαινόμενο, επειδή μόνο τέσσερα μέλη της οικογένειας έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα, και οι πρωτεΐνες αυτές είναι γενετικά σταθερές. Τα μέλη της οικογένειας που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα μπορεί να έχουν επιλεγεί εξελικτικά λόγω της καλύτερης προσαρμοστικότητάς τους. Παρόλα αυτά, είναι αντιληπτό ότι νέα μέλη της οικογένειας Alp θα προκύψουν και θα γίνουν κοινά σε άλλα επιδημιολογικά περιβάλλοντα.

Ανοσολογική σχέση μεταξύ των μελών της οικογένειας Alp.

Η ανοσολογική σχέση μεταξύ των διαφορετικών πρωτεϊνών Alp έχει επιπτώσεις για την ανάπτυξη ενός εμβολίου για το *S. agalactiae* και για την χρήση αντιορών για την ορολογική τυποποίηση των στελεχών. Τα περισσότερα από αυτά τα αποτελέσματα αποκτήθηκαν με υπεράνοσο ορό κουνελιού ενάντια σε απομονωμένες πρωτεΐνες και δεν αντανακλούν απαραίτητα την κατάσταση κατά την φυσική λοίμωξη. Γενικά, οι διασταυρούμενες αντιδράσεις δραστικότητες είναι περιέργως περιορισμένες δεδομένης της εκτεταμένης ταυτότητας των καταλοίπων μεταξύ των διαφορετικών μελών της οικογένειας Alp. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη α δεν έδειξε διασταυρούμενη αντίδραση με καμία από τις πρωτεΐνες Rib και ALP3, παρόλης της ~61% ταυτότητας καταλοίπων άμινο-τελικές περιοχές και ~45% ταυτότητα στις περιοχές επανάληψης. Παρομοίως η πρωτεΐνη Alp2 δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με την Rib, παρόλης της 60-67% ταυτότητας καταλοίπων σε διαφορετικές περιοχές. Ακόμα πιο περίεργο είναι το γεγονός ότι ήταν περιορισμένη η ανοσοογική ομοιότητα μεταξύ Rib και ALP3, παρόλης της 49% ταυτότητας καταλοίπων το μεγαλύτερο μέρος της αμινο-τελικής περιοχής και της 95% ταυτότητας στην περιοχή επανάληψης. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι

η αλληλουχιακή ποικιλότητα θα μπορούσε να αντανακλά αντιγονική ποικιλότητα, επιτρέποντας στα βακτήρια να εκφράζουν μία πρωτεΐνη στην οικογένεια για να αποφύγουν την προστατευτική ανοσία κατευθυνόμενη ενάντια σε κάποιες από τις άλλες πρωτεΐνες (Larsson, C., et al., 1999, .Kling, D. E., et al., 1997, Gravekamp, C et al., 1997).

Από την άποψη της ανάπτυξης εμβολίου, δεν υπάρχει συσχέτισης με το γεγονός ότι ακόμα και μια περιορισμένη διασταυρούμενη αντίδραση μπορεί να αρκεί για να παρέχει προστασία, όπως δείχθηκε από την έρευνα με τις πρωτεΐνες Rib και ALP3. Στη μελέτη αυτή, ο εμβολιασμός ποντικών με απομονωμένη πρωτεΐνη Rib από *S. agalactiae* παρέχει προστασία ενάντια στη λοίμωξη από ένα στέλεχος *S. pyogenes* που εξέφραζε την πρωτεΐνη ALP3 και αντιστρόφως. Δηλαδή, οι πρωτεΐνες Rib και ALP3 που έδωσαν διασταυρούμενη αντίδραση μπορούσαν να επάγουν προστασία ανάμεσα σε στελέχη δύο διαφορετικών ειδών. Επιπλέον μία αντίδραση διασταύρωσης που δύσκολα ανιχνεύεται με ανοσοχημικές τεχνικές θα μπορούσε να επιτρέψει κάποια προστασία *in vivo*, όπως προτάθηκε από έρευνα με τις πρωτεΐνες Rib και α σε μοντέλο ποντικού. Οι αντιδράσεις αυτές διασταύρωσης δείχνουν ότι ένα εμβόλιο που θα αποτελούταν από τις πρωτεΐνες Rib και α θα μπορούσε να προστατεύει ενάντια στα στελέχη *S. agalactiae* που εκφράζουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις πρωτεΐνες Alp που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα (Sta°lhammar-Carlemalm, M., et al., 2000).

Οικογένεια πρωτεϊνών Alp: Βιολογική λειτουργία

Δεν υπάρχουν καταληκτικά δεδομένα ότι οι πρωτεΐνες στην οικογένεια Alp συμβάλουν στη λοιμογόνο δράση, ενώ η βασική βιολογική τους λειτουργία παραμένει ασαφής. Πράγματι, η πιο σημαντική ιδιότητα όπως έχει μέχρι τώρα αναγνωριστεί για τις πρωτεΐνες αυτές είναι πιθανώς η ικανότητά τους να επάγουν προστατευτική ανοσία στα ζωικά μοντέλα. Ωστόσο, το εύρημα ότι τα περισσότερα, αν όχι όλα, στελέχη του *S. agalactiae* εκφράζουν μία πρωτεΐνη της οικογένειας Alp υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να έχουν μία σημαντική βιολογική λειτουργία. Μία πρόσφατη αναφορά προτείνει ότι μια λειτουργία για τις πρωτεΐνες αυτές μπορεί να είναι η πρόσδεση ανθρώπινων γλυκοζαμυνογλυκανών (Baron, M. J., et al., 2004).

Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ β

Γενικές ιδιότητες και αλληλουχία

Η ευαίσθητη σε θρυψίνη πρωτεΐνη αναγνωρίστηκε αρχικά ως ένα από τα δύο συστατικά του *S. agalactiae* C-αντιγόνου, αλλά δεν σχετίζεται με το άλλο συστατικό αυτού του αντιγόνου, της πρωτεΐνης α της οικογένειας Alp. Η πρωτεΐνη β αλληλεπιδρά με δύο συστατικά του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος, IgA-Fc και τον παράγοντα Η (FH), υποδηλώνοντας ότι παίζει ρόλο στην αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης και προκαλεί προστατευτική ανοσία. Αυτή η πρωτεΐνη βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα στελέχη του ορότυπου Ib και σε μια μειοψηφία στελεχών οροτύπων Ia, II και V, αλλά σχεδόν ποτέ στα στελέχη του ορότυπου III. Για άγνωστους λόγους, τα στελέχη που εκφράζουν τη β πρωτεΐνη συνήθως εκφράζουν και την μη σχετιζόμενη πρωτεΐνη α, ενώ η πρωτεΐνη α εκφράζεται συχνά μόνη της, ιδιαίτερα σε στελέχη του ορότυπου Ia. Τα γονίδια για αυτές τις δύο πρωτεΐνες βρίσκονται στο ίδιο τμήμα του χρωμοσώματος του *S. agalactiae*, αλλά δεν είναι στενά συνδεδεμένα. Δεν είναι γνωστό αν η β είναι λοιμογόνος παράγοντας, αν και η ικανότητά της να δεσμεύει διαφορετικά συστατικά του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος υποδηλώνει ότι μπορεί να συνεισφέρει στη λοιμογόνο δράση. Πράγματι, πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν ότι η υψηλή έκφραση της β σχετίζεται με λοιμογόνο δράση (Jerlstro¨m, P. G., et al., 1991; Jardetzky, T. S., et al., 1996; Jarva, H., et al., 2004).

Η αλληλούχιση της πρωτεΐνης β ταυτοποίησε ένα υπολειμματικό πεπτίδιο σήματος 37 και μια τυπική C-τερματική περιοχή , με μοτίβο LPXTG. Σε αντίθεση με πολλές άλλες επιφανειακές πρωτεΐνες θετικών κατά gram βακτηρίων, η πρωτεΐνη β στερείται μακρών διπλών επαναλήψεων, αλλά η μισή C-τελική περιοχή περιλαμβάνει πλούσια σε προλίνη περιοχή με μοναδική περιοδική αλληλουχία, τη λεγόμενη XPG περιοχή, η οποία ποικίλλει σε μήκος μεταξύ των διαφόρων βακτηριακών στελεχών, μια ιδιότητα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επιδημιολογικούς σκοπούς. Η ακολουθία της β βρέθηκε ότι είναι πανομοιότυπη σε δύο διαφορετικά στελέχη *S. agalactiae* και διαφέρει σε ένα απλό κατάλοιπο αμινοξέων και στη διαφορά μεγέθους στην περιοδική περιοχή XPZ. Να σημειωθεί ότι η β απελευθερώνεται σε σχεδόν καθαρή μορφή

από ξεπλυμένα βακτήρια που επωάζονται σε αυξημένο pH, υποδηλώνοντας ότι η πρωτεΐνη LPXTG μπορεί να μην είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το κυτταρικό τοίχωμα. Αυτή η ιδιότητα παρέχει έναν απλό τρόπο καθαρισμού της πρωτεΐνης.

Η πλούσια σε προλίνη περιοχή XPZ στη μισή C-τερματική περιοχή της β υιοθετεί τη δομή έλικας πολυπρολίνης II (PPII), έναν εκτεταμένο τύπο δομής που είναι σημαντικός για τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η σημασία αυτού του τύπου δομής υπογραμμίζεται από την παρουσία του στο κολλαγόνο και από το εύρημα ότι τα μόρια κατηγορίας II του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας δεσμεύουν τα πεπτίδια σε μια διαμόρφωση τύπου PPII. Ωστόσο, η λειτουργία της περιοχής XPZ στη β δεν είναι γνωστή, αλλά είναι παρούσα σε όλες τις παραλλαγές και εκτίθεται στην κυτταρική επιφάνεια, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες του ξενιστή (Lindahl, G., et al., 1990, Williamson, M. P. Et al., 1994, Areschoug, T., et al., 2002).

Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης β είναι η παρουσία μιας περιοχής που πιθανότατα έχει την πτυχή IgSF. Αυτή η περιοχή αναγνωρίστηκε από τους Bateman et al., (1996), οι οποίοι έψαξαν βάσεις δεδομένων για αλληλουχίες προκαρυωτικής πρωτεΐνης που έδειξαν ομολογία προς ευκαρυωτικές πρωτεΐνες που είναι γνωστό ότι έχουν την πτυχή IgSF. Μία από τις δύο μόνο προκαρυωτικές αλληλουχίες που ταυτοποιούνται αντιστοιχεί στο κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης β. Αυτή η περιοχή μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν προκαρυωτικό προγονικό μόριο της οικογένειας ευκαρυωτικών IgSF, αλλά μπορεί επίσης να αντιπροσωπεύει μια περίπτωση οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς από ευκαρυωτικά σε βακτήρια. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, η πρωτεΐνη ALP3 της Alp οικογένειας περιλαμβάνει μια περιοχή που δείχνει ομολογία με την πρωτεΐνη β, και αναφέρθηκε ότι αυτή η περιοχή στο ALP3 αντιστοιχεί στην περιοχή στην β που προβλέπεται ότι έχει αναδίπλωση IgSF. Μαζί, αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η περιοχή με την προβλεπόμενη αναδίπλωση IgSF μπορεί να αντιστοιχεί σε μια κινητή περιοχή (Russell-Jones, G. J et al., 1984).

Σύνδεση ανθρώπινης IgA-Fc και παράγοντα Η. Η πρωτεΐνη β δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια στο τμήμα Fc με το IgA ανθρώπινου ορού και

των δύο υποκατηγοριών, αλλά, απροσδόκητα, δεσμεύεται με χαμηλή συγγένεια με την εκκρινόμενη μορφή IgA, δηλαδή τη μοριακή μορφή της IgA που βρίσκεται στις βλεννογόνες επιφάνειες, όπου το *S. agalactiae* ξεκινά μολύνσεις. Η θέση δέσμευσης IgA-Fc εντοπίζεται εντός μιας περιοχής 73 καταλοίπων στο N-τερματικό τμήμα της πρωτεΐνης και προτάθηκε ότι μία αλληλουχία 6-καταλοίπων εντός αυτής της περιοχής είναι απαραίτητη για τη δέσμευση. Μια δεύτερη θέση δέσμευσης IgA-Fc προτάθηκε ότι παραμένει στο κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης β, αλλά αυτή η παρατήρηση μπορεί να οφείλεται στη δραστικότητα αντισώματος στον πολυκλωνικό IgA ορό που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση. Πράγματι, είναι γνωστό ότι ο φυσιολογικός ορός συχνά περιέχει αντισώματα στη β. Η θέση πρόσδεσης της β στην IgA-Fc εντοπίζεται στην εσωτερική περιοχή Ca2-Ca3, σε μια θέση που επίσης χρησιμοποιείται από πρωτεΐνες δέσμευσης IgA τις M του *S. pyogenes* και από τον ανθρώπινο υποδοχέα IgA, τον CD89 (FcaRI). Κατά συνέπεια, οι στρεπτοκοκκικές πρωτεΐνες δέσμευσης IgA αναστέλλουν τη δέσμευση της IgA στο CD89, αναστέλλοντας έτσι τη λειτουργία τελεστών IgA, μια ιδιότητα που μπορεί να συνεισφέρει στην αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης (Pleass, R. J., et al., 1999 and 2000).

Μερικά στελέχη *S. agalactiae* εκφράζουν εναλλακτικές μορφές της πρωτεΐνης β που είναι επιφανειακά εντοπισμένες αλλά δεν δεσμεύουν την IgA. Ο λόγος για την αδυναμία αυτών των παραλλαγών να δεσμεύονται με IgA δεν είναι γνωστός. Επιπροσθέτως, ορισμένα στελέχη μπορεί να μην έχουν επιφανειακή έκφραση της πρωτεΐνης β, ενώ εκκρίνουν μια παραλλαγή χαμηλού μοριακού βάρους της πρωτεΐνης (Nagano, N., et al., 2002).

Η πρωτεΐνη β δεσμεύει επίσης ανθρώπινη FH, μία μονής αλυσίδας πρωτεΐνη πλάσματος 150 kDa που αναστέλλει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος μέσω της εναλλακτικής οδού. Η κύρια θέση πρόσδεσης FH στη β πρωτεΐνη, είναι εντοπισμένη στο C-τερματικό μισό της πρωτεΐνης και δεν επικαλύπτεται με τη θέση δέσμευσης IgA. Έτσι, η β έχει ξεχωριστές θέσεις δέσμευσης για δύο σημαντικά συστατικά του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος, IgA και FH. Όπως και πολλοί άλλοι ρυθμιστές συμπληρώματος, η FH είναι μέλος των ρυθμιστών της οικογένειας ενεργοποίησης και αποτελείται από μονάδες που ονομάζονται SCR ή CCP, εκ των οποίων 20 υπάρχουν στην

FH. Αξίζει να σημειωθεί ότι η FH συνδέεται με αρκετά βακτηριακά παθογόνα, τα οποία μπορεί να εξωθήσουν τον αναστολέα του ανθρώπινου συμπληρώματος για προστασία έναντι της επίθεσης του συμπληρώματος και της φαγοκυττάρωσης. Σε εκφραζόμενη β του *S. agalactiae*, η επιφανειακά δεσμευμένη FH διατηρεί την ικανότητά της να δρα ως ρυθμιστής συμπληρώματος, υποδηλώνοντας ότι τέτοια στελέχη *S. agalactiae* μπορεί να χρησιμοποιούν δεσμευμένη FH για να αναστέλλουν την προσβολή από το συμπληρώματος, αλλά δεν είναι ακόμη γνωστό εάν η πρωτεΐνη β έχει αντιφαγοκυταρικές ιδιότητες. Πράγματι, η συνδεδεμένη FH με το βακτήριο μπορεί επίσης να έχει άλλες λειτουργίες, π.χ. για να προάγει την προσκόλληση σε ανθρώπινα κύτταρα. Η κύρια θέση δέσμευσης για την FH μπορεί να εντοπιστεί στην περιοχή SCR 8-11 (Areschoug, T., et al., 2002).

1.9.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ

Γενικά, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τη γονιδιακή ρύθμιση στο *S. agalactiae* και υπάρχουν λίγες μόνο μελέτες που έχουν ταυτοποιήσει ρυθμιστικούς μηχανισμούς και γονίδια ελέγχου που κωδικοποιούν επιφανειακές πρωτεΐνες.

Η αλληλουχική ανάλυση του γονιδιώματος του *S. agalactiae* αποκάλυψε ένα αριθμό πιθανών μεταγραφικών παραγόντων, κάποιοι από τους οποίους μπορεί να μοιάζουν με συστήματα που επηρεάζουν την έκφραση πρωτεϊνών επιφάνειας στο S. pyogenes.

Πολλές μελέτες έχουν αναλύσει ρυθμιστικά συστήματα που επηρεάζουν την ικανότητα του *S. agalactiae* να προσδένει Fg. Οι Spellerberg et al., (2002), περιέγραψαν ένα σύστημα δύο-συστατικών, που ορίστηκε ως *rgf*, και επηρεάζει την ικανότητα του *S. agalactiae* να προσκολλάται σε ακινητοποιημένο Fg, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να επηρεάζει την έκφραση της πρωτεΐνης FbsA. Το ρυθμιστικό αυτό σύστημα μπορεί επίσης να καταστέλλει την έκφραση της ScpB.

Η πρωτεΐνη **RogB** του *S. agalactiae* είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας RALP, δείχνοντας ~50% αλληλουχιακή ταυτότητα με τις RofA και Nra πρωτεΐνες του *S. pyogenes.* Η RogB ρυθμίζει θετικά την ικανότητα του *S.*

agalactiae να προσδένει ακινητοποιημένο Fg και Fn και επηρεάζει την ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, η RogB έδειξε να ενεργοποιεί την έκφραση της πρωτεΐνης FbsA που προσδένει Fg , αλλά δεν επηρέασε την έκφραση της πρωτεΐνης ScpB που προσδένει Fn.

Λίγα είναι προς το παρόν γνωστά σχετικά με τη ρύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν για μέλη της οικογένειας Alp, αλλά μία πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι η έκφραση της πρωτεΐνης α υπόκειται σε περιορισμένη ποικιλότητα φάσης *in vitro*, λόγω αλλαγών των νουκλεοτιδικών επαναλήψεων ου βρίσκονται ανοδικά του δομικού γονιδίου. Να σημειωθεί ότι οι δύο γνωστές αλληλουχίες γονιδιωμάτων δείχνουν ότι αλληλόμορφα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες Rib και Alp2 βρίσκονται καθοδικά ενός γονιδίου που κωδικοποιεί έναν ρυθμιστή τύπου AraC. Παρομοίως, οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την οικογένεια Alp των *E. faecalis* και *E. faecium* τοποθετούνται καθοδικά ή ανοδικά ενός γονιδίου τύπου *araC*. Τα γονίδια αυτά πιθανόν ελέγχουν την έκφραση του γειτονικού γονιδίου που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη επιφάνειας (Glaser, P et al., 2002, Tettelin, H et al., 2002, .Samen, U et al., 2004, Puopolo, K et al., 2003).

1.9.3 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ *S. agalactiae*

Genome project- το πρόγραμμα για το γονιδίωμα του S. agalactiae

Ο *S. agalactiae αποτελεί σοβαρή απειλή για την ζωή των νεογνών και απομονώνεται σε* 2-3 περιπτώσεις στις 1000 γεννήσεις, όπως και γενικά για την ανθρώπινη ζωή, ιδίως στην τρίτη ηλικία ασθενείς με ευαίσθητο ανοσοποιητικό σύστημα. Ο μικροοργανισμός αποτελεί επίσης μείζον πρόβλημα οικονομικής απώλειας στη βιομηχανία γαλακτοκομικών προιόντων στην περίπτωση που δεν γίνεται έλεγχος. Λόγω λοιπόν της σημασίας του ως απειλής στον άνθρωπο και τα βοοειδή, το γονιδίωμά του αλληλουχήθηκε ώστε να μελετηθούν σε βάθος οι λοιμογόνοι του παράγοντες και να αναπτυχθούν καλύτερες θεραπείες και η πρόληψη [EntrezGenome (a)]

Δομή του γονιδιώματος

Το γονδίωμα τριών στελεχών *Streptococcus agalactiae* (GBS) αλληλουχήθηκαν πλήρως: *S. agalactiae* NEM 316, *S. agalactiae* 2603V/R, και *S.agalactiae* A909. Επίσης έχουν αλληλουχηθεί τα γονιδιώματα δύο πλασμιδίων του μικροοργανισμού: *S.agalactiae* πλασμίδιο pGB 3631 και *S. agalactiae* πλασμίδιο pGB354.

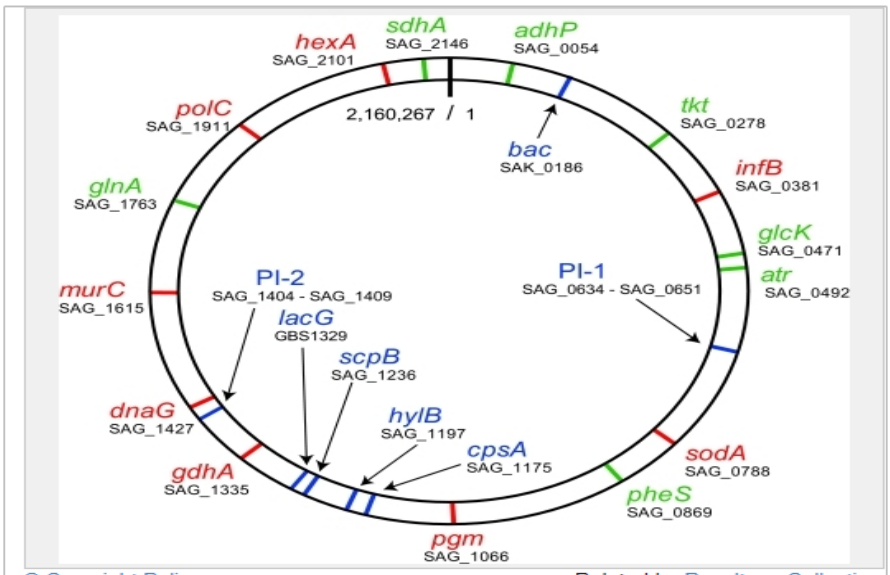
Το γονιδίωμα πέντε στελεχών είναι ακόμη υπό διερεύνηση και η αλληλούχιση δεν έχει ολοκληρωθεί: *S. agalactiae* 515, *S. agalactiae* CJB111, *S. agalactiae* COH1, *S. agalactiae* H36B, *S. agalactiae* 18RS21. [EntrezGenome (β)]

Μέγεθος του χρωμοσώματος: Το στέλεχος *S. agalactiae* NEM 316 ανήκει στον ορότυπο III (GlaserPetal., 2002). Η πλήρης αλληλούχιση του γονδιώματος του στελέχους αυτού, έδειξε πως το χρωμόσωμα του NEM 316, αποτελείται από ένα μοναδικό κυκλικό μόριο διπλής έλικας **DNA (dsDNA)** 2,211,485 ζευγάρια βάσεις, με GC περιεχόμενο 35%, περιοχή που κωδικοποιεί 87% και περιλαμβάνει 2,235 γονίδια, 2,094 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 101 δομικά RNAs, και 40 ψευδογονίδια. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος του στρεπτοκόκκου B ολοκληρώθηκε το 2002 [EntrezGenome (β)]. Ο *S. agalactiae* 2603V/R ανήκει στο ορότυπο V. Το γονιδίωμα του μικροβιακού αυτού στελέχους είναι ένα κυκλικό διπλής έλικας χρωμόσωμα (dsDNA) με 2,160,267 ζευγάρια βάσεις, με GC περιεχόμενο 35%, του οποίου το 86% κωδικοποιεί, και περιλαμβάνει 2,271 γονίδια, με 2,124 γονίδια να κωδικοποιούν πρωτείνες, 96 δομικά RNAs, και χωρίς ψευδογονίδια. Το γονιδίωμά του, επίσης ταυτοποιήθηκε πλήρως το 2002 Genome [EntrezGenome (β)] *S. agalactiae* A909 ανήκει στο ορότυπο serotype Ic. Το πλήρες γονιδίωμα του στελέχους αυτού είναι ένα κυκλικό χρωμόσωμα με διπλής έλικας DNA και 2,127,839 ζευγάρια βάσεις, GC περιεχόμενο 35%, και κωδικοποιούσα περιοχή 86%. Περιλαμβάνει 2,136 γονίδια, 1,996 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτείνες, 102 δομικά RNAs, και 32 ψευδογονίδια. Η αποκωδικοποίηση του γονιδιώματός του ολοκληρώθηκε το 2005 [Glaser P et al., 2002] *[EntrezGenome. Streptococcus agalactiae genome project (α)]*. Το σχήμα της φωτό 4 (Glazer P et al., 2002) απεικονίζει το χρωμόσωμα του

στελέχους *Streptococcus B* με σημειωμένα τα πιο σημαντικά γονίδια ενώ στο Σχήμα 1.9.3.2 απεικονίζονται επίσης κατά γραμμικό τρόπο τα γονίδια παθογένειας. **Ε**δώ εμφανίζεται **η περιοχή που διερευνήθηκε από εμάς, και περιλαμβάνει τα γονίδια *rib, alp, epsilon.***

Κάθε ένα από τα γονιδιώματα *S. agalactiae* που αλληλουχήθηκαν περιέχει ~15 περιοχές, διεσπαρμένες κατά μήκος του γονιδιώματος, που έχουν κάποιες κοινές ιδιότητες με τις νησίδες παθογένειας (PAI). Οι περιοχές αυτές περιέχουν γονίδια για πολλές πρωτεΐνες επιφάνειας που είχαν προβλεφθεί καθώς και για αναφερόμενους λοιμογόνους παράγοντες, περιλαμβάνοντας πολλά από τα γονίδια που είναι μοναδικά για το *S. agalactiae*. Σε πολλές περιπτώσεις, οι περιοχές αυτές σχετίζονται με κινητά στοιχεία όπως οι προφάγοι, τα πλασμίδια και τα συζευκτικά τρανσποζόνια. Αυτές οι 'νησίδες' προφανώς παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλότητα ανάμεσα σε διαφορετικά στελέχη *S. agalactiae* και προβλέπεται ότι υπόκειντα σε γρήγορα εξέλιξη.

Σχήμα 1.9.3.1



© Copyright Policy - open-access License

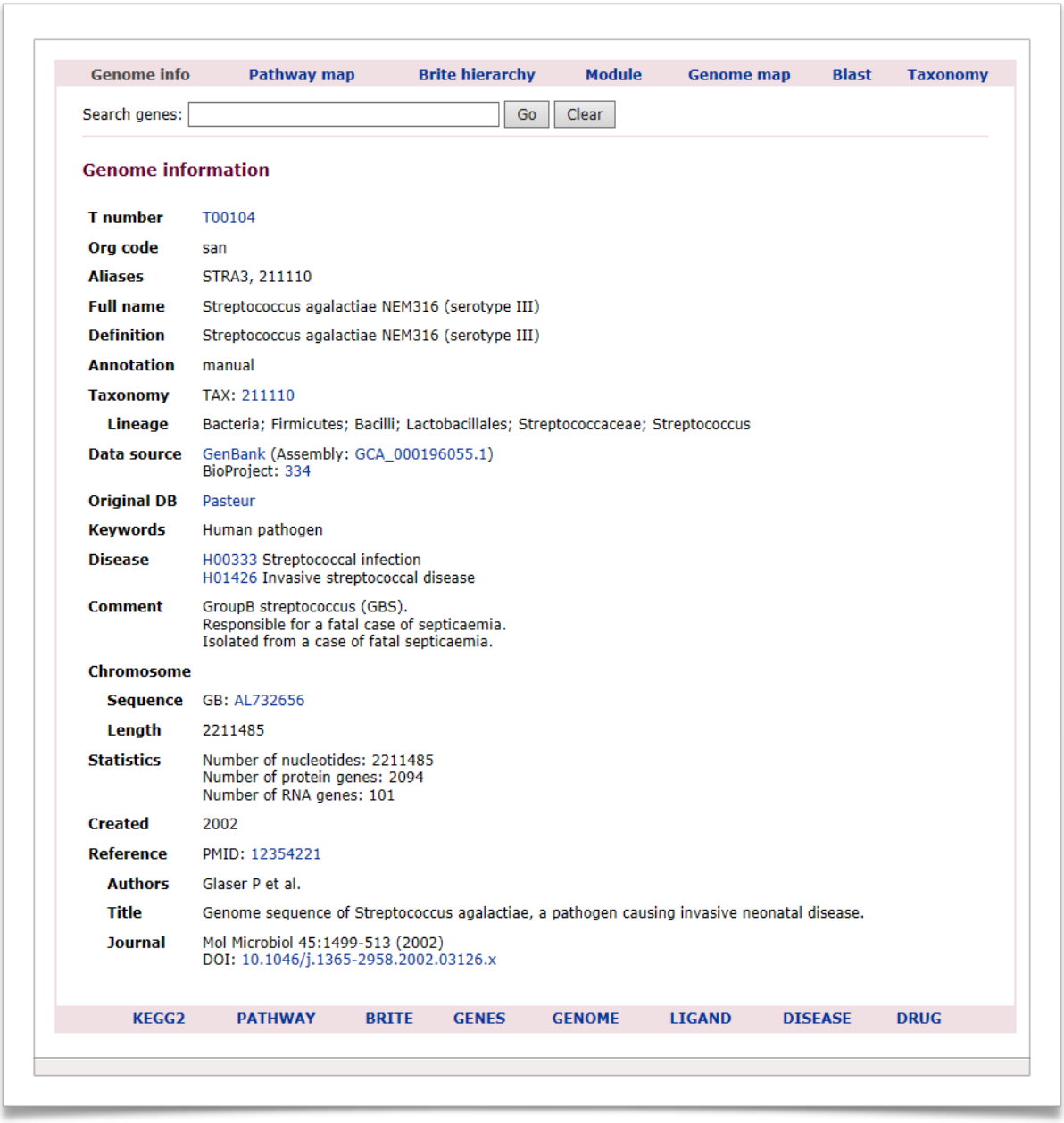
Related In: Results - Collection
Show All Figures

f2: Schematic map of the S. agalactiae genome showing the positions of pilus islands (PI-1 and PI-2) and of genes examined in the present study. Genes used in conventional MLST analysis are indicated in green. The eight additional genes are indicated in red. Other genes, which were not included in the clustering analyses, are shown in blue. Locus tags and positions are given for the genes of strain 2603V/R (25), except for the genes missing in this GBS strain: those encoding β-antigen (bac) and 6-phospho-beta-galactosidase (lacG). The locus tags and positions for these two genes are given for strains A909 and NEM316, respectively. The complete genome sequences of the GBS strains NEM316, 2603V/R, and A909 have been determined (24–26), and all three show conserved gene order (synteny).

Γονιδιωματική Χαρτογράφηση S. agalactiae

Η γονιδιακή ταυτότητα του GBS NEM 316 μετά την αλληλούχιση περιλαμβάνεται σε διάφορες τράπεζες όπως και στην πιο κάτω ιστοσελίδα:

https://academic.oup.com/nar/article/28/1/27/2384332



Genome info | Pathway map | Brite hierarchy | Module | Genome map | Blast | Taxonomy

Search genes: Go Clear

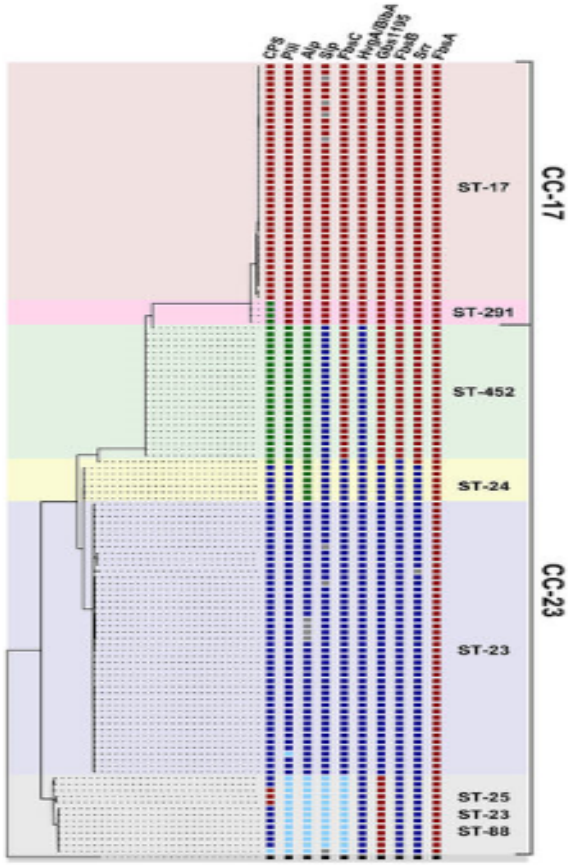
Genome information

T number	T00104
Org code	san
Aliases	STRA3, 211110
Full name	Streptococcus agalactiae NEM316 (serotype III)
Definition	Streptococcus agalactiae NEM316 (serotype III)
Annotation	manual
Taxonomy	TAX: 211110
Lineage	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae; Streptococcus
Data source	GenBank (Assembly: GCA_000196055.1) BioProject: 334
Original DB	Pasteur
Keywords	Human pathogen
Disease	H00333 Streptococcal infection H01426 Invasive streptococcal disease
Comment	GroupB streptococcus (GBS). Responsible for a fatal case of septicaemia. Isolated from a case of fatal septicaemia.
Chromosome	
Sequence	GB: AL732656
Length	2211485
Statistics	Number of nucleotides: 2211485 Number of protein genes: 2094 Number of RNA genes: 101
Created	2002
Reference	PMID: 12354221
Authors	Glaser P et al.
Title	Genome sequence of Streptococcus agalactiae, a pathogen causing invasive neonatal disease.
Journal	Mol Microbiol 45:1499-513 (2002) DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.03126.x

KEGG2 | PATHWAY | BRITE | GENES | GENOME | LIGAND | DISEASE | DRUG

Σχήμα 1.9.3.2

Figure 4: Distribution of allelic variants of major GBS virulence factors families.



Capsule operon (CPS), Pilus island (Pili), Alpha proteins (Alp), Surface immunogenic protein (Sip), Gbs2018 (HvgA/BibA), Serine rich proteins (Srr), Fibrinogen-binding protein (FbsA, B and C), Gbs1195 among 130 isolates belonging to CC23 and CC17. STs (and their s.l.v.) within CC17 and CC23 are highlighted by colored areas. The dendrogram connecting the strains is the same used in Figure S1. For each virulence factor, allelic variants are represented in columns and differentiated by colored squares and defined as follows. **CPS**: red = III, green = IV, blue = Ia, cyan = II; **Pili**: red = 1 + 2b, green = 2b, blue = 2a, cyan = 1 + 2a; **Alp**: red = rib, green = c-alpha, blue = alp1 (epsilon), cyan = alp2; **Sip**: red = COH1, blue = 515, cyan = NEM316; **FbsC**: red = COH1, blue = 515, cyan = NEM316; **HvgA/BibA**: red = HvgA, blue = BibA; **Gbs1195**: red = Gbs1195, blue = Sag1127-2; **FbsB**: red = FbsB2b, blue = FbsB2; **Srr**: red = Srr2, blue = Srr1; **FbsA**: red = FbsA; **other**: grey = N.A., black = outgroup.

Η γονιδιακή ταυτότητα του στελέχους NEM 316, απεικονίζονται κατά γραμμικό τρόπο τα γονίδια παθογένειας. Παρατηρείται η γονιδιακή περιοχή που περιλαμβάνει τα γονίδια rib, alp, epsilon.

Πλασμίδια του στρεπτοκόκκου Β: Το «άγριο πλασμίδιο» του *S. agalactiae* IP501 μπορεί να μεταφερθεί εύκολα και να διατηρηθεί σε διάφορα

στελέχη του *S. agalactiae* προσδίδοντας αντοχή σε αντιβιοτικά στα στελέχη που το φέρουν. Αυτό το πλασμίδιο pIP501 μπορεί να απομονωθεί από διάφορα στελέχη *S. agalactiae* αλλά και από διάφορα είδη Streptococci συμπεριλαμβάνοντας τον *S. sanguis* και *S. faecalis*. Φαίνεται πως αυτό το πλασμίδιο παίζει μεγάλο ρόλο στην παθογένεια του μικροοργανισμού [EntrezGenome. Streptococcus agalactiae genome project, (α)]

Το πλασμίδιο pGB3631 προέρχεται από αποκοπή του άγριου πλασμιδίου I501 [BrantlSetal., 1994]. Το γονιδίωμα του είναι ένα κυκλικό μόριο DNA με 5,842 ζευγάρια βάσεις, GC περιεχόμενο 33%, και κωδικοποιούσα περιοχή 62%, ενώ περιλαμβάνει 9 genes, 6 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτείνες χωρίς κωδικοποίηση δομικού RNA, και χωρίς ψευδογονίδια (Το γονιδίωμα αλληλουχήθηκε το 1994) [Entrez Genome. *Streptococcus agalactiae* genome project, (α), (β)]. Το πλασμίδιο του *S. agalactiae* pGB354 είναι και αυτό προερχόμενο από το άγριο πλασμίδιο του *Streptococcus agalactiae* pIP501. Εχει μέγεθος 6,437 ζευγάρια βάσεις, είναι κυκλικό μόριο DNA με GC περιεχόμενο 33%, κωδικοποιεί κατά 62% και περιλαμβάνει 5 γονίδια, 5 γονίδια πρωτεινών, χωρίς δομικό RNA, και χωρίς ψευδογονίδια, ενώ το γονιδίωμά του αλληλουχήθηκε το 1997 [EntrezGenome (β), (BrantlS, et al., 1994)]

Μοριακή βάση της παθογένειας: Η ανάλυση του γονιδιώματος **NEM316** προβλέπει και ταυτοποιεί γονιδιακούς τόπους υπευθύνους για εξωκυττάριες δομές, όπως καψιδικούς πολυσακχαρίτες, επιφανειακές πρωτείνες, και απεκκρινόμενες πρωτείνες υπεύθυνες για την λοιμωγονικότητα, συνεισφέροντας έτσι στην παθογένεια. Το στέλεχος NEM 316 περιλαμβάνει 17 γονίδια, (cpsA-L, neu/BCDA) το γονίδιο μεταγραφής για το τις τελικές σιαλικές μονάδες του καψιδικού πολυσακχαρίτη, 30 γονίδια (gbs 0391, 0392, 0393, and 27 moregenes) που κωδικοποιούν αντιγόνα επιφάνειας του κυτταρικού τοιχώματος και διάφορα άλλα γονίδια υπεύθυνα για την κωδικοποίηση 71 εκκρινόμενων πρωτεινών (Σχήμα 1.9.3.2). Στην ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους NEM315, διαπιστώθηκε πως η ικανότητα προσαρμογής του στρεπτοκόκκου Β οφείλεται στις πρωτείνες Clp που κωδικοποιούνται από διάφορα γονίδια (gbs 1634, 1383, 1869, 1367, 0535). Αυτές οι πρωτείνες είναι ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες και παίζουν μεγάλο ρόλο στη παθογένεια (Glaser P et al., 2002).

Νησίδες παθογένειας: Το γονιδίωμα του *Streptococcus agalactieae* αναλύθηκε και φάνηκε να φέρει νησίδες παθογένειας, κάτι το οποίο δεν εμφανίζεται σε άλλα είδη στρεπτοκόκκων αλλά μάλλον παρουσιάζει ομοιότητα με την παθογένεια της *Escherichia coli*. Αυτή η απρόσμενη ομοιότητα, οδηγεί στην υπόθεση πως ο παράγων λοιμογονικότητας υπήρχε σε κοινή νησίδα παθογένειας και εξελίχθηκε στα δυο παθογόνα. Η υπόθεση όμως αυτή δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί (Glazer P et al., 2002). Η ανάλυση και σύγκριση βασικών χρωμοσωμικών γονιδίων έδειξε πως, συντηρημένα γονίδια του *S. agalactiae* και *S. Pyogenes,* παρουσιάζουν ομοιότητα, παρά με του *S. Pneumoniae*. Επίσης, γονίδια στις νησίδες παθογένειας του *S. agalactiae* είναι μοναδικά για το μικροοργανισμό, ενώ η διασπορά τους είναι διαφορετική ανάμεσα στα στελέχη of *S. agalactiae*. (Glaser P et al., 2002).

1.10 ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑ

(Vaccine. 34 (26):2876–2879. *doi:10.1016/j.vaccine.2015.12.072)*

Οι πρωτεΐνες επιφάνειας του *S. agalactiae* ως συστατικά εμβολίων

Για τα περισσότερα βακτηριακά παθογόνα, το ιδανικό εμβόλιο θα περιλάμβανε πιθανώς μία μοναδική πρωτεΐνη επιφάνειας που επάγει προστατευτική ανοσία και εκφράζεται από όλα τα κλινικά απομονωμένα στελέχη. Παραμένει να δούμε αν ένα τέτοιο εμβόλιο μπορεί να αναπτυχθεί για το *S. agalactiae* ή κάποιο άλλο gram-θετικό παθογόνο. Πράγματι, οποιοδήποτε αντιγόνο επιφάνειας που αποτελεί στόχο για προστατευτική ανοσία στις φυσικές λοιμώξεις μπορεί να δείξει αντιγονική ποικιλότητα, κάνοντας επιτακτική την ανάγκη για πολύπλοκα εμβόλια. Ωστόσο, η ανοσία που επάγεται από εμβόλιο μπορεί να διαφέρει από τη φυσική ανοσία, και παραμένει η ενδιαφέρουσα πιθανότητα ότι μπορεί να αναπτυχθεί ένα εμβόλιο στη βάση μιας ή λίγων πρωτεϊνών επιφάνειας, ακόμα και αν άλλες πρωτεΐνες επιφάνειας εκφράζουν αντιγονική ποικιλότητα. Για το *S. agalactiae*, μία τέτοια πρωτεΐνη μπορεί να συμπεριλαμβάνεται ανάμεσα σε αυτές που περιγράφηκαν στην επισκόπηση αυτή ή μπορεί να αναγνωριστούν από αλληλουχίες γονιδιωμάτων. Ένα τέτοιο εμβόλιο θα μπορούσε να χορηγηθεί σε εγκυμονούσες γυναίκες ή έφηβα

κορίτσια, καθώς τα προστατευτικά αντισώματα μεταφέρονται ενδοπλακουντιακά.

Μελέτες ανοσοποίησης

Αρκετές πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη β προκαλεί προστατευτικά αντισώματα, μια δυνατότητα που μπορεί να είναι ενδιαφέρουσα για την ανάπτυξη εμβολίων. Σε πειράματα παθητικής ανοσίας παρατηρήθηκε προστασία με αντιορό που αναπτύχθηκε έναντι της πρωτεΐνης β (καθαρισμένης) απευθείας από στρεπτόκοκκο ή ανερχόμενης έναντι ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Στις ενεργές ανοσοποιήσεις, η μητρική ανοσοποίηση των ποντικών με β πρωτεΐνη, προστάτευσε τα μικρά νεογνά έναντι μολύνσεως με β εκφραζόμενο στέλεχος και μητρική ανοσοποίηση με συζευγμένο σύμπλοκο της β και προστατευμένο πολυσακχαρίτη καψιδίου τύπου III, προστάτευσε τα νεογνά έναντι στελεχών που εκφράζουν τα δύο συστατικά υποδηλώνουν ότι τα προστατευτικά αντισώματα μεταφέρονται μέσω του πλακούντα. Στο ανθρώπινο σύστημα, υπάρχουν ενδείξεις ότι πολλές γυναίκες έχουν αντι-β IgG αντισώματα που μπορούν να μεταφερθούν μέσω του πλακούντα. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι το επίπεδο των φυσικώς αποκτηθέντων μητρικών β-ειδικών IgG αντισωμάτων μπορεί να συσχετιστεί με την προστασία των νεογνών από ασθένειες, αλλά δεν βρέθηκε τέτοιος συσχετισμός.

Εμβόλια

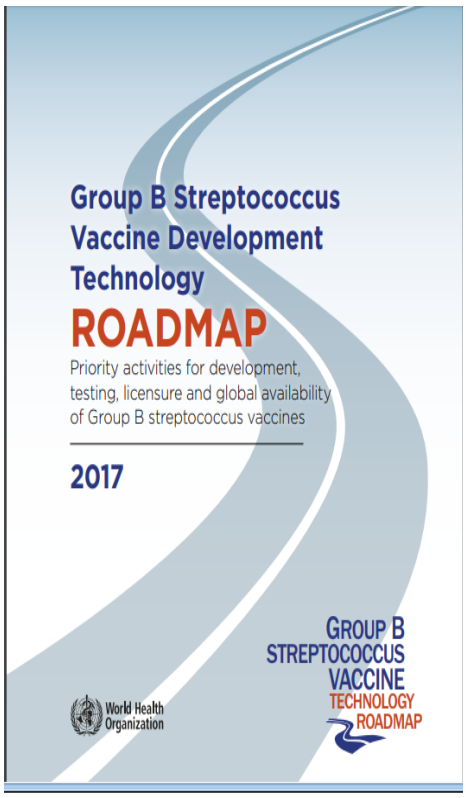
Ο εμβολιασμός φαίνεται πως αποτελεί εξαιρετική λύση στην πρόληψη της GBS περιγεννητικής λοίμωξης στα νεογνά. Προς το παρόν, η έρευνα και οι κλινικές μελέτες αξιολογούν την αποτελεσματικότητα εμβολίων κατά του Β στρεπτοκόκκκου τόσο στις λοιμώξεις εγκύου/εμβρύου, αλλά και για ευπαθείς ομάδες. Ωστόσο δεν υπάρχει ακόμη διαθέσιμο εμβόλιο. Μόρια–στόχοι είναι:

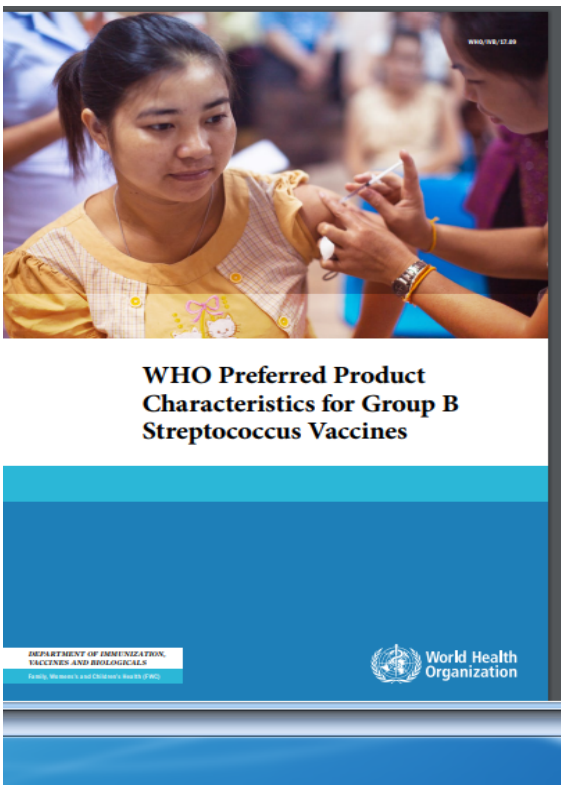
α. επίτοποι του πολυσακχαριδικού αντιγόνου του καψιδίου και

β. άλλα πρωτεινικά μόρια.

Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας εξέδωσε το 2017 οδηγίες για τις ιδιότητες που θα πρέπει να έχουν τα υπό έρευνα εμβόλια αλλά και για τα βήματα που πρέπει να ακολουθηθούν έως την ανάπτυξή τους (Εικόνα 1.10.1).

Εικόνα 1.10.1





Ηλεκτρονικοί σύνδεσμοι με τα νεότερα δεδομένα σχετικά με την ανάπτυξη εμβολίου για την πρόληψη της λοίμωξης απο τον GBS

1. ***http://www.who.int/immunization/research/development/ppc_groupb_strepvaccines /en/)***
2. ***http://www.who.int/immunization/research/development/ppc_groupb_strepvaccines/en/ Heath PT (2016). "Status of vaccine research and development of vaccines forGBS" (PDF). Vaccine. 34 (26): 2876-2879. doi:10.1016/j.vaccine.2015.12.072. PMID 26988258.***

1.11 ΟΔΗΓΙΕΣ ΚΕΝΤΡΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ (CDC)

Η Αμερικανική Ακαδημία Παιδιάτρων (AAP) και το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων (ACOG) δημοσίευσαν στο παρελθόν διαφορετικές και συχνά αντικρουόμενες προτάσεις για την πρόληψη περιγεννητικής λοίμωξης από GBS. Σε απάντηση αυτών των διαφορετικών προτάσεων, το κέντρο ελέγχου και πρόληψης ασθενειών (CDC) των ΗΠΑ

δημοσίευσε (1996), με την συγκατάθεση της AAP και της ACOG, οδηγίες-πρωτόκολλο για την πρόληψη της νεογνικής λοίμωξης από GBS. Αυτές περιελάμβαναν χημειοπροφύλαξη κατά την εγκυμοσύνη και κατά την διάρκεια του τοκετού, φαρμακευτική θεραπεία του νεογνού και ανοσοποίηση.

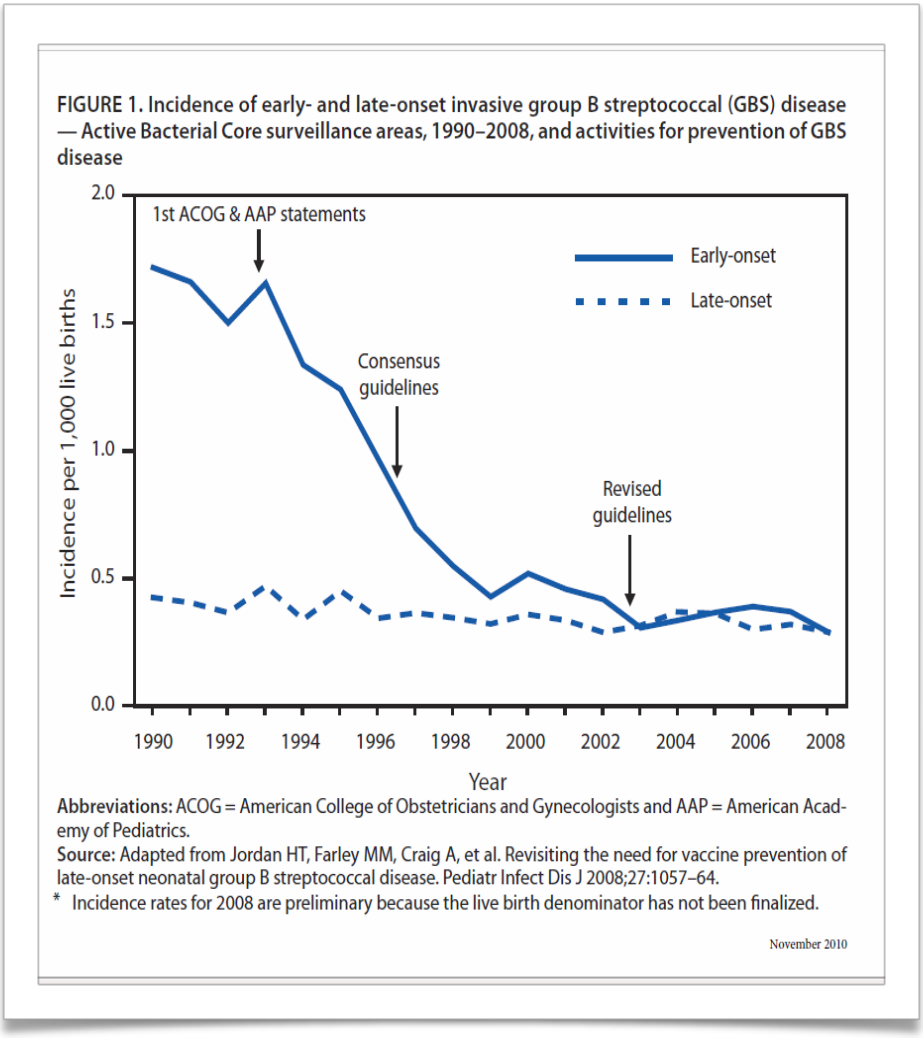
Το πρωτόκολλο βασιζόταν στην αναγνώριση, με δύο βασικές προσεγγίσεις, ασθενών υψηλής επικινδυνότητας οι οποίοι θα επωφελούνταν από φαρμακευτική χημειοπροφύλαξη με αμπικιλλίνη ή πενικιλλίνη κατά την διάρκεια του τοκετού. Η μια προσέγγιση βασιζόταν στον έλεγχο-διαχωρισμό ασθενών φορέων με καλλιέργειες από κολπικό και πρωκτικό υλικό κατά την 35η με 37η εβδομάδα κύησης. Η δεύτερη προσέγγιση βασιζόταν στον έλεγχο συνθηκών γνωστών ότι αυξάνουν τον κίνδυνο αποικισμού μητέρων από GBS, όπως πρόωρος τοκετός, πρώιμη ρήξη μεμβρανών, πυρετική κίνηση κατά τον τοκετό και ιστορικό προηγούμενου νεογνού ή βρέφους με λοίμωξη από GBS. Η εμφάνιση πρώιμης λοίμωξης των νεογνών από τον GBS παρατηρήθηκε πως μειώθηκε κατά 65% μετά την εφαρμογή των οδηγιών του CDC.

Το 2002 το CDC προχώρησε σε αναθεώρηση των οδηγιών και υιοθετήθηκε μια παγκόσμια στρατηγική προγεννητικού ελέγχου γυναικών κατά την 35η με 37η εβδομάδα της κύησης. Σύμφωνα με αυτές τις αναθεωρημένες οδηγίες το επίχρισμα από τον κόλπο και τον πρωκτό των υπό εξέταση γυναικών θα έπρεπε να καλλιεργείται σε στερεό υλικό όπως άγαρ, αλλά και σε ειδικά εμπλουτισμένο ζωμό. Φάρμακα εκλογής παραμένουν σύμφωνα με την οδηγία η πενικιλλίνη και η αμπικιλλίνη.

Η πολιτική αυτή οδήγησε στην χορήγηση αντιβιοτικών στο 24% των επιτόκων στις Η.Π.Α. και αύξηση της ανθεκτικότητας του GBS στις πενικιλίνες. Παρατηρήθηκε όμως πτώση από **1.5/1000** σε **0.34-0.37/1000** νεογνικών λοιμώξεων από GBS μετά την εφαρμογή του πληθυσμιακού ελέγχου σε έγκυες 35-37 εβδομάδων. Ως θεραπεία στις Η.Π.Α. προτείνεται IV πενικιλίνη ή αμπικιλίνη με προτιμότερη την πρώτη τουλάχιστον 4 ώρες πριν τον τοκετό και επί αλλεργίας στην πενικιλίνη χρήση κεφαζολίνης, κλινδαμυκίνης, ερυθρομυκίνης, βανκομυκίνης.

Μέχρι το 2004 παρατηρήθηκε επιπλέον 31% πτώση στην εμφάνιση πρώιμης λοίμωξης (Σχήμα 1.11.1) .

Σχήμα 1.11.1



Ως αποτέλεσμα του μικροβιολογικού ελέγχου και της προληπτικής αντιμικροβιακής αγωγής σύμφωνα με την αναθεωρημένη οδηγία, η μείωση των κρουσμάτων διεισδυτικής πρώιμης νόσου στα νεογνά ήταν κατακόρυφη (CDC, 2008)

Παρά τις αναθεωρημένες οδηγίες όμως, και την καταγεγραμμένη μείωση της πρώιμης λοίμωξης, το 2010 θεωρήθηκε πως η μεθοδολογία ελέγχου περιείχε ατέλειες, ενώ υπολογίστηκε ότι θα παρουσιάζονταν 1600 νέα περιστατικά και 80 θάνατοι ετησίως. Τα αποτελέσματα των καλλιεργειών συνήθως χρειάζονται 24 με 72 ώρες για να προσκομιστούν, ενώ συχνά το εργαστήριο δεν ακολουθεί τις οδηγίες του CDC κατά γράμμα. Επίσης παρόλο που οι μέθοδοι ελέγχου είναι υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης, το αποτέλεσμα εξαρτάται από την παρουσία επαρκούς ποσότητας ζώντων

μικροοργανισμών στο υπό διερεύνηση δείγμα. Επιπλέον πολλές γυναίκες αποικίζονται μεταξύ 35ης εβδομάδας κύησης και τοκετού, ορισμένες δεν υποβάλλονται σε προγεννητικό έλεγχο, κάποιες γεννούν πρόωρα, ενώ ένα 10% των γυναικών που έχουν βρεθεί αρνητικές σε GBS στον προγεννητικό έλεγχο, θετικοποιούνται κατά τον τοκετό.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω και θέλοντας να αποτρέψουν την πρώιμη λοίμωξη των νεογνών από τον GBS ακόμη περισσότερο, το **2010** το **CDC** προχώρησε στην **τρίτη αναθεώρηση** των προτεινόμενων οδηγιών κατά της πρώιμης λοίμωξης από τον GBS. Τα κυριότερα σημεία αυτών των οδηγιών είναι τα ακόλουθα:

- Οι γυναίκες στις οποίες απομονώνεται ο GBS από τα ούρα, οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ή που είχαν ένα προηγούμενο παιδί με ιστορικό λοίμωξης από GBS, πρέπει να λάβουν προφυλακτική αντιβίωση κατά τον τοκετό, ενώ δεν απαιτείται ο καθιερωμένος έλεγχος του τρίτου τριμήνου.
- Όλες οι άλλες έγκυες γυναίκες πρέπει να ελέγχονται κατά την 35η με 37η εβδομάδα της κύησης.
- Όλες οι έγκυες γυναίκες, θετικές σε GBS, πρέπει να λάβουν προφυλαχτική αντιβίωση κατά τον τοκετό, εκτός αν πραγματοποιείται καισαρική πριν την προγραμματισμένη ημερομηνία και δεν έχουν ραγεί οι αμνιακές μεμβράνες.
- Στην περίπτωση όπου τα αποτελέσματα του ελέγχου δεν έχουν προσκομιστεί μέχρι την έναρξη του τοκετού, χορηγείται προφυλακτική αντιβίωση (κατά την διάρκεια του τοκετού) στις εξής περιπτώσεις: Σε έναρξη τοκετού πριν την 37η εβδομάδα, στην περίπτωση που η ρήξη των μεμβρανών έχει διαρκέσει πάνω από 18 ώρες και σε περίπτωση όπου παρουσιάζεται πυρετός πάνω από 38°C στην έγκυο κατά τον τοκετό.
- Στην περίπτωση εγκύου γυναίκας θετικής σε GBS χωρίς όμως προσβολής του ουροποιητικού δεν χορηγείται προφυλαχτική αντιβίωση πριν τον τοκετό.
- Γυναίκες που είναι προγραμματισμένες να υποβληθούν σε καισαρική τομή δεν πρέπει να υποβληθούν σε προφυλακτική αντιβιοτική θεραπεία

πριν την έναρξη του τοκετού αφού μπορεί να γεννήσουν πρόωρα και τότε θα απαιτείται προφυλακτική φαρμακευτική αγωγή κατά τον τοκετό.

- Οι θεράποντες ιατροί θα πρέπει πριν προβούν σε ιατρικές πράξεις να ενημερώσουν τις γυναίκες για τον έλεγχο κατά του GBS και για τις προτεινόμενες οδηγίες του CDC.

Οι κυριότερες διαφορές σε σχέση με τις οδηγίες του 2002 είναι αυτές που αφορούν τις περιπτώσεις καισαρικής τομής και η προαιρετική χρήση μοριακών μεθόδων πχ PCR για την ανίχνευση του GBS.

1.12 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΥΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΣΜΟΙ

Περί τα μέσα της δεκαετίας του 90, όπως προαναφέρθηκε, το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης ασθενειών στην Αμερική (Centers for Disease Control, CDC) προέτρεψε την χορήγηση ενδοφλέβιας αντιμικροβιακής προφύλαξης, κατά τον τοκετό, για τις θετικές στην φορεία GBS γυναίκες, ενώ το 2002, εξέδωσε οδηγία για καθολικό έλεγχο σε εγκύους γυναίκες, (κολπικό και πρωκτικό δείγμα) για αποικισμό στην 35-37 εβδομάδα της εγκυμοσύνης (Verani JR, et al., 2010).

Δεν προτείνονται τα από του στόματος αντιβιοτικά επειδή η χρήση τους δεν φαίνεται να μειώνει τον αποικισμό της μητέρας αλλά ούτε και την μετάδοση στο νεογνό (Hall RT, et al., 1976; Gardner SE, 1979).

Η ισχύουσα οδηγία CDC του 2010 για την πρόληψη της λοίμωξης GBS στα νεογνά, προτείνει καθολικό έλεγχο την 35-37 εβδομάδα της κυήσεως και χρήση προληπτικής ενδοφλέβιας αντιμικροβιακής θεραπείας κατά τον τοκετό. Δυστυχώς, ακόμη κι αν έχει γίνει ο έλεγχος στην 35-37 εβδομάδα της κυήσεως, αυτό δεν σημαίνει ότι η κατάσταση αποικισμού μπορεί να ελεγχθεί πλήρως.

Σύμφωνα με μία μελέτη περισσότερες από 20% των γυναικών που είναι θετικές για GBS στην 37η εβδομάδα, είναι GBS αρνητικές κατά τον τοκετό (Szymusi KI, et al., 2014).

Επί πλέον, η συμμόρφωση των νοσοκομείων με την οδηγία, συγχέει την χορήγηση αντιβιοτικού κατά τον τοκετό, με λιγότερες τελικά από 65% των γυναικών να λαμβάνουν θεραπεία (Gilbert GL, et al., 2003).

Όταν χορηγείται σωστά η αντιμικροβιακή αγωγή, οδηγεί σε μείωση του αποικισμού του κόλπου κατά 47% δυό ώρες μετά από τη χορήγηση και 12% μετά απο τέσσερις ώρες (Scasso S, et al., 2015; Fairlie T, et al., 2013).

Τέσσερις ώρες χορήγηση αντιμικροβιακής ενδοφλέβιας αγωγής με ένα β-λακταμικό αντιβιοτικό φαίνεται ότι είναι εξαιρετικά αποτελεσματική για την πρόληψη της πρώιμης λοίμωξης στα νεογνά, ενώ υπάρχει ένδειξη πως ίσως μακρότερη σε ώρες αγωγή μπορεί να είναι αποτελεσματικότερη (Turrentine M. 2014).

Ένα άλλο πλεονέκτημα της ενδοφλέβιας αγωγής κατά τον τοκετό για τα νεογνά είναι ότι προλαμβάνεται ο αποικισμός τους, αλλά η εν συνεχεία μετάδοση από την μητέρα μήνες αργότερα είναι πιθανή (Berardi A, et al., 2013; Toyofuku M, et al., 2017).

Επιπλέον, η μητρική χλωρίδα, συμπεριλαμβανομένου και του στρεπτοκόκκου Β, δεν φαίνεται να αναπτύσσει επιλεκτική αντοχή στα αντιβιοτικά μετά την χορήγηση ενδοφλέβιας αγωγής κατά τον τοκετό (Spaetgens R, et al., 2002).

Η ενδοφλέβια κατά τον τοκετό αγωγή φαίνεται ότι μείωσε την πρώιμη λοίμωξη του GBS σε 1000 περιπτώσεις ετησίως στην Αμερική. Παρόλα αυτά, ο GBS παραμένει η κύρια αιτία πρώιμης νεογνικής σηψαιμίας στα τελειόμηνα νεογνά και η όψιμη φαίνεται να μην επηρεάζεται, αντίθετα ίσως και να αυξάνεται (Stoll BJ, etal., 2011; Weston EJ, et al., 2011; Bauserman MS, et al., 2013).

Το σώμα ενεργού επιτήρησης βακτηριακών λοιμώξεων του CDC υπολογίζει σήμερα, 28150 λοιμώξεις σε νεογνά και ενήλικες με 1865 θανάτους ετησίως (Report Nogbs 14, 2014, CDC).

Από την παγκόσμια εμπειρία και την πρόσφατη βιβλιογραφία φαίνεται πως η χορήγηση αντιμικροβιακής αγωγής παρουσιάζει «υπέρ και κατά».

Τα οφέλη αλλά και οι κίνδυνοι της αντιμικροβιακής αγωγής για τον αποικισμό της μητέρας και την πρόληψη της λοίμωξης από GBS συνοψίζονται στον Πίνακα 1.12.1. Ενώ στον Πίνακα 1.12.2 εμφαίνονται συνοπτικά τα σημεία που χρήζουν προσοχής όσον αφορά το αντιβιόγραμμα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.12.1

Οφέλη για τη μητέρα	• Μείωση του αποικισμού κατά 2-8% • Πρόληψη δημιουργία αντοχής στα επιλεγμένα αντιβιοτικά
Οφέλη για το νεογνό	• Τεράστια μείωση της πρώιμης λοίμωξης GBS (80% τουλάχιστον) • Μείωση του αποικισμού στην γέννηση
Πιθανά προβλήματα για την μητέρα	• Υψηλός κίνδυνος μυκητιασικής λοίμωξης • Υψηλός κίνδυνος διαταραχής της κολπικής χλωρίδας
Πιθανά προβλήματα για το νεογνό	• Υψηλός κίνδυνος μυκητιασικής λοίμωξης • Υψηλός κίνδυνος λοίμωξης Gram- (αρν.) • Υψηλός κίνδυνος μεταφοράς διαταραγμένης μητρικής χλωρίδας • Διαταραχή εντερικής χλωρίδας • Κίνδυνος εγκεφ παράλυσης • Πάχυνση του μέσου χιτώνα της αορτής

Οφέλη και πιθανά προβλήματα από την αντιμικροβιακή αγωγή για την πρόληψη λοίμωξης του Β αιμολυτικού στρεπτοκόκκου στο νεογνό.

(Patras K, and Nizet V., Front. In Ped. Vol 6, art 17, 2018)

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.12.2.

Οδηγίες Πρόληψης του CDC (2010) για την Ευαισθησία στα Αντιβιοτικά

Ο έλεγχος ευαισθησίας του στρεπτοκόκκου Β είναι κρίσιμος για την αντιβιοτική προφύλαξη διότι οι αλλεργικές στην πενικιλλίνη γυναίκες, θα πρέπει να καταφύγουν στην κλινδαμυκίνη, το πιο χρήσιμο αντιβιοτικό γι' αυτόν τον πληθυσμό, της οποίας η αντοχή αρχίζει να αυξάνεται κατά πολύ.

Επιπλέον πρέπει να χρησιμοποιούνται οι κατάλληλες μεθοδολογίες για το τεστ ευαισθησίας για την ανίχνευση επαγώγιμης αντοχής της κλινδαμυκίνης η οποία με το τέστ ευαισθησίας σε ζωμό δεν μπορεί να φανεί.

Συνοπτικά, το **D τέστ** χρησιμοποιείται για την ανίχνευση στελεχών με αντοχή στην ερυθρομυκίνη και ευαίσθητα στην κλινδαμυκίνη, με τις συνήθεις τεχνικές, το οποίο όμως αποκαλύπτει την επαγώγιμη αντοχή στην κλινδαμυκίνη. Στελέχη με το «D-zone» τεστ θετικό θεωρούνται ως έχοντα επαγώγιμη αντοχή και κατά συνέπεια ανθεκτικά στην κλινδαμυκίνη.

Τι συνιστά το CDC με την οδηγία 2010 πρόληψης για το τεστ ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.

https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5910a1.htm?s_cid=rr5910a1_w

1.13 ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΟΔΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΚΟΛΠΟΥ: η άλλη λύση?

Διάφορες στρατηγικές έχουν προταθεί για την πρόληψη του αποικισμού του κόλπου από το στρεπτόκοκκο Β. Μεταξύ αυτών, είναι η χρήση καθαρμένων ή συνθετικών φυσικών παραγώγων με δράση ειδικά στοχευμένη στον GBS.

Για διάφορους τέτοιους φυσικούς παράγοντες έχουν γίνει πειράματα *invitro* και δοκιμές in vivo σε πειραματικά μοντέλα. Πολλαπλά εκχυλίσματα

από φυτά έχουν χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθεί η αντιμικροβιακή δράση τους στο GBS (Abachi S, et al., 2016). Μία μελέτη χρησιμοποίησε φυτικά λιπίδια από την *Aristolochialonga* και *Bryoniadioïca* με καλές MIC απέναντι στο GBS *invitro* (Dhouioui M, et al., 2016), όπως το μικροβιοκτόνο octyl-glycerol με τοπική δράση στον κόλπο (Moncla BJ, et al., 2008). Βακτηριοστατικά συνθετικά πολυμερή μπορεί επίσης να αποτελέσουν ένα καλό φραγμό για να εμποδίσουν επιλεκτικά την προσκόλληση του GBS στο επιθήλιο του κόλπου, επιτρέποντας ταυτόχρονα στους λακτοβακίλλους να επιβιώνουν (Ardolino LI, et al., 2016).

Πρόσφατα παρήχθη ένα συνθετικό πεπτίδιο που προσομοιάζει στο ανθρώπινο κλάσμα C5a με βακτηριοκτόνο δράση στο GBS και με επιπλέον, θεραπευτική δράση *in vivo* activity σε περιτονίτιδα και σε κολπικό αποικισμό σε πειραματικό μοντέλο ποντικού (Cavaco CK, et al., 2013). Αυτή η λύση, αν και πολλά υποσχόμενη είναι ακόμη μακριά από τις κλινικές μελέτες και την οικονομική ανάλυση για την χρήση στον άνθρωπο. Η χλωρεξιδρίνη που χρησιμοποιείται ως αντισηπτικό του κόλπου, δεν φαίνεται να μειώνει τα ποσοστά πρώιμης λοίμωξης από στρεπτόκοκκο Β (Ohlsson A et al., 2014). Άλλη στρατηγική αποτελεί η χρήση των προβιοτικών (Falagas M et al., 2007; Homayouni A, et al., 2014). Σήμερα τα πιο υποσχόμενα προβιοτικά-υποψήφια για τη ρύθμιση της χλωρίδας του κόλπου, και μάλιστα με μείωση της φορείας GBS είναι μέλη του γένους *Lactobacillus*. Σύμφωνα με πολλές μελέτες η κατασταλτική ικανοτητα των λακτοβακίλλων στο GBS *invitro περιλαμβάνουν το Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, and *Lactobacillus fermentum* (De Gregorio PR, etal., 2014; Acikgoz ZC, et al., 2005; Bodaszewska M et al., 2010; Bodaszewska M et al., 2012; Bodaszewska-Lubas M, et al., 2012; Juarez Tomas MS, et al., 2011), με πιο σημαντικό υποψήφιο τον *L reuteri*, (De Gregorio PR, et al., 2014; De Gregorio PR, et al., 2015).

1.14 β-ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΟΣ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΣ ΟΜΆΔΑΣ Β ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Λίγες μελέτες υπάρχουν σχετικά με τον επιπολασμό του στρεπτοκόκκου Β στη φορεία του κόλπου, εγκύων και μη εγκύων γυναικών στην Ελλάδα, όπως επίσης και στην πρώιμη νεογνική λοίμωξη. Τα αποτελέσματα αυτών των

μελετών είναι συγκρουόμενα. Σύμφωνα με μία σχετικά πρόσφατη μελέτη (Daskalakis et al., 2006) ενώ η βακτηριακή κολπίτιδα φαίνεται να συνδέεται με πρόωρο τοκετό το ίδιο δε συμβαίνει με το στρεπτόκοκκο Β.

Σε μία πολυκεντρική μελέτη που περιλάμβανε 171 στελέχη στρεπτοκόκκου Β από εγκύους μεταξύ του 2007 και 2010 και 46 νεογνά με διεισδυτική νόσο, ο γενετικός προσδιορισμός και ο έλεγχος αντοχής σε αντιβιοτικά έδειξαν τα εξής: Υψηλά ποσοστά αντοχής στην ερυθρομυκίνη παρατηρήθηκαν στις εγκύους (20.47%). Ο γονότυπος ST1 ήταν ο πιο συχνός ως προς τον αποικισμό του κόλπου, ενώ ο πολύ υψηλής λοιμογονικότητας κλώνος ST-17 ταυτοποιήθηκε σε ποσοστό 67.39% των νεογνών με διεισδυτική νόσο (Liakopoulos A et al., 2014).

Σε μία άλλη μελέτη σε μη εγκύους γυναίκες φαίνεται πως η απομόνωση του μικροοργανισμού στον κόλπο είναι πιο συχνή από ότι αναφέρεται, αλλά η μελέτη επικεντρώνεται κυρίως στο ότι ο στρεπτόκοκκος Β μπορεί να αποτελεί κύριο παθογόνο του ουροποιητικού συστήματος (Falagas ME, et al., 2006).

Τέλος, σε μία μελέτη των χαρακτηριστικών της φορείας σε εγκύους γυναίκες στην Ελλάδα (Tsolia M, etal., 2003) αναφέρεται πως η συχνότητα φορείας σε εγκύους και τα νεογνά τους, ήταν 6.6% και 2.4%, αντίστοιχα και πως η κάθετη μετάδοση ήταν 22.5%. Τα συμπεράσματα αυτής της μελέτης προτείνουν πιο εκτεταμένο και συστηματικό έλεγχο σε όλες τις χώρες και πληθυσμούς. Επίσης αναφέρεται πως οι πιο συχνοί ορότυποι, ήταν ο II (26.9%), III (22.4%), Ia (19%), Ib (12%), και V (9%). Αναφέρεται επίσης πως η αντοχή στην ερυθρομυκίνη ήταν (4.5%), στην κλινδαμυκίνη (6%), και (6%) και στις δύο ταυτόχρονα.

Ωστόσο δεν υπάρχει πιο πρόσφατη μελέτη που να αναφέρεται στα σημερινά ποσοστά φορείας και τις αντοχές στα αντιβιοτικά που προτείνονται για χημειοπροφύλαξη κατά την κύηση από τις διεθνείς οδηγίες.

Στόχος της διατριβής αυτής ήταν η διερεύνηση της φορείας του κόλπου σε γυναίκες, έγκυες και μη, των αντοχών στα κατάλληλα για την κύηση αντιβιοτικά και η ανίχνευση γονιδίων λοιμογόνων παραγόντων σημαντικών στην προσκόλληση και εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα καθώς και την νεογνική νόσο.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. 1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης ήταν:

- Να διερευνηθεί η συχνότητα απομόνωσης στρεπτοκόππου Β σε έγκυες και μη γυναίκες σε κατά τη διάρκεια ενός έτους, δηλ., από 1/1/2016-01-01/2017
- Η μελέτη αντοχής σε αντιβιοτικά σε έναν αριθμό τυχαίων στελεχών που απομονώθηκαν σε διάστημα έξι μηνών, που χρησιμοποιούνται στην κύηση ειδικά για την χημειοπροφύλαξη του Β στρεπτοκόκκουπενικιλλίνη, αμπικιλλίνη, κλινδακυκίνηκαι βανκομυκίνη, και επί πλέον στην ερυθρομυκίνη και στην σιπροφλιξασίνη.
- Ο επιπολασμός παθογόνων στοιχείων, δηλαδή πρωτεινών επιφάνειας με μοριακή ανάλυση ***alp2/3, Rib1, AlphaC, epsilon, bac***
- Η συσχέτιση των γονιδίων πρωτεινών επιφάνειας με τις αντοχές σε αντιβιοτικά
- Στατιστική ανάλυση με το μη παραμετρικό τεστ χ^2 για να εξεταστεί αν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταβλητών (κύηση και μη κύηση).
- Μελέτη ενημέρωσης και ευαισθητοποίησης μαιευτήρων γυναικολόγων και βιοπαθολόγων σχετικά με τις οδηγίες πρόληψης της πρώιμης νεογνικής νόσου από στρεπτόκοκκο Β.

2.2. ΛΗΨΗ, ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΒΙΟΓΡΑΜΜΑ

Διάγνωση-Δειγματοληψία

- Περιγεννητικός έλεγχος φορείας (την 35η-37η εβδομάδα κύησης): καλλιέργεια με χρήση κολπικών ή και ορθικών

δειγμάτων, Τα εκλεκτικά υλικά επιτρέπουν την απομόνωση και ταυτοποίηση σε χρόνο 24-48 ωρών.

- Νεογνά: Αιμοκαλλιέργεια, εξέταση και καλλιέργεια ΕΝΥ, συλλογή διάφορων δειγμάτων (φαρυγγικό, ωτικό, γαστρική αναρρόφηση)

ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΥ Β

ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η λήψη και καλλιέργεια πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του CDC του 2010. Η λήψη του κολπικού γίνεται στα δύο τρίτα του κόλπου με το συνηθισμένο στυλεό. Εν συνεχεία, με άλλο στυλεό ή άλλη λήψη από το ορθό: δεν πρέπει να γίνεται εξωτερικά αλλά σε 4-5 εκατοστά διότι ο β στρεπτόκοκκος αποτελεί μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου. Το δείγμα θα μπεί σε υλικό μεταφοράς, όπως οι κοινές καλλιέργειες και θα σταλεί στο εργαστήριο. Σημασία έχει να είναι **δύο στυλεοί από το γεννητικό και από το γαστρεντερικό** (πρωκτικό δείγμα, στα 4 εκατοστά είσοδος του στυλεού) αντίστοιχα σε υλικό μεταφοράς (Stuart's).

Μόλις το δείγμα φτάσει στο εργαστήριο γίνεται καλλιέργεια από το στυλεό σε εκλεκτικό ή εμπλουτιστικό υλικό για Β στρεπτόκοκκο, δηλαδή σε αιματούχο τρυβλίο, χρωμογόνο άγαρ και θρεπτικό ζωμό Todd-Hewitt.

Μετά από επώαση στους 35-37 ^{o}C για 24 ώρες, στο αιματούχο θα αναγνωρίσουμε τις αιμολυτικές αποικίες του στρεπτοκόκκου (Β αιμόλυση, ή πλήρης αιμόλυση), στο χρωμογόνο θα αναγνωρίσουμε αποικίες σύμφωνα με το χρώμα (Εικόνα 2.2.1) ενώ από το ζωμό θα γίνει ανακαλλιέργεια σε τρυβλίο εκ νέου. Αν δεν υπάρχει ανάπτυξη στο ζωμό, αυτός επωάζεται 24 ώρες και εν συνεχεία γίνεται ανακαλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υλικό (συνήθως χρωμογόνο άγαρ ή αιματούχο).

Εικόνα 2.2.1

Ανάπτυξη β-αιμολυτικού στρεπτοκόκκου της ομάδας Β σε χρωμογόνο άγαρ

Στο αιματούχο τρυβίο ανιχνεύεται η μορφολογία των αποικιών και η αιμόλυση.

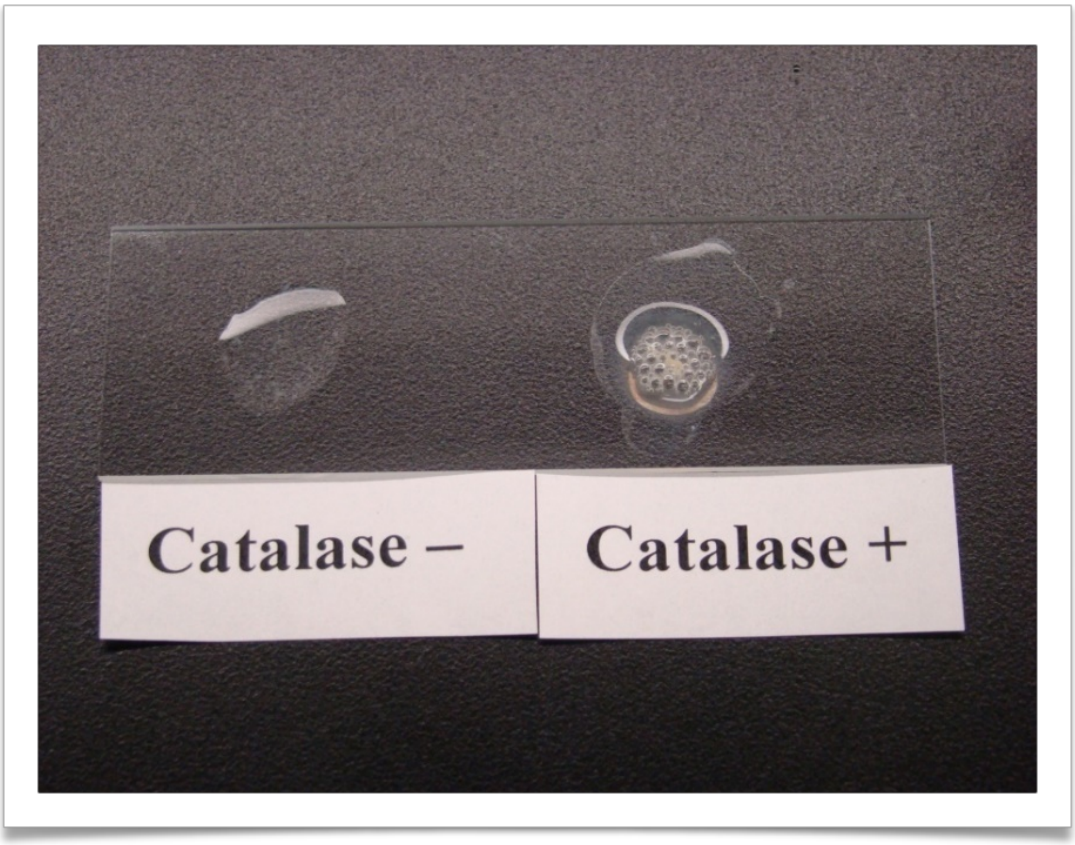
Εικόνα 2.2.2

Αριστερά ανάπτυξη του GBS και β αιμόλυση. Δεξιά στρεπτόκοκκος Α και β αιμόλυση (πιο έντονη).

Η δοκιμασία καταλάσης πραγματοποιείται για το διαχωρισμό των Gram + κόκκων σε καταλάση + και καταλάση – σύμφωνα με την ύπαρξη του ενζύμου. Γίνεται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και η αντίδραση είναι άμεση.

Τοποθετείται μία σταγόνα H_2O_2 3% στην αντικειμενοφόρο πλάκα, και με στυλεό μιας χρήσης μία αποικία του ύποπτου μικροοργανισμού αναμειγνύεται μέσα σε αυτήν. Αν παραχθούν φυσαλίδες ο μικροοργανισμός είναι καταλάση + (Θετ.). **Ο στρεπτόκοκκος Β είναι καταλάση – (Αρν.).**

Εικόνα 2.2.3



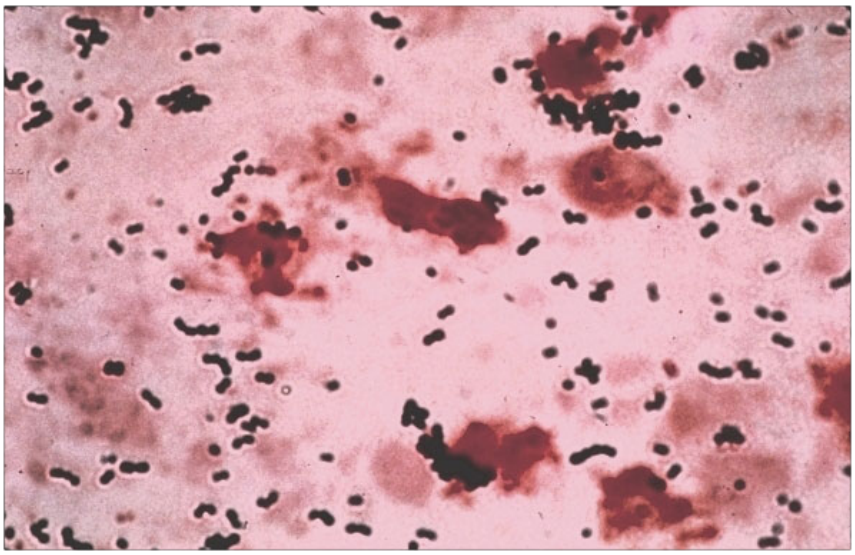
Η δοκιμασία της καταλάσης

Χρώση Gram

Ο μικροοργανισμός είναι θετικός κατά Gram. Μετά την καλλιέργεια μία μικρή αποικία μεταφέρεται σε 100 μικρόλιτρα περίπου φυσιολογικό ορό επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, μονιμοποιείται στην φλόγα και βάφεται με την χρώση Gram**.**

Στο μικροσκόπιο, Χ100 τα κύτταρα φαίνονται βαμμένα μπλέ-βιολετί και διατάσσονται σε αλυσίδες.

Εικόνα 2.2.4

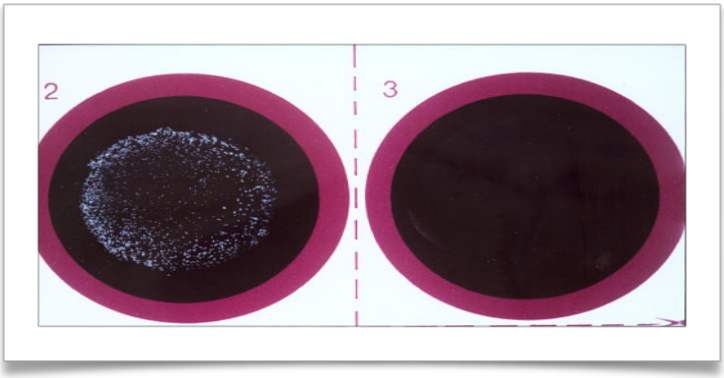


Στρεπτόκοκκος Β στη χρώση Gram

Τυποποίηση κατά Lancefield

Οι στρεπτόκοκκοι τυποποιούνται βάσει του πολυσακχαριδικού αντιγόνου σε ομάδες από Α έως V. Η τεχνική στηρίζεται στην απελευθέρωση του αντιγόνου μετά απο επώαση μιας αποικίας σε αλκαλικό περιβάλλον στους 37 ^{o}C για 5 λεπτά (200 μl). Εν συνεχεία σε χαρτονένια πλάκα με μαύρο φόντο για καλύτερη οπτικοποίηση της κροκίδωσης μία σταγόνα από το ανωτέρω αναμειγνύεται με αντιορό (αντίστοιχα). Η αντίδραση είναι άμεση.

Εικόνα 2.2.5



Η δοκιμασία ταυτοποίησης κατά Lancefield.

2.3 Τεστ ευαισθησίας σε αντιβιοτικά (κατά CLSI, 2013)

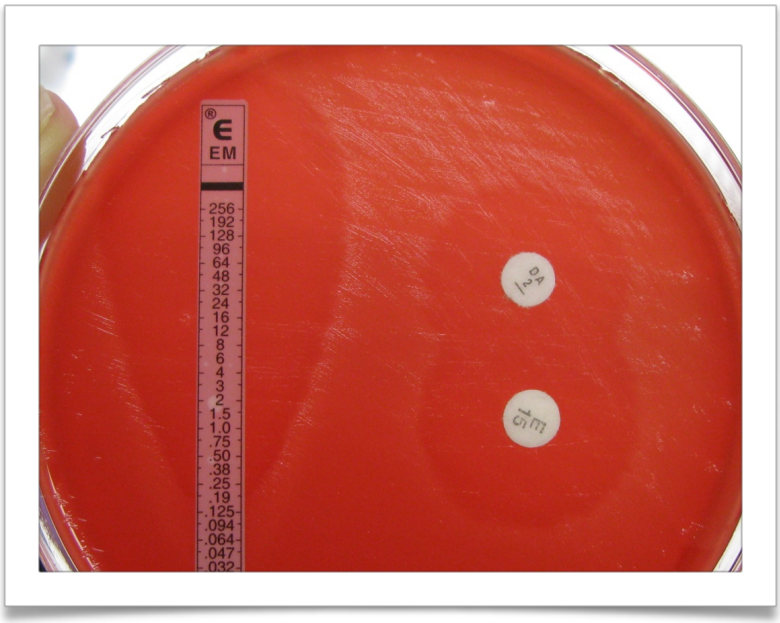
Ο έλεγχος ευαισθησίας γίνεται στα συνήθη αντιβιοτικά του στρεπτοκόκκου:

A. Τέστ Kirby Bauer, και

B. E test.

Από το στερεό θρεπτικό υλικό λαμβάνονται μερικές αποικίες σε θρεπτικό ζωμό μέχρι θολερότητας 0,5 McFarland (μέτρηση στο ειδικό στο θολοσίμετρο). Εν συνεχεία εμβαπτίζεται βαμβακοφόρος στυλεός στο ζωμό και με ελαφρές κινήσεις απλώνεται σε πυκνές γραμμές στο αιματούχο τρυβλίο. Αφού στεγνώσει, με την «σφραγίδα» (διανεμητής, dispenser) τοποθετούνται οι δίσκοι των αντιβιοτικών.

Για το Ε τεστ ο ενοφθαλμισμός γίνεται με τον ίδιο τρόπο, αλλά εν συνεχεία αντί δίσκων αντιβιοτικών τοποθετείται χάρτινο στρίπ με διαβάθμιση αντιβιοτικού.

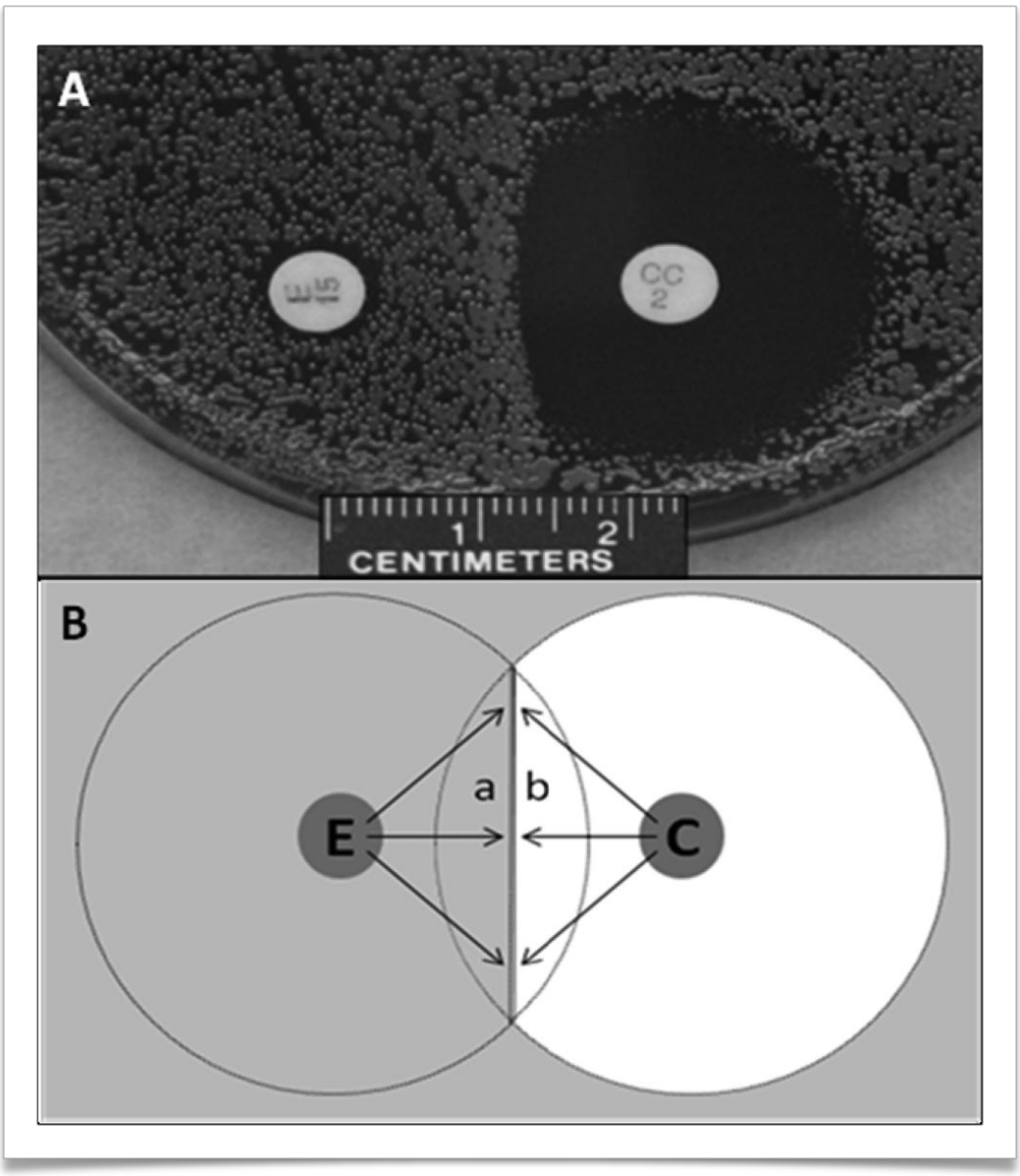


Εικόνα 2.3.1

Αριστερά Ε τεστ, δεξιά Kirby-bauer.

Εικόνα 2.3.2

D test



Ερμηνεία D test.

Μερικές αποικίες στρεπτοκόκκου Β από πρόσφατη καλλιέργεια χρησιμοποιούνται για να γίνει το μικροβιακό εναιώρημα. Εν συνεχεία στρώνεται με βαμβακοφόρο στυλεό το τρυβλίο με το MullerHinton +5% αίμα προβάτου. Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν:

- Πενικιλλίνη,
- Αμπικιλλίνη,

- Ερυθρομυκίνη.
- Κλινδαμυκίνη,
- Σιπροφλιξασίνη.

Κατά τη διαδικασία του D test οι δίσκοι ερυθρομυκίνης (15 ug)-κλινδαμυκίνης (2ug) τοποθετούνται σε απόσταση 12-15 mm δηλ. από την άκρη του κάθε δίσκου, λιγότερο δηλ., από όταν πρόκειται για τους σταφυλοκόκκους (15-20mm). Η επώαση γίνεται στους 37° C για 18+24 ώρες. Εν συνεχεία γίνεται η ανάγνωση

Το τέστ είναι θετικό αν δημιουργηθεί μείωση της ζώνης αναστολής ως D ανάμεσα στο δίσκο ερυθρομυκίνης κλινδαμυκίνης (**Εικόνα 2.3.2**). (*(Woods,Cretal., 2009)*

Ερμηνεία του D test

Τύπος αντοχής	***Φαινότυπος***	***14- ή 15 -μερείς μακρολίδες***	
		Erythromycin	[1]*Clindamycin*
Χρωμοσωμικής αιτιολογίας (γονίδιο erm)	[2]***MLS$_B$***	*R*	*R*
Επαγώγιμη αντοχή (γονίδιο erm)	***MLS$_B$***	*R, I*	*R, I, S**
D- test θετικό, R=αντοχή, I= ενδιάμεσης ευαισθησίας, S=ευαισθησία,			
[1] Η κλινδαμυκίνη (clindamycin) είναι μια ημισυνθετική πυρανοζαμίδη και λινκοζαμίδη. Η κλινδαμυκίνη δημιουργεί δεσμό με την υποομάδα 50S του βακτηριακού ριβοσώματος και αναστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση.			
[2] Φαινότυπος αντοχής μακρολίδες-λινκοζαμίνες-στρεπετογκραμίνες			

2.4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΛΟΙΜΟΓΟΝΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ

2.4.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Εξοπλισμός:

1. ΦυγόκεντροςThermoScientificSL16R Centrifuge
2. Αυτόματες πιπέτες Gilson ρυθμιζόμενου όγκου 100-1000μL, 10-200μL, 10-20μL και 0,1-10μL και τα αντίστοιχα tips τους
3. Eppendorf tubes (σωλήνες συλλογής) των 1,5mL
4. Στατώ για την τοποθέτηση και τους χειρισμούς των σωλήνων συλλογής δειγμάτων
5. Ψυγείο βαθιάς κατάψυξης (-20^{0}C)
6. Θερμική πλάκα επώασης δειγμάτων (thermoblock)
7. Vortex mixerV-1 plus για την καλύτερη ανάμιξη των συστατικών των δειγμάτων
8. Εργαστηριακός αναλυτικός ζυγός KERN 440-

2.4.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

Αντιδραστήρια:

1. PureLink™Genomic Digestion Buffer
2. PureLink™Genomic Lysis Buffer
3. PureLink™Genomic Binding Buffer
4. Πρωτεϊνάση K (Proteinase K)
5. 96-100% Αιθανόλη
6. PureLink™Genomic Wash buffer 1

7. PureLink™Genomic Wash buffer 2
8. PureLink™Genomic Elution buffer
9. Λυσοζύμη 20mg/ml (Sigma-Aldrich, Athens, Greece).

Εικόνα 2.4.1

Εμπορικό κιτ απομόνωσης DNA (PureLink® Genomic DNA Mini Kit της InvitrogenTM)

Η αρχή της μεθόδου απομόνωσης DNA στηρίζεται στη χρησιμοποίηση ειδικών στηλών που είναι πακεταρισμένες με silica (SiO_2) και οι οποίες δεσμεύουν εκλεκτικά τα νουκλεϊκά οξέα ενώ συγχρόνως είναι διαπερατές από πρωτεΐνες και δισθενή κατιόντα που μπορεί να δράσουν σαν αναστολείς της DNA πολυμεράσης κατά την αντίδραση της PCR. Η δέσμευση αυτή αναστρέφεται παρουσία ελαφρά αλκαλικού διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος προκαλώντας έτσι την έκλουση του DNA από τη μεμβράνη. Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης πειραματικής μελέτης, η απομόνωση των στελεχών *S. agalactiae* διεξήχθη με το κιτ PureLink® Genomic DNA Mini Kit της InvitrogenTM

Πρέπει ωστόσο να τονισθεί πως οι πειραματικές πορείες που θα περιγραφούν αναλυτικά παρακάτω διεξήχθησαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα

και τις οδηγίες του κατασκευαστή των αντιδραστηρίων, αλλά πάντα με κάποιες μικρές παραλλαγές που ανταποκρίνονται στις συνθήκες και τις δυνατότητες που προσφέρει το εργαστήριο με σκοπό τη διευκόλυνση των χειρισμών και τον πειραματισμό στις ποσότητες των αντιδραστηρίων για την ενίσχυση του βαθμού απόδοσης του συστήματος και τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων.

Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA

I. Συλλογή βακτηριακών κυττάρων.

Μετά από O/N καλλιέργεια σε θειογλυκολικό θρεπτικό ζωμό, ελήφθησαν 300 ul και αφού φυγοκεντρήθηκαν σε 12,000 g για 10 λεπτά έγινε απόχυση του υπερκείμενου. Εν συνεχεία:

II. Διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης για απελευθέρωση του DNA και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών:

- Απόρριψη υπερκείμενου και προσθήκη 100μL διαλύματος λυσοζύμης 20mg/ml (Sigma-Aldrich, Athens, Greece). Η λυσοζύμη βοηθάει στην επιτυχή λύση του κυτταρικού τοιχώματος των Gram θετικών βακτηρίων. Η πεπτιδογλυκάνη που αποτελεί το κύριο συστατικό των Gram θετικών βακτηρίων είναι ένα μεγάλο και συμπαγές μόριο όπου συμπλέκονται εναλλάξ τα μόρια δύο αμινοσακχάρων, του N-ακετυλ-μουραμικού οξέος και της N-ακετυλ-γλυκοσαμίνης με πεπτιδικούς δεσμούς. Η λυσοζύμη υδρολύει το γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ του C-1 του N-ακετυλ-μουραμικού οξέος και του C-4 της N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης, με αποτέλεσμα να βοηθάει στην περαιτέρω λύση του κυτταρικού τοιχώματος (Mathews CK et al., 2000).
- Καλή ανάδευση.
- Επώαση για 1h στους 37°C σε θερμαντική πλάκα.
- Προσθήκη 200Ml Digestion buffer και 200μL Lysis buffer που αποτελούν διαλύματα με υψηλή συγκέντρωση χαοτροπικών αλάτων για την πέψη των πρωτεϊνών και λύση της κυτταρικής μεμβράνης

- Προσθήκη 20μL Proteinase K που δρα ως πρωτεολυτικό ένζυμο και επιτυγχάνει την υδρόλυση των πρωτεϊνικών μορίων
- Έντονη ανάδευση για 2-3 min στο vortex για βελτιστοποίηση της διάλυσης των συστατικών του δείγματος και τοποθέτησή του σε θερμαντική πλάκα στους 55^{0}C για περίπου 24h (overnight)

I. Ρύθμιση της σύνδεσης και κατακρήμνισης του DNA

- Φυγοκέντριση για 5min στις 12000 Xg (στροφές) για να επιτευχθεί η λήψη kai h metaphor;a του υπερκείμενου υγρού, το οποίο περιέχει το συνολικό DNA (μαζί με πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες) σε καινούριο eppendorf tube.
- Προσθήκη200μL 96-100% αιθανόλης και ήπια ανάδευση με στόχο την παρατήρηση της κατακρήμνισης (precipitation) του DNA.

II. Δέσμευση του DNA

- Ποσοτική μεταφορά του κάθε δείγματος με τη βοήθεια πιπέττας από το eppendorf στη στήλη του εμπορικού κιτ απομόνωσης, η οποία είναι τοποθετημένη σε σωλήνα συλλογής και διαθέτει μέγιστη χωρητικότητα 640μL
- Φυγοκέντριση για 1min στις 10000 xg(στροφές)
- Απόχυση του περιεχομένου του σωλήνα συλλογής (tube) και τοποθέτηση του ξανά στη στήλη (εάν το δείγμα είναι παραπάνω από 640μL τότε επαναλαμβάνονται όλα τα προαναφερθέντα βήματα μέχρι να μεταφερθεί ποσοτικά όλο το δείγμα στη στήλη μεγιστοποιώντας έτσι την τελική ποσότητα και απόδοσή του)

III. Έκπλυση και στέγνωμα της μεμβράνης με σκοπό τον καθαρισμό του DNA

- Κατά την πρώτη έκπλυση, απαιτείται πρωτίστως η παρασκευή του αντιδραστηρίου washbuffer 1 που περιέχει υδροχλωριομένη γουανιδίνη, με προσθήκη 15mL αιθανόλης 96-100% EOH και στη συνέχεια προσθήκη

500μL του έτοιμου πλέον αντιδραστηρίου με μια πιπέτα στη χρησιμοποιούμενη στήλη και φυγοκέντριση για 1min στις 10000 xg (στροφές) για το στέγνωμά της. Ύστερα, γίνεται απόχυση του περιεχομένου του σωλήνα συλλογής κι επανατοποθέτησή του στη στήλη απομόνωσης DNA. Κατά τη δεύτερη έκπλυση, απαιτείται προσθήκη 500μLwashingbuffer 2 (πριν την εφαρμογή του πρέπει να προστεθούν 17,5mL 96-100% αιθανόλης με μια πιπέτα στη στήλη και φυγοκέντριση για 3min στις 10000 xg (στροφές). Τέλος, πραγματοποιείται απόχυση του περιεχομένου και προσθήκη νέου σωλήνα συλλογής κάτω από τη χρησιμοποιούμενη στήλη

IV. Έκλουση και ανάκτηση του DNA

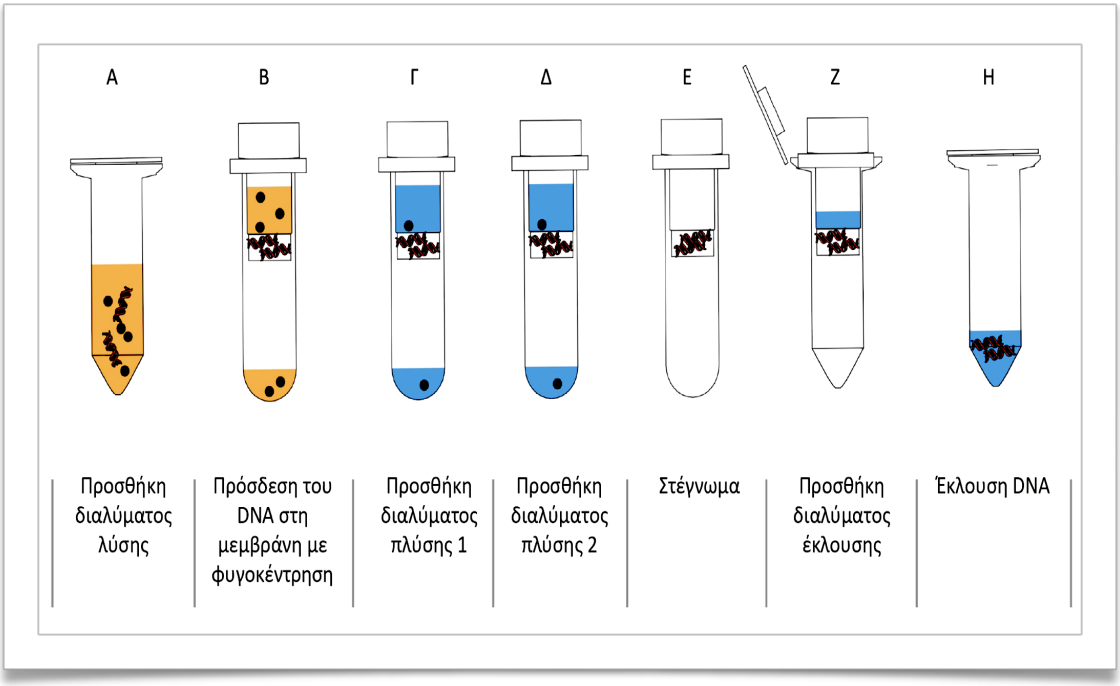
- Προσθήκη με τη χρήση μιας πιπέτας στο κέντρο της στήλης 50μLElutionbuffer, το οποίο περιέχει 10 mMTris-HCl, 0.1 mM EDTA σε pH 9.0 για έκλουση κι αποδέσμευση του DNA από τη στήλη (x2)
- Επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-25^{0}C) για 2-3min (x2)
- Φυγοκέντριση για 2-3min στις 10000 xg (στροφές) (x2)
- Απόχυση του υγρού από το tube, επανατοποθέτησή του στη στήλη και επανάληψη για άλλη μια φορά των παραπάνω βημάτων με την προσθήκη άλλων 50μL Elutionbuffer στοχεύοντας στη λήψη συνολικά 100μLDNA
- Προσεκτική μεταφορά των 100μLDNA που έχουν τελικώς ανακτηθεί σε ένα καινούριο eppendorftube για τη συλλογή του και γρήγορη αποθήκευσή του σε ψυγείο κατάψυξης (-4^{0}C).
- Φωτομέτρηση των δειγμάτων για την επιβεβαίωση της παρουσίας και της ποιότητας του απομονωμένου DNA προσδιορίζοντας την καθαρότητα και τη συγκέντρωσή του

Φωτομέτρηση DNA

- Η μέτρηση του DNA πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά μέσω της μέτρησης της απορρόφησης του υπεριώδους φωτός από τις

βάσεις των πυρηνικών οξέων. Η ένδειξη στα 260nm επιτρέπει τον υπολογισμό της ποσότητας του DNA ή του RNA. Η απορρόφηση στα 260nm (OD)=1 αντιστοιχεί με 50μg/ml δίκλωνου DNA. Λαμβάνεται ακόμα μια ένδειξη στα 280nm. Ο λόγος OD_{260} / OD_{280} παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της καθαρότητας του DNA. Εάν ο λόγος OD_{260} / OD_{280} είναι 1.8 τότε το παρασκεύασμα θεωρείται καθαρό. Εάν ο λόγος OD_{260} / OD_{280} είναι 2 τότε το παρασκεύασμα θεωρείται ότι έχει προσμίξεις από RNA ενώ αν ο λόγος OD_{260} / OD_{280} είναι μικρότερος από 1.8 τότε θεωρείται ότι έχει προσμίξεις από πρωτεΐνες.

Εικόνα 2.4.2



Στάδια απομόνωσης γενωμικού DNA με στήλες SiO2

2.5 Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης PCR

Η πολλαπλή αντιγραφή ή ενίσχυση (amplification) του DNA έχει κεντρική θέση στις διάφορες μελέτες της Μοριακής Βιολογίας και της Γενετικής. Η πολλαπλή αντιγραφή του DNA *in vitro* επικεντρώνεται, στην επιδιωκόμενη αύξηση του

αριθμού των αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA. Για να επιτευχθεί αυτό απαιτείται:

- **μήτρα**, η οποία είναι η αλληλουχία-στόχος ή DNA-στόχος που πρέπει να ενισχυθεί ή να πολλαπλασιαστεί. Εξαιρετικά σημαντικό σημείο είναι η γνώση της αλληλουχίας του DNA-στόχου.
- **DNA πολυμεράση**, ένα ένζυμο που θα επιτελέσει τα επαναλαμβανόμενα βήματα πολλαπλασιασμού. Οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν τον πολυμερισμό των ελεύθερων 5΄ τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) μέσα στην αλυσίδα του DNA. Είναι ένζυμα γνωστά για τον ρόλο τους στην αντιγραφή του DNA, όπου η DNA-πολυμεράση «διαβάζει» την άθικτη αλυσίδα DNA, την οποία χρησιμοποιεί ως πρότυπο για την σύνθεση νέας αλυσίδας DNA. Η δράση της πολυμεράσης ασκείται στο 3΄ άκρο της νέας αλυσίδας και η επιμήκυνση γίνεται στην κατεύθυνση 5΄- 3΄. Καμία από τις γνωστές πολυμεράσες δεν έχουν την δυνατότητα να δημιουργήσουν *de novo* DNA. Οι πολυμεράσες μπορούν να προσθέσουν νουκλεοτίδια μόνο σε προϋπάρχον 3΄- OH άκρο,με απαραίτητη την παρουσία αρχικών ολιγονουκλεοτιδίων.
- **Αλληλουχίες πολλαπλασιασμού ή εκκινητές** (***primers***) είναι ολιγονουκλεοτίδια που συνδέονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες πριν και μετά από το DNA-στόχο και λειτουργούν ως σημείο εκκίνησης της σύνθεσης των αντιγραφόμενων κλώνων του DNA. Για τον σχεδιασμό των εκκινητών λαμβάνονται υπ' όψιν κάποιοι κανόνες, ώστε να αποφεύγονται λάθη ή ενίσχυση μη επιθυμητών αλληλουχιών.
- **Νουκλεοτίδια** (**dNTPs**), πρόκειται για ελεύθερα 5΄ τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια, (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), τα οποία είναι απαραίτητα για την σύνθεση νέων κλώνων από την DNA πολυμεράση. Η μέθοδος εξελίσσεται σε κύκλους αντιδράσεων, όπου σε κάθε κύκλο αντίδρασης, η ολοκλήρωση του προηγούμενου σταδίου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ικανοποιητική ολοκλήρωση του επομένου.

Ένας κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία στάδια:

α) Στάδιο αποδιάταξης (***denaturation***) του DNA, που λαμβάνει χώρα με θέρμανση
του μίγματος μέχρι περίπου στους 95^{0}C, για την αποδιάταξη του DNA-στόχου,

β) Στάδιο ανασύνδεσης ή υβριδισμού (***annealing***) των εκκινητών, όπου λαμβάνει χώρα αντίδραση υβριδισμού μεταξύ των εκκινητών και των συμπληρωματικών τμημάτων του DNA-στόχου. Κατά την διάρκεια του σταδίου ανασύνδεσης, το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 40^{0}C έως 70^{0}C, ανάλογα με το πρωτόκολλο. Στο στάδιο αυτό, ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'-άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του ενός κλώνου, ενώ ο άλλος εκκινητής υβριδοποιείται στο 3·-άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του άλλου κλώνου.

γ) Στάδιο επιμήκυνσης (**extension**) όπου λαμβάνει χώρα συνεχής επιμήκυνση των εκκινητών με προσθήκη των ελεύθερων 5·τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), συμπληρωματικών προς την αλληλουχία-στόχο. Η διαδικασία επιμήκυνσης επιτελείται από μία DNA πολυμεράση. Η συνήθης θερμοκρασία του σταδίου επιμήκυνσης είναι περίπου72^{0}C.

Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR, περιλαμβάνει 30-40 θερμικούς κύκλους. Κατά την διάρκεια των θερμικών κύκλων οι αντιδράσεις επέκτασης ενός εκκινητή καταλήγουν σε διαφορετικές αποστάσεις από την αρχή του κάθε εκκινητή, με αποτέλεσμα στα προϊόντα πολλαπλασιασμού να περιέχονται εκτός του DNA-στόχου και έλικες DNA με απροσδιόριστο μήκος (μη ειδικό προϊόν PCR).

Μετά τον δεύτερο κύκλο όμως έχουμε την συσσώρευση ενός ειδικού προϊόντος πολλαπλασιασμού, το οποίο περιλαμβάνει μόνο την αλληλουχία-στόχο. Πρόκειται για το προϊόν της PCR, το λεγόμενο ***amplicon***. Κάθε φορά που συμπληρώνεται ένας κύκλος, θεωρητικά διπλασιάζεται η αλληλουχία του DNA-στόχου, με αποτέλεσμα να έχουμε εκθετική αύξηση του ειδικού προϊόντος.

Επειδή η τεχνική PCR περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων βημάτων αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αυτοματοποίηση της όλης διαδικασίας της PCR, με την δημιουργία θερμικών κυκλοποιητών και δυνατότητα προγραμματισμού διαφόρων πρωτοκόλλων, έτσι ώστε μετά από προγραμματισμό των επιθυμητών θερμοκρασιών και χρόνων, η διαδικασία να

εκτελείται αυτόματα, χωρίς την παρέμβαση του χειριστή ή την ανάγκη προσθήκης αντιδραστηρίων.

Εξοπλισμός:

- Θερμοκυκλοποιητής Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- Πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου Gilson και τα αντίστοιχα tips
- Ειδικά eppedorf tubes των 0,2mL για τη συσκευή της PCR

Αντιδραστήρια:

1. GoTaq® Green Master Mix (Promega).
2. Αποστειρωμένο νερό DNase/ RNase Free
3. Εκκινητές Invitrogen (αναφέρονται στον πίνακα 2.5.1 παρακάτω)
4. Δείγματα απομονωμένου DNA

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μL ο οποίος περιέχει 15μL εκλουόμενου DNA και 35μL mastermix. Η σύνθεση του mastermix ήταν η εξής:

Πίνακας 2.5.1

Αντιδραστήρια	Τελικές συγκεντρώσεις
Master Mix	x 1
Εκκινητές 1-6	0,4μM

Παρασκευή του mix της PCR

Πίνακας 2.5.2

Holding Stage	95^{0}C για 10min διάρκειας 1 κύκλου
Στάδιο Αποδιάταξης (DenaturationStage)	94^{0}C για 60sec διάρκειας 40 κύκλων
Στάδιο Υβριδοποίησης των εκκινητών (PrimerAnnealingStage).	58^{0}C για 45sec διάρκειας 40 κύκλων
Στάδιο Επιμήκυνσης (ExtensionStage)	72^{0}C για 45sec διάρκειας 40 κύκλων

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ρύθμισης του θερμοκυκλοποιητή της PCR

Πίνακας 2.5.3

	Αλληλουχία εκκινητή (5′→3′)	Amplicon (bp)
Universal forward	TGATACTTCACAGACGAAACAACG	
Alpha-C	TACATGTGGTAGTCCATCTTCACC	395
Rib	CATACTGAGCTTTTAAATCAGGTGA	295
Epsilon.	CCAGATACATTTTTTACTAAAGCGG	200
Alp2/3	CACTCGGATTACTATAATATTTAGCAC	334
bac (forward)	CTATTTTTGATATTGACAATGCAA	652
Bac (reverse)	GTCGTTACTTCCTTGAGATGTAAC	652

Η κατεύθυνση και οι αλληλουχίες βάσεων των εκκινητών, και το μοριακό μέγεθος των προϊόντων

2.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

Εξοπλισμός:

1. Ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης ThermoScientific (μαζί με το εκμαγείο, την ειδική «χτένα» σχηματισμού θέσεων των δειγμάτων, τα ηλεκτρόδια από πλατίνα και το τροφοδοτικό παραγωγής ηλεκτρικής τάσης)
2. Αναλυτικός ζυγός εργαστηρίου
3. Αυτόματη πιπέτα χωρητικότητας 0,1-20μL και τα αντίστοιχα tips
4. Ογκομετρικοί σωλήνες των 500mL
5. Κωνικές φιάλες των 250mL
6. Φούρνος μικροκυμάτων για τη θέρμανση του διαλύματος αγαρόζης
7. Συσκευή με λάμπα υπεριώδους φωτός για την ανάλυση των αποτελεσμάτων

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

- Φόρτωση των δειγμάτων (amplicons) στα «πηγαδάκια» του gel αγαρόζης με τη χρήση αυτόματης πιπέτας ρυθμιζόμενου όγκου, όπου πρωτίστως τοποθετούνται τα αρνητικά δείγματα για την ανίχνευση πιθανής επιμόλυνσης ενώ στη συνήθως στη μέση φορτώνεται ο δείκτης μοριακού μεγέθους (Ladder)
- Σύνδεση της συσκευής με τη μονάδα τάσης της ηλεκτροφόρησης μέσω του τροφοδοτικού, σύμφωνα με την επιθυμητή πολικότητα, και εφαρμογή σταθερής τάσης 100V/cm
- Τερματισμός της ηλεκτροφόρησης με βάση την εκτίμηση της μεταφοράς των μορίων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης που διακρίνεται από τη μετακίνηση των χρωστικών του διαλύματος φόρτωσης
- Άμεση παρατήρηση των αποτελεσμάτων και φωτογράφισή τους σε συσκευή που περιέχει λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας(U.V).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την περίοδο 01/01/2016 - 01/01/2017 ελήφθησαν 5498 δείγματα κολπικού επιχρίσματος από γυναίκες ηλικίας 18 έως 61 ετών. Σε όλα τα δείγματα έγινε καλλιέργεια για απομόνωση στελεχών *S. agalactiae.* Από τα 5498 δείγματα τα 2882 (52,4%) προέρχονταν από έγκυες γυναίκες ενώ τα υπόλοιπα 2616 (47,6%) από μη έγκυες γυναίκες. Από τα 2882 που προέρχονταν από τις έγκυες γυναίκες βρέθηκαν 358 θετικά δείγματα *S. agalactiae* με ποσοστό θετικής φορείας 12,4%. Ενώ από το συνολικό αριθμό δειγμάτων που προέρχονταν από τις μη έγκυες γυναίκες βρέθηκαν 181 θετικά δείγματα *S. agalactiae* με ποσοστό θετικής φορείας 6,9%. Το ποσοστό φορείας ήταν 9,8% στο συνολικό πληθυσμό.

Κατά τη διάρκεια τεσσάρων μηνών (4) ελήφθησαν 130 κλινικά δείγματα. Δύο (2) δείγματα προέρχονταν από λόχεια και τα υπόλοιπα 128 απομονώθηκαν από καλλιέργεια κολπικού υγρού. Τα δύο στελέχη *S. agalactiae* που προέρχονταν από τα λόχεια ήταν θετικά μόνο στο γονίδιο *Alpha C*. Το αντιβιόγραμμα έδειξε ότι και τα δύο στελέχη ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά.

Από τα 128 στελέχη *S. agalactiae* που απομονώθηκαν από την καλλιέργεια κολπικού υγρού τα 86 (67,2%) προέρχονταν από τις έγκυες γυναίκες ενώ τα 42 (32,8%) από μη έγκυες.

Από τα 128 στελέχη *S. agalactiae* τα 32 (25%) είναι θετικά στο *Alp2/3*, τα 24 (18,8%) στο *Alpha C*, τα 48 (37,4%) στο *Rib* και τα 24 (18,8%) στο *Epsilon***.**

Από τα 128 στελέχη *S. agalactiae* μόνο τα 6 (4,7%) ήταν θετικά και στο *bac.* Από αυτά, δύο ήταν θετικά και στο *AlphaC*, δύο στο *Rib*, και δύο στο *Epsilon.*

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 3.1 από τα 86 στελέχη που προέρχονταν από τις έγκυες γυναίκες το 23,3%, 18,6%, 39,5%, και 18,6% ήταν θετικά στις *Alp2/3, AlphaC, Rib1 και Epsilon αντίστοιχα.* Θετικά στο *bac* ήταν μόνο το 7% των στελεχών που προέρχονταν από τις έγκυες γυναίκες.

Ενώ από τα 42 στελέχη που προέρχονταν από μη έγκυες γυναίκες το 28,7%, 19%, 16,3%, και 19% ήταν θετικά στα *Alp2/3, Alpha C, Rib και Epsilon αντίστοιχα.*

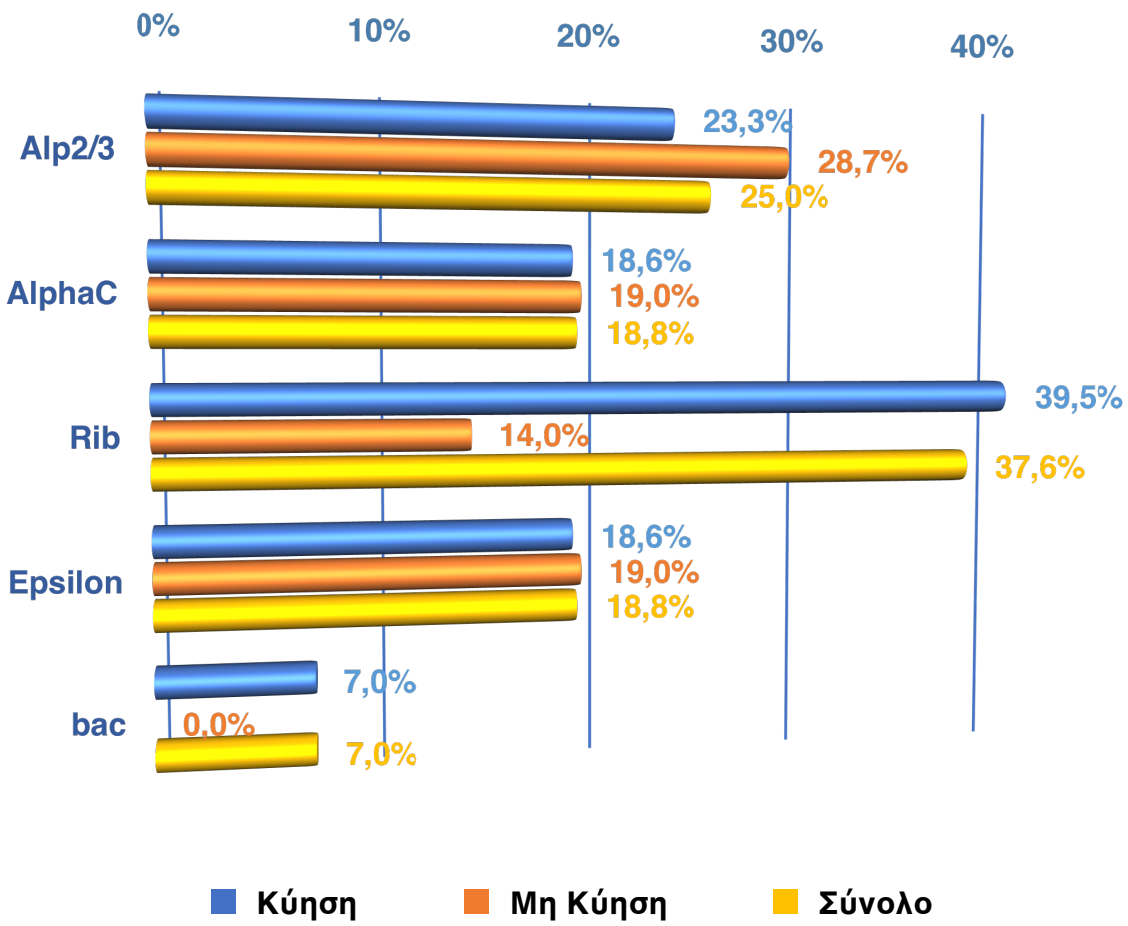
Κανένα από τα στελέχη που προέρχονταν από μη έγκυες γυναίκες δεν ήταν θετικά στο *bac.*

Πίνακας 3.1

ΣΤΕΛΕΧΗ	*Alp2/3*	*AlphaC*	*Rib1*	*Epsilon*	*bac*
ΚΥΗΣΗ (86)	20 (23,3%)	16 (18,6%)	34 (39,5%)	16 (18,6%)	6 (7%)
ΜΗ ΚΥΗΣΗ (42)	12 (28,7%)	8 (19%)	14 (16,3%)	8 (19%)	0 (0%)
ΣΥΝΟΛΟ	32 (25%)	24 (18,8%)	48 (37,4%)	24 (18,8%)	6 (4,7%)

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα συχνότητας απομόνωσης γονιδίων παθογένειας του S. Agalactiae σε έγκυες και μη έγκυες

Ραβδόγραμμα 3.1



Συγκεντρωτικά αποτελέσματα συχνότητας απομόνωσης γονιδίων παθογένειας του S. Agalactiae σε έγκυες και μη έγκυες.

Από τα 20 στελέχη που ήταν θετικά στο ***Alp2/3*** και προέρχονταν από τις έγκυες γυναίκες 6 (30%) ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά, 10 (50%) ήταν ανθεκτικά σε Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη, 2 (10%) ήταν ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη και 2 (10%) ήταν ανθεκτικά μόνο στην Ερυθρομυκίνη.

Από τα 12 στελέχη που ήταν θετικά στο ***Alp2/3*** και προέρχονταν από τις μη έγκυες γυναίκες τα 8 (66,7%) ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά, τα 2 (16,7%) ήταν ανθεκτικά σε Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη. Δύο (16,7%) στελέχη ήταν ανθεκτικά στη σιπροφλοξασίνη και στην ερυθρομυκίνη.

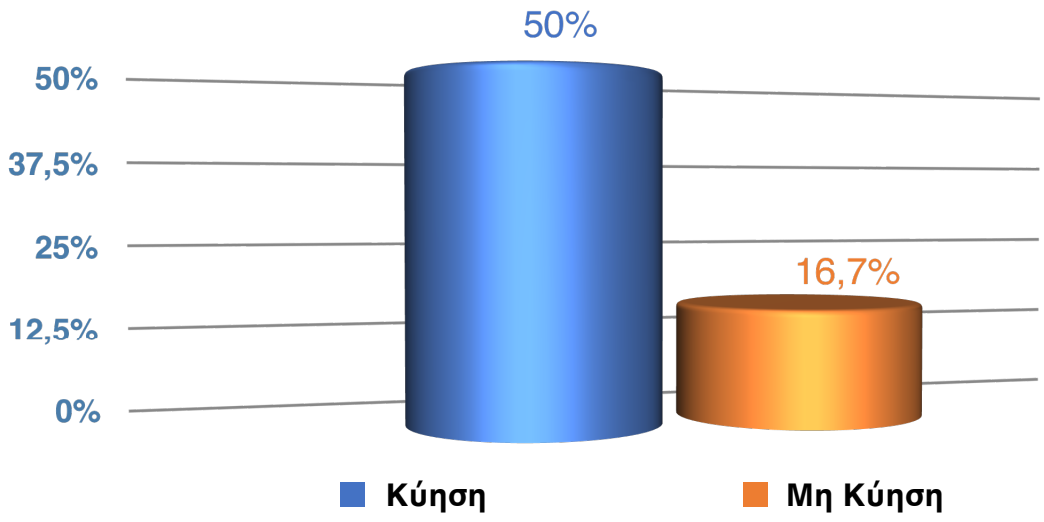
Στο σύνολο των στελεχών που ήταν θετικά στο ***Alp2/3*** τα 14 (43,8%) ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά και τα 12 (37,5%) ήταν ανθεκτικά σε Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη.

Η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε σε επίπεδο $p<0,05$. Από τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων βρέθηκε, ότι τα στελέχη που ήταν θετικά στο *Alp2/3 και προέρχονταν από έγκυες και μη έγκυες γυναίκες είχαν* οριακά *στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη αλλά και ως προς την ευαισθησία στα αντιβιοτικά* ($p=0,03$)

Πίνακας 3.2

Ποσοστά των στελεχών *S.agalactiae* με θετικό *Alp2/3* και αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και την Κλινδαμυκίνη	
ΣΤΕΛΕΧΗ (32)	***Alp2/3* Ανθεκτικά σε Ερυθρ. + Κλινδ.**
ΚΥΗΣΗ (20)	10 (50%)
ΜΗ ΚΥΗΣΗ (12)	2 (16,7%)
ΣΥΝΟΛΟ	12 (37,5%)

Ραβδόγραμμα 3.2



Ποσοστά των στελεχών S.agalactiae με θετικό Alp2/3 και αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και την Κλινδαμυκίνη

Από τα 16 στελέχη που ήταν θετικά στο AlphaC και προέρχονταν από τις έγκυες γυναίκες τα 12 (75%) ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά και τα 4 (25%) ήταν ανθεκτικά σε Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη.

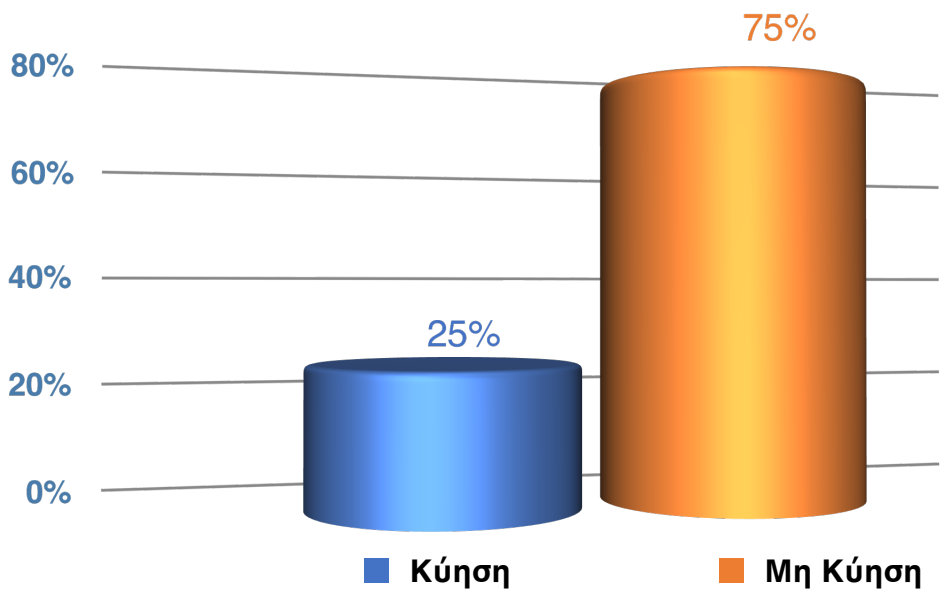
Από τα 8 στελέχη που ήταν θετικά στο **AlphaC** και προέρχονταν από τις μη έγκυες γυναίκες τα 2 (25%) ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά και τα 6 (75%) ήταν ανθεκτικά σε Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη. Από τα δύο (2) στελέχη που ήταν ευαίσθητα ένα (1) ήταν μειωμένης ευαισθησίας στην πενικιλλίνη.

Η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε σε επίπεδο $p<0,05$. Από τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων βρέθηκε, ότι τα στελέχη που ήταν θετικά στο **AlphaC** και προέρχονταν από έγκυες και μη έγκυες γυναίκες είχαν οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη αλλά και ως προς την ευαισθησία στα αντιβιοτικά ($p=0,02$).

Πίνακας 3.3

Ποσοστά των στελεχών *S.agalactiae* με θετικό *AlphaC* και αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και την Κλινδαμυκίνη	
ΣΤΕΛΕΧΗ (24)	***AlphaC* Ανθεκτικά σε Ερυθρ. + Κλινδ.**
ΚΥΗΣΗ (16)	4 (25%)
ΜΗ ΚΥΗΣΗ (8)	6 (75%)
ΣΥΝΟΛΟ	10 (41,7%)

Ραβδόγραμμα 3.3



Ποσοστά των στελεχών S.agalactiae με θετικό AlphaC και αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και την Κλινδαμυκίνη

Από τα 48 στελέχη που ήταν θετικά στο ***Rib*** και προέρχονταν από τις έγκυες γυναίκες τα 8 (23.5%) ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά, τα 24 (70.6%) ήταν ανθεκτικά σε Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη και 6 (17,6%) ήταν ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη. Από τα 6 στελέχη που ήταν ανθεκτικά στη Σιπροφλοξασίνη τα 4 ήταν και στην Ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη.

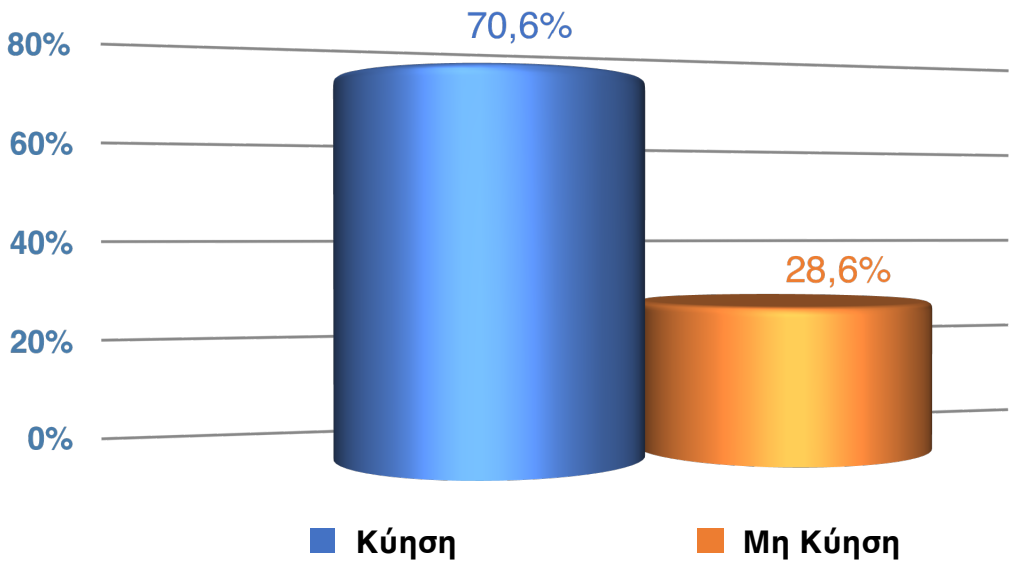
Από τα 48 στελέχη που ήταν θετικά στο ***Rib*** και προέρχονταν από τις μη έγκυες γυναίκες τα 10 (71,4%) ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά και τα 4 (28,6%) ήταν ανθεκτικά σε Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη.

Η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε σε επίπεδο $p<0,05$. Από τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων βρέθηκε, ότι τα στελέχη που ήταν θετικά στο ***Rib*** και προέρχονταν από έγκυες και μη έγκυες γυναίκες είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη αλλά και ως προς την ευαισθησία στα αντιβιοτικά ($p=0,002$).

Πίνακας 3.4

Ποσοστά των στελεχών *S.agalactiae* με θετικό *Rib* και αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και την Κλινδαμυκίνη	
ΣΤΕΛΕΧΗ (48)	***Rib* Ανθεκτικά σε Ερυθρ. + Κλινδ.**
ΚΥΗΣΗ (34)	24 (70,6%)
ΜΗ ΚΥΗΣΗ (14)	4 (28.6%)
ΣΥΝΟΛΟ	28 (58,3%)

Ραβδόγραμμα 3.4



Ποσοστά των στελεχών S.agalactiae με θετικό Rib και αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και την Κλινδαμυκίνη

Από τα 24 στελέχη που ήταν θετικά στο ***Epsilon*** και προέρχονταν από τις έγκυες γυναίκες τα 6 (37.5%) ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά, τα 6 (37.5%) ήταν ανθεκτικά σε Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη και 4 (25%) ήταν ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη.

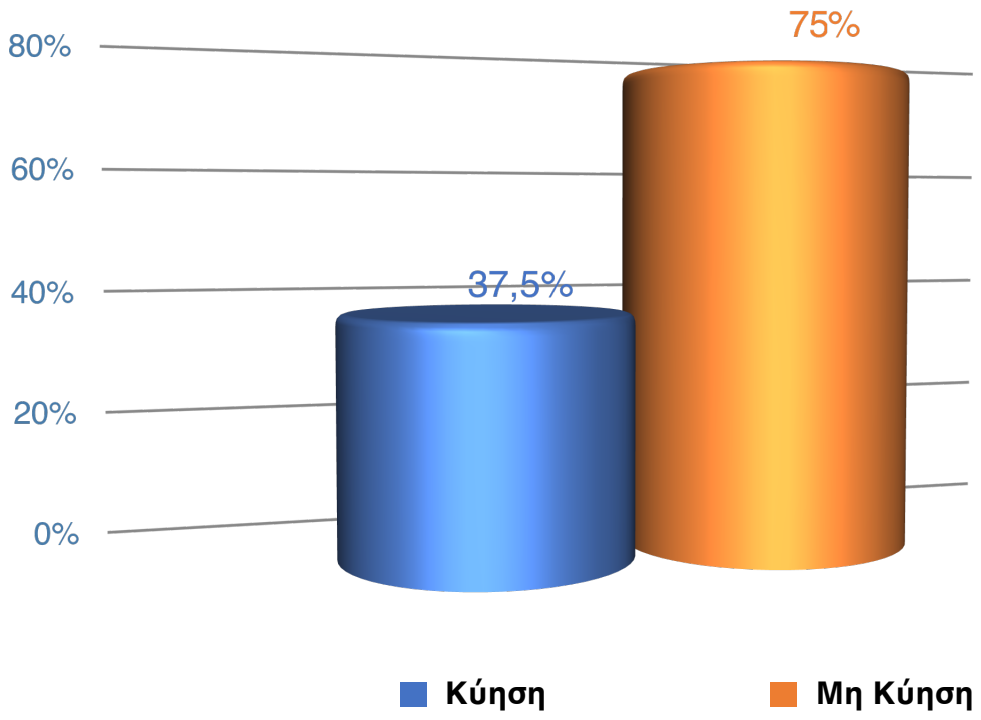
Από τα 24 στελέχη που ήταν θετικά στο ***Epsilon*** και προέρχονταν από τις μη έγκυες γυναίκες τα 2 (25%) ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά και τα 6 (75%) ήταν ανθεκτικά σε Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη.

Η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε σε επίπεδο $p<0,05$. Από τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων βρέθηκε, ότι τα στελέχη που ήταν θετικά στο ***Epsilon*** και προέρχονταν από έγκυες και μη έγκυες γυναίκες δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη αλλά και ως προς την ευαισθησία στα αντιβιοτικά ($p=0,263$).

Πίνακας 3.5

Ποσοστά των στελεχών *S.agalactiae* με θετικό *Epsilon* και αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και την Κλινδαμυκίνη	
ΣΤΕΛΕΧΗ (24)	***Epsilon* Ανθεκτικά σε Ερυθρ. + Κλινδ.**
ΚΥΗΣΗ (16)	6 (37,5%)
ΜΗ ΚΥΗΣΗ (8)	6 (75%)
ΣΥΝΟΛΟ	**12 (50%)**

Ραβδόγραμμα 3.5



Ποσοστά των στελεχών S.agalactiae με θετικό Epsilon και αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και την Κλινδαμυκίνη

Από τα 128 στελέχη *S.agalactiae* τα 6 (4,7%) είναι θετικά στο ***bac*** τα οποία προέρχονταν από δείγματα κολπικού επιχρίσματος από έγκυες γυναίκες. Από αυτά το 66,7% ήταν ευαίσθητο σε όλα τα αντιβιοτικά ενώ το 33,3% ήταν ανθεκτικό σε Ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη.

Πίνακας 3.6

ΣΤΕΛΕΧΗ (6)	***bac* Ανθεκτικά Ερυθρ. + Κλινδ.**
ΚΥΗΣΗΣ (6)	2 (33,3%)
ΜΗ ΚΥΗΣΗΣ (0)	0 (0%)
ΣΥΝΟΛΟ	**2 (33.3%)**

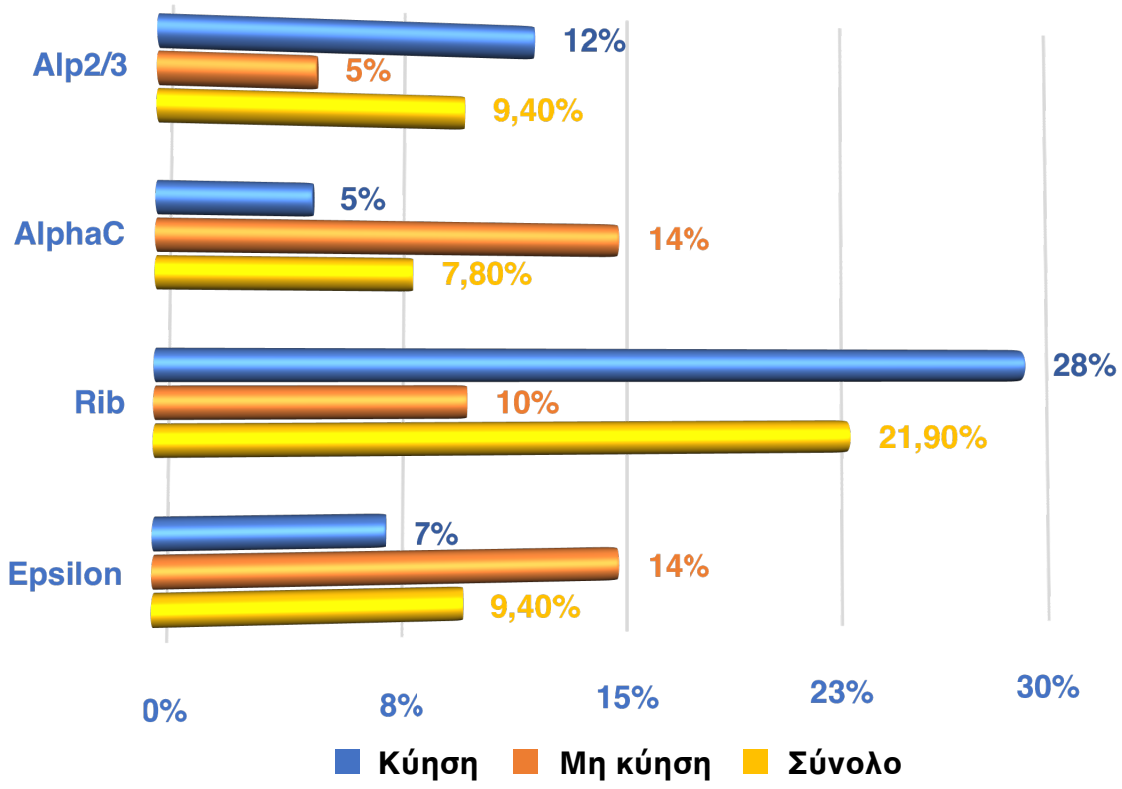
Ποσοστά των στελεχών S.agalactiae με θετικό bac και αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και την Κλινδαμυκίνη

Πίνακας 3.7

	Αντοχή σε Ερθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη			
ΣΤΕΛΕΧΗ *128*	***Alp2/3***	***Alpha C***	***Rib1***	***Epsilon***
ΚΥΗΣΗ (86)	*10 (11,6%)*	4 (4,7%)	24 (27,9%)	6 (7%)
ΜΗ ΚΥΗΣΗ (42)	*2 (4,8%)*	6 (14,3%)	4 (9,5%)	6 (14,3%)
ΣΥΝΟΛΟ	***12 (9,4%)***	**10 (7,8%)**	**28 (21,9%)**	**12 (9,4%)**

Ποσοστά ανθεκτικών στελεχών S.agalactiae με αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και την Κλινδαμυκίνη και κατανομή γονιδίων παθογένειας

Ραβδόγραμμα 3.7



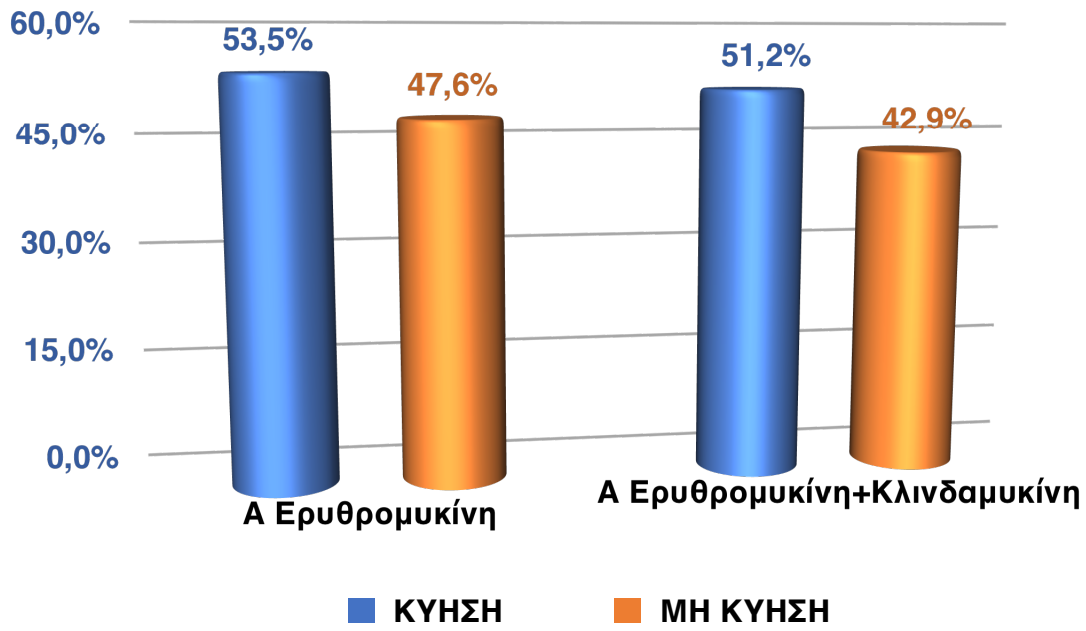
Ποσοστά ανθεκτικών στελεχών S.agalactiae με αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και την Κλινδαμυκίνη και κατανομή γονιδίων παθογένειας

Πίνακας 3.8

ΣΤΕΛΕΧΗ ***128***	***Α Ερυθρομυκίνη***	***Α Ερθρ.+Κλινδ***
ΚΥΗΣΗ (86)	***46*** *(44 Α σε Ερυθρ+Κλινδ. + 2 μόνο σε Ερυρ)* ***(53,5%)***	44 (51,2%)
ΜΗ ΚΥΗΣΗ (42)	***20*** *(18 Α σε Ερυθρ+Κλινδ. + 2 μόνο σε Ερυρ)* ***47,6%)***	18 (42,9%)
ΣΥΝΟΛΟ	***66 (51,6%)***	**62 (48,4%)**

Ποσοστά ανθεκτικών στελεχών S.agalactiae

Ραβδόγραμμα 3.8



Ποσοστά ανθεκτικών στελεχών S.agalactiae σε ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη.

Από τα 128 στελέχη *S.agalactiae* τα 86 (67,2%) που προέρχονταν από δείγματα κολπικού επιχρίσματος από έγκυες γυναίκες το 7%, 14%, 9,3% και 7% που ήταν ευαίσθητο σε όλα τα αντιβιοτικά ήταν θετικό στην *Alp2/3, AlphaC, Rib, και Epsilon* αντίστοιχα. Το 11,6%, 4,7%, 27,9% και το 7% που ήταν ανθεκτικό σε ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη ήταν θετικό στην *Alp2/3, AlphaC, Rib, και Epsilon* αντίστοιχα.

Από τα 42 (32,8%) που προέρχονταν από μη έγκυες γυναίκες το 19, 4,8, 23,8 και 4,8% που ήταν ευαίσθητο σε όλα τα αντιβιοτικά ήταν θετικό στην *Alp2/3, AlphaC, Rib, καιEpsilon* αντίστοιχα. Το 4,8, 14,3, 9,5 και 14,3% που ήταν ανθεκτικό σε ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη ήταν θετικό στην *Alp2/3, AlphaC, Rib, και Epsilon* αντίστοιχα.

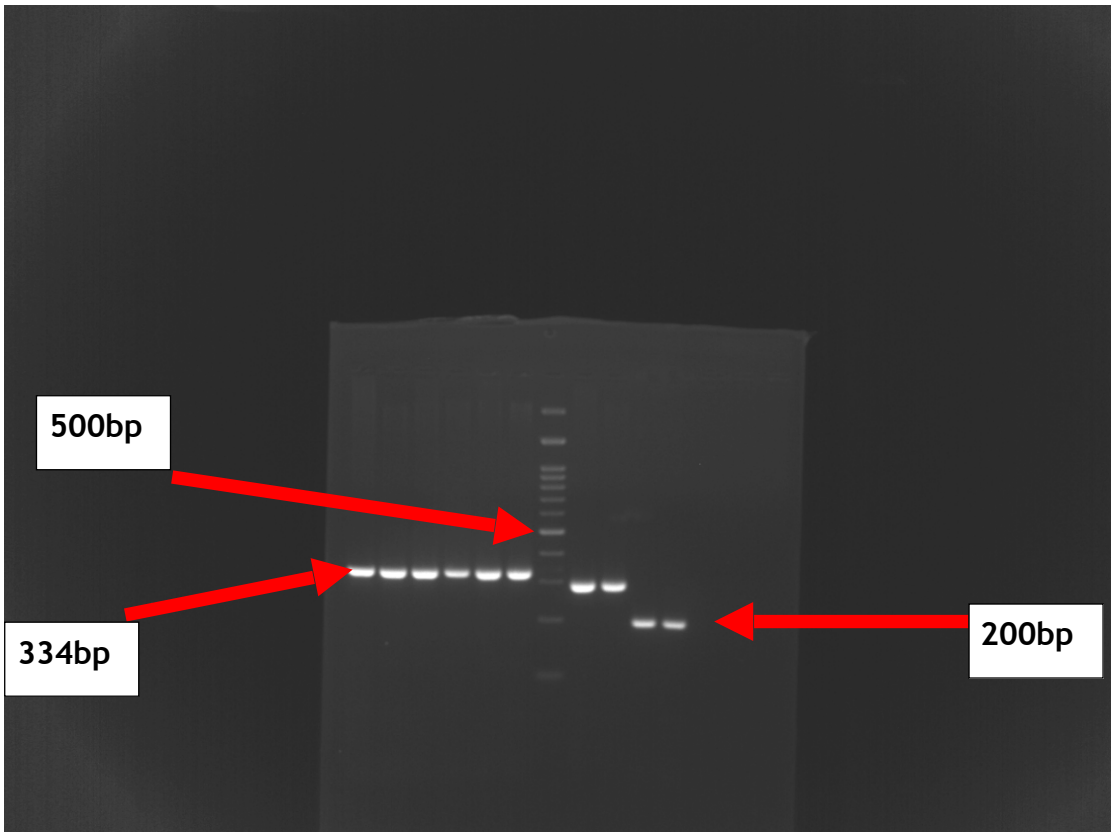
Από τα 128 στελέχη *S.agalactiae* τα 86 (67,2%) που προέρχονταν από δείγματα κολπικού επιχρίσματος από έγκυες γυναίκες το 37,2% ήταν ευαίσθητο σε όλα τα αντιβιοτικά και το 51,2% ανθεκτικό σε ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη. Επίσης βρέθηκαν 10 (11,6%) στελέχη ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη.

Ενώ από τα 42 δείγματα που προέρχονταν από δείγματα κολπικού επιχρίσματος από μη έγκυες γυναίκες το 52,4% ήταν ευαίσθητο σε όλα τα αντιβιοτικά και το 42,9% ανθεκτικό σε ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη. Ωστόσο βρέθηκαν 2 (4,8%) ανθεκτικά σε σιπροφλοξασίνη, 2 (4,8%) σε ερυθρομυκίνη και 1(2,4%) στέλεχος μειωμένης ευαισθησίας στην πενικιλλίνη.

Η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε σε επίπεδο $p<0,05$. Από τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων βρέθηκε, ότι το σύνολο των στελεχών που προέρχονταν από έγκυες και μη έγκυες γυναίκες δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την αντοχή στην Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη αλλά και ως προς την ευαισθησία στα αντιβιοτικά ($p=0,07$)

Συνολικά 1 (0,8%) στελέχος ήταν μειωμένης ευαισθησίας στην πενικιλίνη. Δεκατέσσερα (14) (10,8%) στελέχη ήταν ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη. Από τα 14 στελέχη που ήταν ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη, τα έξι (6) είχαν θετική την ***Rib,*** τα τέσσερα (4) είχαν θετική την ***Alp2/3 και τέσσερα*** (4) ***την Epsilon.***

Εικόνα 3.1



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης διαφορετικών στελεχών S.agalactiae

Διαδρομή 1-6: Δείγματα 6,7, 8, 11, 17, 24 MW=334bp Alp2/3

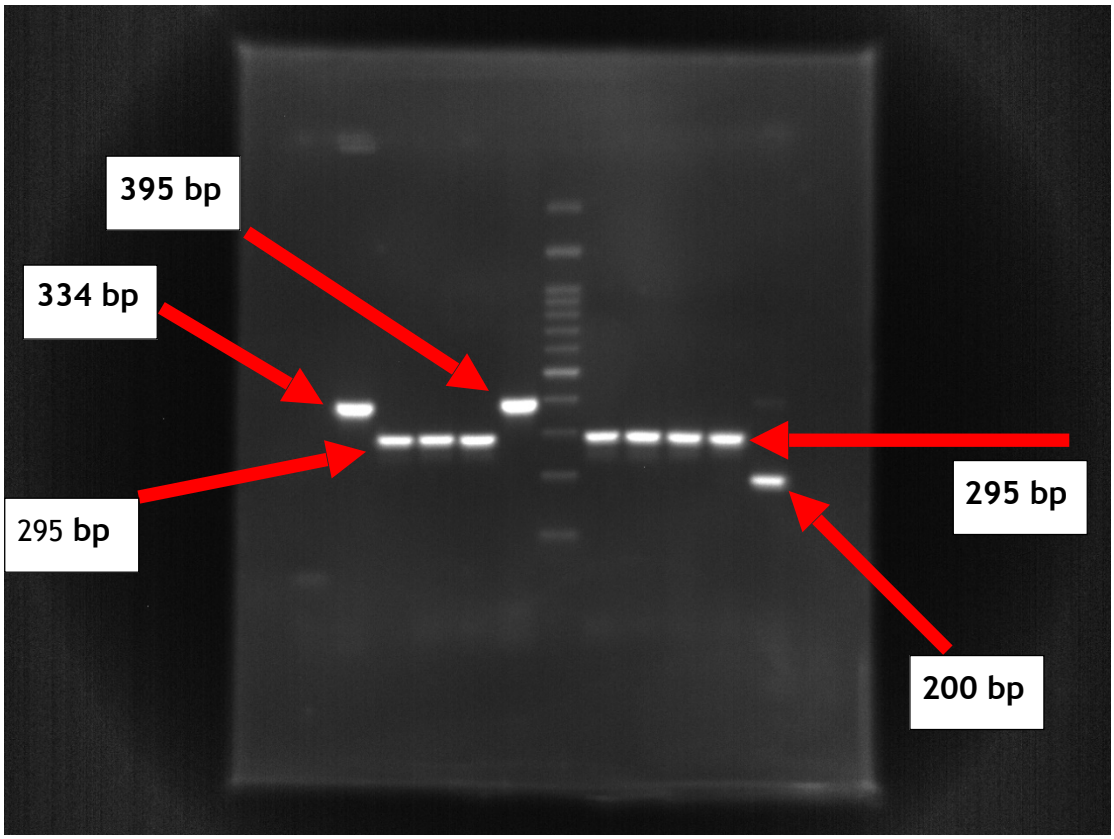
Διαδρομή 7: Δείκτης Μοριακού βάρους ανά 100bp (αριθμός ζευγών βάσεων bp)

Διαδρομή 8-9:Δείγματα 2, 3MW=295bp Rib

Διαδρομή 10-11:Δείγματα 19, 23MW=200bp Epsilon

Διαδρομή 12-13: Αρνητικοί μάρτυρες (H_2O).

Εικόνα 3.2



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης διαφορετικών στελεχών S.agalactiae

Διαδρομή 1και 13: Αρνητικοί μάρτυρες (H_2O).

Διαδρομή 2:Δείγμα 27MW=334bp Alp2/3

Διαδρομή 3-5: Δείγματα 29, 30, 31 MW=295bp Rib

Διαδρομή 6:Δείγμα 1MW=395bp AlphaC

Διαδρομή 7: Δείκτης Μοριακού βάρους ανά 100bp (αριθμός ζευγών βάσεων bp)

Διαδρομή 8-11:Δείγματα 2,3,4,9MW=295bp Rib

Διαδρομή 12: Δείγμα Epsilon MW=200bp

Αποτελέσματα έρευνας ενημέρωσης των μαιευτήρων γυναικολόγων και βιοπαθολόγων σχετικά με την πρόληψη νεογνικής νόσου στρεπτοκόκκου Β

Πίνακας 3.9

ΕΡΕΥΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ ΜΑΙΕΥΤΗΡΩΝ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΓΚΑΙΟΤΗΤΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ Β ΑΙΜΟΚΥΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΥ ΟΜΑΔΑΣ Β ΣΤΗΝ ΚΥΗΣΗ (21 απαντήσεις)		
	ΝΑΙ	**ΟΧΙ**
Γνωρίζετε την οδηγία CDC 2010 Για τον έλεγχο φορείας στρεπτοκόκκου Β στις έγκυες?	19	2 (όχι ακριβώς)
Την εφαρμόζετε?	18	3* (καμιά φορά όχι)
Σε περίπτωση που δεν έχετε κάνει τον έλεγχο «on time» χορηγείτε προφυλακτική αγωγή σε τελειόμηνη κύηση κατά CDC 2010?	17	4
Γνωρίζετε πως η πενικιλλίνη είναι το αντιβιοτικό εκλογής?	20	1
Γνωρίζετε την οδηγία RCOG 2017	0	21

Αποτελέσματα έρευνας για την ενημέρωση Μαιευτήρων Γυναικολόγων

Πίνακας 3.10

ΕΡΕΥΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΩΝ ΓΙΑ ΚΑΛΕΣ ΠΡΑΚΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑ CDC 2010/CLSI M100 ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ Β ΑΙΜΟΚΥΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΥ ΟΜΑΔΑΣ Β ΣΤΗΝ ΚΥΗΣΗ (δέκα απαντήσεις)		
	Ναι	Οχι
Γνωρίζετε την οδηγία CDC 2010 για τον έλεγχο φορείας στρεπτοκόκκου Β στις έγκυες?	2	8
Εφαρμόζετε την οδηγία κατά CDC 2010 όταν πρόκειται για εγκυμονούσα?	1	9
Τι εκλεκτικό/ εμπλουτιστικό ζωμό χρησιμοποιείτε?	1 (Ελληνικής εταιρείας)	Τίποτα
D test, το γνωρίζετε?	7	3
Γνωρίζετε την οδηγία RCOG (2017)για την πρόληψη νεογνικής νόσου σε νεογνά?	0	10

Αποτελέσματα έρευνας για την ενημέρωση Βιοπαθολόγων

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία φαίνεται πως η νεογνική θνησιμότητα από β-αιμολυτικό στρεπτόκοκκο ομάδας Β μειώθηκε μετά την εφαρμογή της οδηγίας CDC 2010. Αυτό οφείλεται στο συστηματικό έλεγχο των εγκύων για φορεία κατά την 35-37 εβδομάδα της κυήσεως. Η πολιτική αυτή όμως, οδήγησε στην χορήγηση αντιβιοτικών σε μεγάλο βαθμό στις επίτοκες Η.Π.Α. και αύξηση της αντοχής του GBS στις πενικιλίνες. Η μείωση των νεογνικών λοιμώξεων από GBS από 1.5/1000 σε 0.34-0.37/1000 θεωρήθηκε μεγάλο βήμα στην πρόληψη νεογνικών λοιμώξεων από GBS. Ωστόσο πολλά ερωτηματικά εγείρονται σχετικά με: τη συχνότητα φορείας, την αύξηση της αντοχής στα αντιβιοτικά αν υπάρχει, τον αριθμό των ψευδώς θετικών καλλιεργειών και την επαγρύπνηση των μαιευτήρων-γυναικολόγων. Επίσης, τα στατιστικά δεδομένα για τη συχνότητα της πρώιμης νεογνικής νόσου δεν είναι επαρκή διεθνώς.

Φορεία στρεπτοκόκκου Β στα κολπικά δείγματα

Στην Ελλάδα, δεν υπάρχει πρόσφατη μελέτη με δεδομένα για την φορεία την τελευταία δεκαετία, τη νόσο και τις αντοχές στα αντιβιοτικά. Σύμφωνα με τη δική μας μελέτη σε σύνολο 5498 καλλιεργειών κολπικού υγρού, σε διάστημα ενός έτους, σε εγκύους και μη, το ποσοστό φορείας ήταν 9,8%, αρκετά δηλαδή χαμηλότερο από αυτό που αναφέρεται παγκοσμίως, και σύμφωνα με μία τελευταία μεγάλη συνολική μελέτη που βασίστηκε σε δεδομένα μελετών διεθνώς και αναφέρεται ως 18% (Russel et al.,2017). Η Ελλάδα, σύμφωνα με την δική μας μελέτη ανήκει στις χώρες με το χαμηλότερο ποσοστό φορείας σε σύγκριση ακόμη και με παλαιότερες μελέτες που αναφέρουν εύρος ανάμεσα σε 8-18% (Stoll BJ et al, 1998; Regan JA 1999; Kwatra G, etal., 2016). Σε μία μελέτη των χαρακτηριστικών της φορείας σε έγκυες γυναίκες στην Ελλάδα (Tsolia M, et al., 2003) αναφέρεται πως η συχνότητα σε εγκύους, ήταν 6.9%, πολύ χαμηλότερο από το δικό μας αποτέλεσμα (12,4%). Σε άλλη μελέτη σε πληθυσμό χαμηλού κινδύνου (δίχως προηγούμενη λοίμωξη GBS, σημεία λοίμωξης, προηγούμενο πρόωρο τοκετό κ.α.) η συχνότητα αποικισμού σε έγκυες ήταν 12,3% (Daskalakis et al., 2006). Ωστόσο σε καμία από τις δύο μελέτες δεν αναφέρεται η τήρηση ή μη

των οδηγιών καλλιέργειας του CDC, 2010. Τα αποτελέσματά μας όσον αφορά τον αποικισμό δεν είναι δυνατόν να συγκριθούν εύκολα με καμία από τις δύο μελέτες διότι, η δική μας μελέτη αφορά εγκύους στις οποίες η λήψη και καλλιέργεια έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες που συμπεριλαμβάνουν το στάδιο του εμπλουτισμού κατ'αρχήν. Δεύτερον, το δικό μας ποσοστό 6,9% απομόνωσης σε μη εγκύους πιθανόν να οφείλεται στη μη χρήση του σταδίου εμπλουτισμού, για γυναίκες χωρίς κλινική συμπτωματολογία λοίμωξης ή που έχουν δηλώσει «μη έγκυος» ή για εμμηνοπαυσιακές.

Κατά τη δική μας μελέτη, η δειγματοληψία και επεξεργασία του δείγματος έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες CDC 2010 για τις εγκύους, αναφορικά με τη λήψη και καλλιέργεια. Κατά τις οδηγίες, η απλή καλλιέργεια σε στερεά θρεπτικά υλικά δεν αρκεί. Συνιστάται η χρήση ζωμού για τον εμπλουτισμό και την εκλεκτική απομόνωση του στρεπτοκόκκου Β μέσα από εκατομμύρια άλλα βακτήρια του κόλπου, δεδομένου ότι η ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών όπως ο εντερόκοκκος, που αναπτύσσεται επίσης στα ίδια θρεπτικά υλικά με το GBS και τα Gram (-) μπορεί να συμβεί ταχέως, μπορεί στην απλή καλλιέργεια να αναστείλουν την ανάπτυξη του στρεπτοκόκκου Β. Αξιοσημείωτο είναι πως η οδηγία του CDC εργαστηριακής πρακτικής στο συγκεκριμένο εργαστήριο ακολουθείται σε εγκύους και πραγματοποιείται σε μη εγκύους, όταν υπάρχει συμπτωματολογία (όπως προαναφέρθηκε).

Επίπεδο ενημέρωσης μαιευτήρων-γυναικολόγων και βιοπαθολόγων για τη σημασία της οδηγίας πρόληψης νεογνικής λοίμωξης GBS CDC 2010

Σε ερώτημα που υποβάλαμε σε εργαστηριακούς-βιοπαθολόγους (Πίνακας 3.10, σελ. 93) σε περιφερειακά ιατρεία σχετικά με την καλλιέργεια, ανακαλύψαμε πως δεν γίνεται η χρήση εμπλουτιστικού/εκλεκτικού ζωμού σε πολύ μεγάλο βαθμό. Το γεγονός αυτό λοιπόν μπορεί να οδηγήσει «ψευδώς αρνητική καλλιέργεια». Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, να δυσχεραίνει την αξιολόγηση της φορείας. Αν για παράδειγμα κατά τον τοκετό, πραγματοποιηθεί εκ νέου καλλιέργεια κολπικού υγρού και ευρεθεί θετική: τι σημαίνει αυτό? πρόκειται για προηγούμενη ψευδώς αρνητική καλλιέργεια η για αποικισμό στο μεταξύ διάστημα?

Φαίνεται, πως πολλά κλινικά εργαστήρια στη χώρα μας ακόμη δεν έχουν βάλει στην ρουτίνα τους σε μεγάλο ποσοστό την νέα οδηγία που μεγιστοποιεί την ανίχνευση του μικροοργανισμού (σύμφωνα με την έρευνα και προσωπικές επικοινωνίες και εκτίμηση).

Οι μαιευτήρες-γυναικολόγοι, φαίνεται πως ακολουθούν την οδηγία σε μεγάλο βαθμό (σύμφωνα με την δική μας έρευνα, (Πίνακας 3.9, σελ. 93). Ενα πολύ μικρό ποσοστό με ελλιπή ενημέρωση μόνο φαίνεται να ολιγωρεί.

Στο σύνολο, μαιευτήρες-γυναικολόγοι δεν γνωρίζουν πως η καλλιέργεια πρέπει να πραγματοποιείται κατά CDC και πως κατά συνέπεια, είναι σημαντικό να παραπέμπεται η έγκυος σε κατάλληλο εργαστήριο. Στο σύνολο μαιευτήρες-γυναικολόγοι και βιοπαθολόγοι δεν γνωρίζουν την νέα οδηγία RCOG, 2017.

Συμπερασματικά:

1. *Συνιστάται η εφαρμογή της οδηγίας του CDC (2010) για την καλλιέργεια–screening του στρεπτοκόκκου Β και όχι η απλή καλλιέργεια κολπικού υγρού*
2. *Οι μαιευτήρες γυναικολόγοι είναι ευαισθητοποιημένοι σε μεγάλο βαθμό*
3. *Οι βιοπαθολόγοι είναι ευαισθητοποιημένοι σε πολύ χαμηλό βαθμό*
4. *Μαιευτήρες γυναικολόγοι και βιοπαθολόγοι δεν γνωρίζουν την οδηγία RCOG*

Επίσης, ακόμη και αν η επίτοκος φτάσει στην αίθουσα τοκετών χωρίς να έχει ελεγχθεί, και πάλι η πρόληψη της νεογνικής λοίμωξης ή αποφυγή χρήσης άσκοπης αντιβιοθεραπείας θα μπορούσε να είναι εφικτή. Σε υποψία φορείας, η πιθανότητα χρήσης ενός άμεσου τεστ ανίχνευσης αντιγόνου απ'ευθείας από τον κόλπο αποτελεί μία δυνατότητα. Το τεστ είναι παρόμοιο με αυτό του στρεπτοκόκκου Α που γίνεται από την φαρυγγική κοιλότητα. Κατά τη δική μας εμπειρία, στο μαιευτήριο όπου συνεργαζόμαστε, η χρήση αυτού του τεστ είναι ευρεία και συστηματική κατά την εισαγωγή της εγκύου για τον τοκετό. Ωστόσο επειδή το τεστ είναι σχετικά νέο χρήζει αξιολόγησης.

Σε υποψία φορείας κατά τον τοκετό, συνιστάται η χρήση τέστ άμεσης ανίχνευσης αντιγόνου στρεπτοκόκκου Β με ανοσοχρωματογραφία ή άλλο γρήγορο τέστ. Το τέστ άμεσης ανίνχευσης αντιγόνου GBS με

ανοσοχρωματογραφία πρέπει να αξιολογηθεί σε σύγκριση με την καλλιέργεια και μοριακή μέθοδο

Θετικές καλλιέργειες-αντοχές σε αντιβιοτικά και λοιμογόνα στοιχεία

Από το σύνολο των 128 θετικών καλλιεργειών για στρεπτόκοκκο Β που μελετήθηκαν και απομονώθηκαν καλλιέργεια κολπικού εκκρίματος το 67,2% περίπου προέρχονταν από τις έγκυες γυναίκες ενώ τα 32,8 % περίπου από γυναίκες οι οποίες είχαν έρθει στα εξωτερικά ιατρεία για απλή καλλιέργεια κολπικού.

Αντοχές στα αντιβιοτικά στο σύνολο των μικροβιακών στελεχών

Πενικιλλίνη-αμπικιλλίνη

Στο σύνολο των απομονωμένων στελεχών, από τα 130 στελέχη, παρατηρήθηκε μειωμένη αντοχή στην πενικιλλίνη σε ένα μόνο στέλεχος. Το στέλεχος απόμονώθηκε από μη έγκυο που έφερε μόνο το γονίδιο Alpha C, και δεν παρουσίασε άλλη αντοχή σε αντιβιοτικό. Το ποσοστό αυτό αν και σχεδόν ασήμαντο, μαζί με ακόμη άλλο ένα αποτέλεσμα δικής μας μελέτης του 2015, όπου στα 100 στελέχη στρεπτοκόκκου Β ανιχνεύτηκε ένα στέλεχος με «μειωμένη αντοχή στην πενικιλλίνη (δηλ., 1%) αποτελεί σημαντικό στοιχείο για προφανή τάση αυξανόμενης αντοχής στην πενικιλλίνη. Αυτό σημαίνει πως το τέστ ευαισθησίας πρέπει να γίνεται συστηματικά και όχι να μελετάται απλά η φορεία, όπως συνηθίζεται από μερικά εργαστήρια. Οι στρεπτόκοκκοι ομάδας Α παρουσιάζουν κατά την βιβλιογραφία «καθολική ευαισθησία» στην πενικιλλίνη και αμπικιλλίνη. Δεν αναφέρεται διεθνώς αντοχή στην πενικιλλίνη και αμπικιλλίνη, αλλά μερικά στελέχη παρουσιάζουν. Ο GBS δεν θεωρείται ένα απόλυτα ευαίσθητο μικρόβιο στην πενικιλλίνη, όπως οι στρεπτόκοκκοι της ομάδα Α, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία από χρόνια (Betriu et al., 1994) και σε ορισμένες περιοχές του κόσμου (Kimura K et al. 2008; Gaudreau C, et al., 2010). Αυτή ήταν και η εικόνα των δύο δικών μας στελεχών GBS (προηγούμενης μελέτης και στην παρούσα), ελάχιστες ανασταλτικές πυκνότητες (Minimum inhibitory concentrations, MICs) κοντά στο χαμηλότερο όριο ευαισθησίας για ορισμένα β-λακταμικά αντιβιοτικά όπως σε άλλες μελέτες (Phares CR et al., 2005). Σε πιο πρόσφατη μελέτη, φαίνεται πως σε κάποιες

περιπτώσεις τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τέτοιων στελεχών, με μειωμένη ευαισθησία στην πενικιλλίνη, συνδιάζονται επίσης, με απώλεια της αιμολυτικής ιδιότητας και άλλες αντοχές, ενώ ο μηχανισμός, κατά πάσα πιθανότητα ενέχει μετάλλαξη των πενικιλλινοδεσμευτικών πρωτεινών (Banno H, et al., 2014). Γι' αυτό το λόγο, η αρχική θεραπεία για την λοίμωξη GBS είναι πάντα μία **υψηλής δόσης** παρεντερική πενικιλλίνη ή αμπικιλλίνη. Στην παρούσα μελέτη, αντοχή στην κεφαζολίνη παρατηρήθηκε μόνο σε ένα στέλεχος (αποτέλεσμα που δεν συμπεριλαμβάνεται στα εξετασθέντα αντιβιοτικά, αλλά προέρχεται από το εργαστήριο όπου έγιναν οι απομονώσεις των μικροοργανισμών). Η κεφαζολίνη, αποτελεί την πρώτη εναλλακτική λύση αν η ασθενής παρουσιάζει ελαφρά αλλεργία στην πενικιλλίνη, σύμφωνα με τη οδηγία CDC 2010.

Ερυθρομυκίνη-Κλινδαμυκίνη

Το ήμισυ περίπου του συνόλου των στελεχών ήταν ανθεκτικό στην κλινδαμυκίνη και ερυθρομυκίνη, αλλά για λόγους μη δημιουργίας σύγχυσης στον κλινικό ιατρό, δίδεται μόνο το αποτέλεσμα της κλινδαμυκίνης. Στο εργαστήριο του μαιευτηρίου που πραγματοποιήθηκε το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας, πραγματοποιείται πάντα το D-test σύμφωνα με την οδηγία CDC 2010 και το CLSI-2016 (Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing, M100-S23, 2013). Το αποτέλεσμα σχετικά με την αντοχή στην κλινδαμυκίνη, έχει αποτυπωθεί όχι μόνο κατά το χρονικό διάστημα της μελέτης, αλλά και σε προηγούμενα χρόνια, από το 2011 έως σήμερα. Πρόκειται για το υψηλότερο ποσοστό αντοχής στην ερυθρομυκίνη/κλινδαμυκίνη που έχει καταγραφεί στην χώρα μας (Ελεύθερη Ανακοίνωση στο 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, 2015) σε σύγκριση με άλλες, προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ποσοστά της τάξης του 6% (Tsolia M, et al., 2003) έως 20,47% (Liakopoulos et al., 2014). Αυτός ήταν και ένας από τους λόγους, που οδηγηθήκαμε στην καταγραφή των αντοχών για το έτος 2016-2017. Στην παρούσα μελέτη, ανιχνεύτηκε έναw πολύ μικρός αριθμός στελεχών με αντοχή στην ερυθρομυκίνη μόνο χωρίς αντοχή στην κλινδαμυκίνη. Σε προηγούμενη μελέτη που κάναμε σε 100 στελέχη από εγκύους και μη γυναίκες (Πανελλήνιο

Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας 2015) το αποτέλεσμα ήταν αντίστροφο: δηλαδή, ταυτοποιήθηκε ένας μικρός αριθμός στελεχών με ευαισθησία στην ερυθρομυκίνη και παράληλα με αντοχή στην κλινδαμυκίνη, που παραπέμπει, πως στην Ελλάδα πιθανόν να κυκλοφορούν στελέχη με άλλα ένζυμα ή άλλου τύπου αντοχή στην κλινδαμυκίνη. Παρόμοιο αποτέλεσμα έχει δημοσιευτεί και έχει αποδοθεί σε ένα ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο IsaC (Malbruny B et al., 2011).

Η επαγώγιμη αντοχή της κλινδαμυκίνη παρουσιάστηκε σε περίπου 6% των στελεχών, ένα σχετικά μικρό ποσοστό, ενώ η συστασιακή (χρωμοσωμιακή) στο μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με πολλές δημοσιευμένες μελέτες, αν και υπάρχουν άλλες, από διάφορες περιοχές που παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό επαγώγιμης και μικρό ποσοστό χρωμοσωμιακής αντοχής. Σε μία πρόσφατη μελέτη ευαισθησιών στελεχών που απομονώθηκαν σε έλεγχο φορείας σε εγκυμονούσες στις ΗΠΑ, αναφέρεται ποσοστό αντοχής στην ερυθρομυκίνη 45%, και 36,7% στην κλινδαμυκίνη ενώ η επαγώγιμη αντοχή ήταν περίπου 8% (Berg R Benjamin et al., 2014). Το ποσοστό της επαγώγιμης αντοχής στα Ελληνικά στελέχη ήταν στο σύνολό τους και όχι μόνο μικροβιακά στελέχη των εγκύων, ελαφρά μικρότερο από ότι στα στελέχη της παραπάνω μελέτης. Αξιοσημείωτο είναι πως στην γείτονα χώρα (Ρουμανία) σε πρόσφατη μελέτη αναφέρεται (Usein C et al., 2009) χρωμοσωμιακή στο 84% των στελεχών. Σε άλλη μελέτη αντίθετα, αναφέρεται υψηλό ποσοστό επαγώγιμης αντοχής στην κλινδαμυκίνη (Capraro et al., 2013).Σε αυτή τη μελέτη, από τα 178 στελέχη που εξετάστηκαν, τα 53 παρουσίασαν συστασιακή αντοχή ενώ τα 125 επαγώγιμη. Η παρούσα μελέτη σημαίνει πως πρέπει να υπάρχει υψηλού επιπέδου επαγρύπνηση διότι λόγω του μεγάλου ποσοστού αντοχής και μάλιστα χρωμοσωμικής στην χώρα μας στην κλινδαμυκίνη, το δεύτερης γραμμής φάρμακο επιλογής για την χημειοπροφύλαξη του GBS κατά τον τοκετό.

Η πρόσφατα ανακαλυφθείσα αντοχή στην βανκομυκίνη, σε δύο άσχετα ως προς την επιδημιολογία στελέχη GBS οφειλόταν στην ενσωμάτωση γονιδίων αντοχής τύπου *vanG* η οποία ταυτοποιείται τυπικά στον *Enterococcus faecalis (*Park C et al; 2014). Η περιοχή *vanG* κωδικοποιεί ένζυμα τα οποία

συνθέτουν πρώιμα τμήματα της πεπτιδογλυκάνης, με χαμηλή συνάφεια προς την βανκομυκίνη, και που αντικαθιστούν το υψηλής C-terminal D-Ala κατάλοιπο με χαμηλής συγγένειας D-serine (D-Ser), αφαιρώντας με αυτό τον τρόπο το στόχο πρόσδεσης της βανκομυκίνης. Η προέλευση της ανοχής και ο τρόπος με τον οποίο το γονίδιο *vanG* του GBS μεταφέρεται δεν είναι γνωστός (Courvalin P., 2006). Αντοχή στη βανκομυκίνη δεν παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη, αλλά όπως προαναφέρθηκε παρατηρήθηκε μειωμένη αντοχή στην πενικιλλίνη σε ποσοστό 0.76% που σημαίνει, πως αν και ελάχιστο, υπάρχει τάση ανάπτυξης αντοχής. Το γεγονός αυτό μαζί με την πιθανότητα αλλεργίας της εγκύου καθιστά σημαντική τον έλεγχο ευαισθησίας στην πενικιλλίνη αλλά και την σκέψη πως λόγω της μεγάλης συχνότητας αντοχής στην κλινδαμυκίνη, η βανκομυκίνη είναι το αμέσως επόμενο αντιβιοτικό εκλογής.

Ανίχνευση γονιδίων παθογένειας

Επιδιώξαμε να μελετήσουμε την συχνότητα ανίχνευσης γονιδίων προσκόλλησης και εισβολής στα στελέχη που απομονώθηκαν και να γίνει συσχέτιση με τις αντοχές σε αντιβιοτικά σε εγκύους και μη εγκύους. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία φαίνεται πως στην Ελλάδα ο γονότυπος ST1 (μέσω MLST) τύπο εμφανίζεται με την μεγαλύτερη συχνότητα (Liakopoulos A et al., 2014) και σύμφωνα με μία μόνο ορολογική μελέτη ο τύπος II (Tsolia M et al., 2003). Δεν υπάρχει άλλη μελέτη σχετική με μοριακή ανίχνευση λοιμογόνων παραγόντων στην Ελλάδα. Εφόσον η οροτυπία σχετίζεται με διάφορους τύπους αλληλούχισης (STs) και εμφανίζονται πολλές πιθανότητες γενετικού ανασυνδιασμού, προτιμήθηκε σε αυτή την μελέτη να διερευνηθούν κατ'ευθείαν γονίδια προσκόλλησης και εισβολής, δηλ., γονίδια παθογένειας.

Οι πρωτεΐνες της οικογένεια α-like ή (Alp) παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του GBS και αποτελούν υποψήφιους για ένα εμβόλιο (Gilbert GL 2004). Η οικογένεια Alp περιλαμβάνει την α, Rib, Alp2, Alp3/ALP3, Alp4 και ε που κωδικοποιούνται από τα αλλήλια των γονιδίων *bca*, *rib*, *alp2*, *alp3*, *alp4* και *alp1/alp5* αντίστοιχα, που εδράζονται αντίστοιχα στο νησίδιο παθογένειας (Cretti et al., 2004; Lindalh G et al.2005) ενώ συνδέονται με συγκεκριμένους οροτύπους και κατά συνέπεια με την παθογένεια και τα παθογόνα στοιχεία τους (Kong, F.,2002 Lachenauer, C. S.,2000). Επίσης, αποτελούν υποψήφια μόρια για εμβόλιο.

Από τα στελέχη *S. agalactiae* που μελετήθηκαν η συχνότητα ανίχνευσης με το μεγαλύτερο ποσοστό με φθίνουσα σειρά ήταν στο Rib, Alp2/3, και εξ ίσου στα AlphaC και Epsilon. Ως προς το γονίδιο Rib, το αποτέλεσμά μας συνάδει με μία Ευρωπαική μελέτη (Sadowy et al., 2010) κατά την οποία το πιο συχνό γονίδιο παθογένειας ήταν το Rib. Στις εγκύους παρατηρήθηκε το υψηλότερο ποσοστό συχνότητας στελεχών φερόντων το Rib γονιδίο, σχεδόν υπερδιπλάσιο από ότι στις μη εγκύους. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως το γονίδιο αυτό αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα προσκόλλησης που ευνοείται από το περιβάλλον του κόλπου κατά την κύηση και είναι το πιο συχνό στα μικροβιακά στελέχη που αποικίζουν τις Ελληνίδες.

Το γονίδιο ***Rib*** αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα προσκόλλησης από την οικογένεια α-like πρωτεϊνών του GBS, που ευνοείται από το περιβάλλον του κόλπου κατά την κύηση και είναι το πιο συχνά ανιχνευόμενο στα GBS στελέχη των εγκύων.

Στις μη εγκύους με μεγαλύτερη συχνότητα απομονώθηκε το γονίδιο *Alp2/3.* Τόσο η φορεία στελεχών φέροντα το γονίδιο Rib όσο και του Alp2/3 σε εγκύους και μη εγκύους αντίστοιχα δε μπορεί να ερμηνευτεί από την μελέτη μας διότι περιλαμβάνει κλινικά στελέχη με μόνο κλινικά δεδομένα. Οι παράγοντες αυτοί παθογένειας του GBS που δεν είναι απομονωμένοι, δε μπορεί να μελετηθούν ένας προς έναν. Ωστόσο η ένδειξη της σημασίας του αποικισμού από Rib+ στελέχη σε σημαντικό αριθμό εγκύων αποτελεί σημαντικό εύρημα και παραπέμπει σε περαιτέρω διερεύνηση του λοιμογόνου στοιχείου.

Παρόμοια, σχεδόν ίδια μεταξύ τους ήταν τα ποσοστά ανίχνευσης των γονιδίων AlphaC, και εψιλον (ε) σε εγκύους και μη, που παραπέμπει σε κοινό παράγοντα προσκόλλησης στο περιβάλλον του κόλπου εγκύων και μη, αν και δεν είναι γνωστό σύμφωνα με τα δεδομένα της μελέτης μας κατά πόσο, στις μη εγκύους η ανίχνευση του GBS συνδεόταν με λοίμωξη. Το θέμα αυτό είναι υπό διερεύνηση και αποτελεί επόμενο στόχο της έρευνάς μας, εφόσον πρόκειται να ανατρέξουμε εκ νέου στο αρχείο του εργαστηρίου, για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν σημεία λοίμωξης στις γυναίκες με *Alpha C,* και έψιλον (ε) θετικά στελέχη.

‘Οσο για το γονίδιο *bac* που διερευνήθηκε στην μελέτη μας, αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Beta-C ή πρωτείνη β, ενέχει ρόλο στην αναστολή της φαγοκυττάρωσης, και τη δέσμευση της IgA (Lindahl G. Et al., 2005). Το γονίδιο αυτό απομονώθηκε σε πολύ μικρό ποσοστό και μόνο από τις εγκύους. Ωστόσο, ο αριθμός είναι πολύ μικρός για να αναλυθεί στατιστικά και να οδηγήσει σε συμπεράσματα.

Γονίδια παθογένειας και αντοχή σε αντιβιοτικά

Η συσχέτιση της παρουσίας γονιδίων πρωτεϊνών α και αντοχών είναι ενδιαφέρουσα, κυρίως όσον αφορά την ερυθρομυκίνη. Είναι ενδιαφέρον το πως στα στελέχη Rib + εγκύων η αντοχή στην ερυθρομυκίνη ήταν σε πολύ υψηλό ποσοστό σχεδόν 70%, ενώ αντίστοιχα σε μη εγκύους το ποσοστό στελεχών Rib1 + παρουσίαζε αντοχή στην ερυθρομυκίνη λιγότερο και από το ήμισυ αυτού ($p< 0.05$).

Σε όλα τα GBS στελέχη των εγκύων με τα γονίδια, epsilon, Rib, Alp2/3, Alpha C, παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά αντοχής στην ερυθρομυκίνη/κλινδαμυκίνη, 7%, 27.9, 11,6% και 4.7% αντίστοιχα. Είναι προφανές πως η αντοχή στην κλινδαμυκίνη συνυπάρχει σε μεγάλο ποσοστό και με γονίδια ποσκόλλησης και εισβολής. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η μελέτη (Usein CR et al., 2014) στην Ρουμανία, οπου οι πιο κοινοί τύποι του μικροβίου που απομονώθηκαν από γυναίκες φορείς στην περιοχή του Βουκουρεστίου, περιλάμβαναν τα rib+GBSi1+PI-1, rib+GBSi1+PI-1, PI-2b και alp2/3+PI-1, PI-2a. Οι τύποι αυτοί συνδέονταν και με τα καψιδιακά γονίδια και MLST τύπους, cps III/ST-17 και cps V/ST-1.

Στις μη-εγκύους, αντοχή στην ερυθρομυκίνη/κλινδαμυκίνη ήταν συνδεδεμένη στο 14,3%, 9,5%, 14,3% και 4.8%με την παρουσία των γονιδίων Alpha C, Rib, epsilon και alp2/3 αντίστοιχα. Τα Alp2/3+ και Alpha C+ εμφανίζουν παράλληλα αντοχή στις φλουοροκινολόνες (σιπροφλοξασίνη) σε μικρό ποσοστό. Παρόμοιος τύπος με αντοχή στις φουλορκινολόνες αναφέρεται επίσης σε άλλη πρόσφατη μελέτη στην Ρουμανία (Usein CR et al., 2014). Η αντοχή στις φλουροκινολόνες είναι κατά κανόνα χρωμοσωμικής προέλευσης, οφείλεται σε μεταλλάξεις της περιοχής QRDR (quinolone resistance determining region) που κωδικοποιεί τα γονίδια των

τοποισομερασών *GyrA, GyrB* αλλά και στα γονίδια *ParC και ParE* (Wu HM et al., 2008) και δεν σχετίζεται με νησίδες παθογένειας ή μεταθετά στοιχεία. Το γεγονός αυτό, συνηγορεί μάλλον για το ότι υπάρχει ένας τύπος GBS που συνδυάζει γονίδια προσκόλλησης με αντοχή στις φλουοροκινολόνες και μπορεί να μην παρουσιάζει αντοχή στην ερυθρομυκίνη/κλινδαμυκίνη. Πιθανόν αυτός ο τύπος να οφείλεται στην κατάχρηση των φλουροκινολονών. *Υψηλά ποσοστά αντοχής στην ερυρθομυκίνη συνδέονται με την ύπαρξη των γονιδίων Rib, Alpha C, epsilon στις εγκύους. Η συνύπαρξη αντοχής στην ερυθρομυκίνη με τα γονίδια παθογένειας που εδράζονται σε περιοχές υψηλής δυνατότητας ανασυνδιασμού συνηγορεί υπέρ της δυνατότητα διασποράς των γονιδίων και αντοχών αυτών μέσω περιοχών υψηλής δυνατότητας χρωμοσωμικού ανασυνδυασμού.* Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, στα στελέχη GBS που αποικίζουν τις εγκυμονούσες στην Ελλάδα επικρατούν γονίδια προσκόλλησης και εισβολής μαζί με αντοχή στην ερυθρομυκίνη/κλινδαμυκίνη. Το γεγονός παραπέμπει σε μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση εφόσον και ο αποικισμός από τέτοια στελέχη είναι επικίνδυνος για διεισδυτική νόσο στο νεογνό, και η προληπτική αντιβιοθεραπεία παρουσιάζει περιορισμένη επιλογή.

Τα στελέχη που αποικίζουν τις μη-εγκύους επίσης παρουσιάζουν γονίδια προσκόλλησης και σε μικρότερο βαθμό αντοχή στην ερυθρομυκίνη/ κλινδαμυκίνη. Λόγω του ότι, ο GBS παρουσιάζει την ιδιαιτερότητα των γονιδιακών περιοχών υψηλού βαθμού ανασυνδιασμού και των μεταθετών στοιχείων, η διασπορά τέτοιων στελεχών μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω.

Αντοχή σε ερυθρομυκίνη/κλινδαμυκίνη, όπως προαναφέρθηκε, ήταν σχεδόν πάντοτε κοινή και παρουσιάστηκε περίπου στο ήμισυ (48,4%) των στελεχών. Τέσσερα στελέχη μόνον ήταν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη και ευαίσθητα στην κλινδαμυκίνη. Τα 4 αυτά στελέχη προερχόντουσαν από δύο δείγματα κολπικού επιχρίσματος από γυναίκες που είχαν επισκεφτεί το ιατρείο για απλή καλλιέργεια κολπικού και δύο δείγματα από έγκυο γυναίκα. Και τα τέσσερα στελέχη ήταν θετικά στην *Alp2/3.* Σε αυτή τη μελέτη η αντοχή σε ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη πραγματοποιήθηκε με το αντιβιόγραμμα σε στερεό θρεπτικό υλικό και με το D test για την επαγώγιμη αντοχή της κλινδαμυκίνης. Επαγώγιμη αντοχή με το D test παρουσιάστηκε σε περίπου 6.25

% των στελεχών. Από τα 8 στελέχη που παρουσίασαν επαγώγιμη αντοχή τα 6 έφεραν το γονίδιο Rib1 και ανήκαν σε εγκύους.

Η συνύπαρξη γονιδίων παθογένειας με μεταθετά στοιχεία είναι προφανής και σημαίνει πως η διασπορά της αντοχής μπορεί να επεκταθεί περαιτέρω και να δημιουργήσει φαινοτύπους που συνδυάζουν την παθογένεια μαζί με την αντοχή.

Μελέτη περίπτωσης: η επικινδυνότητα του GBS

Ενώ πραγματοποιείτο η διατριβή, χειριστήκαμε ένα δείγμα από περιστατικό δίδυμης, δι-χωριακής, δι-αμνιακής κύησης κατά το οποίο απεβίωσε το ένα εκ των δύο πρόωρων νεογνών. Στον πλακούντα, τον κόλπο, και στην αιμοκαλλιέγεια του νεογνού απομονώθηκε στέλεχος GBS **Rib + ERYR**. Η μητέρα είχε ελεγχθεί σε περιφερειακό εργαστήριο την 29η εβδομάδα και το τέστ για GBS ήταν αρνητικό **(Karakalpakis et al., 2018).** Το γεγονός της αρνητικής καλλιέργειας την 29η εβδομάδα, ερμηνεύεται ως αδυναμία του εργαστηρίου να απομονώσει τον μικροοργανισμό ή ως αποικισμό στο διάστημα των τριών εβδομάδων που μεσολάβησε μέχρι τον τοκετό. Ωστόσο, η πρώτη υπόθεση είναι πιο πιθανή επειδή κατά τη υπερηχογράφημα τα δύο νεογνά παρουσίασαν αυξανόμενη διαφορά στο βάρος κατά περίπου 10%. Και πάλι, το γεγονός ο, τι η θανατηφόρος λοίμωξη επήλθε στο βαρύτερο νεογνό τείνει να ισχυροποιήσει την υπόθεση της «ψευδώς αρνητικής καλλιέργειας».

Πρόληψη: Ναι ή όχι στην καλλιέργεια κατά CDC/CLSI?

Για τους πιο πάνω λόγους (γονίδια παθογένειας, μεταθετά στοιχεία), αλλά και λόγω της επικινδυνότητας της πρώιμης λοίμωξης στα νεογνά όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, και εκ της εμπειρίας που αποκτήθηκε μέσα από αυτή τη μελέτη, είναι προφανές πως ο έλεγχος κατά την οδηγία CDC 2010 είναι απαραίτητος. Η οδηγία ισχύει και σήμερα με υπενθύμιση που έγινε στον ιστότοπο του CDC το 2014.

Ωστόσο η οδηγία του RCOG (Royal College of Obstetricians and gynecologists) που δημοσιεύτηκε το 2017, **ΔΕΝ** συνιστά τον καθολικό έλεγχο. Κατά συνέπεια, νομικά, η θέση του μαιευτήρα μπορεί να είναι σχετικά ασφαλής, μιάς και η τελευταία αυτή οδηγία αποτελεί ένα από στοιχεία

κάλυψης όσον αφορά το φυσιολογικό τοκετό, χωρίς προηγούμενη γέννηση με λοίμωξη, πρόωρο ή δίδυμη κύηση. Η οδηγία RCOG επικεντρώνεται στην πρόληψη σε ειδικές συνθήκες.

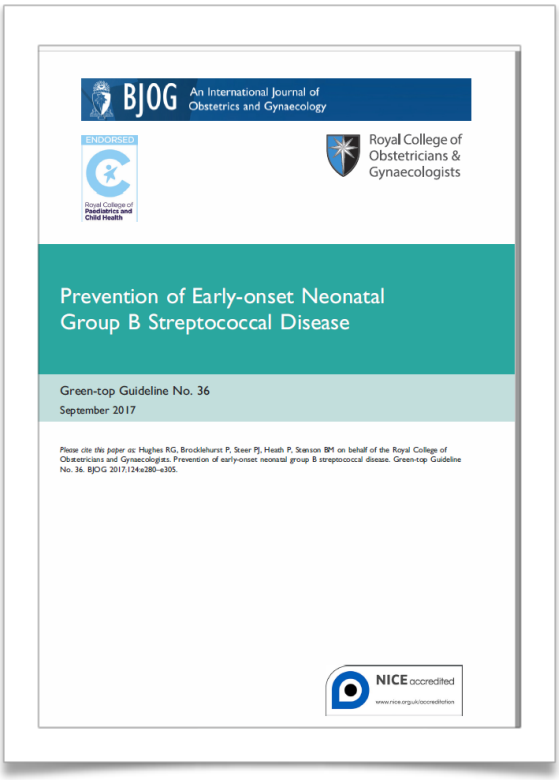
Οδηγία RCOG 2017

(Εμφαση στις ειδικές περιπτώσεις για την πρόληψη)

BJOG An international Journal of Obstetrics and Gynecology. "Prevention of Early-onset Neonatal Group B Streptococcal Disease", Green- top Guideline No 36, September 2017

Πρόληψη της πρώιμης νεογνικής λοίμωξης β αιμολυτικού στρεπτοκόκκου Β.

Πρόκειται για την δεύτερη έκδοση της οδηγίας του 2012, που δημοσιεύτηκε τον Σεπτέμβριο 2017.


BJOG An International Journal of Obstetrics and Gynaecology

ENDORSED Royal College of Paediatrics and Child Health

Royal College of Obstetricians & Gynaecologists

Prevention of Early-onset Neonatal Group B Streptococcal Disease

Green-top Guideline No. 36
September 2017

Please cite this paper as: Hughes RG, Brocklehurst P, Steer PJ, Heath P, Stenson BM on behalf of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease. Green-top Guideline No. 36. BJOG 2017;124:e280–e305.

NICE accredited www.nice.org.uk/accreditation

Η οδηγία εκδόθηκε μετά από συνηθισμένη επιστημονική διεργασία και έρευνα που πραγματοποιήθηκε από εμπειρογνώμονες για την RCOG. Εγινε

έρευνα στην COCHRANE Database, Cochrane Central Register of Controlled trials, [Central], EMBASE, Medline, Trip, για τα δημοσιευμένα άρθρα και περιείχε όλα τα σχετικά άρθρα από τον Ιανουάριο 2011 έως τον Οκτώβριο 2016.

Η έρευνα έγινε με υψηλά πρότυπα αξιολόγησης και όρους και επικεντρώθηκε σε λέξεις κλειδιά όπως:

- *B Streptococcus*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Group B Streptococcus and pregnancy*
- *Streptococcal infections*
- *GBS bacteriuria*

Η έρευνα περιορίστηκε μόνο στην ανθρώπινη λοίμωξη και σε δημοσιεύσεις στην αγγλική γλώσσα. Επικεντρώθηκε επίσης σε σχετικές οδηγίες χρησιμοποιώντας τα ίδια κριτήρια από το “National Guideline Clearinghouse”, «National Institute for Health and care Excellence (NICE)» Evidence Search.

Η οδηγία προτείνει τρόπους πρόληψη της νεογνικής λοίμωξης σε πρόωρο τοκετό. Για την πρόληψη του EOGBS (early onset GBS) προτείνεται ενδοφλέβια αντιμικροβιακή αγωγή με πενικιλλίνη G, μία κεφαλοσπορίνη σε ελαφρά αλλεργία στην πενικιλλίνη ή βανκομυκίνη σε γυναίκες με σοβαρή αλλεργία στην πενικιλλίνη. Παρότι **το RCOG δε συστήνει καθολικό έλεγχο** έναντι του GBS για όλες τις εγκύους γυναίκες. Εαν αυτός τελικά πραγματοποιηθεί, να γίνεται στην 35-37 εβδομάδα της κυήσης ή 3-5 εβδομάδες πρίν από τον τοκετό (πχ 32-34 εβδομάδα, αν πρόκειται για διδύμους). Πιο συγκεκριμένα, αυτό μπορεί να εφαρμόζεται σε γυναίκες που είχαν GBS σε προηγούμενη κύηση, διότι ανάλογα με το αποτέλεσμα, θα πρέπει να ληφθεί η απόφαση της αντιμικροβιακής αγωγής κατά τον τοκετό. Δεν χρησιμεύει η αντιμικροβιακή αγωγή για φορείς που έχουν προγραμματισμένη καισαρική τομή και έχουν ανέπαφες τις μεμβράνες. Η οδηγία επικεντρώνεται στις περιπτώσεις που η αντιμικροβιακή αγωγή είναι απαραίτητη (Πίνακας 4.1, σελ. 109).

Σύμφωνα με την έρευνα του RCOG δεν συστήνεται ο καθολικός μικροβιολογικός έλεγχος όλων των εγκύων για GBS αφού δεν έχουν στοιχεία που να πιστοποιούν ότι ο έλεγχος προσφέρει ουσιαστικά οφέλη. Όπως αναφέρουν πολλές γυναίκες είναι φορείς αλλά τα νεογνά τους δεν εμφανίζουν κάποια λοίμωξη. Επιπλέον ο έλεγχός προς το τέλος της εγκυμοσύνης δεν μπορεί να προβλέψει με ακρίβεια εαν το νεογνό θα νοσήσει απο τον GBS. Το 17% με 25% με θετική καλλιέργεια κολπικού υγρού για GBS στις 35–37 εβδομάδες ανιχνεύοματι αρνητικές κατά τον τοκετό ενώ το 5% με 7% των αρνητικών σε GBS στις 35 με 37 εβδομάδες θα βρεθούν θετικές κατά τον τοκετό. Τέλος πολλά απο τα νεογνά που εμφανίζουν σοβαρή λοίμωξη απο GBS γεννιούνται πρόωρα πριν γίνει ο προγραμματισμένος μικροβιολογικός έλεγχος. Επιπλέον προφυλαχτική αντιβιοθεραπεία κατά τον τοκετό σε όλες τις φορείς του GBS θα σήμαινε ότι ένας μεγάλος αριθμός γυναικών θα λάβαμανε φαρμακευτική αγωγή την οποία δεν θα είχε ανάγκη.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1

- **Παράγοντες κινδύνου (ταυτόχρονη παρουσία 2 και παραπάνω παραγόντων κινδύνου αυξάνει την πιθανότητα λοίμωξης):**
  - **Κύηση <37 εβδομάδες**
  - **Ρήξη υμένων > 18 ώρες**
  - **Θερμοκρασία >38ο C κατά τον τοκετό**
- **Θετική καλλιέργεια κολπικού υγρού ή ούρων για GBS κατά την κύηση και ιδιαίτερα μεταξύ 35ης – 37ης εβδομάδας**
- **Προηγούμενη κύηση με νεογνική λοίμωξη από GBS ή στην περίπτωση όπου δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία εαν στην προηγούμενη κύηση είχε ανιχνευθεί μόνο στη μητέρα φορεία.**
- **βακτηριουρία από GBS στην παρούσα κύηση ή συμπτωματική λοίμωξη**
- **Γυναίκες που βρέθηκαν θετικές στο GBS κατά την παρούσα κύηση (λόγω τυχαίου ή θελημένου ελέγχου)**
- **Γυναίκες -φορείς GBS με πρόωρη ρήξη υμένων, ενώ επί πλέον συνιστάται και άμεση πρόκληση τοκετού**

Οδηγίες RCOG (Green- top Guideline No 36, September 2017): Πότε χορηγείται αντιμικροβιακή αγωγή για το GBS.

Υπάρχει διαφορά ως προς τον καθολικό έλεγχο και την προληπτική χρήση αντιβιοτικών μεταξύ του CDC και RCOG?

Αν παρατηρήσει κανείς τον αλγόριθμο της RCOG, θα δεί, πως η χρήση αντιβιοτικών τελικά γίνεται σε πολλές περιπτώσεις αλλά δε συνιστάται καθολικός έλεγχος. Το δίλημμα είναι λοιπόν: έλεγχος με τα υπέρ και τα κατά του, ή αντιμετώπιση όπως προτείνει η RCOG, κατά περίπτωση?

Η Ελληνική κοινότητα των μαιευτήρων γυναικολόγων θα πρέπει να αποφασίσει τι θα πρέπει να θεσμοθετηθεί και να προταθεί.

Η εμπειρία μας, στα τρία έτη που ολοκληρώθηκε η διατριβή αυτή, δεδομένης της διασποράς παθογόνων στοιχείων και αντοχών στα Ελληνικά μικροβιακά στελέχη, αλλά και της δυνατότητας χρήσης της καλλιέργειας που δεν έχει κόστος, ακόμη και αν προστεθεί στην ρουτίνα των εργαστηρίων ένας εμπλουτιστικός ζωμός, τείνει προς τον καθολικό έλεγχο για GBS στην 35 με 37 εβδομάδα κυήσεως. Πιστεύουμε επίσης, πως ο καθολικός έλεγχος, παρά τα «κατά» που προαναφέραμε, μπορεί να αποτελέσει καλή λύση για την πρόληψη της πρώιμης νεογνικής νόσου GBS, ενώ η χρήση αντιβιοτικών θα περιοριστεί.

European consensus conference

Λόγω των διαφορών στις πρακτικές και οδηγίες και της έλλειψης Εθνικών οδηγιών για την πρόληψη της νεογνικής νόσου από GBS, στην Ευρώπη, το 2014 πραγματοποιήθηκε η Ευρωπαική Συνδιάσκεψη για την συναινετική οδηγία σχετικά με τον έλεγχο φορείας και την χημειοπροφύλαξη (Di Rienzo GC et al., 2014). Η οδηγία συνηγορεί υπέρ του ελέγχου και την, κάτω από συνθήκες, χημειοπροφύλαξη. Ισως η συναινετική Ευρωπαική οδηγία να μπορούσε να υιοθετηθεί ως εθνική οδηγία στην χώρα μας

Τι γίνεται αν στον τοκετό η ασθενής δεν έχει ελεγχθεί; Υπάρχει καλή πρακτική;

1. *Ελεγχος φορείας με ταχεία μέθοδο (μία καλή πρακτική ιδιωτικού μαιευτηρίου)*
2. *Οδηγίες αντιβιοθεραπείας CDC 2010 (αλγόριθμος)*

1. *Ελεγχος φορείας με ταχεία μέθοδο (μία καλή πρακτική ιδιωτικού μαιευτηρίου)*

Η πρόταση του CDC (2010) αναφέρει χωρίς όμως ιδιαίτερες εξηγήσεις, εκτός από την καλλιέργεια που θα πάρει χρόνο, την χρήση NAAT (nucleic acid amplification techniques) τεχνικών για την άμεση ανίχνευση του μικροοργανισμού και την αποφυγή αντιβιοθεραπείας. Ωστόσο, αυτό δεν είναι εφικτό με τις σημερινές συνθήκες, όχι μόνο στην Ελλάδα αλλά και στις ανεπτυγμένες χώρες. Τα εργαστήρια μοριακής διάγνωση, όπου θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί RT PCR πχ, δεν λειτουργούν 24/24, φυσικά διότι οι περισσότερες εξετάσεις μπαίνουν σε ρουτίνα, και δεν εφημερεύουν.

Η λήψη κολπικού υγρού για καλλιέργεια, μπορεί να γίνει πριν την αντιβιοθεραπεία, αλλά το αποτέλεσμα θα αργήσει για τουλάχιστον 24 ώρες.

Μία καλή πρακτική που ακολουθείται στο ιδιωτικό μαιευτήριο από όπου προέρχεται το μεγαλύτερο των δεδομένων αυτής της διατριβής εφαρμόζει στην αίθουσα τοκετών ένα τέστ ανοσοχρωματογραφίας άμεσης ανίχνευσης αντιγόνου GBS στον κόλπο.

Παραδείγματα εμπορευματοποιημένων τέστ άνοσο-χρωματογραφίας

1. ***ULTIMED (γερμανικό)***
2. ***Diasource –GBS cassette test (RAPU014B280) (Βέλγιο)***
3. ***Novamed (Ισραήλ)***

Η ευαισθησία και ειδικότητα των kit που κυκλοφορούν είναι πολύ υψηλή, αλλά θα πρέπει να διερευνάται από τα ίδια τα εργαστήρια που τα χρησιμοποιούν.

2. Οδηγίες Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας του CDC (2010) κατά τον Τοκετό

Η αντιμικροβιακή αγωγή όταν η έγκυος φτάσει στην αίθουσα τοκετών και υπάρχει υποψία φορείας GBS, ή μία από τις περιπτώσεις που χρήζει αγωγής όπως:

- μητέρες με ιστορικό βακτηριουρίας από GBS κατά τη διάρκεια της κύησης
- έγκυες με ιστορικό προηγούμενου τοκετού όπου το νεογνό εμφάνισε επιθετική νόσο από GBS τεκμηριωμένη εργαστηριακά ή κλινικά έγκυες με θετικές καλλιέργειες (πρωκτογεννητική περιοχή) πού έγιναν τη 35η-37η κύησης ή μέσα στις 6 εβδομάδες πριν τον τοκετό (εξαιρούνται όσες προγραμματισμένα θα υποβληθούν σε καισαρική τομή)
- έγκυες για τις οποίες δεν είναι γνωστό αν είναι φορείς του GBS ή όχι με:
  - ➢ ρήξη μεμβρανών για ≥ 18 ώρες
  - ➢ πυρετός κατά τον τοκετό με θερμοκρασία ≥38oC
  - ➢ διάρκεια κύησης <37 εβδομάδες
- επί υποψίας ή απόδειξης χοριοαμνιονίτιδας (μπορεί να χρειαστεί η χορήγηση αντιβιοτικών ευρέος φάσματος) (Verani J. R., 2010).

Αξίζει να σημειωθεί πως η προφυλακτική αντιμικροβιακή αγωγή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης με στόχο την εξάλειψη του αποικισμού του γυναικείου γεννητικού σωλήνα από *S. agalactiae* δεν έχει αποδειχθεί αποτελεσματική (Nandyal R., 2008).

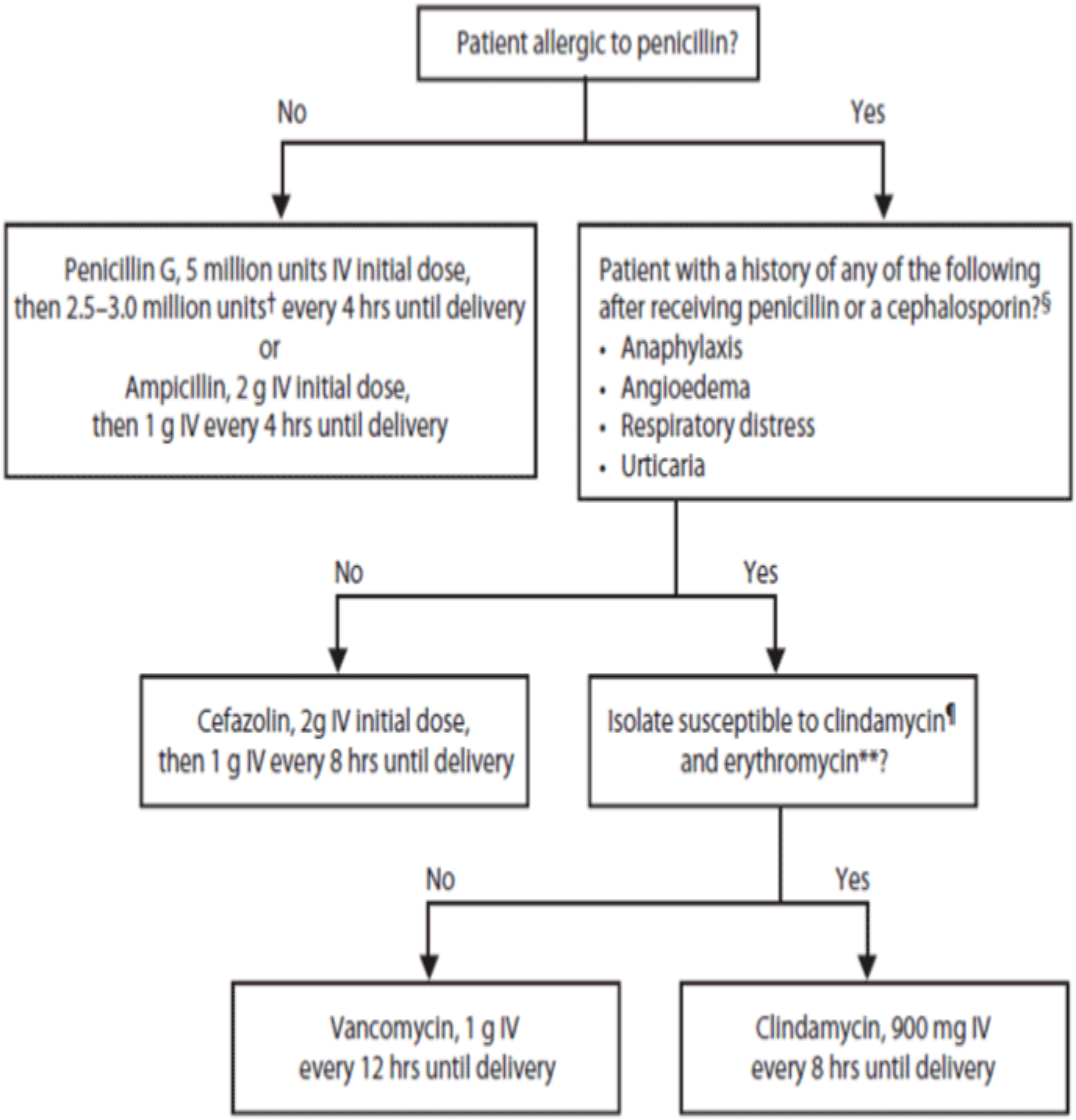
Όπως φαίνεται παρακάτω (Πίνακας 4.2), σύμφωνα με τις αναθεωρημένες οδηγίες του CDC (2010), η πενικιλίνη G παραμένει το φάρμακο εκλογής λόγω της αποτελεσματικής μεταφοράς του μέσω του πλακούντα, του περιορισμένου φάσματος του και του χαμηλού κόστους και ακολουθεί η αμπικιλλίνη ως εναλλακτική επιλογή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.2

- Πενικιλλίνη G: αρχική δόση 5 εκατομ. μονάδες IV και 2.5-3 εκατομ. μονάδες IV κάθε 4 ώρες μέχρι το πέρας του τοκετού.
- Εναλλακτικά αμπικιλλίνη: αρχική δόση 2 γρ. IV και 1γρ. IV κάθε 4 ώρες μέχρι το πέρας του τοκετού.
- Σε ασθενείς αλλεργικές στην πενικιλίνη αλλά χωρίς ιστορικό αναφυλακτικής αντίδρασης, προτείνεται η κεφαζολίνη: αρχική δόση 2 γρ. IV και 1 γρ. IV κάθε 8 ώρες μέχρι το πέρας του τοκετού.
- Αν υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης αναφυλακτικής αντίδρασης και απο τον εργαστηριακό έλεγχο έχει διαπιστωθεί ευαισθησία του *S. agalactiae* στη κλινδαμυκίνη, χορηγείται κλινδαμυκίνη 900 mg IV κάθε 8 ώρες μέχρι το πέρας του τοκετού (η χορήγηση ερυθρομυκίνης δεν υποστηρίζεται πλέον όπως στις οδηγίες του 2002)
- Τέλος εαν υπάρχει ιστορικό αναφυλαξίας και ο στρεπτόκοκκος είναι ανθεκτικός στην κλινδαμυκίνη, συνιστάται: η χορήγηση βανκομυκίνης, 1 g IV κάθε 12 ώρες μέχρι το πέρας του τοκετού.

Οδηγίες Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας του CDC (2010) κατά τον Τοκετό (Ακολουθεί ο αντίστοιχος αλγόριθμος του CDC)

US Centers for Disease Control and Prevention, 2010, pecommended regimens for intrapartum antibiotic prophylaxis for prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) disease



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Ο στρεπτκοκκος Β απομονώθηκε σε ποσοστό 9,8% σε γενικό πληθυσμό γυναικών στην Ελλάδα, σε 12,4 % σε εγκύους και 6,9 σε μη εγκύους γυναίκες.
- Σε μεγάλο ποσοστό τα στελέχη που απομονώθηκαν από εγκύους έφεραν το γονίδιο Rib, και εν συνεχεία τα Alp2/3, Alpha C, e, bac.
- Τα στελέχη που απομονώθηκαν από μη-εγκύους έφεραν επίσης σε υψηλό ποσοστό το γονίδιο Rib, αλλά σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό από ότι σε αυτά που απομονώθηκαν από εγκύους.
- Το γονίδιο Rib συνυπήρχε σε μεγάλο βαθμό με αντοχή στην ερυθρομυκίνη/κλινδαμυκίνη.
- Η μειωμένη ευαισθησία στην πενικιλλίνη είναι περίπου 0,76%, πράγμα που επιβάλλει να πραγματοποιείται το αντιβιόγραμμα.
- Η αντοχή στην ερυρθομυκίνη σε όλα τα στελέχη μαζί ήταν περίπου 48,4% (περίπου όσο και στην κλινδαμυκίνη)- το μεγαλύτερο % αντοχής του GBS που έχει αναφερθεί στην Ελλάδα.
- Το ποσοστό επαγώγιμης αντοχής ατην κλινδαμυκίνη ήταν περίπου 6%, ενώ η χρωιμοσωμική στο μεγαλύτερο αριθμό στελεχών.
- Αντοχή στην σιπροφλοξασίνη παρουσιάστηκε στο περίπου 9,2% των μικροβιακών στελεχών ανεξαρτήτως γονιδίων παθογένειας.
- Η συχνότητα γονιδίων παθογένειας (προσκόλλησης/εισβολής) και αντοχών σε αντιβιοτικά σημαίνει πως ο έλεγχος για φορεία είναι επιβεβλημένος.
- Η χρήση νέων ταχέων και με χαμηλό κόστος διαγνωστικών μέσων (ανοσοχρωματογραφία) ή NAAT μπορεί να αποβεί σημαντικό εργαλείο για τον έλεγχο φορείας ή στην περίπτωση που δεν έχει προηγηθεί έλεγχος φορείας.
- Ο βαθμός ευαισθητοποίησης και ενημέρωσης των μαιευτήρων γυναικολόγων είναι υψηλός για την πρόληψη του GBS , αλλά ο βαθμός ευαισθητοποίησης βιοπαθολόγων όχι.
- Η συμμόρφωση μη την οδηγία CDC 2010 για την πρόληψη της πρώιμης νεογνικής νόσου με καθολικό έλεγχο την 35-37 εβδομάδα στη χώρα μας, είναι εφικτή, με χαμηλό κόστος και βοηθά στην αποφυγή αντιβιοθεραπείας σε αρνητικό αποτέλεσμα .
- Η συμμόρφωση με την οδηγία RCOG 2017 σε ειδικές περιπτώσεις (συγκλείνει με την οδηγία CDC) όσον αφορά την αντιμικροβιακή αγωγή μπορεί και πρέπει να εφαρμόζεται στην Ελλάδα.
- Η Ευρωπαική Συνδιάσκεψη για συναινετική οδηγία συνηγορεί υπέρ του ελέγχου φορείας.
- Πρέπει να υιοθετηθεί οδηγία από τις Εθνικές εταιρείες Μαιευτικής-Γυναικολογίας και βιοπαθολογίας για την πρόληψη της νεογνικής νόσου από GBS.
- Θα πρέπει να υιοθετηθεί στην Ελλάδα Εθνική οδηγία πρόληψης νεογνικής νίσου GBS και η πληρέστερη οδηγία την παρούσα χρονική στιγμή είναι η οδηγία CDC 2010. Εναλλακτικά η Ευρωπαική Συναινετική οδηγία θα μπορούσε επίσης να υιοθετηθεί.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta TA, Coarfa C, et al. A metag-enomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One* (2012) 7(6):e36466. doi:10.1371/ journal.pone. 0036466.
- Abachi S, Lee S, Rupasinghe HP. Molecular mechanisms of inhibition of *Streptococcus* species by phytochemicals. *Molecules* (2016) 21(2): 215. doi:10.3390/molecules21020215.
- Acikgoz ZC, Gamberzade S, Gocer S, Ceylan P. [Inhibitor effect of vaginal lactobacilli on group B streptococci]. *Mikrobiyol Bul* (2005) 39(1):17–23.
- Adderson, E. E., S. Takahashi, Y. Wang, J. Armstrong, D. V. Miller, and J. F. Bohnsack. 2003. Subtractive hybridization identifies a novel predicted protein mediating epithelial cell invasion by virulent serotype III group B *Streptococcus agalactiae*. Infect. Immun. 71:6857–6863.
- Akoh CC, Pressman EK, Cooper E, Queenan RA, Pillittere J, O'Brien KO. Prevalence and risk factors for infections in a pregnant adolescent population. *J Pediatr Adolesc Gynecol* (2017) 30(1):71–5. doi:10.1016/j.jpag.2016.08.001.
- Al Safadi R, Mereghetti L, Salloum M, Lartigue MF, Virlogeux-Payant I, Quentin R, et al. Two-component system RgfA/C activates the *fbsB* gene encoding major fibrinogen-binding protein in highly virulent CC17 clone group B *Streptococcus*. *PLoS One* (2011) 6(2):e14658. doi:10.1371/journal. pone.0014658.
- Alp F, Findik D, Dagi HT, Arslan U, Pekin AT, Yilmaz SA. Screening and genotyping of group B *Streptococcus* in pregnant and non-pregnant women in Turkey. *J Infect Dev Ctries* (2016) 10(3):222–6. doi:10.3855/jidc.6190 31.
- Altoparlak U, Kadanali A, Kadanali S. Genital flora in pregnancy and its association with group B streptococcal colonization. *Int J Gynaecol Obstet* (2004) 87(3):245–6. doi:10.1016/j.ijgo.2004.08.006.
- Anderson, E. T., M. G. Wetherell, L. A. Winter, S. B. Olmsted, P. P. Cleary, and Y. V. Matsuka. 2002. Processing, stability, and kinetic

parameters of C5a peptidase from *Streptococcus pyogenes*. Eur. J. Biochem. 269:4839–4851.

- Ardolino LI, Meloni M, Brugali G, Corsini E, Galli CL. Preclinical evaluation of tolerability of a selective, bacteriostatic, locally active vaginal formulation. *Curr Ther Res Clin Exp* (2016) 83:13–21. doi: 10.1016/j.curtheres.2016.07.002.
- Areschoug, T., F. Carlsson, M. Sta°lhammar-Carlemalm, and G. Lindahl. 2004. Host-pathogen interactions in *Streptococcus pyogenes* infections, with special reference to puerperal fever and a comment on vaccine development. Vaccine 22:S9–S14.
- Areschoug, T., M. Sta°lhammar-Carlemalm, C. Larsson, and G. Lindahl. 1999. Group B streptococcal surface proteins as targets for protective antibodies: identification of two novel proteins in strains of serotype V. Infect. Immun. 67:6350–6357.
- Areschoug, T., M. Sta°lhammar-Carlemalm, I. Karlsson, and G. Lindahl. 2002. Streptococcal _ protein has separate binding sites for human factor H and IgA-Fc. J. Biol. Chem. 277:12642–12648.
- Areschoug, T., S. Linse, M. Sta°lhammar-Carlemalm, L.-O. Hede´n, and G. Lindahl. 2002. A proline-rich region with a highly periodic sequence in streptococcal _ protein adopts the polyproline II structure and is exposed on the bacterial surface. J. Bacteriol. 184:6376–6383.
- Augusta I. Kvam, *et al*. Streptococcus agalactiae Alpha-Like Protein 1 Possesses Both Cross-Reacting and Alp 1-Specific Epitopes. Clinical And Vaccine Immunology, Aug. 2011, Vol. 18, No 8, p. 1365-1370
- Baker, C. J., and D. L. Kasper. 1976. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. N. Engl. J. Med. 294:753–756.
- Baker, C. J., and M. S. Edwards. 2003. Group B streptococcal conjugate vaccines. Arch. Dis. Child. 88:375–378.
- Baker, C. J., L. C. Paoletti, M. A. Rench, H. K. Guttormsen, M. S. Edwards, and D. L. Kasper. 2004. Immune response of healthy women to 2 different group B streptococcal type V capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. J. Infect. Dis. 189:1103–1112.

- Banerjee A, Kim BJ, Carmona EM, Cutting AS, Gurney MA, Carlos C, et al.Bacterial Pili exploit integrin machinery to promote immune activation and efficient blood-brain barrier penetration. *Nat Commun* (2011) 2:462. doi:10.1038/ncomms1474.
- Banks, D. J., S. F. Porcella, K. D. Barbian, J. M. Martin, and J. M. Musser. 2003. Structure and distribution of an unusual chimeric genetic element encoding macrolide resistance in phylogenetically diverse clones of group A *Streptococcus*. J. Infect. Dis. 188:1898–1908.
- Banno H, Kimura K, Tanaka Y, Kitanaka H, Jin W, Wachino J, Yamada K, Shibayama K, Arakawa Y. Characterization of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility forming small non-beta-hemolytic colonies on sheep blood agar plates. J. Clin. Microbiol. 2014. 52:2169–2171.
- Baron, M. J., G. R. Bolduc, M. B. Goldberg, T. C. Auperin, and L. C. Madoff. 2004. Alpha C protein of group B *Streptococcus* binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin-dependent mechanism. J. Biol. Chem. 279:24714–24723.
- Bateman, A., S. R. Eddy, and C. Chothia. 1996. Members of the immunoglobulin superfamily in bacteria. Protein Science (1996). 5:1939-1941.
- Bauserman MS, Laughon MM, Hornik CP, Smith PB, Benjamin DK Jr, Clark RH, et al. Group B *Streptococcus* and *Escherichia coli* infections in the intensive care nursery in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Pediatr Infect Dis J* (2013) 32(3):208–12. doi: 10.1097/INF.0b013e318275058a.
- Bedford H, de Louvois J, Halket S, Peckham C, Hurley R, Harvey D. Meningitis in infancy in England and Wales: follow up at age 5 years. *BMJ* (2001) 323(7312):533–6. doi:10.1136/bmj.323.7312.533.
- Berardi A, Rossi C, Creti R, China M, Gherardi G, Venturelli C, et al. Group B streptococcal colonization in 160 mother-baby pairs: a prospective cohort study. *J Pediatr* (2013) 163(4):1099–104.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2013. 05.064

- Berardi A, Rossi C, Guidotti I, Vellani G, Lugli L, Bacchi Reggiani ML, et al. Factors associated with intrapartum transmission of group B *Streptococcus*. *Pediatr Infect Dis J* (2014) 33(12) :1211–5.
- Berg BR, Houseman JL, terSteeg ZE, LeBar WD, Newton DW· Antimicrobial susceptibilities of group B streptococcus isolates from prenatal screening samples. J Clin Microbiol. 2014 Sep;52(9): 3499-500.
- Betriu C, Gomez, A Sanchez, A Cruceyra, J Romero, and J J Picazo. Antibiotic resistance and penicillin tolerance in clinical isolates of group B streptococci. Antimicrob Agents Chemother. 1994 Sep; 38(9): 2183–2186.
- Bevanger, L. 1983. Ibc proteins as serotype markers of group B streptococci. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B 91:231–234.
- Bevanger, L., and A. I. Naess. 1985. Mouse-protective antibodies against the Ibc proteins of group B streptococci. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B 93:121–124.
- Bodaszewska M Gerbaldo G, Garcia MJ, Giordano W, Pascual L, Barberis IL. Synergistic effect between two bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacilli* strains with inhibitory activity for *Streptococcus agalactiae*. *Curr Microbiol* (2012) 64(4):349–56. doi: 10.1007/s00284-011- 0077-0
- Bodaszewska M, Brzychczy-Wloch M, Gosiewski T, Adamski P, Strus M, Heczko PB. [Evaluation of group B *Streptococcus* susceptibility to lactic acid bacteria strains]. *Med Dosw Mikrobiol* (2010) 62(2):153–61.
- Bodaszewska-Lubas M, Brzychczy-Wloch M, Gosiewski T, Heczko PB. Antibacterial activity of selected standard strains of lactic acid bacteria producing bacteriocins – pilot study. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* (2012) 66:787–94. doi:10.5604/17322693.1015531.
- Boldenow E, Gendrin C, Ngo L, Bierle C, Vornhagen J, Coleman M, et al. Group B *Streptococcus* circumvents neutrophils and neutrophil extracellular traps during amniotic cavity invasion and preterm labor.

Sci Immunol (2016) 1(4):eaah4576. doi:10.1126/sciimmunol.aah4576 181.

- Bolduc, G. R., M. J. Baron, C. Gravekamp, C. S. Lachenauer, and L. C.Madoff. 2002. The alpha C protein mediates internalization of group B Streptococcus within human cervical epithelial cells December 2002 Cellular Microbiology 4(11):751-8
- Boyer KM, Gotoff SP. Prevention of early-onset neonatal group B strepto-coccal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. *N Engl J Med* (1986) 314(26):1665–9. doi:10.1056/ NEJM198606263142603.
- Brantl S, C. Kummer, and D. Behnke (1994). "Complete nucleotide sequence of plasmid pGB3631, a derivative of the Streptococcus agalactiae plasmid pIP501". Gene. Volume 142, Issue 1, p. 155-156, May 1994.
- Brigtsen AK, Jacobsen AF, Dedi L, Melby KK, Fugelseth D, Whitelaw A. Maternal colonization with group B *Streptococcus* is associated with an increased rate of infants transferred to the neonatal intensive care unit. *Neonatology* (2015) 108(3):157–63. doi:10.1159/000434716 16.
- Brzychczy-Wloch M, Pabian W, Majewska E, Zuk MG, Kielbik J, Gosiewski T, et al. Dynamics of colonization with group B streptococci in relation to normal flora in women during subsequent trimesters of pregnancy. *New Microbiol* (2014) 37(3):307–19.
- Buscetta M, Papasergi S, Firon A, Pietrocola G, Biondo C, Mancuso G, et al. FbsC, a novel fibrinogen-binding protein, promotes S*treptococcus agalactiae*-host cell interactions. *J Biol Chem* (2014) 289(30):21003–15. doi:10.1074/ jbc.M114.553073 .
- Capan-Melser M, Mombo Ngoma G, Akerey-Diop D, Basra A, Wurbel H, Groger M, et al. Evaluation of intermittent preventive treatment of malaria against group B *Streptococcus* colonization in pregnant women: a nested analysis of a randomized controlled clinical trial of sulfadoxine/pyrimeth-amine versus mefloquine. *J Antimicrob Chemother* (2015) 70(6):1898–902. doi:10.1093/jac/dkv041.

- Capraro GA, Rambin ED, Vanchiere JA, Bocchini JA Jr, Matthews-Greer JM. High rates of inducible clindamycin resistance among prenatal group B streptococcal isolates in one northwest Louisiana academic medical center. J Clin Microbiol. 2013 Jul; 51(7):2469.
- Carey AJ, Tan CK, Mirza S, Irving-Rodgers H, Webb RI, Lam A, et al. Infection and cellular defense dynamics in a novel 17beta-estradiol murine model of chronic human group B *Streptococcus* genital tract colonization reveal a role for hemolysin in persistence and neutrophil accumulation. *J Immunol* (2014) 192(4):1718–31. doi:10.4049/jimmunol.1202811.
- Cavaco CK, Patras KA, Zlamal JE, Thoman ML, Morgan EL, Sanderson SD, et al. A novel C5a-derived immunobiotic peptide reduces *Streptococcus agalactiae* colonization through targeted bacterial killing. *Antimicrob Agents Chemother* (2013) 57(11):5492–9. doi:10.1128/AAC.01590-13.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Antimicrobial susceptibilities among group B *Streptococcus* isolates—Active Bacterial Core Surveillance (ABCs), 2010. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, Group B Streptococcus, 2014*. (2014). Report No gbs14. Centers for Disease Control and Prevention.
- Chan GJ, Lee AC, Baqui AH, Tan J, Black RE. Prevalence of early-onset neonatal infection among newborns of mothers with bacterial infection or colonization: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* (2015) 15:118. doi:10.1186/s12879-015-0813-3.
- Chang, L.-Y. Maternal colonization and neonatal group B streptococcal infection: time to universal screening and intrapartum chemoprophylaxis in Taiwan? *Pediatr Neonatol* 52, 181-182 (2011).
- Cheng Q, Stafslien D, Purushothaman SS, Cleary P. The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an

invasin. *Infect Immun* (2002) 70(5):2408–13. doi:10.1128/IAI.70.5.2408-2413.2002,

- Chhatwal, G. S. 2002. Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. Trends Microbiol. 10:205–208.
- Chmouryguina, I., A. Suvorov, P. Ferrieri, and P. P. Cleary. 1996. Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. Infect. Immun. 64:2387–2390.
- CLSI. 2013. Performance Standards fro antimicrobial susceptibility testing; 23rd informational susceptibility suppl. , M -100 S23 Vol 33., CLSI, Wayne, PA.
- Cossart, P., and R. Jonquie`res. 2000. Sortase, a universal target for therapeutic agents against gram-positive bacteria? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 5013–5015.
- Creti, R., F. Fabretti, G. Orefici, and C. von Hunolstein. 2004. Multiplex PCR assay for direct identification of group B streptococcal alpha-proteinlike protein genes. J. Clin. Microbiol. 42:1326–1329.
- Cucarella, C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa, and J. R. Penade´s. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilmformation. J. Bacteriol. 183:2888–2896.
- Daskalakis G., Papapanagiotou A., Mesogitis S., MavromatisK. Antsaklis A. Bacterial Vaginosis and Group B Streptococcal Colonization and Preterm Delivery in a Low-Risk Population. Diagn Ther 2006;21:172–176
- De Gregorio PR, Juarez Tomas MS, Leccese Terraf MC, Nader-Macias ME. In vitro and in vivo effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens responsible for urogenital tract infections. *J Med Microbiol* (2014) 63 (Pt 5):685–96. doi:10.1099/jmm.0.069401.
- De Gregorio PR, Juarez Tomas MS, Leccese Terraf MC, Nader-Macias ME. Preventive effect of *Lactobacillus reuteri* CRL1324 on Group B *Streptococcus* vaginal colonization in an experimental mouse model. *J Appl Microbiol* (2015) 118(4):1034–47. doi:10.1111/jam.12739.

- De Gregorio PR, Juarez Tomas MS, Nader-Macias ME. Immunomodulation of *Lactobacillus reuteri* CRL1324 on group B *Streptococcus* vaginal col-onization in a murine experimental model. *Am J Reprod Immunol.* 2016 Jan;75(1):23-35. doi: 10.1111/aji.12445
- de-Paris, F. *et al.* Group B Streptococcus detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women. *Braz J Infect Dis* 15, 323-327 (2011).
- de Tejada, B. M. *et al.* Intrapartum Group B streptococcus detection by rapid polymerase chain reaction assay for the prevention of neonatal sepsis. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1786-1791 (2011).
- Dehbashi S, Pourmand MR, Mashhadi R. Characterization of Afb, a novel bifunctional protein in *Streptococcus agalactiae*. *Iran J Microbiol* (2016) 8(1):73–9.
- Dermer, P., Lee, C., Eggert, J. & Few, B. A history of neonatal group B streptococcus with its related morbidity and mortality rates in the United States. *J Pediatr Nurs* 19, 357-363 (2004).
- Deutscher M, Lewis M, Zell ER, Taylor TH Jr, Van Beneden C, Schrag S, et al. Incidence and severity of invasive *Streptococcus pneumoniae*, group A *Streptococcus*, and group B *Streptococcus* infections among pregnant and postpartum women. *Clin Infect Dis* (2011) 53(2):114–23. doi:10.1093/cid/ cir325.
- Devi AS, Ponnuraj K. Cloning, expression, purification and ligand binding studies of novel fibrinogen-binding protein FbsB of *Streptococcus agalactiae*. *Protein Expr Purif* (2010) 74(2):148–55. doi: 10.1016/j.pep.2010.07.004.
- Dhouioui M, Boulila A, Jemli M, Schiets F, Casabianca H, Zina MS. Fatty acids composition and antibacterial activity of *Aristolochia longa* L. and *Bryonia dioica* Jacq. growing wild in Tunisia. *J Oleo Sci* (2016) 65(8):655–61. doi:10.5650/jos.ess16001.
- Di Renzo G. C., P. Melin , A. Berardi , M. Blennow, X. Carbonell-Estrany, G. P. Donzelli , S. Hakansson , M. Hod , R. Hughes , M. Kurtzer, C. Poyart, E. Shinwell, B. Stray-Pedersen, M. Wielgos, and N. El Helali. J Intrapartum GBS screening and antibiotic prophylaxis: a

European consensus conference Matern Fetal Neonatal Med, Early Online: 1–17 ! 2014.

- Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. BJOG. 2002 Jan;109(1):34-43.
- Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AK, Cousens S, et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet* (2012) 379(9815):547–56. doi:10.1016/S0140-6736(11)61651-6.
- Edwards, M. S., and C. J. Baker. 2001. Group B streptococcal infections, p. 1091–1156. *In* J. S. Remington and J. O. Klein (ed.), Infectious diseases of the fetus and the newborn infant. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.
- Edwards MS, Rench MA, Palazzi DL, Baker CJ. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in healthy elderly persons. *Clin Infect Dis* (2005) 40(3):352–7. doi: 10.1086/426820.
- Entrez Genome (α). Streptococcus agalactiae NEM316 genome project. Project ID: 33, p.1 (online), Institut Pasteur.
- Entrez Genome (β). Streptococcus agalactiae genome project taxonomy id: 1311, p. 1 (online).
- Fairlie T, Zell ER, Schrag S. Effectiveness of intrapartum antibiotic prophy-laxis for prevention of early-onset group B streptococcal disease. *Obstet Gynecol* (2013) 121(3):570–7. doi:10.1097/AOG. 0b013e318280d4f6.
- Falagas M, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect* (2007) 13(7): 657–64. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01688.x.
- Falagas ME, Rosmarakis ES, Avramopoulos I, Vakalis N. Streptococcus agalactiae infections in non-pregnant adults: single center experience of a growing clinical problem. Med Sci Monit. 2006 Nov;12(11):CR447-51.

- Fanrong Kong, *et al*. Molecular Profiles of Group B Streptococcal Surface Protein Antigen Genes: Relationship to Molecular Serotypes, Journal Of Clinical Microbiology, Feb. 2002, Vol. 40, No. 2, p. 620–626.
- Ferretti, J. J., W. M. McShan, D. Ajdic, D. J. Savic, G. Savic, K. Lyon, C. Primeaux, S. Sezate, A. N. Suvorov, S. Kenton, H. S. Lai, S. P. Lin, Y. Qian, H. G. Jia, F. Z. Najar, Q. Ren, H. Zhu, L. Song, J. White, X. Yuan, S. W. Clifton, B. A. Roe, and R. McLaughlin. 2001. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 4658–4663.
- Ferrieri P, Baker CJ, Hillier SL, Flores AE. Diversity of surface protein expres-sion in group B streptococcal colonizing & invasive isolates. *Indian J Med Res* (2004) 119(Suppl):191–6.
- Ferrieri, P. 1988. Surface-localized protein antigens of group B streptococci. Rev. Infect. Dis. 10(Suppl. 2):S363–S366.
- Fischetti, V. A. 1989. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. Clin. Microbiol. Rev. 2:285–314.
- Franken C, Haase G, Brandt C, Weber-Heynemann J, Martin S, Lammler C, Franken, C., G. Haase, C. Brandt, J. Weber-Heynemann, S. Martin, C. La¨mmler, A. Podbielski, R. Lu¨tticken, and B. Spellerberg. 2001. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. Mol. Microbiol. 41:925–935.
- Fuchslocher, B., L. L. Millar, and P. A. Cotter. 2003. Comparison of *bipA* alleles within and across *Bordetella* species. Infect. Immun. 71:3043–3052.
- Galan, J. E. 1998. 'Avirulence genes' in animal pathogens? Trends Microbiol. 6:3–6.
- Gardner SE, Yow MD, Leeds LJ, Thompson PK, Mason EO Jr, Clark DJ. Failure of penicillin to eradicate group B streptococcal colonization in the pregnant woman. A couple study. *Am J Obstet Gynecol* (1979) 135(8):1062–5. doi:10.1016/0002-9378(79)90737-3.

- Gaudreau C, Lecours R, Ismail J, Gagnon S, Jetté L, Roger M. Prosthetic hip joint infection with a Streptococcus agalactiae isolate not susceptible to penicillin G and ceftriaxone. J. Antimicrob. Chemother. 2010. 65:594–595.
- Gibson, R. L., M. K. Lee, C. Soderland, E. Y. Chi, and C. E. Rubens. 1993. Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion. Infect. Immun. 61:478–485.
- Gilbert GL, Hewitt MC, Turner CM, Leeder SR. Compliance with protocols for prevention of neonatal group B streptococcal sepsis: practicalities and limitations. *Infect Dis Obstet Gynecol* (2003) 11(1): 1–9. doi:10.1155/ S1064744903000012.
- Gilbert GL Vaccines for other neonatal infections: are group B streptococcal infections vaccine-preventable? *Expert Rev Vaccines* 2004, vol 4 pg. 371-4
- Glaser, P., C. Rusniok, C. Buchrieser, F. Chevalier, L. Frangeul, T. Msadek, M. ouine, E. Couve´, L. Lalioui, C. Poyart, P. Trieu-Cuot, and F. Kunst. 2002. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. Mol.Microbiol. 45:1499–1513.
- Gravekamp, C., D. L. Kasper, J. L. Michel, D. E. Kling, V. Carey, and L. C. Madoff. 1997. Immunogenicity and protective efficacy of the alpha C protein of group B streptococci are inversely related to the number of repeats. Infect. Immun. 65:5216–5221.
- Gutekunst, H., B. J. Eikmanns, and D. J. Reinscheid. 2003. Analysis of RogB-controlled virulence mechanisms and gene repression in *Streptococcus agalactiae*. Infect. Immun. 71:5056–5064.
- Gutekunst, H., B. J. Eikmanns, and D. J. Reinscheid. 2004. The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. Infect. Immun. 72:3495–3504.
- Hall RT, Barnes W, Krishnan L, Harris DJ, Rhodes PG, Fayez J, et al. Antibiotic treatment of parturient women colonized with group B strepto-cocci. *Am J Obstet Gynecol* (1976) 124(6):630–4. doi: 10.1016/0002-9378(76) 90065-X

- Hamburger, Z. A., M. S. Brown, R. R. Isberg, and P. J. Bjorkman. 1999. Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. Science 286:291–295.
- Harris, T. O., D. W. Shelver, J. F. Bohnsack, and C. E. Rubens. 2003. A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. J. Clin. Investig. 111: 61–70.
- Harrison, L. H., J. A. Elliott, D. M. Dwyer, J. P. Libonati, P. Ferrieri, L. Billmann, and A. Schuchat. 1998. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. J. Infect. Dis. 177:998–1002.
- Hauge, M., C. Jespersgaard, K. Poulsen, and M. Kilian. 1996. Population structure of *Streptococcus agalactiae* reveals an association between specific evolutionary lineages and putative virulence factors but not disease. Infect. Immun. 64:919–925.
- Heath PT, Schuchat A. Perinatal group B streptococcal disease. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2007 Jun;21(3):411-24.
- Heath, P. T., G. Balfour, A. M. Weisner, A. Efstratiou, T. L. Lamagni, H. Tighe, L. A. O'Connell, M. Cafferkey, N. Q. Verlander, A. Nicoll, and A. C. McCartney. 2004. Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days. Lancet 363:292–294.
- Hill JB, Sheffield JS, McIntire DD, Wendel GD Jr. Acute pyelonephritis in pregnancy. *Obstet Gynecol* (2005) 105(1):18–23. doi: 10.1097/01.AOG. 0000149154.96285.a0
- Hede´n, L.-O., E. Frithz, and G. Lindahl. 1991. Molecular characterization of an IgA receptor from group B streptococci: sequence of the gene, identification of a proline-rich region with unique structure and isolation of N-terminal fragments with IgA-binding capacity. Eur. J. Immunol. 21:1481– 1490.
- Helmig, R., N. Uldbjerg, J. Boris, and M. Kilian. 1993. Clonal analysis of *Streptococcus agalactiae* isolated from infants with neonatal sepsis or meningitis and their mothers and from healthy pregnant women. J. Infect. Dis. 168:904–909.

- Hill JB, Sheffield JS, McIntire DD, Wendel GD Jr. Acute pyelonephritis in pregnancy. *Obstet Gynecol* (2005) 105(1):18–23. doi: 10.1097/01.AOG. 0000149154.96285.a0
- Ho M, Chang YY, Chang WC, Lin HC, Wang MH, Lin WC, et al. Oral *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 to reduce group B *Streptococcus* colonization in pregnant women: a randomized controlled trial. *Taiwan J Obstet Gynecol* (2016) 55(4): 515–8. doi:10.1016/j.tjog.2016.06.003
- Homayouni A, Bastani P, Ziyadi S, Mohammad-Alizadeh-Charandabi S, Ghalibaf M, Mortazavian AM, et al. Effects of probiotics on the recurrence of bacterial vaginosis: a review. *J Low Genit Tract Dis* (2014) 18(1):79–86. doi:10.1097/LGT.0b013e31829156ec
- Honig E, Mouton JW, van der Meijden WI. Can group B streptococci cause symptomatic vaginitis? *Infect Dis Obstet Gynecol* (1999) 7(4): 206–9. doi:10.1155/S1064744999000368
- Hughes, M. J., 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. M. Greer, T. Paxton, M. Panico, H. R. Morris, R. G. Feldman, and J. D. Santangelo. 2002. Identification of major outer surface proteins of *Streptococcus agalactiae*. in proteins. Biochem. J. 297:249–260.
- Hull JR, Tamura GS, Castner DG. Interactions of the streptococcal C5a peptidase with human fibronectin. *Acta Biomater* (2008) 4(3): 504–13. doi:10.1016/j.actbio.2008.01.009.
- Jardetzky, T. S., J. H. Brown, J. C. Gorga, L. J. Stern, R. G. Urban, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1996. Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:734–738.
- Jarva, H., J. Hellwage, T. S. Jokiranta, M. J. Lehtinen, P. F. Zipfel, and S. Meri. 2004. The group B streptococcal _ and pneumococcal Hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion. J. Immunol. 172:3111–3118.

- Jenkinson, H. F. 1994. Cell surface protein receptors in oral streptococci. FEMS Microbiol. Lett. 121:133–140.
- Jensen NE, Andersen BL. The prevalence of group B streptococci in human urogenital secretions. *Scand J Infect Dis* (1979) 11(3):199–202. doi:10.3109/ inf.1979.11.issue-3.04
- Jerlstro¨m, P. G., G. S. Chhatwal, and K. N. Timmis. 1991. The IgA-binding _ antigen of the c protein complex of group B streptococci: sequence determination of its gene and detection of two binding regions. Mol. Microbiol. 5:843–849.
- Jiang S, Wessels MR. BsaB, a novel adherence factor of group B *Streptococcus*. *Infect Immun* (2014) 82(3):1007–16. doi:10.1128/IAI.01014-13.
- Johnson, D. R., and P. Ferrieri. 1984. Group B streptococcal Ibc protein antigen: distribution of two determinants in wild-type strains of common serotypes. J. Clin. Microbiol. 19:506–510.

- Johnson, D. R., and P. Ferrieri. 1984. Group B streptococcal Ibc protein antigen: distribution of two determinants in wild-type strains of common serotypes. J. Clin. Microbiol. 19:506–510.

- Johri A.K, Paoletti L C, Glaser P, Dua M Sharma P K. Grandi G & R Rappuoli Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development *Nature Reviews Microbiology* volume 4, pages 932–942 (2006) doi:10.1038/nrmicro1552.
- Jones N, *et al*. Multilocus Sequence Typing System for Group B Streptococcus. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 41, No. 6, June 2003, p. 2530–2536.
- Jonquie`res, R., H. Bierne, F. Fiedler, P. Gounon, and P. Cossart. 1999. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of grampositive bacteria. Mol. Microbiol. 34:902–914.
- Joubert L, Dagieu JB, Fernandez A, Derre-Bobillot A, Borezee-Durant E, Fleurot I, et al. Visualization of the role of host heme on the virulence of the heme auxotroph *Streptococcus agalactiae*. *Sci Rep* (2017) 7:40435. doi:10.1038/srep40435

- Juarez Tomas MS, Saralegui Duhart CI, De Gregorio PR, Vera Pingitore E, Nader-Macias ME. Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal *Lactobacillus* strains to be considered as probiotic candidates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (2011) 159(2):399–406. doi:10.1016/j.ejogrb. 2011.07.010 278.
- Ka¨llman, J., and E. Kihlstro¨m. 1997. Penetration of group B streptococci through polarized Madin-Darby canine kidney cells. Pediatr. Res. 42:799– 804.
- Kalliola, S., J. Vuopio-Varkila, A. K. Takala, and J. Eskola. 1999. Neonatal group B streptococcal disease in Finland: a ten-year nationwide study. Pediatr. Infect. Dis. J. 18:806–810.
- Keefe, G. P. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. Can. Vet. J. 38:429–437.
- Kehoe, M. A. 1994. Cell-wall-associated proteins in gram-positive bacteria. New Comp. Biochem. 27:217–261.
- Kessous R, Weintraub AY, Sergienko R, Lazer T, Press F, Wiznitzer A, et al. Bacteruria with group-B *Streptococcus*: is it a risk factor for adverse pregnancy outcomes? *J Matern Fetal Neonatal Med* (2012) 25(10):1983–6. doi:10.3109/14767058.2012.671872
- Khan MA, Faiz A, Ashshi AM. Maternal colonization of group B *Streptococcus*: prevalence, associated factors and antimicrobial resistance. *Ann Saudi Med* (2015) 35(6):423–7. doi: 10.5144/0256-4947.2015.423
- Kihlberg, B. M., J. Cooney, M. G. Caparon, A. Olse´n, and L. Bjo¨rck. 1995. Biological properties of a *Streptococcus pyogenes* mutant generated by Tn*916* insertion in *mga*. Microb. Pathog. 19:299–315.
- Kimura K, Suzuki S, Wachino J, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, Nagano N, Kato H, Shibayama K, Arakawa Y. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Aug;52(8):2890-7.
- Kling, D. E., C. Gravekamp, L. C. Madoff, and J. L. Michel. 1997. Characterization of two distinct opsonic and protective epitopes within

the alpha C protein of the group B *Streptococcus*. Infect. Immun. 65:1462–1467.

- Knudtson, E. J. *et al.* The effect of digital cervical examination on group B streptococcal culture. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202, 58.e1-4 (2010).
- Koenig JM, Keenan WJGroup B streptococcus and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. Pediatr Clin North Am. 2009 Jun; 56(3):689-708.
- Kogan, G., D. Uhrin, J. R. Brisson, L. C. Paoletti, A. E. Blodgett, D. L Kasper, and H. J. Jennings. 1996. Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. J. Biol. Chem. 271:8786–8790.
- Kong, F., S. Gowan, D. Martin, G. James, and G. L. Gilbert. 2002. Molecular profiles of group B streptococcal surface protein antigen genes: relationship to molecular serotypes. J. Clin. Microbiol. 40:620–626.
- Krohn MA, Hillier SL, Baker CJ. Maternal peripartum complications associated with vaginal group B streptococci colonization. *J Infect Dis* (1999) 179(6):1410–5. doi:10.1086/314756,
- Kubota T, Nojima M, Itoh S. Vaginal bacterial flora of pregnant women colonized with group B *Streptococcus*. *J Infect Chemother* (2002) 8(4):326–30. doi:10.1007/s10156-002-0190-x .
- Kwatra G, Adrian PV, Shiri T, Buchmann EJ, Cutland CL, Madhi SA. Serotype-specific acquisition and loss of group B *Streptococcus* recto-vaginal colonization in late pregnancy. *PLoS One* (2014) 9(6):e98778. doi:10.1371/ journal.pone.0098778
- Kwatra G, Cunnington MC, Merrall E, Adrian PV, Ip M, Klugman KP, et al. Prevalence of maternal colonisation with group B *Streptococcus*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* (2016) 16(9): 1076– 84. doi:10.1016/S1473-3099(16)30055-X
- Lachenauer, C. S., and L. C. Madoff. 1996. A protective surface protein from type V group B streptococci shares N-terminal sequence homology with the alpha C protein. Infect. Immun. 64:4255–4260.

- Lachenauer, C. S., C. J. Baker, M. J. Baron, D. L. Kasper, C. Gravekamp, and L. C. Madoff. 2002. Quantitative determination of immunoglobulin G specific for group B streptococcal _ C protein in human maternal serum. J. Infect. Dis. 185:368–374.
- Lachenauer, C. S., D. L. Kasper, J. Shimada, Y. Ichiman, H. Ohtsuka, M. Kaku, L. C. Paoletti, P. Ferrieri, and L. C. Madoff. 1999. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. J. Infect. Dis. 179:1030–1033.
- Lachenauer, C. S., R. Creti, J. L. Michel, and L. C. Madoff. 2000. Mosaicism in the alpha-like protein genes of group B streptococci. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:9630–9635.
- Lancefield, R. C. 1934. A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B). J. Exp. Med. 59:441–458. 134.
- Lancefield, R. C., and E. H. Freimer. 1966. Type-specific polysaccharide antigens of group B streptococci. J. Hyg. (London) 64:191–203.
- Lancefield, R. C., and G. E. Perlmann. 1952. Preparation and properties of a protein (R antigen) occuring in streptococci of group A, type 28, and in certain streptococci of other serological groups. J. Exp. Med. 96:83–97.
- Lancefield, R. C., M. McCarty, and W. N. Everly. 1975. Multiple mouseprotective antibodies directed against group B streptococci. Special reference to antibodies effective against protein antigens. J. Exp. Med. 142:165– 179.
- Larsson, C., J. Holmgren, G. Lindahl, and C. Bergquist. 2004. Intranasal immunization of mice with group B streptococcal protein Rib and cholera toxin B subunit confers protection against lethal infection. Infect. Immun. 72:1184–1187.
- Larsson, C., M. Sta°lhammar-Carlemalm, and G. Lindahl. 1996. Experimental vaccination against group B streptococcus, an encapsulated bacterium, with highly purified preparations of cell surface proteins Rib and _. Infect. Immun. 64:3518–3523.

- Larsson, C., M. Sta°lhammar-Carlemalm, and G. Lindahl. 1999. Protection against experimental infection with group B streptococcus by immunization with a bivalent protein vaccine. Vaccine 17:454–458.
- Lawn JE, Cousens S, Zupan J; The Lancet Neonatal Survival Steering Team. 4 Million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet* (2005) 365(9462): 891–900. doi:10.1016/S0140-6736(05)71048-5.
- Leclerq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Inf Dis, 2002. 34: 482-92.
- Le Doare K, Heath PT. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine* (2013) 31(Suppl 4):D7–12. doi:10.1016/j.vaccine.2013.01.009.
- Liakopoulos A, Mavroidi A, Vourli S, Panopoulou M, Zachariadou L, Chatzipanagiotou S, Spiliopoulou I, Zerva L, Petinaki E. Molecular characterization of Streptococcus agalactiae from vaginal colonization and neonatal infections: a 4-year multicenter study in Greece. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014 Apr;78(4)
- Lin, F. Y., J. D. Clemens, P. H. Azimi, J. A. Regan, L. E. Weisman, J. B. Philips III, G. G. Rhoads, P. Clark, R. A. Brenner, and P. Ferrieri. 1998. Capsular polysaccharide types of group B streptococcal isolates from neonates with early-onset systemic infection. J. Infect. Dis. 177:790–792.
- Lindahl, G., B. A° mkerstro¨m, J.-P. Vaerman, and L. Stenberg. 1990. Characterization of an IgA receptor from group B streptococci: specificity for serum IgA. Eur. J. Immunol. 20:2241–2247.
- Lindahl, G., U. Sjo¨bring, and E. Johnsson. 2000. Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms. Curr. Opin. Immunol. 12:44–51.
- Lindahl G, Stålhammar-Carlemalm M, Areschoug T. Surface proteins of Streptococcus agalactiae and related proteins in other bacterial pathogens. Clin Microbiol Rev. 2005 Jan;18(1):102-27.
- Linde´n, V. 1983. Mouse-protective effect of rabbit anti-R-protein antibodies against group B streptococci type II carrying R-protein.

Lack of effect on type III carrying R-protein. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B 91:145–151.

- Liszewski, M. K., T. C. Farries, D. M. Lublin, I. A. Rooney, and J. P. Atkinson. 1996. Control of the complement system. Adv. Immunol. 61:201– 283.
- Luo, Y., E. A. Frey, R. A. Pfuetzner, A. L. Creagh, D. G. Knoechel, C. A. Haynes, B. B. Finlay, and N. C. Strynadka. 2000. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. Nature 405: 1073–1077.
- Luck, S., M. Torny, K. d'Agapeyeff, A. Pitt, P. Heath, A. Breathnach, and A. B. Russell. 2003. Estimated early-onset group B streptococcal neonatal disease. Lancet 361:1953–1954.
- Lutticken R, et al. Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, M. J. Patterson, S. Baron, et al, eds. "Streptococcus." Baron's Medical Microbiology, Section 1, Chapter 13, pp. 1 (on website), 4th ed. (1996), Univ of Texas Medical Branch.
- Madoff, L. C., L. C. Paoletti, J. Y. Tai, and D. L. Kasper. 1994. Maternal immunization of mice with group B streptococcal type III polysaccharidebeta C protein conjugate elicits protective antibody to multiple serotypes. J. Clin. Investig. 94:286–292.
- Maeland J, Afset Jan E Lyng R V., Radtke A Survey of Immunological Features of the Alpha-Like Proteins of *Streptococcus agalactiae* Clinical and Vaccine Immunology February 2015 Volume 22 Number 2
- Maisey HC, Doran KS, Nizet V. Recent advances in understanding the molec-ular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev Mol Med* (2008) 10:e27. doi:10.1017/S1462399408000811.
- Malburny B, Werno AM, Murdoh DR, Leclercq R, Cattoir V. Cross-resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins due to the lsa(C) gene in Streptococcusagalactiae UCN70. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(4):1470-74.
- Manning SD, Lewis MA, Springman AC, Lehotzky E, Whittam TS, Davies HD. Genotypic diversity and serotype distribution of group B

Streptococcus isolated from women before and after delivery. *Clin Infect Dis* (2008) 46(12):1829–37. doi:10.1086/588296.

- Marques, M. B., D. L. Kasper, M. K. Pangburn, and M. R. Wessels. 1992. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. Infect. Immun. 60:3986–3993.
- Mathews CK, KE van Holde and KG Ahern. 2000. Carbohydrates. Biochemistry (3rd ed.) pp.308.
- McKenna, D. S. & Iams, J. D. Group B streptococcal infections. *Semin. Perinatol.* 22, 267-276 (1998).
- McLean, J. W., J. E. Tomlinson, W. J. Kuang, D. L. Eaton, E. Y. Chen, G. M. Fless, A. M. Scanu, and R. M. Lawn. 1987. cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. Nature 330:132–137.
- Michel, J. L., L. C. Madoff, D. E. Kling, D. L. Kasper, and F. M. Ausubel. 1991. Cloned alpha and beta C-protein antigens of group B streptococci elicit protective immunity. Infect. Immun. 59:2023–2028.
- Michel, J. L., L. C. Madoff, K. Olson, D. E. Kling, D. L. Kasper, and F. M. Ausubel. 1992. Large, identical, tandem repeating units in the C protein alpha antigen gene, *bca*, of group B streptococci. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10060–10064.
- Mitchell, T. J. 2003. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. Nat. Rev. Microbiol. 1:219–230.
- Mohamed, J. A., W. Huang, S. R. Nallapareddy, F. Teng, and B. E. Murray. 2004. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect. Immun. 72:3658–3663.
- Moncla BJ, Pryke K, Isaacs CE. Killing of *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*), *Haemophilus ducreyi*, and vaginal *Lactobacillus* by 3-O-octyl-sn-glycerol. *Antimicrob Agents Chemother* (2008) 52(4):1577–9. doi:10.1128/AAC.01023-07.

- Morales, W. J., Dickey, S. S., Bornick, P. & Lim, D. V. Change in antibiotic resistance of group B streptococcus: impact on intrapartum management. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 181, 310-314 (1999).
- Morandi V, et al. Metallopeptidases produced by group B *Streptococcus*: *Mucosal Immunol* (2015) 8(6):1339–48. doi:10.1038/mi.2015.23.
- Mu R, Cutting AS, Del Rosario Y, Villarino N, Stewart L, Weston TA, et al. Identification of CiaR regulated genes that promote group B streptococcal virulence and interaction with brain endothelial cells. *PLoS One* (2016) 11(4):e0153891. doi:10.1371/journal.pone.0153891.
- Muller AE, Oostvogel PM, Steegers EA, Dorr PJ. Morbidity related to maternal group B streptococcal infections. *Acta Obstet Gynecol Scand* (2006) 85(9):1027–37. doi:10.1080/00016340600780508.
- Nagano, N., Y. Nagano, and F. Taguchi. 2002. High expression of a C protein _ antigen gene among invasive strains from certain clonally related groups of type Ia and Ib group B streptococci. Infect. Immun. 70:4643–4649.
- Namavar Jahromi B, Poorarian S, Poorbarfehee S. The prevalence and adverse effects of group B streptococcal colonization during pregnancy. *Arch Iran Med* (2008) 11(6):654–7.
- Nan C, Dangor Z, Cutland CL, Edwards MS, Madhi SA, Cunnington MC. Maternal group B *Streptococcus*-related stillbirth: a systematic review. *BJOG* (2015) 122(11):1437–45. doi:10.1111/1471-0528.13527.
- Nandyal R. Update on Group B streptococcal infections: Perinatal and Neonatal Periods. J Perinat Neonat Nurs 2008; 22:230-7.
- Navarre, W. W., and O. Schneewind. 1999. Surface proteins of gram positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63:174–229.
- Nizet, V., K. S. Kim, M. Stins, M. Jonas, E. Y. Chi, D. Nguyen, and C. E. Rubens. 1997. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. Infect. Immun. 65:5074–5081.
- Nordsiek G, S. Novella, B. de Pablos, J. C. Pe´rez-Diaz, R. Purcell, B. Remmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J. A. Va´zquez-

Boland, H. Voss, J. Wehland, and P. Cossart. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. Science 294:849–852.

- Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O. Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Front Microbiol* (2016) 7:1031. doi: 10.3389/ fmicb.2016.01031
- Ohlsson A, Shah VS, Stade BC. Vaginal chlorhexidine during labour to prevent early-onset neonatal group B streptococcal infection. *Cochrane Database Syst Rev* (2014) 12:CD003520. doi: 10.1002/14651858.CD003520. pub3
- Ortiz L, Ruiz F, Pascual L, Barberis L. Effect of two probiotic strains of *Lactobacillus* on in vitro adherence of *Listeria monocytogenes, Streptococcus agalactiae*, and *Staphylococcus aureus* to vaginal epithelial cells. *Curr Microbiol* (2014) 68(6):679–84. doi:10.1007/ s00284-014-0524-9
- Park SE, Jiang S, Wessels MR. CsrRS and environmental pH regulate group B *Streptococcus* adherence to human epithelial cells and extracellular matrix. *Infect Immun* (2012) 80(11):3975–84. doi: 10.1128/IAI.00699-12.
- Parker RE, Laut C, Gaddy JA, Zadoks RN, Davies HD, Manning SD. Association between genotypic diversity and biofilm production in group B *Streptococcus*. *BMC Microbiol* (2016) 16:86. doi:10.1186/ s12866-016-0704-9.
- Patras KA, Rosler B, Thoman ML, Doran KS. Characterization of host immunity during persistent vaginal colonization by group B *Streptococcus*. *Mucosal Immunol* (2015) 8(6):1339–48. doi:10.1038/ mi.2015.23
- Patras KA, Wang NY, Fletcher EM, Cavaco CK, Jimenez A, Garg M, et al. Group B *Streptococcus* covR regulation modulates host immune signaling pathways to promote vaginal colonization. *Cell Microbiol* (2013) 15(7): 1154–67. doi:10.1111/cmi.12105.
- Patterson M J, S. Baron, et al, eds. "Streptococcus." Baron's Medical Microbiology, Section 1, Chapter 13, pp. 1 (on website), 4th ed. (1996), Univ of Texas Medical Branch.

- Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA*. 2008 May 7. 299(17):2056-65
- Pleass, R. J., J. I. Dunlop, C. M. Anderson, and J. M. Woof. 1999. Identification of residues in the CH2/CH3 domain interface of IgA essential for interaction with the human Fc_ receptor (Fc_R) CD89. J. Biol. Chem. 274: 23508–23514.
- Pleass, R. J., T. Areschoug, G. Lindahl, and J. M. Woof. 2001. Streptococcal IgA-binding proteins bind in the C_2-C_3 interdomain region and inhibit binding of IgA to human CD89. J. Biol. Chem. 276:8197–8204.
- Prince AL, Ma J, Kannan PS, Alvarez M, Gisslen T, Harris RA, et al. The placental membrane microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with and without chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* (2016) 214(5):627.e1–16. doi:10.1016/j.ajog.2016.01.193
- Puopolo, K. M., and L. C. Madoff. 2003. Upstream short sequence repeats regulate expression of the alpha C protein of group B *Streptococcus*. Mol. Microbiol. 50:977–991.
- Qiao J, Kwok L, Zhang J, Gao P, Zheng Y, Guo Z, et al. Reduction of *Lactobacillus* in the milks of cows with subclinical mastitis. *Benef Microbes* (2015) 6(4):485–90. doi:10.3920/BM2014.0077
- Quach D, van Sorge NM, Kristian SA, Bryan JD, Shelver DW, Doran KS. The CiaR response regulator in group B *Streptococcus* promotes intracel-lular survival and resistance to innate immune defenses. *J Bacteriol* (2009) 191(7):2023–32. doi:10.1128/JB.01216-08.
- Randis TM, Gelber SE, Hooven TA, Abellar RG, Akabas LH, Lewis EL, et al. Group B *Streptococcus* beta-hemolysin/cytolysin breaches maternal-fetal barriers to cause preterm birth and intrauterine fetal demise in vivo. *J Infect Dis* (2014) 210(2):265–73. doi:10.1093/infdis/jiu067.
- Rauen, N. C., Wesenberg, E. M. & Cartwright, C. P. Comparison of selective and nonselective enrichment broth media for the detection

of vaginal and anorectal colonization with group B streptococcus. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 51, 9-12 (2005).

- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108(Suppl 1):4680–7. doi:10.1073/pnas.1002611107
- Recommendations for the Prevention of Perinatal Group B Streptococcal (GBS) Disease. *Pediatrics* (2011).doi:10.1542/peds. 2011-1466
- Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP. The epidemiology of group B strepto-coccal colonization in pregnancy. Vaginal infections and prematurity study group. *Obstet Gynecol* (1991) 77(4):604–10.
- Rego S, Heal TJ, Pidwill GR, Till M, Robson A, Lamont RJ, et al. Structural and functional analysis of cell wall-anchored polypeptide adhesin BspA in *Streptococcus agalactiae*. *J Biol Chem* (2016) 291(31):15985–6000. doi:10.1074/ jbc.M116.726562
- Rick AM, Aguilar A, Cortes R, Gordillo R, Melgar M, Samayoa-Reyes G, et al. Group B streptococci colonization in pregnant Guatemalan women: prevalence, risk factors, and vaginal microbiome. *Open Forum Infect Dis* (2017) 4(1):ofx020. doi:10.1093/ofid/ofx020
- Rinaudo CD, Rosini R, Galeotti CL, Berti F, Necchi F, Reguzzi V, et al. Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B *Streptococcus*. *PLoS One* (2010) 5(2):e9216. doi:10.1371/ journal.pone.0009216
- Rocchetti, T. T. *et al.* Group B streptococci colonization in pregnant women: risk factors and evaluation of the vaginal flora. *Arch. Gynecol. Obstet.* 283, 717-721 (2011).
- Ronnqvist PD, Forsgren-Brusk UB, Grahn-Hakansson EE. Lactobacilli in the female genital tract in relation to other genital microbes and vaginal pH. *Acta Obstet Gynecol Scand* (2006) 85(6):726–35. doi: 10.1080/00016340600578357.
- Rubens, C. E., M. R. Wessels, L. M. Heggen, and D. L. Kasper. 1987. Transposon mutagenesis of type III group B *Streptococcus*:

correlation of capsule expression with virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7208–7212.

- Rubens, C. E., H. V. Raff, J. C. Jackson, E. Y. Chi, J. T. Bielitzki, and S. L. Hillier. 1991. Pathophysiology and histopathology of group B streptococcal sepsis in *Macaca nemestrina* primates induced after intraamniotic inoculation: evidence for bacterial cellular invasion. J. Infect. Dis. **164:**320–330.
- Russell NJ, Seale AC, O'Driscoll M, O'Sullivan C, Bianchi-Jassir F, Gonzalez- Guarin J, et al. Maternal colonization with group B *Streptococcus* and serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses 2007 Clinical Infectious Diseases Volume 65, Issue suppl_2, 6 November 2017, Pages S100–S111, https://doi.org/10.1093/cid/cix658.
- Russell-Jones, G. J., E. C. Gotschlich, and M. S. Blake. 1984. A surface receptor specific for human IgA on group B streptococci possessing the Ibc protein antigen. J. Exp. Med. 160:1467–1475.
- Sadowy E., *et al.* Population structure-, virulence factors and resistance determinants of invasive, non-invasive and colonizing Streptococcus agalactiae in Poland. *J Antimicrob Chemother.* 2010, 65(9), p. 1907-14
- Samen, U., B. Gottschalk, B. J. Elkmanns, and D. J. Reinscheid. 2004. Relevance of peptide uptake systems to the physiology and virulence of *Streptococcus agalactiae*. J. Bacteriol. 186:1398–1408.
- Santi I, Scarselli M, Mariani M, Pezzicoli A, Masignani V, Taddei A, et al. BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood. *Mol Microbiol* (2007) 63(3): 754–67. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05555.x.
- Scasso S, Laufer J, Rodriguez G, Alonso JG, Sosa CG. Vaginal group B *Streptococcus* status during intrapartum antibiotic prophylaxis. *Int J Gynaecol Obstet* (2015) 129(1):9–12. doi:10.1016/j.ijgo.2014.10.018.
- Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective.

Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* (1996) 45(RR–7):1–24.

- Schubert A, Zakikhany K, Schreiner M, Frank R, Spellerberg B, Eikmanns BJ, et al. A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Mol Microbiol* (2002) 46(2):557–69. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03177.x
- Shabayek S, Bauer R, Mauerer S, Mizaikoff B, Spellerberg B. A streptococcal NRAMP homologue is crucial for the survival of *Streptococcus agalactiae* under low pH conditions. *Mol Microbiol* (2016) 100(4):589–606. doi:10.1111/ mmi.13335
- Sheen TR, Jimenez A, Wang NY, Banerjee A, van Sorge NM, Doran KS. Serine-rich repeat proteins and pili promote *Streptococcus agalactiae* coloni-zation of the vaginal tract. *J Bacteriol* (2011) 193(24):6834–42. doi:10.1128/ JB.00094-11
- Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD. Early-onset neonatal sepsis. *Clin Microbiol Rev* (2014) 27(1):21–47. doi:10.1128/ CMR. 00031-13
- Slogrove AL, Goetghebuer T, Cotton MF, Singer J, Bettinger JA. Pattern of infectious morbidity in HIV-exposed uninfected infants and children. *Front Immunol* (2016) 7:164. doi:10.3389/fimmu.2016.00164
- Soares GC, da Silva BA, Dos Santos MH, da Costa AF, Dos Santos AL, Morandi V, et al. Metallopeptidases produced by group B *Streptococcus*: influence of proteolytic inhibitors on growth and on interaction with human cell lineages. *Int J Mol Med* (2008) 22(1):119–25. doi:10.3892/ijmm.22.1.119
- Spaetgens R, DeBella K, Ma D, Robertson S, Mucenski M, Davies HD. Perinatal antibiotic usage and changes in colonization and resistance rates of group B *Streptococcus* and other pathogens. *Obstet Gynecol* (2002) 100(3):525–33. doi: 10.1097/00006250-200209000-00020
- Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Lutticken R. rgf encodes a novel two-component signal transduction system of

Streptococcus agalactiae. Infect Immun (2002) 70(5):2434–40. doi: 10.1128/IAI.70.5. 2434-2440.2002

- Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Schnitzler N, Stapleton RD, Kahn JM, Evans LE, Critchlow CW, Gardella CM. Risk factors for group B streptococcal genitourinary tract colonization in pregnant women. *Obstet Gynecol* (2005) 106(6): 1246–52. doi:10.1097/01. AOG.0000187893.52488.4b
- Springman A. C., *et al*. Selection, recombination, and virulence gene diversity among group B streptococcal genotypes. *J Bacteriol.* 2009, 191(17), p. 5419-2
- Sta°lhammar-Carlemalm, M., L. Stenberg, and G. Lindahl. 1993. Protein Rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. J. Exp. Med. 177:1593–1603.
- Sta°lhammar-Carlemalm, M., T. Areschoug, C. Larsson, and G. Lindahl. 2000. Cross-protection between group A and group B streptococci due to cross-reacting surface proteins. J. Infect. Dis. 182:142–149.
- Sta°lhammar-Carlemalm, M., T. Areschoug, C. Larsson, and G. Lindahl. 1999. The ALP3 protein of *Streptococcus pyogenes* is related to several group 126 LINDAHL ET AL. CLIN. MICROBIOL. REV. Downloaded from http://cmr.asm.org/ on March 15, 2018 by guest B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells. Mol. Microbiol. 33:208–219.
- Stapleton RD, Kahn JM, Evans LE, Critchlow CW, Gardella CM. Risk factors for group B streptococcal genitourinary tract colonization in pregnant women. *Obstet Gynecol* (2005) 106(6):1246–52. doi: 10.1097/01. AOG.0000187893.52488.4b.
- Steer, P. J. & Plumb, J. Myth: Group B streptococcal infection in pregnancy: comprehended and conquered. *Semin Fetal Neonatal Med* 16, 254-258 (2011).

- Stenson BJ, Heath PT, Russell AR. Respiratory distress related to asymptomatic colonization with group B streptococci. Pediatr Infect Dis J. 2007 Aug;26(8):765.
- Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, et al. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics* (2011) 127(5): 817–26. doi:10.1542/ peds.2010-2217.
- Stoll BJ, Schuchat A. Maternal carriage of group B streptococci in devel-oping countries. *Pediatr Infect Dis J* (1998) 17(6):499–503. doi: 10.1097/ 00006454-199806000-00013.
- Sutcliffe, I. C., and D. J. Harrington. 2004. Putative lipoproteins of *Streptococcus agalactiae* identified by bioinformatic genome analysis. Antonie Leeuwenhoek 85:305–315.
- Szymusik I, Kosinska-Kaczynska K, Krolik A, Skurnowicz M, Pietrzak B, Wielgos M. The usefulness of the universal culture-based screening and the efficacy of intrapartum prophylaxis of group B *Streptococcus* infection. *J Matern Fetal Neonatal Med* (2014) 27(9): 968–70. doi:10.3109/14767058. 2013.845659.
- Tamura GS, Rubens CE. Group B streptococci adhere to a variant of fibronectin attached to a solid phase. *Mol Microbiol* (1995) 15(3):581–9. doi:10.1111/ j.1365-2958.1995.tb02271.x.
- Teatero S, Ferrieri P, Martin I, Demczuk W, McGeer A, Fittipaldi N. Serotype distribution, population structure, and antimicrobial resistance of group B *Streptococcus* strains recovered from colonized pregnant women. *J Clin Microbiol* (2017) 55(2):412–22. doi:10.1128/ JCM.01615-16
- Tettelin, H., K. E. Nelson, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, R. T. DeBoy, D. H. Haft, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. Gwinn, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, S. L. Salzberg, M. R. Lewis, D. Radune, E. Holtzapple, H. Khouri, A. M. Wolf, T. R. Utterback, C. L. Hansen, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, S. Angiuoli, T. Dickinson, E. K. Hickey, I. E. Holt, B. J. Loftus, F. Yang, H. O. Smith, J. C. Venter, B. A. Dougherty,

D. A. Morrison, S. K. Hollingshead, and C. M. Fraser. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. Science 293:498–506.

- Tettelin, H., V. Masignani, M. J. Cieslewicz, J. A. Eisen, S. Peterson, M. R. Wessels, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, I. Margarit, T. D. Read, L. C. Madoff, A. M. Wolf, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. DeBoy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, M. R. Lewis, D. Radune, N. B. Fedorova, D. Scanlan, H. Khouri, S. Mulligan, H. A. Carty, R. T. Cline, S. E. Van Aken, J. Gill, M. Scarselli, M. Mora, E. T. Iacobini, C. Brettoni, G. Galli, M. Mariani, F. Vegni, D. Maione, D. Rinaudo, R. Rappuoli, J. L. Telford, D. L. Kasper, G. Grandi, and C. M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:12391–12396.
- Timoney J, J. Gillespie, F. Scott, and J. Barlough. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals, Chapter 19, pp. 181-186, 8th ed., 1973.
- Toyofuku M, Morozumi M, Hida M, Satoh Y, Sakata H, Shiro H, et al. Effects of intrapartum antibiotic prophylaxis on neonatal acquisition of group B streptococci. *J Pediatr* (2017) 190:169–73.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2017.07.039
- Tsolia M, Psoma M, Gavrili S, Petrochilou V, Michalas S, Legakis N, Karpathios T. Group B streptococcus colonization of Greek pregnant women and neonates: prevalence, risk factors and serotypes.Clin Microbiol Infect. 2003 Aug;9(8):832-8.
- Turrentine M. Intrapartum antibiotic prophylaxis for group B *Streptococcus*: has the time come to wait more than 4 hours? *Am J Obstet Gynecol* (2014) 211(1):15–7. doi:10.1016/j.ajog.2013.12.010.
- Ulett KB, Benjamin WH Jr, Zhuo F, Xiao M, Kong F, Gilbert GL, et al. Diversity of group B *Streptococcus* serotypes causing urinary tract infection in adults. *J Clin Microbiol* (2009) 47(7):2055–60. doi:10.1128/JCM.00154-09.

- Usein CR[1], Petrini A, Georgescu R, Grigore L, Străuţ M, Ungureanu V. Group B streptococcus colonization of Romanian women: phenotypic traits of isolates from vaginal swabs. Roum Arch Microbiol Immunol. 2009 Oct-Dec;68(4):235-9.
- Usein CR, Militaru M, Cristea V, Străuţ M. Mem Inst Oswaldo Cruz. Genetic diversity and antimicrobial resistance in Streptococcus agalactiae strains recovered from female carriers in the Bucharest area. 2014 Apr;109(2):189-96.
- Valkenburg-van den Berg AW, Sprij AJ, Dekker FW, Dorr PJ, Kanhai HH. Association between colonization with group B *Streptococcus* and preterm delivery: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand* (2009) 88(9):958–67. doi:10.1080/00016340903176800.
- Verani JR, McGee L, Schrag SJ; Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of perinatal group B strepto-coccal disease – revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* (2010) 59(RR–10):1–36.
- Verani, J. R., McGee, L. & Schrag, S. J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* **59**, 1–36 (2010).
- Vornhagen J, Quach P, Boldenow E, Merillat S, Whidbey C, Ngo LY, et al. Bacterial hyaluronidase promotes ascending GBS infection and preterm birth. *MBio* (2016) 7(3):e00781–16. doi:10.1128/mBio.00781-16
- Wang NY, Patras KA, Seo HS, Cavaco CK, Rosler B, Neely MN, et al. Group B streptococcal serine-rich repeat proteins promote interaction with fibrino-gen and vaginal colonization. *J Infect Dis* (2014) 210(6): 982–91. doi:10.1093/ infdis/jiu151.
- Wei, C.-F. *et al.* Prenatal Group B Streptococcus test using real-time polymerase chain reaction. *Taiwan J Obstet Gynecol* 48, 116-119 (2009).
- Weston EJ, Pondo T, Lewis MM, Martell-Cleary P, Morin C, Jewell B, et al. The burden of invasive early-onset neonatal sepsis in the United

States, 2005–2008. *Pediatr Infect Dis J* (2011) 30(11):937–41. doi: 10.1097/ INF.0b013e318223bad2

- Whidbey C, Harrell MI, Burnside K, Ngo L, Becraft AK, Iyer LM, et al. A hemolytic pigment of group B *Streptococcus* allows bacterial penetra-tion of human placenta. *J Exp Med* (2013) 210(6):1265–81. doi:10.1084/ jem.20122753
- Wilkinson, H. W., and R. G. Eagon. 1971. Type-specific antigens of group B type Ic streptococci. Infect. Immun. 4:596–604.
- Williamson, M. P. 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. Biochem. J. 297:249–260.
- Winn HN. Group B *Streptococcus* infection in pregnancy. *Clin Perinatol* (2007) 34(3):387–92. doi:10.1016/j.clp.2007.03.012
- Wood EG, Dillon HC Jr. A prospective study of group B streptococcal bacte-riuria in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* (1981) 140(5):515–20. doi:10.1016/ 0002-9378(81)90226-X
- Wu HM, Janapatla RP, Ho YR, Hung KH, Wu CW, Yan JJ, et al. Emergence of fluoroquinolone resistance in group B streptococcal isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 May. 52(5): 1888-90.
- Wu P, Feldman AS, Rosas-Salazar C, James K, Escobar G, Gebretsadik T, et al. Relative importance and additive effects of maternal and infant risk factors on childhood asthma. *PLoS One* (2016) 11(3):e0151705. doi:10.1371/ journal.pone.0151705
- Yancey MK, Duff P, Clark P, Kurtzer T, Frentzen BH, Kubilis P. Peripartum infection associated with vaginal group B streptococcal colonization. *Obstet Gynecol* (1994) 84(5):816–9.
- Yu, H.-W. *et al.* Group B streptococcal infection in Taiwan: maternal colonization and neonatal infection. *Pediatr Neonatol* 52, 190-195 (2011).
- Zarate G, Nader-Macias ME. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett Appl Microbiol* (2006) 43(2):174–80. doi:10.1111/j.1472-765X. 2006.01934.x

- Zegels G, Van Raemdonck GA, Coen EP, Tjalma WA, Van Ostade XW. Comprehensive proteomic analysis of human cervical-vaginal fluid using colposcopy samples. *Proteome Sci* (2009) 7:17. doi:10.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των στελεχών *S.agalactiae*,

Στέλεχος	***Δείγμα***	***Κύηση***	***Alp 2/3***	***Alpha-C***	***Rib rev***	***Epsilon***	***bac***	**Αντιβιόγραμμα**
1	λόχεια	Ναι		Θετικό				Ε σε όλα
2	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Ε σε όλα
3	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α σιπροφλοξασίνη, Α Ερυθρ, Α κλινδ
4	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α ερυθ, Α κλινδ
5	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Ε σε όλα
6	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Α Ερυρ, Α κλινδ
7	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Α Ερυρ, Α κλινδ
8	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Α Ερυρ, Α κλινδ
9	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α Ερυρ, Α κλινδ
10	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			ΑΣιπροφλοξασίνη,
11	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Α Ερυρ, Α κλινδ
12	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Ε σεόλα
13	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Ε σεόλα
14	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α Ερυρ, Α κλινδ
15	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α ερυθ, Α κλινδ

16	ΚΚΥ	Όχι			Θετικό			Α ερυθ, Α κλινδ
17	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Α ερυθρ,
18	ΚΚΥ	Όχι			Θετικό			Ε σεόλα
19	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		Ε σεόλα
20	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α ερυθρ, Α κλινδ
21	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Α ερυθ, Α κλινδ
22	ΚΚΥ	Όχι			Θετικό			Ε σεόλα
23	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		Α ερυθρ, Α κλινδ
24	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Ε σεόλα
25	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		Ε σεόλα
26	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α ερυθ, Α κλινδ
27	ΚΚΥ	Όχι	Θετικό					Ε σεόλα
28	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Ε σεόλα
29	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α ερυθρ, Α κλινδ
30	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Ε σεόλα
31	ΚΚΥ	Όχι			Θετικό			Ε σεόλα
32	ΚΚΥ	Όχι			Θετικό			Α ερυθ, Α κλινδ
33	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό	Θετικό	Ε σεόλα
34	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		Α ερυθ, Α κλινδ

35	ΚΚΥ	Όχι				Θετικό		Α ερυθ, Α κλινδ
36	ΚΚΥ	Όχι				Θετικό		Α ερυθ, Α κλινδ
37	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό			Θετικό	Ε σεόλα
38	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό		Θετικό	Α ερυθρ, Α κλινδ
39	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					ΑΣιπροφλοξασίνη,
40	ΚΚΥ	Όχι		Θετικό				Α ερυθ, Α κλινδ
41	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		Α ερυθρ, Α κλινδ
42	ΚΚΥ	Όχι	Θετικό					Ε σεόλα
43	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Ε σεόλα
44	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		ΑΣιπροφλοξασίνη,
45	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		ΑΣιπροφλοξασίνη,
46	ΚΚΥ	Όχι		Θετικό				Ε σεόλα, ΜΕ πενικ,
47	ΚΚΥ	Όχι			Θετικό			Ε σεόλα
48	ΚΚΥ	Όχι	Θετικό					Α ερυθρ, Α κλινδ,
49	ΚΚΥ	Όχι		Θετικό				Αερυθρ, Ακλινδ,
50	ΚΚΥ	Όχι				Θετικό		Α ερυθ, Α κλινδ
51	ΚΚΥ	Όχι		Θετικό				Α ερυθρ, Α κλινδ,
52	ΚΚΥ	Όχι	Θετικό					Ε σεόλα
53	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Ε σεόλα

54	ΚΚΥ	Όχι				Θετικό		Ε σεόλα
55	ΚΚΥ	όχι			Θετικό			Ε σεόλα
56	ΚΚΥ	όχι	Θετικό					Α Ερυθ Α Σιπροφλοξασίνη,
57	ΚΚΥ	Όχι	Θετικό					Ε σεόλα
58	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Α ερυθ, Α κλινδ
59	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Ε σεόλα
60	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α Σιπροφλοξασίνη, Α ερυθ, Α κλινδ
61	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α Ερυθ, Α κλινδ
62	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α Ερυθ, Α κλινδ
63	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Α Ερυθ, Α κλινδ
64	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Ε σεόλα
65	λόχεια	Ναι		Θετικό				Ε σεόλα
66	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Ε σε όλα
67	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Ε σε όλα
68	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α σιπροφλοξασίνη, Α Ερυθρ, Α κλινδ
69	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α ερυθ, Α κλινδ
70	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Ε σε όλα

71	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Α Ερυρ, Α κλινδ
72	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Α Ερυρ, Α κλινδ
73	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Α Ερυρ, Α κλινδ
74	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α Ερυρ, Α κλινδ
75	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			ΑΣιπροφλοξασίνη,
76	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Α Ερυρ, Α κλινδ
77	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Ε σεόλα
78	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Ε σεόλα
79	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α Ερυρ, Α κλινδ
80	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α ερυθ, Α κλινδ
81	ΚΚΥ	Όχι			Θετικό			Α ερυθ, Α κλινδ
82	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Α ερυθρ,
83	ΚΚΥ	Όχι			Θετικό			Ε σεόλα
84	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		Ε σεόλα
85	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α ερυθρ, Α κλινδ
86	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Α ερυθ, Α κλινδ
87	ΚΚΥ	Όχι			Θετικό			Ε σεόλα
88	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		Α ερυθρ, Α κλινδ
89	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Ε σεόλα

90	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		Ε σεόλα
91	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α ερυθ, Α κλινδ
92	ΚΚΥ	Όχι	Θετικό					Ε σεόλα
93	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Ε σεόλα
94	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α ερυθρ, Α κλινδ
95	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Ε σεόλα
96	ΚΚΥ	Όχι			Θετικό			Ε σεόλα
97	ΚΚΥ	Όχι			Θετικό			Α ερυθ, Α κλινδ
98	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό	Θετικό	Ε σεόλα
99	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		Α ερυθ, Α κλινδ
100	ΚΚΥ	Όχι				Θετικό		Α ερυθ, Α κλινδ
101	ΚΚΥ	Όχι				Θετικό		Α ερυθ, Α κλινδ
102	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό			Θετικό	Ε σεόλα
103	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό		Θετικό	Α ερυθρ, Α κλινδ
104	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					ΑΣιπροφλοξασίνη,
105	ΚΚΥ	Όχι		Θετικό				Α ερυθ, Α κλινδ
106	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		Α ερυθρ, Α κλινδ
107	ΚΚΥ	Όχι	Θετικό					Ε σεόλα
108	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Ε σεόλα

109	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		ΑΣιπροφλοξασίνη,
110	ΚΚΥ	Ναι				Θετικό		ΑΣιπροφλοξασίνη,
111	ΚΚΥ	Όχι		Θετικό				Ε σεόλα
112	ΚΚΥ	Όχι			Θετικό			Ε σεόλα
113	ΚΚΥ	Όχι	Θετικό					Αερυθρ, Α κλινδ,
114	ΚΚΥ	Όχι		Θετικό				Αερυθρ, Ακλινδ,
115	ΚΚΥ	Όχι				Θετικό		Α ερυθ , Α κλινδ
116	ΚΚΥ	Όχι		Θετικό				Α ερυθρ, Α κλινδ,
117	ΚΚΥ	Όχι	Θετικό					Ε σεόλα
118	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Ε σεόλα
119	ΚΚΥ	Όχι				Θετικό		Ε σεόλα
120	ΚΚΥ	όχι			Θετικό			Ε σεόλα
121	ΚΚΥ	όχι	Θετικό					ΑΕρυθ, ΑΣιπροφλοξασίνη,
122	ΚΚΥ	Όχι	Θετικό					Ε σεόλα
123	ΚΚΥ	Ναι	Θετικό					Α ερυθ, Α κλινδ
124	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Ε σεόλα
125	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α Σιπροφλοξασίνη , Α ερυθ, Α κλινδ
126	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α Ερυθ, Α κλινδ

127	ΚΚΥ	Ναι			Θετικό			Α Ερυθ, Α κλινδ
128	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Α Ερυθ, Α κλινδ
129	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Ε σεόλα
130	ΚΚΥ	Ναι		Θετικό				Ε σεόλα

ΜΕ πενικιλλίνη=Μειωμένης ευαισθησίας πενικιλλίνη

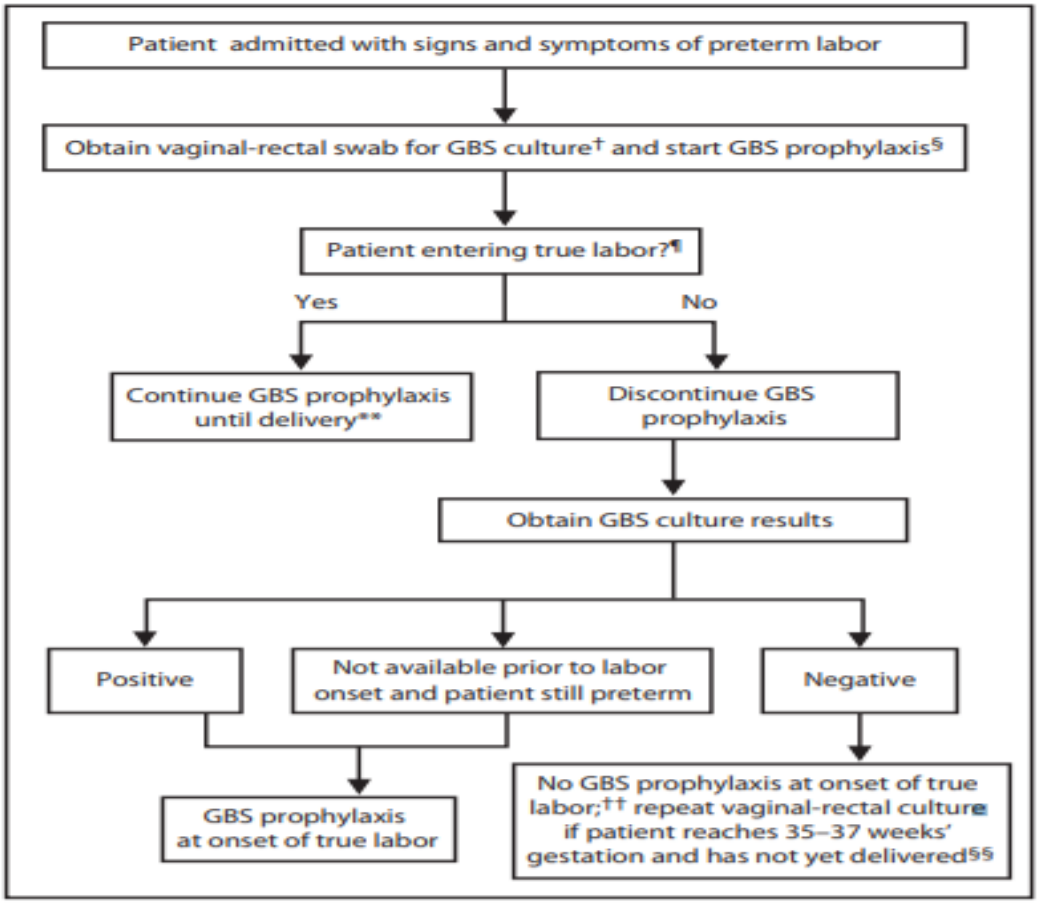
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Οδηγίες CDC 2010 για την πρόληψη της πρώιμης νεογνικής λοίμωξης σπό στρεπτόκοκκο Β

Α. Κλινική αντιμετώπιση

- **προτεινόμενος αλγόριθμος για έλεγχο και διαχείριση ασθενών με πρόωρο τοκετό**

FIGURE 5. Algorithm for screening for group B streptococcal (GBS) colonization and use of intrapartum prophylaxis for women with preterm* labor (PTL)



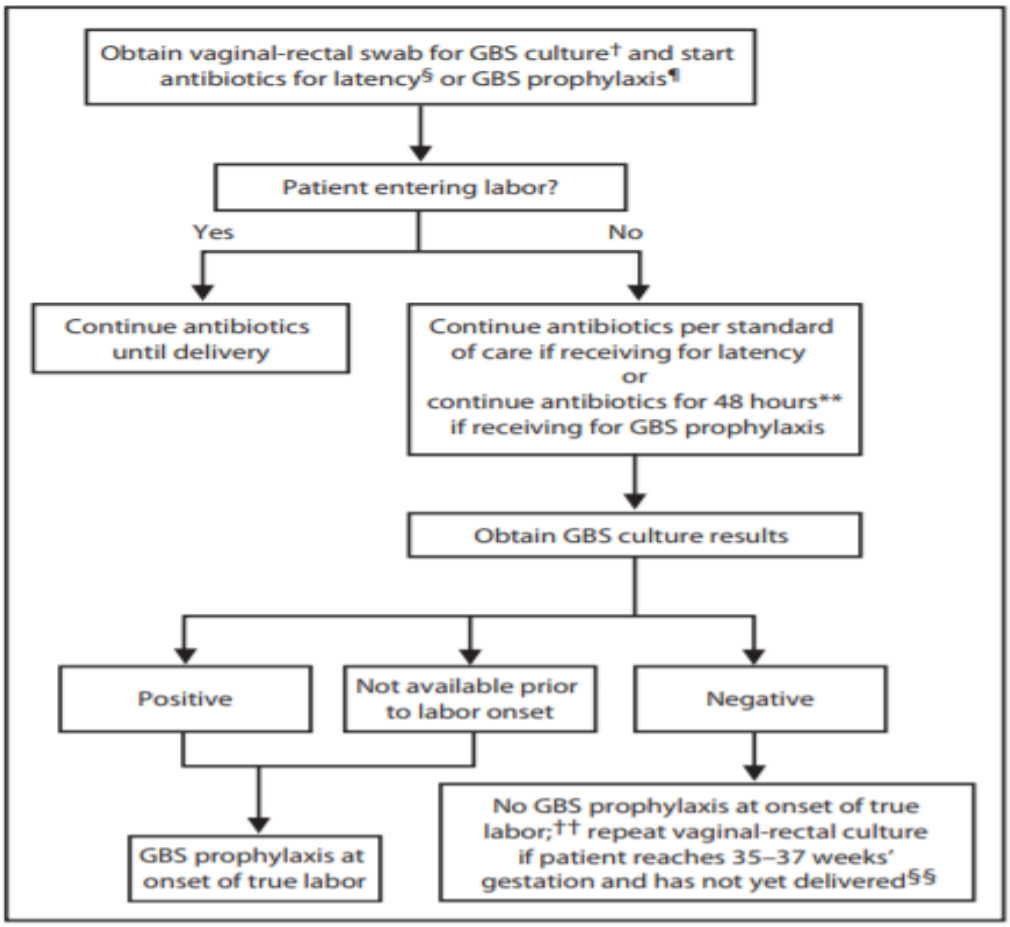
* At <37 weeks and 0 days' gestation.
† If patient has undergone vaginal-rectal GBS culture within the preceding 5 weeks, the results of that culture should guide management. GBS-colonized women should receive intrapartum antibiotic prophylaxis. No antibiotics are indicated for GBS prophylaxis if a vaginal-rectal screen within 5 weeks was negative.
§ See Figure 8 for recommended antibiotic regimens.
¶ Patient should be regularly assessed for progression to true labor; if the patient is considered not to be in true labor, discontinue GBS prophylaxis.
** If GBS culture results become available prior to delivery and are negative, then discontinue GBS prophylaxis.
†† Unless subsequent GBS culture prior to delivery is positive.
§§ A negative GBS screen is considered valid for 5 weeks. If a patient with a history of PTL is re-admitted with signs and symptoms of PTL and had a negative GBS screen >5 weeks prior, she should be rescreened and managed according to this algorithm at that time.

November 2010

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

- **Προτεινόμενος αλγόριθμος για έλεγχο φορείας και αντιμικροβιακή θεραπεία σε πρόωρη ρήξη υμένων**

FIGURE 6. Algorithm for screening for group B streptococcal (GBS) colonization and use of intrapartum prophylaxis for women with preterm* premature rupture of membranes (pPROM)



* At <37 weeks and 0 days' gestation.

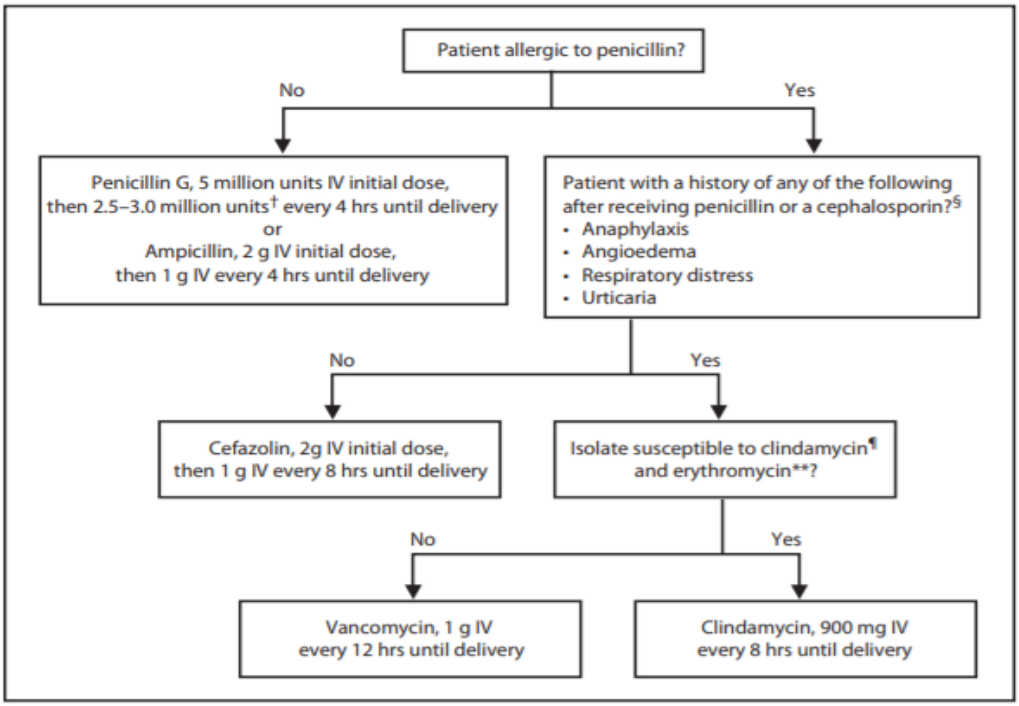
† If patient has undergone vaginal-rectal GBS culture within the preceding 5 weeks, the results of that culture should guide management. GBS-colonized women should receive intrapartum antibiotic prophylaxis. No antibiotics are indicated for GBS prophylaxis if a vaginal-rectal screen within 5 weeks was negative.

§ Antibiotics given for latency in the setting of pPROM that include ampicillin 2 g intravenously (IV) once, followed by 1 g IV every 6 hours for at least 48

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

- **Προτεινόμενος αλγόρθμος χορήγησης αντιμικροβιακής αγωγής για την πρόληψη λοίμωξης από στρεπτόκοκκο Β**

FIGURE 8. Recommended regimens for intrapartum antibiotic prophylaxis for prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) disease*



Abbreviation: IV = intravenously.

* Broader spectrum agents, including an agent active against GBS, might be necessary for treatment of chorioamnionitis.

† Doses ranging from 2.5 to 3.0 million units are acceptable for the doses administered every 4 hours following the initial dose. The choice of dose within that range should be guided by which formulations of penicillin G are readily available to reduce the need for pharmacies to specially prepare doses.

§ Penicillin-allergic patients with a history of anaphylaxis, angioedema, respiratory distress, or urticaria following administration of penicillin or a cephalosporin are considered to be at high risk for anaphylaxis and should not receive penicillin, ampicillin, or cefazolin for GBS intrapartum prophylaxis. For penicillin-allergic patients who do not have a history of those reactions, cefazolin is the preferred agent because pharmacologic data suggest it achieves effective intraamniotic concentrations. Vancomycin and clindamycin should be reserved for penicillin-allergic women at high risk for anaphylaxis.

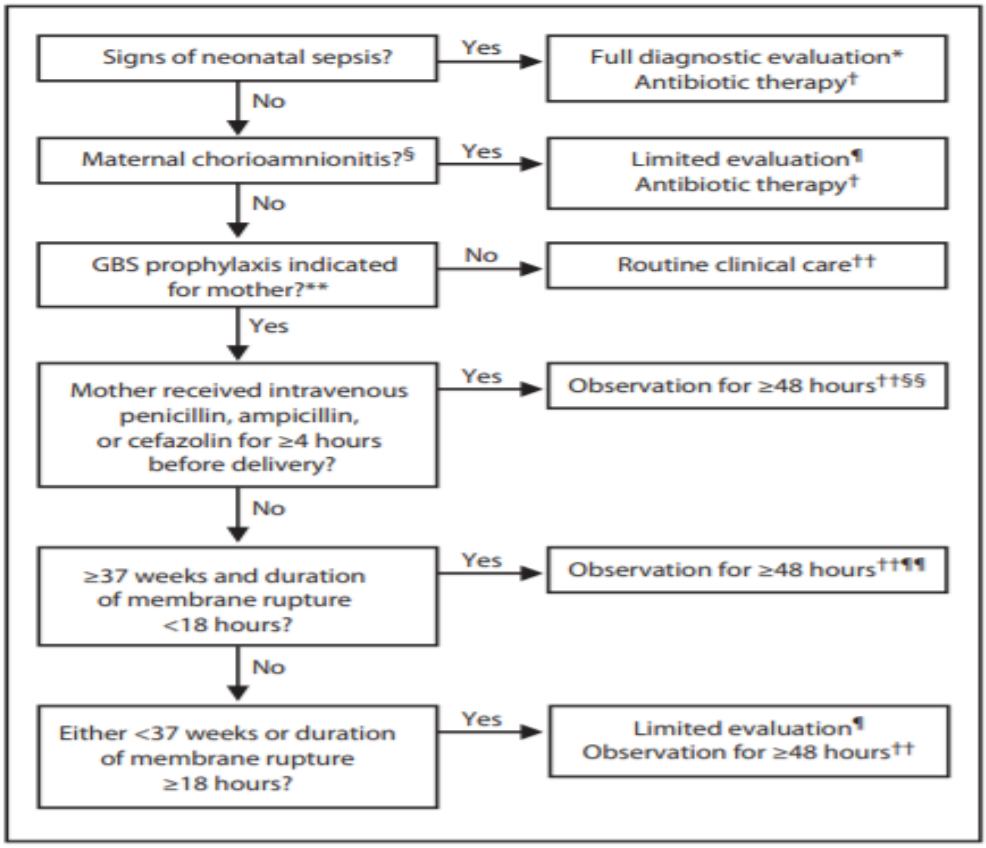
¶ If laboratory facilities are adequate, clindamycin and erythromycin susceptibility testing (Box 3) should be performed on prenatal GBS isolates from penicillin-allergic women at high risk for anaphylaxis. If no susceptibility testing is performed, or the results are not available at the time of labor, vancomycin is the preferred agent for GBS intrapartum prophylaxis for penicillin-allergic women at high risk for anaphylaxis.

** Resistance to erythromycin is often but not always associated with clindamycin resistance. If an isolate is resistant to erythromycin, it might have inducible resistance to clindamycin, even if it appears susceptible to clindamycin. If a GBS isolate is susceptible to clindamycin, resistant to erythromycin, and testing for inducible clindamycin resistance has been performed and is negative (no inducible resistance) , then clindamycin can be used for GBS intrapartum prophylaxis instead of vancomycin.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5

- **Αντιμικροβιακή αγωγή στο νεογνό για την πρόληψη EOD - GBS λοίμωξης**

FIGURE 9. Algorithm for secondary prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) disease among newborns



* Full diagnostic evaluation includes a blood culture, a complete blood count (CBC) including white blood cell differential and platelet counts, chest radiograph (if respiratory abnormalities are present), and lumbar puncture (if patient is stable enough to tolerate procedure and sepsis is suspected).

† Antibiotic therapy should be directed toward the most common causes of neonatal sepsis, including intravenous ampicillin for GBS and coverage for other organisms (including *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens) and should take into account local antibiotic resistance patterns.

§ Consultation with obstetric providers is important to determine the level of clinical suspicion for chorioamnionitis. Chorioamnionitis is diagnosed clinically and some of the signs are nonspecific.

¶ Limited evaluation includes blood culture (at birth) and CBC with differential and platelets (at birth and/or at 6–12 hours of life).

** See table 3 for indications for intrapartum GBS prophylaxis.

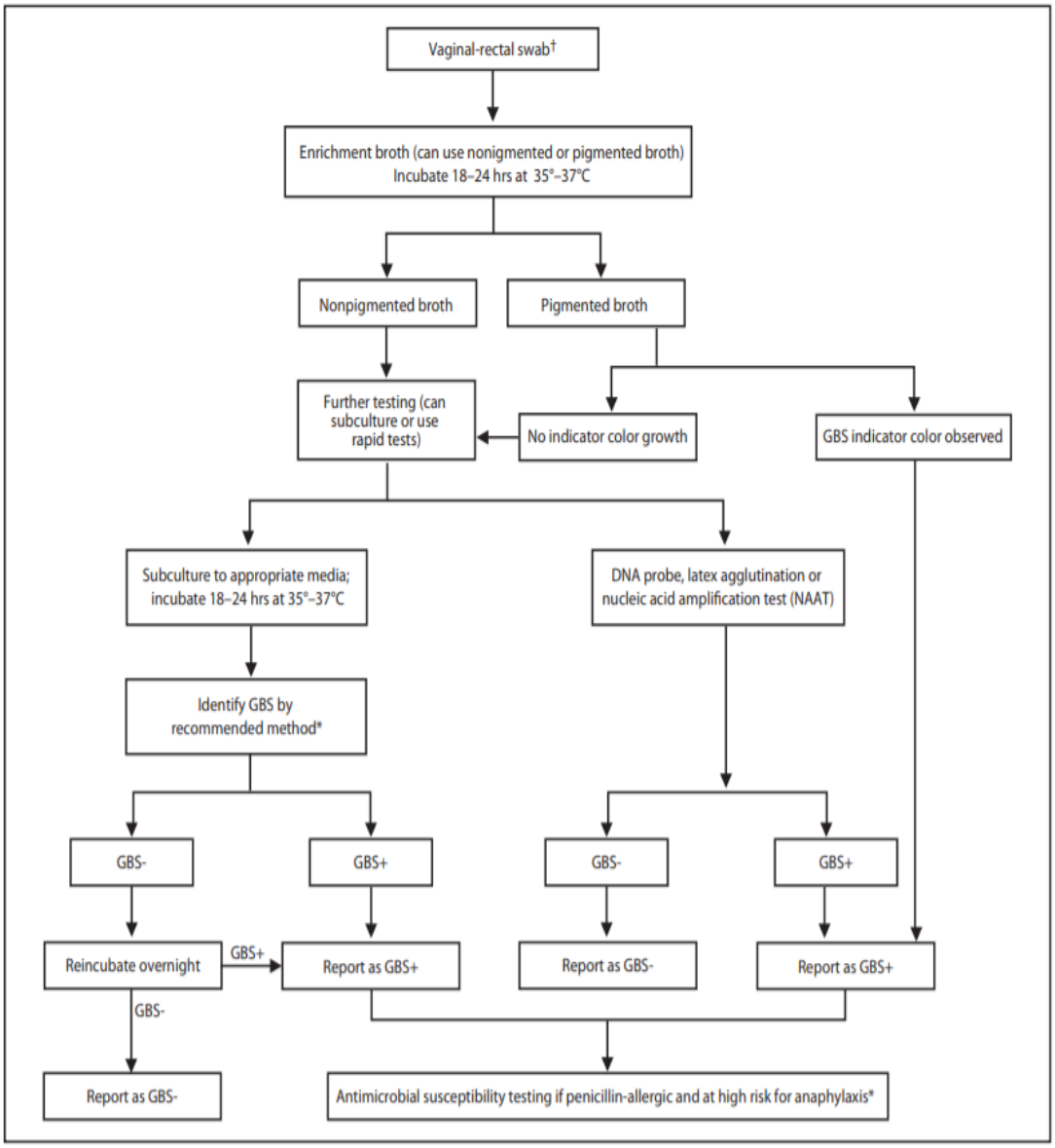
†† If signs of sepsis develop, a full diagnostic evaluation should be conducted

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6

Β. Εργαστηριακή πρακτική για την πρόληψη και αντιμετώπιση πρώιμης λοίμωξης Στρεπτοκόκκου Β στα νεογνά

- **Αλγόριθμος για το screening της εγκύου**

FIGURE 7. Algorithm for recommended laboratory testing for prenatal screening for group B streptococcal (GBS) colonization*



* See Boxes 1–3 for details on specimen processing and antimicrobial susceptibility testing.
† Direct plating with appropriate media may be done in addition to enriched culture. Direct plating should not be used as the sole means to identify GBS.

November 2010