



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΑΡΕΤΑΙΕΙΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ. Ε. ΚΟΥΣΚΟΥΝΗ

ΤΑΧΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΩΝ ΟΜΑΔΑΣ Β ΣΕ
ΕΠΙΤΟΚΕΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ Κ. ΓΕΡΟΥΜΑΤΟΣ
ΝΟΣΗΛΕΥΤΗΣ ΠΕ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2018

Στη μνήμη του καθηγητή Δημήτρη Χασιάκου

Στους γονείς μου

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγήτρια Ευαγγελία Κουσκούνη

(επιβλέπουσα διατριβής)

Διευθύντρια του Εργαστηρίου βιοπαθολογίας

Αρεταιείου Νοσοκομείου

Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Αθηνών

Αν. Καθηγήτρια Ραχήλ Κουρκουλή - Καπέτα

Εργαστήριο Βιοπαθολογίας

Αρεταιείου Νοσοκομείου

Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Αθηνών

Αν. Καθηγήτρια Σταυρούλα Μπάκα

Εργαστήριο Βιοπαθολογίας

Αρεταιείου Νοσοκομείου

Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας αυτό το έργο, θέλω να αναφερθώ σε εκείνους που βοήθησαν στην πραγματοποίησή του.

Ευχαριστώ βαθύτατα την Καθηγήτρια κα Ευαγγελία Κουσκούνη, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοπαθολογίας του Αρεταιείου Νοσοκομείου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της εργασίας, την έμπρακτη στήριξη και την καθοδήγηση στην εκπόνησή της.

Ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Σταυρούλα Μπάκα για την επίβλεψη, την πολύτιμη αρωγή και την εποικοδομητική κριτική της στην εξέλιξη και τη δόμηση της μελέτης.

Θεωρώ επίσης υποχρέωση μου να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Ραχήλ Κουρκουλή - Καπέτα για την αρωγή της στην πραγματοποίηση της εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Επικ. Καθηγητή κ. Γεώργιο Καπαρό, για την επίβλεψη, τις πολύτιμες παρατηρήσεις του και την αρωγή στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θεωρώ βαθύτατη υποχρέωση να αναφερθώ στον αείμνηστο καθηγητή Δημήτρη Χασιάκο, αναγνωρίζοντας την ανεκτίμητη συμβολή του με το υλικό της μελέτης και τιμώντας με σεβασμό τη μνήμη του και την επιστημονική και κοινωνική προσφορά του.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ:

Όνομα: Γεράσιμος

Επώνυμο: Γερολυμάτος

Ημερομηνία Γέννησης: 20/08/1980

Τόπος Γέννησης: Χολαργός (ΑΘΗΝΑ)

Διεύθυνση Κατοικίας: Ελύτη 2, Παιανία

Τηλέφωνο: 210-9524882 / 6947-048717 / 210-5212888

1. Βασική εκπαίδευση

1998	Απολυτήριο Λυκείου από την Ελληνογαλλική Σχολή Αγίας Παρασκευής «Ευγένιος Ντελακρουά» (<i>Lycee Franco-Hellenique Eugene Delacroix</i>) με βαθμό ‘λίαν καλώς’ .
2004	Πτυχίο από το Τμήμα Νοσηλευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό ‘λίαν καλώς’ .
2007	Πτυχίο Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών (MBA) με τίτλο «Οργάνωση και Διοίκηση Υπηρεσιών Υγείας» του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό ‘άριστα’ .

2. Μετεκπαίδευση

Βιοστατιστική/ Modelling/ Ερευνητική Επιδημιολογία	2009	EUROCADET: Prevent: Principles, Methods and Analysis. <i>Modelling the impact of interventions to reduce the burden of cancer on the population level.</i> Barcelona, Spain
	2010	Μετεκπαίδευση στο φορέα IKNO στο Groningen στην Ολλανδία σχετικά με την Οργάνωση του αρχείων χρόνιων νοσημάτων και την επιδημιολογία των νεοπλασιών.
	2011	« ABC in Epidemiology & Biostatistics » ΕΚΠΑ, Αθήνα
	2015	ECDC EPIET-EUPHEM “Rapid Assessment and Survey Methods” module, June 2015. Athens, Greece
CBRN / Security	2015	Basic Security in the field II course United Nations Department of Safety and Security
	2015	Advanced Security in the field course United Nations Department of Safety and Security
	2018	SSEE CBRN-e First Responders Training KEMEA Athens, 2018
Διοίκηση	2010	Crisis management , F. Business School Αθήνα, 2010
	2010	Συναισθηματική Νοσημοσύνη , F. Business School Αθήνα, 2010
	2013	Project Management , F. Business School Αθήνα, 2013
Κλινικά/Παρακλινικά	2012	Introduction to MDR-TB Clinical Management Webinar DR-TB Training Network, USAID, TB CARE II
	2017	Immediate Life Support (ILS) Provider <i>European Resuscitation Council</i>
	2018	Immediate Life Support (ILS) Instructor <i>European Resuscitation Council</i>

3. Εργασιακή Εμπειρία

2000-2004	Κυκλική πρακτική εξάσκηση σε κλινικές Κεντρικών Νοσοκομείων της Πρωτεύουσας στα πλαίσια του Προπτυχιακού Κύκλου Σπουδών .
2005	Εξάμηνη απασχόληση στο γραφείο Νοσηλευτικής Υποδιεύθυνσης του πρώτου θεραπευτηρίου Ι.Κ.Α «Η Πεντέλη »
2006	Απασχόληση στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών του Ναυτικού Νοσοκομείου Σαλαμίνας και στο Γραφείο Νοσηλευτικής Διεύθυνσης του Ναυτικού Νοσοκομείου Αθηνών στα πλαίσια της έκτισης στρατιωτικής θητείας στο πολεμικό ναυτικό ως στρατεύσιμος δίοπος με την ειδικότητα νοσηλεύτη.
2007 - 2008	Απασχόληση στην Καρδιοχειρουργική Μονάδα Εντατικής Θεραπείας και το Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών του Ωνασείου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου .
09/2008 02/2011	Απασχόληση στο Διατομεακό Γραφείο Βιοστατιστικής και Έρευνας του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.)
09/2009 06- 2010	Παράλληλη ανάθεση καθηκόντων στην υποστήριξη της λειτουργίας του Κέντρου Επιχειρήσεων του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. για την εφαρμογή του Εθνικού Σχεδίου Αντιμετώπισης της Πανδημίας γρίπης H₁N₁
2/2011- 9/2014	Παράλληλη ανάθεση στο τμήμα Οικονομικής Διαχείρισης της Περιφερικής Δ/νσης Αν. Αττικής του ΕΟΠΥΥ
09/2014 - Σήμερα	Απασχόληση στο Κέντρο Επιχειρήσεων του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.

4. Συμμετοχή σε συναντήσεις εργασίας

2014	<u>Αναδυόμενα Λοιμώδη Νοσήματα & Παγκόσμια Υγεία'</u> ΚΕ.ΕΛ.Π.Ν.Ο. , Ε.Ε.Τ.Ι., Αθήνα
	<u>Εξέλιξη αναδυόμενων λοιμώξεων</u> ΚΕ.ΕΛ.Π.Ν.Ο. , Ε.Ε.Τ.Ι., Αθήνα

5. Διεθνείς εκπροσωπήσεις σε ομάδες εργασίας και ασκήσεις

2015	<u>Exercise Quicksilver Plus (PHE, DG-SANTE, DG-HOME)</u> <i>Command post exercise on serious cross-border threats to health.</i> Athens, Greece
2016	2016 Annual Meeting of National Focal Points for Threat Detection,

	EWRS and IHR. ECDC Stockholm, Sweden
2017	2017 Annual Meeting of National Focal Points for Threat Detection, EWRS and IHR. ECDC Stockholm, Sweden
2017	Impress fp7 TTX Software Training and Preparation Θεσσαλονίκη
2017	Greek-Bulgarian Exercise of IMPRESS fp7 on emergency health care operations (Public Health England, DG-HOME) Sofia, Bulgaria
2018	Άσκηση επί χάρτου «Ε.Υ.Ζ.Σ.1.» Για το χαρακτηρισμό Εθνικών Υποδομών Ζωτικής Σημασίας KEMEA, Αθήνα 2018
2018	State of Play of Preparedness on Serious Cross-border Threats to Health in the EU Workshop DG-SANTE, DG-HOME Luxembourg

6. Ενεργό μέλος ευρωπαϊκών συστημάτων ερευνητικής επιδημιολογίας και ετοιμότητας ενάντια απειλών για την υγεία.

- **EWRS** (Early Warning and Response System) **DG-SANTE, European Commission**
- **EPIS** (Epidemic Intelligence Information System) **ECDC**
- **ELDSNnet** (European Legionnaires Disease Surveillance Network) **ECDC**

7. Ενεργό μέλος εθνικών και διεθνών οργανισμών/επιστημονικών εταιριών

- **Ελληνική Εταιρεία Ταξιδιωτικής Ιατρικής**
- **European Public Health Association (EUPHA)**
- **European Center for Disease Prevention and Control training Extranet (ECDC)**
- **EOC-Net** (Public Health Emergency Operations Centre Network), **WHO**
- **NFP** (National Focal Point) for Preparedness and Response, **ECDC**

Διεθνείς Εισηγήσεις

- **Experts Panel Debate on Preparedness planning for new types of threats.**
Συμμετοχή ως εκπρόσωπος της Ελλάδας στη Συνάντηση Εργασίας: **Preparedness on serious cross-border threats to health in the EU (WHO, DG-HOME, ECDC, DG-SANTE)**
Luxembourg
- Συμμετοχή ως εισηγητής στην ενότητα **Emerging Chemical, Biological and Radiological Threats (CBRN)** στα πλαίσια της Διεθνούς Συνάντησης **Best Practices in Implementation of IHR, CHAFAA European Commission**

8. Συμμετοχή σε δράσεις/προγράμματα/έρευνα

2009	Συμμετοχή στη λειτουργία του Κέντρου Επιχειρήσεων του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. στα πλαίσια του Εθνικού Σχεδίου Δράσης για την αντιμετώπιση της πανδημίας γρίπης H₁N₁.
2009	Σχεδιασμός του λογισμικού του Εθνικού Αρχείου Νεοπλασιών καθώς και των αυτοματοποιημένων (VB-Script) στατιστικών ελέγχων ποιότητας δεδομένων με βάση τα πρότυπα του ENCR.
2009	Συμμετοχή σε δράσεις επιδημιολογικής διερεύνησης πεδίου στα πλαίσια των εφημεριών ετοιμότητας επαγγελματιών υγείας του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.
2010 – 2012	Συμμετοχή στις δράσεις του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. σε συνεργασία με τη FRONTEX για τον υγειονομικό έλεγχο διαλογής και την περίθαλψη μεταναστών στα κέντρα υποδοχής και κράτησης (Αλεξανδρούπολη / Έβρος)
2014	Συμμετοχή ως εκπαιδευτής στη χρήση ατομικών μέσων και μέτρων προστασίας στη δράση του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. σε συνεργασία με τη Γενική Διεύθυνση Δημόσιας Υγείας με θέμα: « Αιμορραγικός πυρετός Ebola: Μέτρα πρόληψης και μέσα ατομικής προστασίας. » για τα Νοσοκομεία Ανατολικής Μακεδονίας & Θράκης και Ανατολικού Αιγαίου
2014	Συμμετοχή στην ομάδα εργασίας για την επιδημιολογική διερεύνηση και διαχείριση ύποπτων κρουσμάτων αιμορραγικού πυρετού ebola σε συνεργασία με το ΕΚΕΠΥ στα πλαίσια του Εθνικού Σχεδίου Δράσης «ΑΘΗΝΑ».
2015	Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα διερεύνησης επιδημίας λεπτοσπείρωσης στη Ζάκυνθο σε συνεργασία με τη Σχολή Επιστημών Υγείας του Παν. Θεσσαλίας του Γ.Ν. Ζακύνθου και τη Δ/ση Δημόσιας Υγείας της Περιφέρειας Ιονίων Νήσων)
2015-2017	Ενεργός συμμετοχή στην υγειονομική περίθαλψη προσφύγων και μεταναστών και τον έλεγχο επιδημιών εκτός οργανωμένων δομών φιλοξενίας (Αλεξανδρούπολη/ Αττική/ Ειδομένη Κιλκίς/Λιμένας Πατρών)
2017 - σήμερα	Συμμετοχή στο WP2 του προγράμματος PHILOS
2017	Συμμετοχή στην ομάδα εργασίας για την αναθεώρηση του Γενικού Σ.Α.Τ.Α.Μ.Ε. της Γενικής Γραμματείας Πολιτικής Προστασίας
2017	Συμμετοχή στο Συντονιστικό Όργανο Πολιτικής Προστασίας για τη διαχείριση των συνεπειών από τη Σεισμική δόνηση στη Μυτιλήνη (06/2017)
2017	Συμμετοχή στις συνεδριάσεις του Συντονιστικού Οργάνου Πολιτικής Προστασίας και την Ομάδα Εργασίας για τη διαχείριση των συνεπειών στη Δημόσια Υγεία από τα ακραία καιρικά φαινόμενα στη Μάνδρα Αττικής (11/2017)
2018	Συμμετοχή στην ομάδα εργασίας για τις Επηρεαζόμενες από Λύσσα Περιοχές, ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. , Γενική Δ/ση Δημόσιας Υγείας

9. Δημοσιευμένες εργασίες / Ομιλίες σε συνέδρια

2002	<i>Epidemiology and clinical characteristics of febrile diseases in travelers from developing countries living in Greece.</i> <i>C.Gerolymatos, D.Neophytos, E.Sevdalis, G.Gerolymatos, E.Kouskouni, M. Agioutandis. Travel & Epidemics 3rd European Conference On Travel Medicine, Florence (Italy) May 2002.</i>
2007	Σχεδιασμός ιστοτόπου για τη στάση της πολιτείας, της κοινωνίας και τις εκκλησίες απέναντι στην περίθαλψη των μεταναστών στον ελλαδικό και ευρωπαϊκό χώρο. Διπλωματική Εργασία, ΕΚΠΑ 2007
2008	Τα κύρια προβλήματα στην Υγειονομική Περίθαλψη των μεταναστών στον Ελλαδικό χώρο Γ.Γερολυμάτος, Καπετανάκη Α. , Γερολυμάτου Κ. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο για τη Διοίκηση, τα οικονομικά και τις πολιτικές Υγείας.
2015	Οι ψυχοκοινωνικές παράμετροι του φαινομένου της μετανάστευσης και ο ρόλος της Δημόσιας Υγείας. Μπράβου Α., Γερολυμάτος Γ., Ηλιόπουλος Δ. Κέντρο Επιχειρήσεων ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Ταξιδιωτικής Ιατρικής 15-17 Μαΐου 2015, Αθήνα
2015	Υποδοχή μεταναστών. Υγειονομικό screening, Εμβολιασμοί. Γ. Γερολυμάτος 1^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Ταξιδιωτικής, Γεωγραφικής & Τροπικής Ιατρικής 2015, Divani Caravel, Αθήνα
2016	Αποτύπωση του εύρους των υγειονομικών αναγκών των μεταναστών και του ρόλου της ταξιδιωτικής ιατρικής στην κάλυψή τους, με ταυτόχρονη προάσπιση της δημόσιας υγείας καθημερινά και σε περιόδους επιδημιών / κρίσεων. Γ. Γερολυμάτος 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ταξιδιωτικής, Γεωγραφικής & Τροπικής Ιατρικής 7 - 9 Οκτωβρίου 2016, 251 Γ.Ν.Α. - Αθήνα
2018	Group B Streptococcus detection in pregnant women: culture or PCR? <i>S. Baka (Athens, Greece), G. Gerolymatos, P. Karlovasiti, E.Logothesis, G. Kaparos, I. Tsouma, V. Gennimata, E. Kouskouni</i> ECCMID 2018, Madrid Spain
2018	Ανίχνευση του Στρεπτοκόκκου Ομάδας Β σε εγκύους: Καλλιέργεια ή PCR; Γ. Γερολυμάτος, Σ. Μπάκα, Π. Καρλοβασίτη, Ε. Λογοθέτης, Η. Τσούμα, Γ. Καπαρός, Β. Γεννηματά, Ε. Κουσκούνη Εργαστήριο Βιοπαθολογίας, Αρεταίειο Νοσοκομείο, Αθήνα 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 26-28/04/2018, Αθήνα
2018	Επίπτωση του GBS σε Ελληνίδες, εγκύους και μη. Γ. Γερολυμάτος, Σ. Μπάκα, Π. Καρλοβασίτη, Ε. Λογοθέτης, Η. Τσούμα,

	Γ. Καππαρός, Β. Γεννηματά, Ε. Κουσκούνη Εργαστήριο Βιοπαθολογίας, Αρεταίειο Νοσοκομείο, Αθήνα 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας 26-28/04/2018, Αθήνα
2018	ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΘΑΛΨΗ ΜΕΤΑΝΑΣΤΩΝ ΕΚΤΟΣ ΔΟΜΩΝ ΦΙΛΟΞΕΝΙΑΣ Ηλιόπουλος Δημήτριος, Γερολυμάτος Γεράσιμος, Τσέκου Αικατερίνη, Ρεμουντάκη Ελίνα, Τερζίδης Αγάπιος. 5ο Συνέδριο «ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΡΙΣΕΩΝ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΥΓΕΙΑΣ» 9-11 Φεβρουαρίου 2018, Ξενοδοχείο Divani Caravel, Αθήνα
2018	ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΓΚΩΝ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ & ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΤΩΝ ΔΟΜΩΝ ΦΙΛΟΞΕΝΙΑΣ ΠΡΟΣΦΥΓΩΝ/ΜΕΤΑΝΑΣΤΩΝ Ηλιόπουλος Δημήτριος, Γερολυμάτος Γεράσιμος, Τσέκου Αικατερίνη, Παππά Λαμπρινή, Μακρή Ευφραξία, Τερζίδης Αγάπιος 5ο ΣΥΝΕΔΡΙΟ «ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΡΙΣΕΩΝ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΥΓΕΙΑΣ» 9-11 Φεβρουαρίου 2018, Ξενοδοχείο Divani Caravel, Αθήνα
2018	Διαδραστικό Ενημερωτικό Βήμα Ε.Ε.Τ.Ι. Εμβολιασμοί και Ταξίδι Γ. Γερολυμάτος Ημέρες Υγείας 2018 Αθήνα, Ζάππειο Μέγαρο
2018	Evaluation of pharmaceutical needs of immigrants living in refugee camps in Greece G. Gerolymatos, D. Iliopoulos, A. Tsekou, A. Terzidis, T. Rosenberg European Public Health Conference, Ljubljana, 2018

1. Παρακολούθηση συνεδρίων

2000	12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS Αθήνα
2001	22nd International congress of chemotherapy Amsterdam, Netherlands
2002	5ο Σεμινάριο “Έντατική Θεραπεία – Αέρια αίματος- Οξεοβασική Ισορροπία” Αθήνα
2002	3rd European conference on Travel Medicine Florence, Italy
1999-2002	2^ο-3^ο-4^ο-5^ο-6^ο-7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φοιτητών Νοσηλευτικής Αθήνα
2004	«Διαλέξεις συνεχιζόμενης εκπαίδευσης στη Μαιευτική και Γυναικολογία» Αθήνα
2006	Ημερίδα με Θέμα: «Μικροβιολογία Αναερόβιων Λοιμώξεων» Αθήνα
2005-2017	1^ο, -13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο για τη Διοίκηση, τα Οικονομικά και τις Πολιτικές Υγείας. Αθήνα

2007	5th International conference on “Information Communication Technologies in Health” Samos, <i>Greece</i>
2007	3^d Trends in Medical Mycology Torino, <i>Italy</i>
2007	17th European Congress of Clinical Microbiology and infectious diseases Munich, <i>Germany</i>
2008	18th European Congress of Clinical Microbiology and infectious diseases Barcelona, <i>Spain</i>
2008	11^ο Θεματικό Συνέδριο: Εντατική Θεραπεία και Επείγουσα Ιατρική: Κλινικές Περιπτώσεις και Σπάνια Νοσήματα Αθήνα
2009	7th International Conference on “Information Communication Technologies in Health” ICICTH Samos 2009
2014	4 ^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ταξιδιωτικής (Γεωγραφικής & Τροπικής) Ιατρικής. <u>Παρακολούθηση Φροντιστηρίου με τίτλο:</u> « Ασφαλής προετοιμασία ειδικών ομάδων ταξιδιωτών » « Εξέλιξη αναδυόμενων λοιμώξεων » « Η επιστροφή του ταξιδιώτη »
2016	5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ταξιδιωτικής, Γεωγραφικής & Τροπικής Ιατρικής 7 - 9 Οκτωβρίου 2016, 251 Γ.Ν.Α. - Αθήνα
2015	1^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Ταξιδιωτικής, Γεωγραφικής & Τροπικής Ιατρικής 2015, Divani Caravel, Αθήνα
2018	1^ο – 5^ο ΣΥΝΕΔΡΙΟ «ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΡΙΣΕΩΝ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΥΓΕΙΑΣ» 9-11 Φεβρουαρίου 2018, Ξενοδοχείο Divani Caravel, Αθήνα
2018	10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας 26-28/04/2018, Αθήνα

2. Ξένες γλώσσες

Αγγλικά	First Certificate in English από το Πανεπιστήμιο του Cambridge . (1994)
	Certificate of Proficiency in English από το Πανεπιστήμιο του Cambridge . (1995)
Γαλλικά	Diplôme d'études en langue Française D.E.L.F 1er Degré <i>Unités (A1,A2,A3,A4)</i>
	Diplôme d'études en langue Française D.E.L.F 2nd Degré <i>Unité (A5 A6)</i>
Ιταλικά	Εμπειρική γνώση

3. Υπολογιστές και γλώσσες προγραμματισμού

Λειτουργικά συστήματα (Άριστη γνώση χειρισμού και προχωρημένης παραμετροποίησης)	MS Windows (95 – 10) Επάρκεια ECDL (βάσει Π.Δ. 44/2005 ΦΕΚ 63/Α/9.3.2005) MS Windows Server unRAID (KVM)
	Linux (RPM, Debian based)
Εφαρμογές (Άριστη γνώση χειρισμού και προχωρημένης παραμετροποίησης)	MS OFFICE PRO (2007-13)
	VISUAL STUDIO, STATA, SPSS, QUANTUM GIS, E-POP, ECDC-EMMA, WORDPRESS, GLeamViz, VmWare, TrueCrypt
Γλώσσες προγραμματισμού (Πολύ καλή γνώση)	Visual Basic, SQL, Python
Καλή γνώση	C++, Turbo pascal

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I ΕΙΣΑΓΩΓΗ

II ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Στρεπτόκοκκοι

- 1.1 Ιστορία
- 1.2 Περιγραφή
- 1.3 Ταξινόμηση
 - 1.3.1 Αιμολυτικές ιδιότητες
 - 1.3.2 Αντιγονική δομή
- 1.4 Στρεπτόκοκκοι της ομάδας B
 - 1.4.1 Μορφολογία και αναγνώριση
 - 1.4.2 Πολυσακχαριδικά αντιγόνα και ανίχνευση οροτύπων
 - 1.4.3 Πρωτεΐνες επιφάνειας
- 1.5 Γονιδιακή δομή
 - 1.5.1 Μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης
 - 1.5.2 PFGE
 - 1.5.3 MILST

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Η βακτηριακή χλωρίδα του Κόλπου

- 2.1 Εισαγωγή
- 2.2 Η φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Νεογνικές λοιμώξεις

- 3.1 Ορισμοί
- 3.2 Νεογνική Σήψη
- 3.3 Η επίπτωση της νεογνικής σήψης
- 3.4 Αιτιολογία της νεογνικής σήψης
- 3.5 Νεογνικές Λοιμώξεις από GBS
 - 3.5.1 Μετάδοση
 - 3.5.2 ΠΕΝ (Πρωΐμης Εμφάνισης Νόσος)
 - 3.5.3 ΟΕΝ (Όψιμης Εμφάνισης Νόσος)
 - 3.5.4 Μακροχρόνιες συνέπειες και υπολειμματικές βλάβες
- 3.6 Παθογένεια και νοσογόνοι παράγοντες
 - 3.6.1 Αποικισμός
 - 3.6.2 Προσκόλληση στα κύτταρα του ξενιστή
 - 3.6.3 Διείσδυση μέσω των κυτταρικών φραγμών
 - 3.6.4 Κυτταροτοξικότητα εναντίον των φαγοκυττάρων και απενεργοποίηση του συμπληρώματος
 - 3.6.5 Κυτταροτοξικότητα εναντίον των κυττάρων του μυοκαρδίου
 - 3.6.6 Ενεργοποίηση φλεγμονώδους απάντησης
 - 3.6.7 Ανθεκτικότητα στους μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας
 - 3.6.8 Παράγοντες του ξενιστή
- 3.7 Αντιμικροβιακή αντιμετώπιση της νεογνικής σήψης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Στρατηγικές πρόληψης

- 4.1 Εισαγωγή
- 4.2 Παράγοντες κινδύνου

- 4.2.1 Αποικισμός της γεννητικής οδού της μητέρας από GBS
- 4.2.2 Προωρότητα και χαμηλό βάρος νεογνού
- 4.2.3 Παράταση χρόνου Ρήξης Μεμβρανών - Τοκετού
- 4.2.4 Πυρετός
- 4.2.5 Χοριοαμνιονίτιδα
- 4.2.6 Βακτηριουρία (GBS)
- 4.2.7 Μητρικά αντισώματα
- 4.2.8 Ιστορικό ΠΕΝ νεογνού ή μητρικού αποικισμού σε προηγηθέντα τοκετό, ως παράγοντας κινδύνου για επόμενο τοκετό
- 4.2.9 Λοιποί παράγοντες
- 4.3 Η εξέλιξη και τα αποτελέσματα των στρατηγικών πρόληψης
 - 4.3.1 Δεκαετία του 1990
 - 4.3.2 Δεκαετία του 2000
- 4.4 Τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες
 - 4.4.1 Διαλογή των περιπτώσεων για χορήγηση ΙΑΡ
 - 4.4.2 Επιλογή της χρονικής περιόδου για τον έλεγχο διαλογής
- 4.5 Αποτελέσματα των εφαρμοζόμενων στρατηγικών πρόληψης
 - 4.5.1 Αντιμικροβιακή αντοχή του GBS
- 4.6 Εμβολιασμός

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μέθοδοι ανίχνευσης

- 5.1 Εισαγωγή
- 5.2 Η καλλιέργεια
- 5.3 Δοκιμασίες αντιγόνων
- 5.4 Δοκιμασίες υβριδισμού
- 5.5 PCR

III ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Σκοπός της μελέτης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. Υλικό και Μέθοδοι

- 7.1 Ασθενείς
- 7.2 Πρωτόκολλο
- 7.3 Μέθοδοι επεξεργασίας
 - 7.3.1 7.3.1 Καλλιέργεια
 - 7.3.2 PCR
 - 7.3.2.1
 - 7.3.3
- 7.4 Στατιστική Ανάλυση. Μέθοδοι που εφαρμόστηκαν

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. Αποτελέσματα και ανάλυση

- 8.1 Συνοπτική αποτύπωση των αποτελεσμάτων
- 8.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων
 - 8.2.1 Συχνότητα αποικισμού
 - 8.2.2 Συχνότητα αποικισμού σε εγκύους και μη καθώς και μεταξύ των τριμήνων κύησης.
 - 8.2.3 Σύγκριση μεθόδων συλλογής δειγμάτων.
 - 8.2.4 Ηλικιακή κατανομή αποτελεσμάτων.
- 8.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων της μεθόδου PCR

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. Συζήτηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. Συμπεράσματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11. Περίληψεις

11.1 Περίληψη

11.2 Summary

IV ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Ταχεία ανίχνευση των Στρεπτοκόκκων ομάδας Β σε επίτοκες γυναίκες με
νεότερες μοριακές τεχνικές**

I ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο Στρεπτόκοκκος της ομάδας B, αναφερόμενος και ως Lancefield Group B *Streptococcus* (GBS), είναι gram-θετικός κόκκος, που αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα παθογόνα αίτια για την πρόκληση επιθετικής λοιμώδους νόσου σε νεογνά. Παρά το γεγονός ότι, η πρώτη καταγραφή της νόσου έγινε το 1935 από τους Lancefield και Hare, η μητρική λοίμωξη από GBS αναγνωρίσθηκε επίσημα σαν αίτιο νεογνικής λοίμωξης στις αρχές της δεκαετίας του 1960. Έκτοτε και μέχρι σήμερα, εξακολουθεί να είναι μια από τις κυριότερες αιτίες νεογνικής νοσηρότητας στις ανεπτυγμένες χώρες, με υψηλά ποσοστά θνητότητας (5%-20%). Στα νεογνά επικρατεί ο διαχωρισμός της νόσου σε δύο κλινικά σύνδρομα: στην Πρώιμης Εμφάνισης Νόσο (ΠΕΝ), όταν εμφανίζεται κατά την πρώτη εβδομάδα ζωής του νεογνού και στην Όψιμης Εμφάνισης Νόσο (ΟΕΝ), όταν εμφανίζεται σε χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας έως και 3 μηνών από τον τοκετό.

Η μετάδοση του GBS από τη μητέρα με αποικισμένο κόλπο στο νεογνό συμβαίνει στο 30%-70% των περιπτώσεων. Τα περισσότερα νεογνά παραμένουν ασυμπτωματικά. Ποσοστό όμως 1%-3% από αυτά θα εμφανίσει σοβαρή νόσο. Η μετάδοση μπορεί να γίνει ενδομητρίως διαμέσου άθικτης μεμβράνης ή κατά τη διαδρομή στο γεννητικό σωλήνα κατά τον τοκετό. Η πυκνότητα του αποικισμού κατά τον τοκετό ή τη ρήξη των μεμβρανών συνδέεται άμεσα με τον κίνδυνο κάθετης μετάδοσης στο νεογνό και την εμφάνιση ΠΕΝ, που εκδηλώνεται κλινικά με σημεία συστηματικής λοίμωξης, όπως καλπάζουσα πνευμονία και σήψη ή σπανιότερα μηνιγγίτιδα.

Η συνέπειες της νεογνικής νόσου από GBS εκτείνονται πέρα από τη νεογνική θνητότητα σε μακροχρόνιες νευρολογικές βλάβες, όπως εξασθενημένη όραση, απώλεια ακοής και εμφάνιση νοητικής υστέρησης. Μεταξύ των βρεφών που παρουσιάζουν μηνιγγίτιδα από GBS περίπου το 50%

εμφανίζει μακροχρόνια νευρολογικά συμπτώματα ενώ έως και το 30% θα παρουσιάσει σημαντικές νευρολογικές βλάβες.

Κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν προταθεί σημαντικές μέθοδοι πρόληψης της νεογνικής νόσου από GBS. Μελέτες της δεκαετίας του '80 απέδειξαν ότι η επιλεκτική χορήγηση χημειοπροφύλαξης με β-λακτάμες στις επίτοκες είναι η πλέον αποτελεσματική μέθοδος πρόληψης. Ο κύριος στόχος των μεθόδων επιλογής υποψηφίων είναι η εξάλειψη της μετάδοσης του GBS στο νεογνό, με τη χορήγηση αντιμικροβιακής αγωγής στη μητέρα-φορέα του GBS κατά τον τοκετό. Οι κατευθυντήριες οδηγίες του CDC καθώς και αρκετών Ευρωπαϊκών Χωρών βασίζονται στον καθολικό προγεννητικό έλεγχο με καλλιέργεια για τον αποικισμό με GBS μεταξύ της 35^{ης} και 37^{ης} εβδομάδας της κύησης. Μια στρατηγική, βασιζόμενη σε ταχεία ανίχνευση του GBS στην επίτοκο κατά την εισαγωγή για τοκετό, μπορεί εμφανώς να μειώσει τις ακόμη και σήμερα παρατηρούμενες περιπτώσεις ΠΕΝ καθώς και τις περιπτώσεις που γίνεται άσκοπη χρήση της χημειοπροφύλαξης.

Κατά την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί ταχείες διαγνωστικές μέθοδοι ανίχνευσης αντιγόνων και υβριδισμού. Αυτές οι μέθοδοι, ενώ παρουσιάζουν υψηλή ειδικότητα, δείχνουν να έχουν χαμηλή ευαισθησία, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πιθανότητα ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων σε περιπτώσεις χαμηλού βαθμού αποικισμού. Εντούτοις, τελευταίες εξελίξεις στις μεθόδους PCR έχουν προσφέρει μια σειρά νέων πρακτικών ανίχνευσης και ταυτοποίησης βακτηριδίων. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι μέθοδοι PCR πραγματικού χρόνου (Τεχνικές Ενίσχυσης Νουκλεϊκού Οξέος) παρουσιάζουν ισάξια ή και ανώτερα αποτελέσματα προγνωστικής αξίας με την καλλιέργεια στις 35-37 εβδομάδες κύησης, για την ανίχνευση αποικισμού

από GBS. Ο χρόνος εκτέλεσης των παραπάνω μεθόδων είναι 45-100 λεπτά, ενώ απαιτείται ελάχιστη απασχόληση ανθρώπινου δυναμικού.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση της αρνητικής και θετικής προγνωστικής αξίας νεότερης τεχνικής ταχείας PCR, με άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου με εκείνα από την επεξεργασία με κλασσική καλλιέργεια 36 ωρών, σε δείγματα που έχουν ληφθεί από τον κόλπο και το ορθό στο χρονικό διάστημα μεταξύ 35-37^{ης} εβδομάδος της κύησης καθώς και σε δείγματα που έχουν ληφθεί μετά τη ρήξη των μεμβρανών.

II ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στρεπτόκοκκοι

1.1 Ιστορία.

Οι πρώτες αναφορές των συμπτωμάτων που προκαλούσαν οι λοιμώξεις από στρεπτοκόκκους εμφανίζονται σε κείμενα του 5^{ου} αιώνα π.Χ. Από τότε, με την πάροδο των αιώνων, τα συμπτώματα που προκαλούσαν οι λοιμώξεις από στρεπτόκοκκους αναφέρονται με αυξανόμενη συχνότητα σε έγγραφα ιατρών και ιστορικών.

Η πρώτη αναφορά στο στρεπτόκοκκο αποδίδεται στον Ιπποκράτη, ο οποίος περιγράφει τα σχετικά συμπτώματα ενός «σαρκοφάγου» βακτηριδίου. Αρκετούς αιώνες αργότερα, το 1874, ο Theodor Billroth, Αυστρο-Γερμανός χειρουργός, παρατήρησε βακτηρίδια με μορφή κόκκων, διπλόκοκκων και αλυσίδων στο πύον ασθενών. Ήταν ο πρώτος που πρότεινε το όνομα Στρεπτόκοκκος από τις ελληνικές λέξεις Στρεπτός και Κόκκος[1,6].

Πολύ νωρίτερα, στις αρχές του 1800, μία αντιφατική φυσιογνωμία της Ιατρικής, ο Ούγγρος μαιευτήρας Ignác Semmelweiss, ήταν ο πρώτος που συνέδεσε την περιγεννητική λοίμωξη με μεταδοτικό (λοιμώδη) παράγοντα. Σε μία - κεφαλαιώδη για την εποχή - παρατήρηση, ο Semmelweiss συνέδεσε το θάνατο από σήψη ενός από τους συναδέλφους του, ο οποίος πραγματοποίησε βιοψία σε γυναίκα με επιλόχεια σήψη, σε λοιμώδη παράγοντα που βρισκόταν στο βιοψικό υλικό. Οι παρατηρήσεις του

οδήγησαν στην καθιέρωση του πλυσίματος των χεριών πριν και μετά την εξέταση του ασθενή. Οι εικασίες του όμως για οργανικό αιτιολογικό παράγοντα στην περιγεννητική σήψη, αποτέλεσαν τη βάση για τη μικροβιακή θεωρία της λοίμωξης, μερικές δεκάδες χρόνια αργότερα[2,3].

Αργότερα το 1883, βακτηρίδια που σχημάτιζαν αλυσίδες απομονώθηκαν από τον Friedrich Fehleisen, Γερμανό χειρουργό, σε ασθενείς με ρευματικό πυρετό, φαρυγγίτιδα και νεκρωτική φλεγμονή. Ένα χρόνο αργότερα ο Γερμανός μικροβιολόγος Friedrich Julius Rosenbach, καθιέρωσε τον όρο *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) και απέδωσε το αίτιο του ερυσιπέλατος στο βακτηρίδιο αυτό [6]. Παρά τις έρευνες του Fehleisen, πιστεύεται πως ο Louis Jean Pasteur ήταν εκείνος που πρώτος αναγνώρισε, σε καλλιέργεια αίματος γυναίκας με επιλόχειο πυρετό το στρεπτόκοκκο, το 1879[4,5].

Η περαιτέρω διερεύνηση του βακτηριδίου συνεχίστηκε και στις αρχές του επόμενου αιώνα από τους Hugo Schottmueller και J.H. Brown οι οποίοι μελέτησαν και καθόρισαν τα πρότυπα α, β και γ αιμόλυσης. Μεγαλύτερη πρόοδος στον τομέα των αιμολυτικών δομών του *S. Pyogenes* έγιναν από την Αμερικανή μικροβιολόγο Rebecca Lancefield. Για πρώτη φορά, ο GBS ταυτοποιήθηκε σαν αίτιο περιγεννητικής σήψης το 1935, όταν οι Lancefield and Hare παρατήρησαν διαφορές στα χαρακτηριστικά των αιμολυτικών καλλιεργειών δύο τύπων στρεπτοκόκκων, που είχαν ληφθεί από βιοψικό υλικό γυναικών με περιγεννητική σήψη[8,9]. Η ταυτοποίηση και ο διαχωρισμός οροτύπων οδήγησαν στην σε βάθος κατηγοριοποίηση των β-αιμολυτικών στρεπτόκοκκων τη δεκαετία του 1930 και η πρώτη καταγραφή περιστατικών με βαρεία σήψη και θανατηφόρο κατάληξη, που οφειλόταν σε στρεπτόκοκκο ομάδας Β έγινε από τον Fry το 1938[11]. Τέλος, από ιστορικής πλευράς, ο στρεπτόκοκκος ομάδας Β (*Streptococcus*

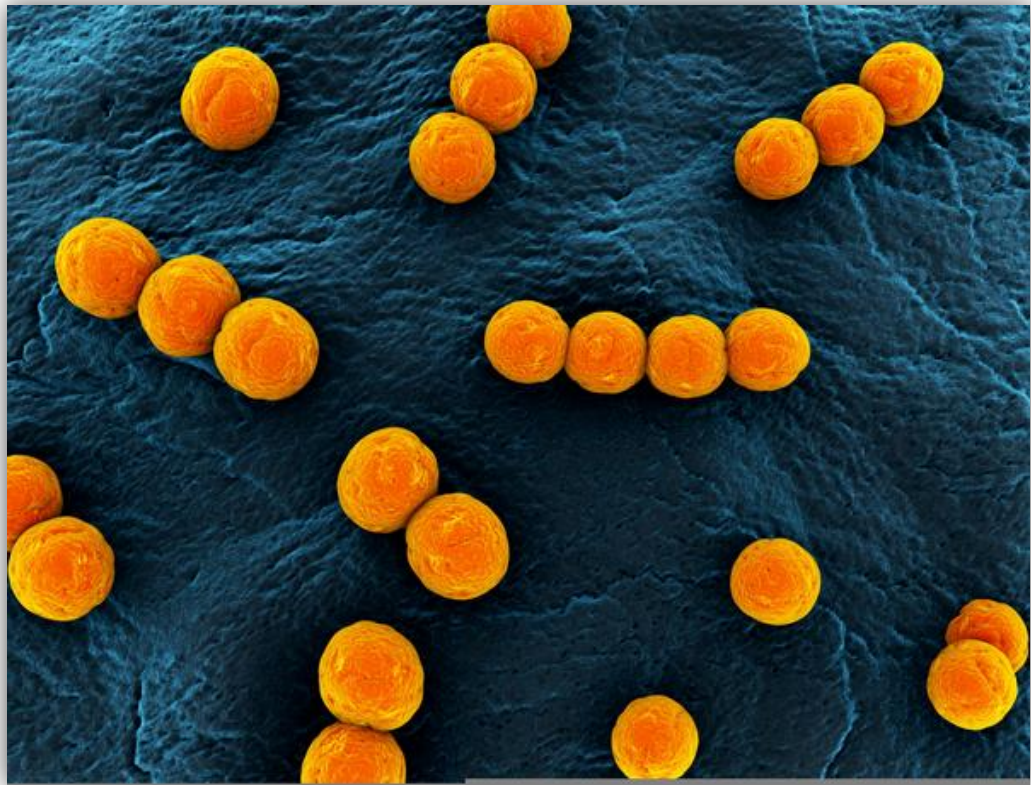
agalactiae, GBS) άρχισε να περιγράφεται σαν σημαντικός αιτιολογικός παράγων σε απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις νεογνών (<3 ημερών) τη δεκαετία του 1960[10,13,14].

1.2 Περιγραφή

Οι στρεπτόκοκκοι είναι θετικοί κατά gram ακίνητοι κόκκοι(στρογγυλά ή ωοειδή έως και επιμήκη βακτηρίδια με διάμετρο 1μm). Είναι δυνητικά αναερόβιοι και διατάσσονται σε περιστρεφόμενες (στρεπτές) αλυσίδες ή κατά ζεύγη (διπλόκοκκοι). Δεν παράγουν καταλάση και δε σχηματίζουν σπόρους Η πλειοψηφία των στρεπτόκοκκων ανήκει στη φυσιολογική χλωρίδα των βλεννογόνων.

Πίνακας 1. Γενεαλογική ταξινόμηση των Στρεπτοκόκκων

Βασίλειο:	Βακτηρίδια
Φύλο:	<u>Firmicutes</u>
Κλάση:	<u>Coccus</u>
Τάξη:	<u>Lactobacillales</u>
Οικογένεια:	<u>Streptococcaceae</u>
Γένος:	<u>Streptococcus</u>



Εικόνα 1. Στρεπτόκοκκοι στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, χρωματισμένοι τεχνητά.

(Πηγή: <http://imgkid.com/streptococcus-pyogenes-bacteria.shtml>)

1.3 Ταξινόμηση

Οι στρεπτόκοκκοι διαχωρίζονταν παλαιότερα σε δύο κατηγορίες, το στρεπτόκοκκο τον πυογενή (*S. Pyogenes*) και το στρεπτόκοκκο της πνευμονίας ή πνευμονιόκοκκο (*S. pneumoniae*). Περαιτέρω μελέτες οδήγησαν στη διαπίστωση ότι, τα δύο αυτά γένη αποτελούνται από

πολυάριθμα είδη, τα οποία για πρακτικούς λόγους στην ιατρική διαιρούνται σε 3 κατηγορίες, σύμφωνα με τις αιμολυτικές τους ιδιότητες και σε περισσότερες υποκατηγορίες, ανάλογα με την αντιγονική τους δομή.

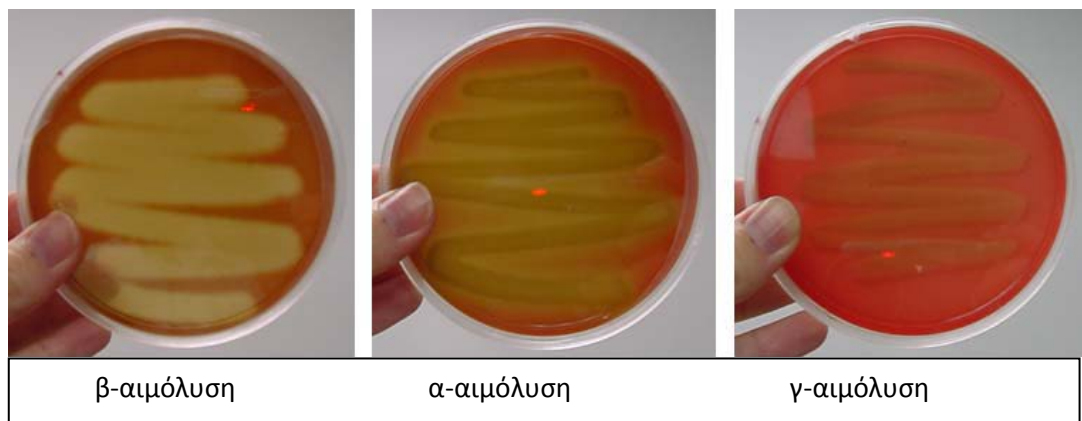
1.3.1 Αιμολυτικές ιδιότητες.

Ο διαχωρισμός βάσει των αιμολυτικών ιδιοτήτων γίνεται με την παρατήρηση του επιπέδου της αιμόλυσης σε αποικίες στρεπτόκοκκων σε αιματούχο άγαρ.

- **α-Αιμόλυση**: Οι αποικίες περιβάλλονται από πράσινη ζώνη. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου που παράγεται από τα βακτηρίδια προκαλεί την οξείδωση του σιδήρου στο μόριο της αιμοσφαιρίνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων μετατρέποντάς τη σε μεθαιμοσφαιρίνη, ένωση όμοια με χολοπρασίνη, στην οποία οφείλεται και η πρασινωπή χροιά της ζώνης αιμόλυσης. Αναφέρεται και ως ατελής ή πράσινη αιμόλυση.
- **β-Αιμόλυση**: Στην περιοχή των αποικιών και γύρω από αυτές παρατηρείται πλήρης αιμόλυση. Η εξωτοξίνη του βακτηριδίου, που ορίζεται ως στρεπτολυσίνη, προκαλεί τη λύση των αιμοσφαιρίων και την αποδόμηση της αιμοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα η περιοχή να εμφανίζει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Ορισμένα είδη ασθενώς β-αιμολυτικού στρεπτόκοκκου παρουσιάζουν εντονότερη αιμόλυση όταν καλλιεργούνται σε αιματούχο άγαρ μαζί με χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο. Η αιμολυτική δράση του στρεπτοκόκκου εντείνει τη ζώνη αιμόλυσης από τη β-αιμολυσίνη του σταφυλόκοκκου με αποτέλεσμα να σχηματίζονται περιοχές έντονης αιμόλυσης με

τη μορφή βέλους στο σημείο διατομής των αποικιών (CAMP test). Ο *S. agalactiae* ανήκει σε αυτή την κατηγορία στρεπτόκοκκων.

- **γ-Αιμόλυση**: Με τον όρο αυτό περιγράφεται η απουσία αιμόλυσης.



Εικόνα 2. Τα επίπεδα αιμόλυσης σε καλλιέργεια στρεπτόκοκκου σε αιματούχο άγαρ.

(Πηγή: <http://www2.collin.edu/MicrobiologyTutorial/>)

1.3.2 Αντιγονική δομή

Οι μελέτες της Αμερικανίδας μικροβιολόγου Rebecca Lancefield οδήγησαν στην ανακάλυψη ενός επιφανειακού αντιγόνου, το οποίο

αποδείχθηκε εξαιρετικά χρήσιμο στην κατηγοριοποίηση των στρεπτόκοκκων. Το αντιγόνο ονομάστηκε αντιγόνο *Lancefield* και η κατηγοριοποίηση «κατά Lancefield» (Lancefield grouping). Πρόκειται για έναν πολυμερή υδατάνθρακα στο κυτταρικό τοίχωμα των περισσότερων στρεπτόκοκκων με ποικίλη αντιγονική συμπεριφορά, ανάλογα με την οποία οι στρεπτόκοκκοι κατατάσσονται σε ομάδες κατά Lancefield A – V. Το γεγονός ότι, το αντιγόνο αυτό απουσιάζει από το κυτταρικό τοίχωμα αρκετών στελεχών στρεπτόκοκκου καθώς και η εκρηκτική αύξηση του ρυθμού ανακάλυψης νέων στελεχών, έχουν οδηγήσει στη σταδιακή εγκατάλειψη του συστήματος κατηγοριοποίησης κατά Lancefield. Εντούτοις, καθώς το μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν στελέχη που είναι συχνότερα παθογόνα για τον άνθρωπο, το σύστημα χρησιμεύει ακόμη για την περιγραφή τριών εκ των 5 σημαντικότερων ομάδων: των στρεπτόκοκκων ομάδας A, B, D καθώς και 2 ομάδων στρεπτόκοκκων που δεν έχουν το επιφανειακό αντιγόνο Lancefield, του *S. pneumoniae* και του *S. viridans* (από το λατινικό: *viridis* που σημαίνει πράσινο)[10].

Πίνακας 2. Ταξινόμηση ορισμένων από τους σημαντικότερους στρεπτόκοκκους σύμφωνα με τις αντιγονικές (Lancefield) και αιμολυτικές ιδιότητες.

Είδος	Αιμόλυση	Αντιγόνο Lancefield
S. pyogenes	β	A
S. Agalactiae	β	B
C	β(α-γ)	C
G	β	G
S. pneumoniae	α	-
S. bovis	α-γ	D
Εντερόκοκκοι		
E. faecalis	α	D
E. faecium	α-γ	D

1.4 Οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας B.

Ο στρεπτόκοκκος της Ομάδας B ή GBS (Group B *Streptococcus*), έγινε γνωστός ως παθογόνος παράγοντας που προκαλούσε μαστίτιδα στα βοοειδή και ως εκ τούτου του αποδόθηκε η ονομασία *S. agalactiae contagiosae*, που αργότερα συντμήθηκε στην ονομασία *S. agalactiae* (που σημαίνει «χωρίς γάλα» στα λατινικά). Περιγράφηκε για πρώτη φορά ως αίτιο ανθρώπινης λοίμωξης το 1938, σε τρεις περιπτώσεις θανατηφόρου επιλόχειου πυρετού. Τη δεκαετία του 1970 όμως αποτέλεσε την πρωταρχική αιτία περιγεννητικών διεισδυτικών νεογνικών λοιμώξεων, καθώς ανιχνευόταν στο 40% περίπου των περιπτώσεων.

1.4.1 Μορφολογία και αναγνώριση

Οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας B (Lancefield Group B *Streptococci* ή GBS) είναι δυνητικά αναερόβιοι gram θετικοί κόκκοι, οι οποίοι σχηματίζουν αποικίες με σχήμα αλυσίδων διαφόρων μεγεθών σε ποικιλία θρεπτικών μέσων. Οι αποικίες έχουν διάμετρο 1-3mm και εμφανίζουν γκρίζο ή λευκό χρώμα σε καλλιέργεια με αιματούχο άγαρ. Οι επίπεδες, βλεννώδεις αποικίες περιβάλλονται από υποκίτρινη ζώνη που προκαλείται από την πλήρη αιμόλυση (β-αιμόλυση). Ένα ποσοστό περίπου 2% των GBS είναι μη αιμολυτικοί [7].

1.4.2. Πολυσακχαριδικά αντιγόνα και ανίχνευση οροτύπων.

Ο GBS παράγει δύο ευδιάκριτα πολυσακχαριδικά αντιγόνα. Το αντιγόνο Lancefield τύπου B το οποίο είναι κοινό σε όλα τα στελέχη, και τους ειδικούς πολυσακχαρίτες της κάψας (Capsular Polysaccharides, CPS). Με βάση τους τελευταίους, οι GBS διαιρούνται σε περαιτέρω οροτύπους. Σημαντικούς αντιγονικούς παράγοντες αποτελούν επίσης οι πρωτεΐνες που βρίσκονται καθηλωμένες στην επιφάνεια της κάψας. Για την αναγνώριση του GBS είναι απαραίτητη η ανίχνευση του ειδικού αντιγόνου Lancefield τύπου B. Η κοινότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται, είναι η αντίδραση συγκόλλησης με latex, ενώ έχουν αναπτυχθεί και αντιοροί μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου τύπου B.

Σχεδόν όλα τα εργαστηριακώς μελετημένα στελέχη GBS έχουν ειδικό καψικό πολυσακχαρίτη (CPS). Οι CPS είναι επαναλαμβανόμενες μονάδες πέντε έως επτά μονοσακχαριτών (γλυκόζη, γαλακτόζη, γλυκοζαμίνη, N-ακετυλ-νευραμινικό οξύ ή σιαλικό οξύ) και με βάση αυτούς, οι GBS υποδιαιρούνται σε 10 αντιγονικά μοναδικούς οροτύπους (Ia, Ib, και II – IX) [8,9,10]. Εντούτοις, περίπου 4-7% των στελεχών δεν παρουσιάζουν αντιγονική αντίδραση και χαρακτηρίζονται ως μη-τυποποιήσιμοι. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί: α) σε περιπτώσεις μη ενθυλακωμένων στελεχών (χωρίς επιφανειακούς πολυσακχαρίτες), β) σε περιπτώσεις CPS που δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί και άρα δεν υπάρχουν τα αντίστοιχα αντισώματα για την ανίχνευσή τους και γ) σε περιπτώσεις μεταλλάξεων ή ενθέσεων σε γονίδια που κωδικοποιούν τους CPS [12,15,16]. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νεότερες μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης γονιδιακών συμπλεγμάτων, που κωδικοποιούν τα μόρια της κάψας [17,18].

1.4.3 Πρωτεΐνες επιφάνειας.

Τα περισσότερα στελέχη των GBS εκφράζουν μια ποικιλία επιφανειακών πρωτεϊνών. Παρόλο που οι περισσότερες μελέτες για την αντιγονική δράση των μορίων της κάψας των GBS είχαν μέχρι πρόσφατα εστιάσει στους CPS, το ενδιαφέρον των ερευνητών στρέφεται στις επιφανειακές πρωτεΐνες. Οι επιφανειακές πρωτεΐνες, με βάση τα στοιχεία νέων μελετών, παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των στελεχών, ενώ αρκετές από αυτές προκαλούν ανοσία σε θηλαστικά και είναι υποψήφιες για την κατασκευή εμβολίων[19]. Η πρώτη πρωτεΐνη που αναγνωρίστηκε είναι το αντιγόνο c, το οποίο αποτελείται από την ανθεκτική στην τρυψίνη πρωτεΐνη α και την ευαίσθητη στην τρυψίνη πρωτεΐνη β.[20,21]. Τα στελέχη μπορεί να

εκφράζουν την α πρωτεΐνη, την β πρωτεΐνη ή και τις δύο. Οι κύριες εντοπισμένες επιφανειακές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες α -c, β -c, τις πρωτεΐνες R (R1, R3 και R4) και τις προσομοιάζουσες Alpha πρωτεΐνες Alp2 και Alp3 οι οποίες μπορεί να είναι παραλλαγές της πρωτεΐνης R1 [22,23]. Η πρωτεΐνη ϵ (epsilon) αναφέρεται επίσης ως Alp1.

Οι πρωτεΐνες α -c, Alp1, Alp3, Rib και ϵ /Alp1, αντίθετα από την πρωτεΐνη β -c, χαρακτηρίζονται από ομοιότητες στην πρωτογενή τους δομή (με ομολογία που αγγίζει το 100% στην τριτοταγή τους δομή) καθώς και από το χαρακτηριστικό σχηματισμό «σκάλας» στις αναλύσεις Western Blot[24]. Η εικόνα αυτή οφείλεται πιθανώς σε μεγάλες επαναλαμβανόμενες ομάδες, ο αριθμός των οποίων μεταβάλλεται από στέλεχος σε στέλεχος[25,26].

Οι επιφανειακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από σταθερά μωσαϊκά γονίδια, τα οποία προκύπτουν από τον ανασυνδυασμό τμημάτων αλληλουχιών στον ίδιο γενετικό επίτοπο. Τα γονίδια *bca*, *ϵ /alp1*, *bac*, *rib*, *alp2* και *alp3* κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες α -c, epsilon(ϵ)/Alp1, β c, Rib, Alp2 και Alp3 αντίστοιχα[24,26].

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά ορισμένων εκ των σημαντικότερων επιφανειακών πρωτεϊνών του GBS.

[27,28,29,30]

Πρωτεΐνη	Αντιγονικά χαρακτηριστικά
C5a πεπτιδάση	Παρούσα σε όλα τα στελέχη GBS χωρίς ιδιαίτερες αντιγονικές παραλλαγές. Προκαλεί ανοσοποίηση για όλους τους οροτύπους [177].
β-Συστατικό της πρωτεΐνης c	Προκαλεί προστατευτική ανοσία [163] (1992)
LmbP	Εκφράζεται από την πλειοψηφία των GBS (2005)
Sip	Παρούσα σε όλα τα στελέχη GBS, Παράγει προστατευτική ανοσία [179]
LrrG	Διατηρημένη πρωτεΐνη. Παράγει προστατευτική ανοσία [182].
Σύμπλοκη πρωτεΐνη από το αμινοτελικό άκρο της Rib και του συστατικού α της πρωτεΐνης c	Παράγει ανοσία ακόμη και χωρίς ανοσοενισχυτικό (2007).

1.5 Γονιδιακή δομή.

Μέχρι σήμερα έχουν χαρτογραφηθεί:

- Πλήρως, το γονιδίωμα τριών στελεχών GBS: του *S. agalactiae* NEM 316, *S. agalactiae* 2603 V/R, και *S. agalactiae* A909.

- Μερικώς, το γονιδίωμα πέντε στελεχών: *S. agalactiae* 515, *S. agalactiae* CJB111, *S. agalactiae* COH1, *S. agalactiae* H36B και *S. agalactiae* 18RS21
- πλήρως το γονιδίωμα δύο πλασμιδίων: *pGB3631* και *pGB354* [31]

Ο *S.agalactiae* NEM 316 αντιστοιχεί στον ορότυπο III [31]. Η ολική γονιδιακή του ακολουθία αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα (dsDNA) με 2.211.485 nt

(87% κωδικοποιητικό περιεχόμενο), που περιλαμβάνει 2.235 γονίδια, από τα οποία τα 2.094 κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα 101 δομικό RNA και 40 ψευδογονίδια.

Ο *S.agalactiae* 2603V/R αντιστοιχεί στον ορότυπο V [31]. Η ολική γονιδιακή του ακολουθία αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα (dsDNA) με 2.160.267nt

(86% κωδικοποιητικό περιεχόμενο), που περιλαμβάνει 2.124 γονίδια, από τα οποία τα 1.996 κωδικοποιούν πρωτεΐνες και τα 102 δομικό RNA.

Ο *S.agalactiae* A909 αντιστοιχεί στον ορότυπο Ic. Η ολική γονιδιακή του ακολουθία αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα (dsDNA) με 2.127.839nt

(86% κωδικοποιητικό περιεχόμενο), που περιλαμβάνει 2.136 γονίδια, από τα οποία τα 1.996 κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα 102 δομικό RNA και 32 ψευδογονίδια.

Η ανάλυση του γονιδιώματος του NEM316 ταυτοποίησε τις υπεύθυνες για την κωδικοποίηση περιοχές εξωκυττάρων μορίων, με σημαντικό ρόλο στην αντιγονικότητα και τη λοιμογόνο δράση του GBS, όπως οι CPS και οι

επιφανειακές πρωτεΐνες. Το γονιδίωμα του NEM316 περιλαμβάνει 17 γονίδια (cpsA - L, neuBCDA) καθώς και το μεταγραφικό γονίδιο cpsY, που κωδικοποιούν μόρια CPS. 30 γονίδια κωδικοποιούν επιφανειακές πρωτεΐνες και 71 εκκρινόμενες. Από την ανάλυση του γονιδιώματος προέκυψε και η δυνατότητα σύνθεσης πρωτεϊνών clp (chaperone proteins – πρωτεΐνες συνοδοί) που κωδικοποιούνται από 5 γονίδια [31].

Πίνακας 4. Ονοματολογία και χαρακτηριστικά των c και R πρωτεϊνών [32])

Ονομασία	Εναλλακτική Ονομασία	Γονίδιο	Συνηθέστερος ορότυπος όπου παρατηρούνται
<u>Πρωτεΐνες c</u>			
β		bac	Ib
a		bca	Ib
α, (ε)	Alp1	epsilon/Alp1	Ia
<u>Πρωτεΐνες R</u>			
R1	Alp2*	alp2	III
R1	Alp3*, R28	alp3	V, VIII
R3		-	V
R4	Rib	rib, r4	III
R5	BPS	sar5	Στέλεχος Compton 25/60

1.5.1 Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης.

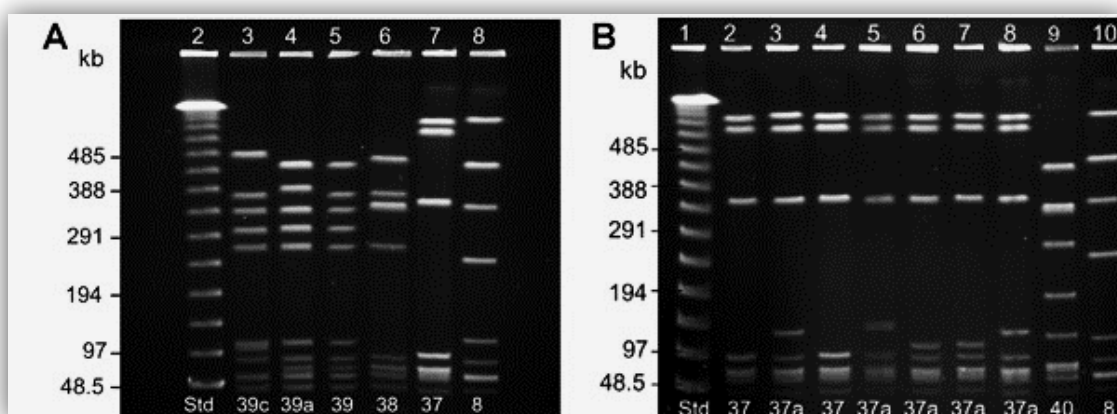
Η ανίχνευση των CPS ή των επιφανειακών πρωτεϊνών, είναι χρήσιμη για την αναγνώριση στελεχών και οροτύπων σε ένα μικροβιακό πληθυσμό. Είναι όμως ανεπαρκής, όσον αφορά στην αναγνώριση κλώνων στελεχών, σε περιπτώσεις μιας τοπικής επιδημίας ή σε προοπτικές μελέτες. Οι μοριακές μέθοδοι τυποποίησης προσφέρουν τη δυνατότητα αναγνώρισης κλώνων στελεχών ή στελεχών με μεγάλες ομοιότητες στο γονιδίωμά τους, όπως, για παράδειγμα, σε τοπικές επιδημίες ή σε περιπτώσεις μελέτης της γονιδιακής συγγένειας στελεχών από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές ή σε διαφορετικές φυλές. Έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι μοριακής τυποποίησης, από τις οποίες οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες σε επιδημιολογικές μελέτες είναι η ηλεκτροφόρηση σε παλμικό πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis ή PFGE) και η τυποποίηση βάσει της αλληλουχίας πολλαπλών γενετικών τόπων (Multi-Locus Sequence Typing ή MLST).

1.5.2 PFGE

(Pulsed Field Gel Electrophoresis - Ηλεκτροφόρηση σε Παλμικό Πεδίο)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην τομή του DNA σε μεγάλα τμήματα με τη χρήση ειδικών περιοριστικών ενδονουκλεασών. Σε αντίθεση με τα μικρά θραύσματα DNA τα οποία μπορούν να διαχωριστούν σε γέλη (gel) με ηλεκτροφόρηση, τα μεγάλα τμήματα, που προκύπτουν από αυτή τη μέθοδο, απαιτούν για το διαχωρισμό τους παλμικό ρεύμα σε ειδικό εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Οι ηλεκτρικοί παλμοί διαχωρίζουν τα τμήματα του DNA σε μια μήτρα από γέλη αгарόζης, ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος και η

παρατήρηση μπορεί να γίνει οπτικά με το διαχωρισμό ζωνών. Οι συγγένεια μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με την εφαρμογή συντελεστών ομοιότητας στις παρατηρούμενες ζώνες και την κατασκευή δενδρογράμματος το οποίο απεικονίζει τις γενετικές ομοιότητες μεταξύ των στελεχών[32].



Εικόνα 3. Ανάλυση με τη μέθοδο PFGE στελεχών του οροτύπου IV.

Patricia Ferrieri , Ruth Lynfield, Roberta Creti, and Aurea E. Flores Serotype IV and Invasive Group B Streptococcus Disease in Neonates, Minnesota, USA, 2000–2010

1.5.3 MILST

(Multi-Locus Sequence Typing – Αλληλουχία Πολλαπλών Γενετικών Τόπων).

Τα δεδομένα από αυτή τη μέθοδο είναι χρήσιμα για την ανάλυση εξελικτικών σχέσεων μεταξύ στελεχών βακτηριδίων. Σε αντίθεση με τη μέθοδο PFGE, δεν βασίζεται σε οπτική μέτρηση των αποτελεσμάτων και συνεπώς είναι πιο σαφής. Επιπλέον, τα αποτελέσματά της είναι συγκρίσιμα μεταξύ των εργαστηρίων. Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση αυτοματοποιημένου αναλυτή νουκλεϊδικής αλληλουχίας για την ανάλυση

τμημάτων μεγέθους 450-500 bp από επτά επιλεγμένα διαχειριστικά γονίδια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση βασικών μεταβολικών ενζύμων του βακτηρίου. Για κάθε διαχειριστικό γονίδιο, η αλληλουχία μπορεί να διαφέρει. Οι παραλλαγές στην αλληλουχία εκχωρούνται ως αλληλόμορφα και ο συνδυασμός των αλληλομόρφων για τα επτά διαχειριστικά γονίδια καθορίζει τον τύπο αλληλουχίας (Sequence type ή ST) για κάθε στέλεχος. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 1.273 στελέχη, ενώ αναλυτικές πληροφορίες είναι διαθέσιμες στην κεντρική βάση δεδομένων (www.mlst.net και <http://pubmlst.org/sagalactiae>)

Η Βακτηριακή Χλωρίδα του Κόλπου

2.1 Εισαγωγή

Η βακτηριακή χλωρίδα του κόλπου αποτελεί ένα πολύπλοκο παράδειγμα δυναμικού μικροβιακού αποικισμού, του οποίου οι μηχανισμοί ρύθμισης δεν είναι πλήρως κατανοητοί [33]. Τα στοιχεία που είναι διαθέσιμα μέχρι σήμερα, προέρχονται κυρίως από ποιοτικές/περιγραφικές μελέτες οι οποίες, ενώ έχουν αναγνωρίσει τα κύρια βακτηρίδια που αποικίζουν τον κόλπο, δεν παρέχουν πληροφορίες για την ποσοτική τους αλληλεξάρτηση.

Επιπροσθέτως, παράγοντες όπως η ηλικία, η εγκυμοσύνη, η σεξουαλική δραστηριότητα και η έμμηνη ρύση έχει υποδειχθεί ότι έχουν σημαντικό ρόλο στη μεταβολή της φυσιολογικής χλωρίδας. Το γεγονός στο οποίο, το σύνολο των σύγχρονων μελετών φαίνεται να συμφωνεί, είναι το ότι οι ποσοτικοί δείκτες αποικισμού καθώς και της αλληλεξάρτησης μεταξύ των μικροβίων, αποτελούν το κλειδί για την κατανόηση της δυναμικής ισορροπίας στη μικροβιακή χλωρίδα του κόλπου.

2.2 Η φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα

Στη φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα του κόλπου κυριαρχούν οι γαλακτοβάκιλλοι (*Lactobacilli*), gram θετικά, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ. Άλλοι μικροοργανισμοί, που παρατηρούνται συχνότερα σε μελέτες, είναι gram θετικοί κόκκοι (*A. vaginae*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *G. vaginalis*) καθώς και gram αρνητικοί οργανισμοί όπως εντεροβακτηρίδια (*E. coli*)[34,35].

Η επικράτηση αναερόβιων οργανισμών (10:1) έναντι των αερόβιων φαίνεται να είναι χαρακτηριστικό των νεότερων ηλικιών, ενώ από την έναρξη της ενεργού σεξουαλικής ζωής και κατά τη διάρκεια της παραγωγικής περιόδου τα αερόβια στελέχη φαίνεται να επικρατούν. Εντούτοις, οι συσχετισμοί φαίνεται να μεταβάλλονται με το χρόνο, ενώ ο διαχωρισμός της φυσιολογικής χλωρίδας από την παθολογική, γίνεται όχι μόνο με ποιοτικά (νέα εισερχόμενα στελέχη) αλλά και με ποσοτικά κριτήρια, δεδομένου ότι η ποσοτική αποδυνάμωση του προστατευτικού ρόλου ορισμένων βακτηρίων (π.χ. γαλακτοβάκιλλοι) αποτελεί σημαντικό παράγοντα διαταραχής της μικροβιακής χλωρίδας καθώς και εμφάνισης λοιμώξεων. Αναλυτικότερα, τα ποσοστά που έχουν αναφερθεί από ποικίλες μελέτες παρουσιάζονται στους πίνακες 5 και 6[36,37].

Από τις πρώτες μελέτες για τη μικροβιακή χλωρίδα του κόλπου, είχε προταθεί η ποσοτική και ποιοτική εξάρτηση των μικροβιακών αποικιών από τα οιστρογόνα. Ωστόσο, η πρώτη διαχρονική μελέτη της σύστασης και σταθερότητας της βακτηριακής χλωρίδας εγκύων γυναικών χωρίς επιπλοκές ή συμπτώματα λοίμωξης δημοσιεύτηκε μόλις το 2014 [30]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, διαπιστώθηκε ότι η σύσταση της μικροβιακής χλωρίδας εγκύων γυναικών παρουσιάζει διαφορές ως προς συγκεκριμένους πληθυσμούς βακτηρίων με επικράτηση των *L. Vaginalis*, *L. Crispatus*, *L. Gasseri* και *L. Jensenii*. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε ότι η ποσοτική και ποιοτική σταθερότητα της μικροβιακής χλωρίδας είναι μεγαλύτερη από αυτή μη εγκύων γυναικών[38,39].

Πίνακας 5. Επικράτηση αερόβιων (προαιρετικά) οργανισμών στη μικροβιακή χλωρίδα. [33]

Οργανισμός	Επικράτηση στη μικροβιακή χλωρίδα (%)		
	Κατώτερο	Μέσο	Υψηλότερο
<u>Gram θετικά βακτήρια</u>			
<i>Diphtheroids</i>	3	40	80
<i>Lactobacilli</i>	18	60	90
<u>Gram-θετικοί κόκκοι</u>			
<i>Staph. aureus</i>	0	2	25
<i>Staph. epidermidis</i>	5	50	95
<u>Στρεπτόκοκκοι</u>			
<i>a-αιμολυτικός</i>	8	20	38
<i>b-αιμολυτικός</i>	3	15	22
<i>Μη αιμολυτικοί</i>	0	20	32
<i>Ομάδα D</i>	2	28	45
<u>Gram-αρνητικά βακτήρια</u>			
<i>E. coli</i>	3	18	33
<i>Klebsiella</i> και <i>Enterobacter sp.</i>	0	10	20
<i>Proteus sp.</i>	0	5	10
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0.1	3

Πίνακας 6. Επικράτηση αναερόβιων οργανισμών στη μικροβιακή χλωρίδα.

Οργανισμοί	<i>Επικράτηση στη μικροβιακή χλωρίδα (%) σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες</i>				
	<i>[34]</i>	<i>[35]</i>	<i>[36]</i>	<i>[37]</i>	<i>[38]</i>
Bacteroides species					
B. biviusa	—	12	—	—	—
B. fragilis	17	4	40	12	16
B. melaninogenicusb	—	—	—	33	—
Λοιπά	40	—	18	46	—
Bifidobacterium species					
	10	—	—	2	2
Clostridium species					
C. perfringens	3	4	—	—	—
Λοιπά	13	2	—	4	—
Αδιευκρίνιστα	—	—	—	4	0
Eubacterium species					
	3	7	—	31	7
Fusobacterium species					
	—	7	28	13	—
Gaffkya speciesc					
	—	—	—	2	—
Lactobacillus species					
	—	10	—	46	52
Peptococcus speciesd					
P. asaccharolyticus	—	48	—	12	—
P. magnus	—	11	—	17	—
P. prevotii	—	17	—	21	—
Λοιπά	—	11	—	33	—
Αδιευκρίνιστα	7	—	64	65	8
Peptostreptococcus species					
P. anaerobius	—	34	—	15	—
P. intermedius	—	5	—	10	—
P. micros	—	7	—	8	—
P. productus	—	—	—	6	—
Λοιπά	33	—	76	35	15

Νεογνικές Λοιμώξεις

3.1 Ορισμοί.

Σήψη, Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Απάντησης και Σηπτική Καταπληξία (Sepsis – SIRS – Septic shock)

Οι όροι σήψη ή σηψαιμία χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις απομόνωσης βακτηριδίων στην κυκλοφορία με την ταυτόχρονη εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων. Ο όρος SIRS προτάθηκε αρχικά για την περιγραφή περιπτώσεων μη ειδικής φλεγμονώδους απάντησης σε ασθενείς με βαρύ τραυματισμό, λοιμώξεις, εγκαύματα μεγάλης έκτασης, παγκρεατίτιδα και άλλες νόσους σε ενηλίκους. Σε περιπτώσεις νεογνών τα κριτήρια για το SIRS είναι δύο ή περισσότερα από τα ακόλουθα:

- Θερμοκρασία $>38,5^{\circ}\text{C}$ ή $<36,0^{\circ}\text{C}$,
- ταχυκαρδία ή βραδυκαρδία,
- ταχύπνοια
- διαταραχή στον αριθμό των λευκοκυττάρων (πτώση ή αύξηση)

Για το χαρακτηρισμό της σήψης, στα παραπάνω προστίθεται το κριτήριο της υποπτευόμενης ή αναγνωρισμένης λοίμωξης. Περαιτέρω επιβάρυνση της κλινικής εικόνας χαρακτηρίζεται ως σοβαρή σήψη (βαριά σήψη) με την προσθήκη των κριτηρίων: α) της δυσλειτουργίας του καρδιαγγειακού συστήματος ή β) Συνδρόμου Οξείας Αναπνευστικής Ανεπάρκειας (ARDS) ή γ) ανεπάρκειας 2 ή περισσότερων οργάνων. Τέλος, ο όρος Σηπτική Καταπληξία (Σηπτικό shock – Septic shock) χρησιμοποιείται για

την περιγραφή του SIRS, σε συνδυασμό με την ανεπάρκεια του καρδιαγγειακού συστήματος[39].

3.2 Νεογνική Σήψη

Η νεογνική σήψη αναφέρεται συνήθως στο χρονικό διάστημα του πρώτου μήνα της ζωής του νεογνού. Εντούτοις, η αυξημένη επιβίωση πρόωρων νεογνών, με παρατεταμένη παραμονή στο νοσοκομειακό περιβάλλον, έχει επεκτείνει το χρονικό όριο χαρακτηρισμού της νεογνικής σήψης πέρα από τον πρώτο μήνα, σε όλη τη διάρκεια της νοσηλείας [40]. Αναλόγως με το χρόνο εμφάνισης της νόσου διαχωρίζεται σε όψιμης εμφάνισης νόσο (OEN) και πρωΐμης εμφάνισης νόσο (PEN). Ο διαχωρισμός έχει κλινική σημασία, δεδομένου ότι στις περισσότερες περιπτώσεις της PEN, ο παθογόνος παράγοντας έχει μεταδοθεί κάθετα από τη μητέρα στο νεογνό πριν ή κατά τον τοκετό, ενώ στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων OEN, η μετάδοση γίνεται μετά τον τοκετό (νοσοκομειακά ή οριζόντια από τη μητέρα ή/και λοιπές κοινωνικές επαφές).

Παρόλο που, δεν υπάρχει επισήμως ομοφωνία ως προς τα χρονικά όρια εμφάνισης και το διαχωρισμό των δύο τύπων, στην πλειοψηφία των μελετών το χρονικό διάστημα για το χαρακτηρισμό της PEN είναι 0-6 ημέρες και για την OEN 7-90 ημέρες μετά τον τοκετό.

3.3 Η επίπτωση της νεογνικής σήψης.

Στις αναπτυσσόμενες χώρες, η νεογνική θνησιμότητα κυμαίνεται από 17 έως 68 θανάτους ανά 1000 γεννήσεις ζώντων νεογνών, με περίπου το 30%

των περιπτώσεων να οφείλεται σε λοιμώξεις τις πρώτες 28 ημέρες της ζωής του νεογνού. Η σήψη και η μηνιγγίτιδα είναι οι συχνότερες αιτίες θανάτου στις περιπτώσεις αυτές [43].

Στις αναπτυγμένες χώρες, η νεογνική θνησιμότητα κυμαίνεται από 2-5 ανά 1000 γεννήσεις ζώντων νεογνών. Οι Λοιμώξεις (σήψη, πνευμονία, διαρροϊκά σύνδρομα, τέτανος) αποτελούν την αιτία για το 36% των θανάτων, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO, Levels & Trends in Child Mortality 2014).

3.4 Αιτιολογία νεογνικής σήψης.

Οι παθογόνοι οργανισμοί που ευθύνονται για την εμφάνιση της νεογνικής σήψης στις αναπτυγμένες χώρες, έχουν μεταβληθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες (Πίνακας 7). Παρόλο που ο *S. pyogenes* και ο *S. pneumoniae* αποτελούσαν το αίτιο για περίπου το 50% των περιπτώσεων νεογνικής σήψης τις δεκαετίες 1930 – 1950, καμία περίπτωση σήψης οφειλόμενης σε αυτά τα στελέχη δεν αναφέρθηκε την περίοδο 1989-2003 [42]. Η χρήση των σουλφοναμίδων και της πενικιλίνης μεταβίβασε στα gram-αρνητικά βακτηρίδια και κυρίως στο *E. Coli* τον πρωτεύοντα παθογενετικό ρόλο στις νεογνικές λοιμώξεις.

Κατά τη δεκαετία του 1970 ο GBS αναδύθηκε αιφνιδίως ως σημαντικό παθογόνο που προκαλούσε διεισδυτικές βακτηριακές λοιμώξεις, σήψη, πνευμονία και μηνιγγίτιδα σε νεογνά την πρώτη εβδομάδα μετά τον τοκετό, με αυξημένη επίπτωση στο πρώτο 24ωρο της ζωής του νεογνού[42,43]. Έκτοτε, ο GBS παραμένει η επικρατούσα λοιμώδης αιτία νεογνικής θνητότητας και θνησιμότητας στις αναπτυγμένες χώρες, με συχνότητα

εμφάνισης που κυμαίνεται από 0,3-3 ανά 1000 γεννήσεις ζώντων νεογνών[43,44].

Κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες, οι gram-θετικοί οργανισμοί επικρατούν σαν αίτιο της ΕΟΝ και ΠΟΝ, ενώ το *E.coli* εμφανίζεται συχνότερα σε περιπτώσεις πρόωρου τοκετού [45,46]. Ορισμένες πρόσφατες μελέτες αναφέρουν μείωση της συχνότητας εμφάνισης της ΠΕΝ σε νεογνά με χρόνο κύησης άνω των 37 εβδομάδων καθώς και μείωση της συχνότητας της διεισδυτικής νόσου από GBS. Ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση της ΟΕΝ που προκαλείται από *CoNS* (*Coagulase Negative Staphylococci*) [47].

Πιθανή εξήγηση για τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν: α) η πρόοδος στη νεογνική φροντίδα, β) η προφυλακτική αγωγή με αντιβιοτικά κατά την κύηση γ) η παρατεταμένη νοσηλεία και δ) η αυξημένη επιβίωση πρόωρων, ανώριμων ανοσολογικά νεογνών, τα οποία και παρουσιάζουν ευαισθησία σε ευκαιριακές νοσοκομειακές λοιμώξεις από παθογόνα όπως ο *CoNS* [44].

Πίνακας 7. Οργανισμοί που απομονώθηκαν από το αίμα σηπτικών νεογνών από διάφορες μελέτες

Περίοδος	Επικρατέστερα παθογόνα	Πηγές
1928-1958	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S.pyogenes</i>	[33]
1959-1965	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i>	[33]
1966-1988	<i>GBS</i> , <i>E. coli</i>	[33]
1989-1995	<i>CoNS*</i> , <i>GBS</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>S. aureus</i>	[33-35]
1996-2006	<i>CoNS*</i> , <i>GBS</i> , <i>E. coli</i> , <i>viridans streptococci</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>S. aureus</i>	[33-38]

* *Coagulase Negative Staphylococci*

3.5 Νεογνικές Λοιμώξεις από GBS.

3.5.1 Μετάδοση

Η μετάδοση του GBS, από τη μητέρα με αποικισμένο κόλπο στο νεογνό, παρατηρείται στο 30%-70% των περιπτώσεων. Τα περισσότερα νεογνά παραμένουν ασυμπτωματικά. Όμως 1%-3% από αυτά θα εμφανίσει σοβαρή νόσο. Η μετάδοση είναι δυνατόν να γίνει ενδομητρίως, διαμέσου άθικτης μεμβράνης ή κατά τη διαδρομή στο γεννητικό σωλήνα κατά τον τοκετό. Ο

βαθμός του αποικισμού κατά τον τοκετό ή τη ρήξη των μεμβρανών συνδέεται άμεσα με τον κίνδυνο κάθετης μετάδοσης στο νεογνό και την εμφάνιση ΠΕΝ που εκδηλώνεται κλινικά με σημεία συστηματικής λοίμωξης, όπως καλπάζουσα πνευμονία και σήψη ή σπανιότερα μηνιγγίτιδα.

Σε αντίθεση με την ΠΕΝ, η ΟΕΝ δεν οφείλεται πάντοτε σε κάθετη μετάδοση του GBS από τη μητέρα στο νεογνό. Η μετάδοση μπορεί να συμβεί οριζοντίως από τη μητέρα (κατά το θηλασμό) ή από νοσοκομειακές και κοινωνικές πηγές. Η κορύφωση της χρονικής επίπτωσης της ΟΕΝ παρουσιάζεται ένα περίπου μήνα μετά τον τοκετό και εκδηλώνεται συνήθως με σημεία βακτηριαιμίας, ενώ ποσοστό 25% των νεογνών παρουσιάζουν μηνιγγίτιδα και σπανίως οστεοαρθρίτιδα. Αναφέρεται δε ότι, η λοίμωξη από GBS παρουσιάζει τη μεγαλύτερη θνητότητα μεταξύ των αιτίων νεογνικής σήψης [48,49,50].

3.5.2 ΠΕΝ (Πρωΐμης Εμφάνισης Νόσος)

Η ΠΕΝ αποτελεί περίπου το 60-80% περιπτώσεων νεογνικής λοίμωξης από GBS. Οι κυρίαρχοι ορότυποι που ευθύνονται για την ΠΕΝ στα νεογνά είναι σε φθίνουσα σειρά οι Ia, III και V. Η κλινική εμφάνιση σημείων της ΠΕΝ γίνεται εντός του πρώτου 24ώρου από τον τοκετό σε ποσοστό περίπου 90%. Σε πρόωρα νεογνά, η εμφάνιση των συμπτωμάτων παρατηρείται μέσα στο πρώτο δωρο από τον τοκετό. Οι συχνότερες εκδηλώσεις της ΠΕΝ είναι: σηψαιμία, καλπάζουσα πνευμονία και σπανιότερα (5-10% νεογνών) μηνιγγίτιδα. Ανεξαρτήτως από την εντόπιση της νόσου, τα αρχικά κλινικά σημεία εμφανίζονται από το αναπνευστικό, με τη μορφή Συνδρόμου

Αναπνευστικής Δυσχέρειας (άπνοια, ταχύπνοια ή κυάνωση), στο 80% των περιπτώσεων.

Στην τρέχουσα διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι, η συχνότητα εμφάνισης της ΠΕΝ σε πρόωρα νεογνά είναι έως και 8 φορές μεγαλύτερη [43,50]. Πρόσφατες μελέτες προσδιορίζουν τη θνητότητα της ΠΕΝ από 4,7-15%, αναλόγως πάντα με τη γεωγραφική περιοχή. Ακτινολογικά, εμφανίζονται στοιχεία συμβατά με τη Νόσο της Υαλοειδούς Μεμβράνης (γνωστή και ως Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας των Νεογνών – Respiratory Distress Syndrome, RDS) περίπου στο 50% των νεογνών με πνευμονική λοίμωξη από GBS. Η διαφορική διάγνωση μεταξύ των δύο νόσων με βάση την ακτινολογική εικόνα είναι δυσχερής. Η αντιμετώπιση υποκατάστασης με επιφανειοδραστικό παράγοντα βελτιώνει την ανταλλαγή αερίων στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, αν και χρόνος ανταπόκρισης στη θεραπεία είναι μεγαλύτερος από τις περιπτώσεις RDS χωρίς συνυπάρχουσα πνευμονική λοίμωξη από GBS [49,51].

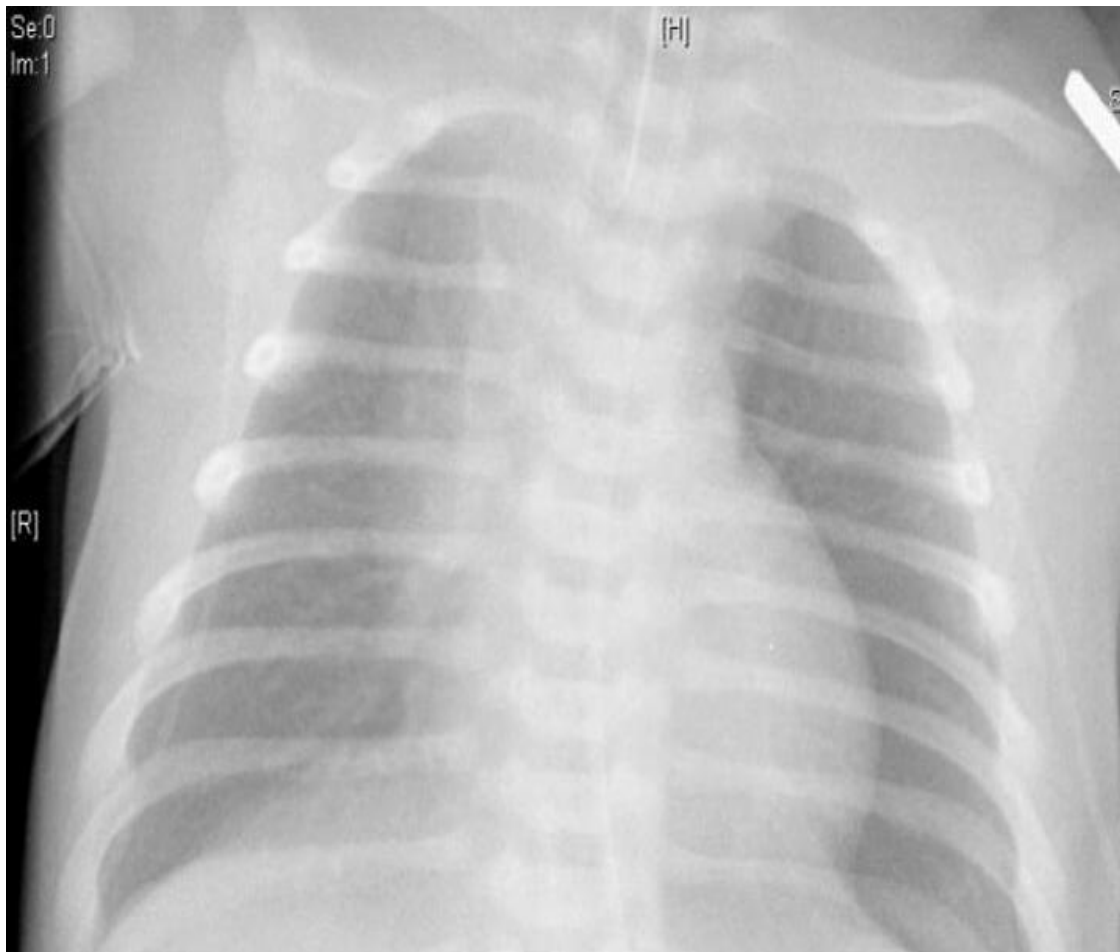
Άλλα συνοδά συμπτώματα που αναφέρονται είναι: λήθαργος, υποθερμία ή πυρετός, ωχρότητα, κοιλιακή διάταση, ταχυκαρδία και ίκτερος. Η υπόταση αποτελεί αρχικό εύρημα στο 25% περίπου των περιπτώσεων[48]. Σε περιπτώσεις νεογνών με περιγεννητική ασφυξία σχετιζόμενη με ενδομήτρια λοίμωξη από GBS, εμφανίζεται αναπνευστική ανεπάρκεια και καταπληξία αμέσως μετά τον τοκετό. Μηνιγγίτιδα εμφανίζεται σε περίπου 5-10% των περιπτώσεων, με την πλειοψηφία των νεογνών όμως να μην παρουσιάζει ειδική συμπτωματολογία [48,50].

Η συχνότητα εμφάνισης της ΠΕΝ έχει σταθεροποιηθεί την τελευταία δεκαετία σε 0,4 ανά 1000 γεννήσεις ζώντων νεογνών[43,49]. Η αναφερόμενη θνητότητα σχετιζόμενη με την ΠΕΝ από GBS έχει επίσης μειωθεί δραματικά

τις τελευταίες δεκαετίες από 50% σε 4-10%. Στοιχεία από πρόσφατες τοπικές μελέτες εμφανίζουν αύξηση της θνητότητας (Νορβηγία 2006-2007, 16,3% από 6,5% τα προηγούμενα έτη) γεγονός που προκαλεί ανησυχία για την εμφάνιση στελεχών ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη καθώς και στελεχών με αυξημένη λοιμογόνο δράση.

Οι συνέπειες βέβαια της νεογνικής νόσου από GBS εκτείνονται, πέρα από τη νεογνική θνητότητα, σε μακροχρόνιες νευρολογικές βλάβες, όπως εξασθενημένη όραση, απώλεια ακοής και εμφάνιση νοητικής υστέρησης. Μεταξύ των νεογνών που παρουσιάζουν μηνιγγίτιδα από GBS περίπου το 50% εμφανίζουν μακροχρόνια νευρολογικά υπολειμματικά συμπτώματα, ενώ έως και το 30% θα παρουσιάσουν σημαντικές νευρολογικές βλάβες. Πιθανολογείται ότι η ανίχνευση του GBS στις παρατηρούμενες περιπτώσεις, που γίνεται με καλλιέργεια αίματος ή εγκεφαλονωτιαίου υγρού, ενδέχεται να οδηγεί σε υποτίμηση της πραγματικής επίπτωσης της νόσου [51].

Η σπανίως εφαρμοσμένη πρακτική των συστηματικών καλλιιεργειών, σε συνδυασμό με την καλλιέργεια μικρών δειγμάτων αίματος ή ΕΝΥ που ενδεχομένως έχουν ήδη υποστεί την επενέργεια χορηγούμενης αντιμικροβιακής θεραπείας πριν και κατά τον τοκετό, είναι παράγοντες, που μπορεί να πολλαπλασιάσουν τη συχνότητα ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων στην ανίχνευση του GBS. Κατά συνέπεια, είναι δυνατό να μειώσουν σημαντικά το ποσοστό των αναφερόμενων περιστατικών λοίμωξης [52,53].



Εικόνα 4. Ακτινογραφία θώρακα νεογνού με πνευμοθώρακα αριστερού πνεύμονα και θετική καλλιέργεια για GBS από τις τραχειακές εκκρίσεις (Πρωΐμης εμφάνισης Πνευμονία από GBS).

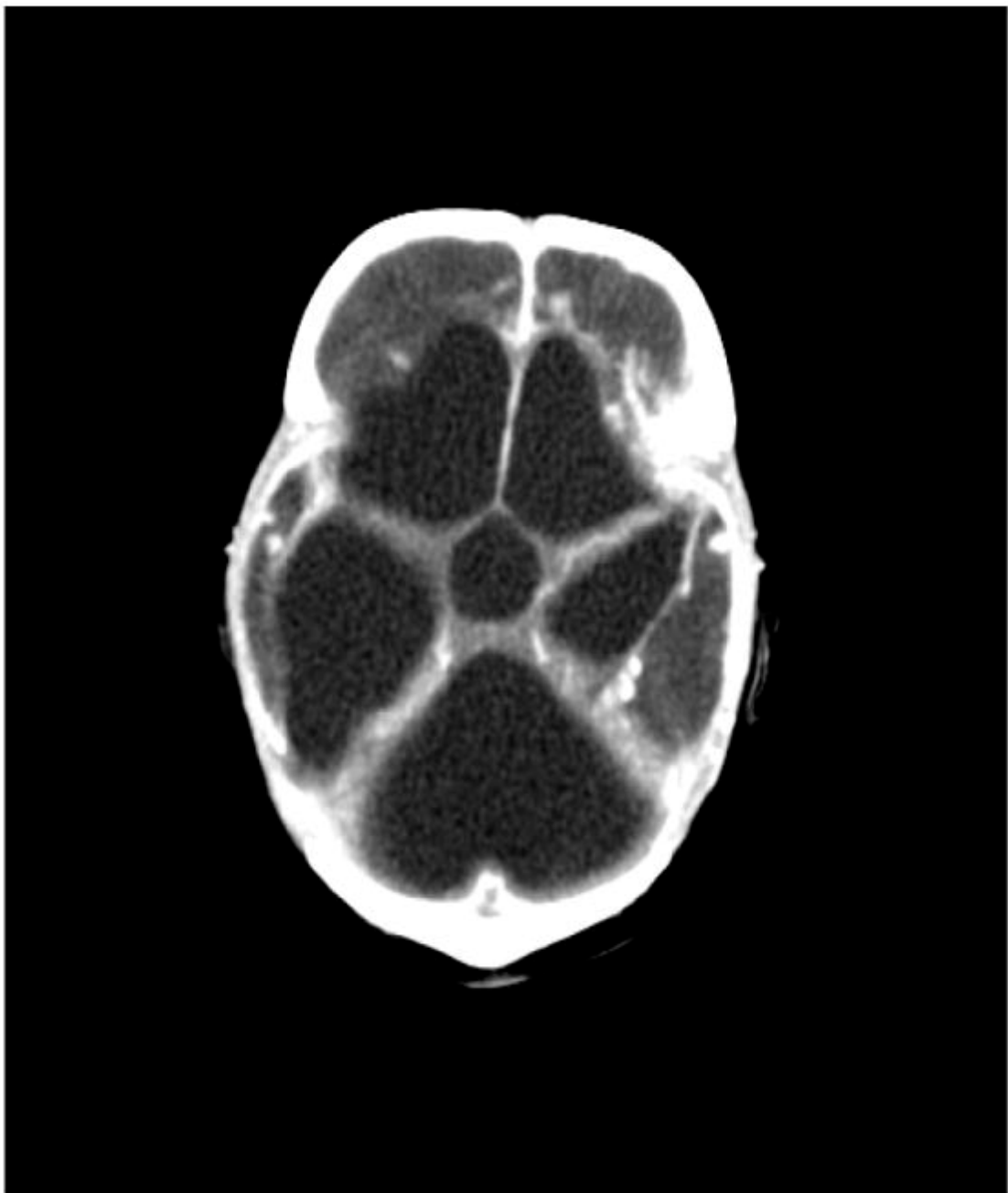
Dr Ayoob Ali, Cardinal Glennon Children's Medical Center, St. Louis, MO.)

3.5.3 OEN (Όψιμης Εμφάνισης Νόσος)

Η OEN εμφανίζεται από 7 έως 90 ημέρες από τον τοκετό, με μέση περίοδο εμφάνισης 1 μήνα. Οι κυρίαρχοι ορότυποι που ευθύνονται για την OEN στα νεογνά είναι σε φθίνουσα σειρά οι III , Ia, και V. Αντίθετα με την ΠΕΝ η μετάδοση γίνεται οριζόντια, είτε νοσοκομειακά σε πρόωρα νεογνά κατά τη νοσηλεία τους είτε από τη μητέρα μέσω της δερματικής επαφής ή του μητρικού γάλακτος. Νεογνά με OEN συχνά παρουσιάζουν υποθερμία ή υπερθερμία, υπεργλυκαιμία και ευερεθιστότητα [49,50,51]. Στις περιπτώσεις OEN πάντως η εμφάνιση συμπτωμάτων κατά τις πρώτες ημέρες μετά τον τοκετό είναι εξαιρετικά σπάνια, καθώς δεν έχουν αναγνωριστεί έως σήμερα στατιστικά σημαντικοί παράγοντες κινδύνου.

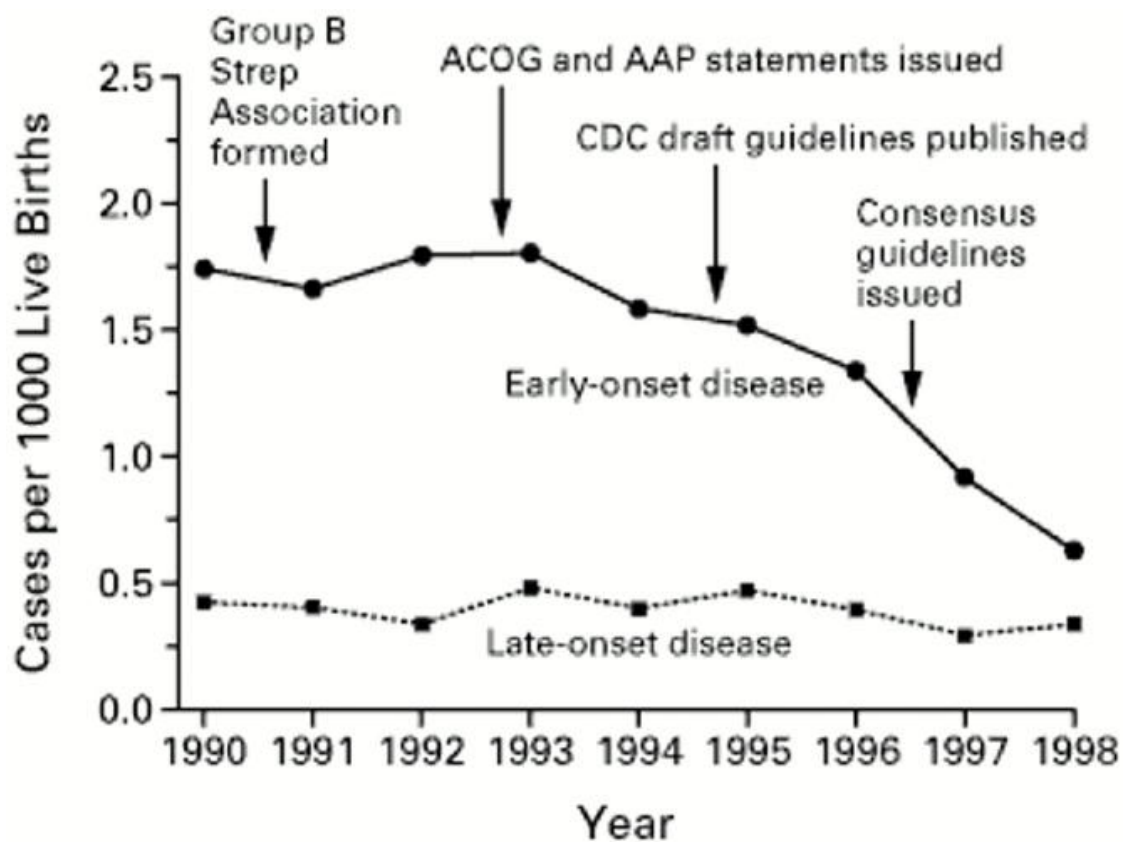
Εντούτοις, μετά την παρέλευση 7 ή περισσότερων ημερών από τον τοκετό, τα νεογνά εμφανίζουν ληθαργικότητα ή ευερεθιστότητα, μειωμένη όρεξη για σίτιση, ταχύπνοια και πυρετό ενδεικτικά μηνιγγίτιδας ή σηψαιμίας. Συμπτώματα από το αναπνευστικό, ενδεικτικά Συνδρόμου Αναπνευστικής Δυσχέρειας, είναι σχετικά σπάνια. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να παρουσιαστούν συμπτώματα οστεοαρθρίτιδας ή κυτταρίτιδας. Η θνητότητα της OEN είναι χαμηλότερη της ΠΕΝ και κυμαίνεται από 2-6% [50,51,52].

Το 20%-30% των νεογνών με μηνιγγίτιδα από GBS που θα επιζήσουν, θα παρουσιάσουν σημαντικές μόνιμες νευρολογικές βλάβες όπως απώλεια ακοής, διανοητική υστέρηση, φλοιώδη τύφλωση και εγκεφαλική παράλυση. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη στη Μεγάλη Βρετανία το ποσοστό νεογνών με λοίμωξη από GBS που θα αναπτύξουν κάποιο βαθμό αναπηρίας είναι περίπου 50% για τα νεογνά που εμφάνισαν μηνιγγίτιδα και 25% για τα νεογνά που εμφάνισαν σηψαιμία [48].



Εικόνα 5. υπολογιστική Τομογραφία αγοριού 3 εβδομάδων με Όψιμης Εμφάνισης GBS Μηνιγγίτιδας

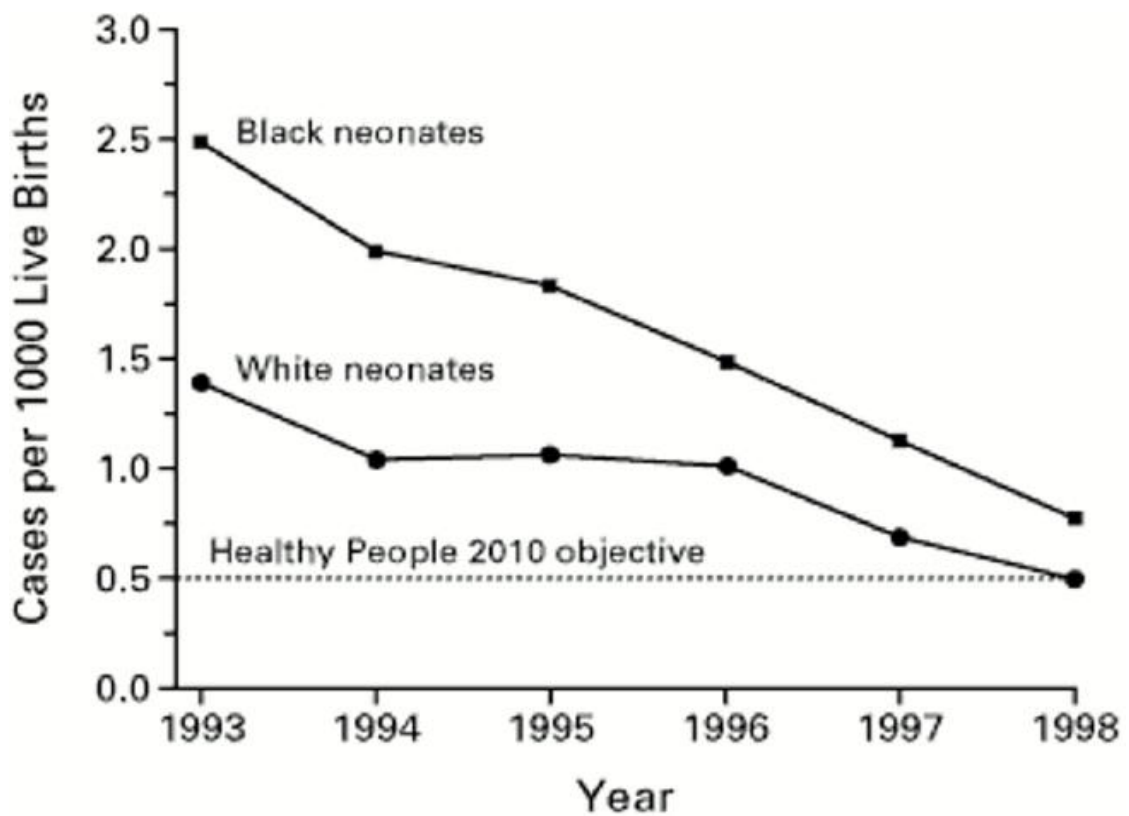
(Dr Carol J. Baylor, Baylor College of Medicine)



Εικόνα 6. Επίπτωση της ΠΕΝ και ΟΕΝ από Στρεπτόκοκκους ομάδας Β σε τρεις Πολιτείες των ΗΠΑ, κατά την περίοδο 1990 – 1998 και οι ενέργειες που πραγματοποιήθηκαν στον τομέα της πρόληψης [51].

ACOG: American College of Obstetricians and Gynecologists

AAP: American Academy of Pediatrics.



Εικόνα 7. Επίπτωση της ΠΕΝ από Στρεπτόκοκκους ομάδας Β σε τέσσερις πολιτείες των ΗΠΑ, σε έγχρωμα και λευκά νεογνά, κατά την περίοδο 1990 – 1998 (οι ζώσες γεννήσεις του 1998 υπολογίσθηκαν με βάση τα στοιχεία του 1997) [51].

Η “Healthy People 2010 objectives” εξαγγέλθηκε από το U.S. Department of Health and Human Services των ΗΠΑ και αποτελεί εθνική στρατηγική πρόληψης για τη βελτίωση της Δημόσιας Υγείας στις ΗΠΑ.

3.5.4 Μακροχρόνιες συνέπειες και υπολειμματικές βλάβες.

Λίγες μελέτες έχουν δημοσιευτεί σχετικά με το φορτίο των μακροχρόνιων επιπλοκών και των υπολειμματικών βλαβών που σχετίζονται με την PEN ή την OEN από GBS.

Ως ελαφρού βαθμού αναπηρία, χαρακτηρίζονται καταστάσεις που εμφανίζονται σε παιδιά της ίδιας ηλικιακής ομάδας, που δεν έχουν προσβληθεί από μηνιγγίτιδα της PEN ή της OEN (νόσος μέσου ωτός, στραβισμός, εμπύρετοι σπασμοί, προβλήματα συμπεριφοράς).

Ως μέσου βαθμού (μέτρια) αναπηρία, αναφέρονται προβλήματα που προκαλούν δυσλειτουργικότητα σε καθημερινές δραστηριότητες, χωρίς όμως να τις εμποδίζουν. Για παράδειγμα, ένα παιδί μπορεί να παρακολουθήσει το σχολικό πρόγραμμα είτε με πρόσθετη βοήθεια είτε χωρίς αυτή. Περιλαμβάνουν καταστάσεις όπως: ήπιες νευροκινητικές διαταραχές, νοητική υστέρηση, επιληψία ελεγχόμενη με αγωγή και υδροκέφαλο χωρίς επιπλοκές.

Στην κατηγορία της σοβαρής αναπηρίας περιλαμβάνονται σοβαρές υπολειμματικές βλάβες όπως: ημιπάρεση, σπαστική παραπληγία, κώφωση, τύφλωση, σπασμοί, παραλύσεις κρανιακών νεύρων, διαταραχές του λόγου και της ακοής καθώς και σοβαρές αναπτυξιακές διαταραχές.

Μελέτες από τη Μεγάλη Βρετανία έδειξαν ποσοστά αναπηρίας 25% ως συνέπεια της βακτηριαμίας από GBS με 7,0% σοβαρή αναπηρία, 13,9% μέτρια αναπηρία και 4,5% ήπια αναπηρία [54]. Σε νεογνά με μηνιγγίτιδα από GBS αναφέρεται 50% ποσοστό αναπηρίας με αντίστοιχα ποσοστά 13,3%, 17,3% και 18,4% για σοβαρή, μέτρια και ήπια αναπηρία αντίστοιχα [55,56,57]. Οι συχνότερα αναφερόμενες υπολειμματικές βλάβες της νεογνικής μηνιγγίτιδας από GBS είναι η εγκεφαλική παράλυση, η απώλεια της όρασης, η κώφωση και ο υδροκέφαλος [56].

Μία αναδρομική μελέτη 78 ασθενών με ΠΕΝ από GBS στην Ολλανδία έδειξε ότι οι υπολειμματικές βλάβες εμφανίστηκαν συχνότερα στις περιπτώσεις εμφάνισης συμπτωμάτων της νόσου τις πρώτες 6 ώρες μετά τον τοκετό. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, η έγκαιρη αντιμετώπιση των συμπτωμάτων είχε σημαντική επίδραση στην έκβαση της νόσου όσον αφορά την επιβίωση, δεν είχε όμως καμία επίδραση στην εμφάνιση των όψιμων επιπλοκών και των υπολειμματικών βλαβών. [58].

3.6 Παθογένεια και νοσογόνοι παράγοντες

Η μετάδοση του GBS από τη μητέρα με αποικισμένο κόλπο στο νεογνό συμβαίνει στο 30%-70% των περιπτώσεων. Η διεισδυτική νεογνική λοίμωξη μπορεί να οφείλεται σε νοσογόνους παράγοντες του GBS ή/και σε νοσογόνους παράγοντες του φορέα όπως ο βαθμός αποικισμού και η έλλειψη μητρικών αντισωμάτων.

Οι νοσογόνοι παράγοντες του GBS περιλαμβάνουν μόρια και διεργασίες, που εμποδίζουν τους αμυντικούς ανοσολογικούς μηχανισμούς, καθώς και την ιδιότητά του να διαπερνά τους επιθηλιακούς και ενδοθηλιακούς κυτταρικούς φραγμούς και να διεισδύει στην κυκλοφορία και τους ιστούς. Επιπροσθέτως περιλαμβάνουν την ικανότητά του να παράγει τοξίνες, που βλάπτουν άμεσα τους ιστούς του ξενιστή καθώς και να συνθέτει παράγοντες που προκαλούν φλεγμονώδεις απαντήσεις και επιβαρύνουν την κλινική εικόνα και την πρόγνωση της λοίμωξης [59,60].

3.6.1 Αποικισμός

Ο γαστρεντερικός σωλήνας είναι η φυσική δεξαμενή του GBS και η πιθανότερη πηγή για το δευτερογενή αποικισμό του κόλπου στις γυναίκες, ο οποίος μπορεί να είναι επιμένων, ευκαιριακός ή διαλείπων. Ο βαθμός αποικισμού κυμαίνεται σημαντικά ενώ η πλειοψηφία των εγκυμονούντων γυναικών με κολπικό αποικισμό από GBS παραμένουν ασυμπτωματικές.

Εντούτοις μπορεί να παρουσιάσουν κλινικές εκδηλώσεις πριν και μετά τον τοκετό, όπως λοιμώξεις της ουροποιητικής οδού, ενδομητρίτιδα, αμνιονίτιδα, λοιμώξεις μαλακών μορίων (ως επιπλοκή καισαρικής τομής) και σπανιότερα μηνιγγίτιδα, σηπτική θρομβοφλεβίτιδα ή άλλες σοβαρές επιπλοκές. Επιπροσθέτως, οι επίτοκες γυναίκες με αποικισμό του κόλπου από GBS έχουν αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού και αποβολών. Τα ποσοστά ανίχνευσης του GBS στη χλωρίδα του κόλπου ή του ορθού εγκυμονούντων γυναικών κυμαίνονται από 10% έως 37%. Η λήψη συνδυασμού δειγμάτων από το ορθό και τον κόλπο αποτελεί την ασφαλέστερη μέθοδο για τη βέλτιστη ανίχνευση των φορέων [60].

3.6.2 Προσκόλληση στα κύτταρα του ξενιστή.

Ο αποικισμός του κόλπου από τον GBS επιτυγχάνεται λόγω της επίτευξης της μέγιστης συγκολλητικής ικανότητας του βακτηριδίου σε συνθήκες όξινου pH, που επικρατούν στον κολπικό βλεννογόνο. Μόρια που φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη δυνατότητα προσκόλλησης του GBS σε ανθρώπινα κύτταρα, όπως του κυψελιδικού επιθηλίου και ενδοθηλίου καθώς και του εγκεφαλικού ενδοθηλίου, επηρεάζουν άμεσα την παθογένεια της νεογνικής σήψης από GBS [61]. Αυτά περιλαμβάνουν επιφανειακές

πρωτεΐνες όπως η C5a πεπτιδάση (επιφανειακή δι-λειτουργική πρωτεΐνη που διαχωρίζει ενζυμικά την πρωτεΐνη C5a και μεσολαβεί στη συγκόλλησή της με τη φμπρονεκτίνη) και την πρωτεΐνη δέσμησης με τη λαμινίνη [59,60].

3.6.3 Διείσδυση μέσω των κυτταρικών φραγμών.

Ο GBS έχει τη δυνατότητα να διαπερνά τις άθικτες μεμβράνες του πλακούντα με αποτέλεσμα να αποδυναμώνει την αντοχή τους σε εφελκυσμό και να προκαλεί σε αρκετές περιπτώσεις τη ρήξη τους με συνέπεια τον πρόωρο τοκετό.

Αναπαράγεται ευχερώς στη μητρική κοιλότητα με αποτέλεσμα μεγάλες ποσότητες βακτηριδίων μέσω της κατάποσης να μπορούν να αποικίσουν τους πνεύμονες του εμβρύου. Στη συνέχεια τα βακτηρίδια έχουν τη δυνατότητα να εξαπλωθούν από την αρχική πνευμονική εστία στην κυκλοφορία του εμβρύου και να εγκατασταθούν σε άλλα όργανα και ιστούς.

Κύριος παράγοντας στην ικανότητα πρόκλησης βλαβών στους ιστούς του ξενιστή είναι η β-αιμολυσίνη (β-τοξίνη ή σφιγγομυελινάση). Η κυτταρολυτική δράση του GBS αναστέλλεται αρχικά από τον επιφανειοδραστικό παράγοντα *DPPC* (διπαλμιτολεϊκή φωσφατιδυλοχολίνη) των πνευμόνων του νεογνού.

Σε περιπτώσεις όμως πρόωρων νεογνών με μειωμένη παραγωγή του παραπάνω ενζύμου, η πνευμονική νόσος είναι βαρύτερη και οι βλάβες του πνευμονικού ιστού σοβαρότερες. Άλλωστε, η κυτταρική διεισδυτικότητα του GBS σχετίζεται άμεσα με την παθογόνο του δράση, όπως έχει αποδειχτεί από

μελέτες σύμφωνα με τις οποίες, στελέχη του GBS, που απομονώθηκαν από πρόωρα νεογνά με ΠΕΝ, παρουσίασαν αυξημένη επιθηλιακή διεισδυτικότητα, σε σχέση με στελέχη που απομονώθηκαν από ασυμπτωματικές εγκύους γυναίκες [62].

3.6.4 Κυτταροτοξικότητα εναντίον των φαγοκυττάρων και απενεργοποίηση του συμπληρώματος.

Η τοξίνη β-αιμολυσίνη, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *cylE*, το οποίο συνδέεται με τη μεμβράνη της βακτηριακής κάψας, [62] έχει άμεση κυτταρολυτική επίδραση στα μακροφάγα, με αποτέλεσμα την πρόκληση της απόπτωσής τους [63,64]. Ταυτόχρονα, το ένζυμο C5a πεπτιδάση αποκόπτει τμήμα του πεπτιδίου C5a του ανθρώπινου συμπληρώματος, με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή του, γεγονός που έχει αρνητική επίδραση στον χημειοτακτισμό των πολυμορφοκυττάρων. [65].

3.6.5 Κυτταροτοξικότητα εναντίον των κυττάρων του μυοκαρδίου.

Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε κουνέλια έχουν δείξει μειωμένο κλάσμα εξώθησης και υπόταση, μετά από επιμόλυνση των ιστών του μυοκαρδίου με GBS. Με βάση αυτές, έχει διατυπωθεί η υπόθεση της άμεσης κυτταροτοξικής επίδρασης της β-αιμολυσίνης στα κύτταρα του μυοκαρδίου, μέσω της διαταραχής της ομοιόστασης του ασβεστίου, με αποτέλεσμα το θάνατό τους [66].

3.6.6. Ενεργοποίηση φλεγμονώδους αντίδρασης.

Η νεογνική σήψη και η μηνιγγίτιδα από GBS παρουσιάζουν δραματική κλινική εικόνα, κυρίως λόγω της αυξημένης φλεγμονώδους αντίδρασης [67,68]. Ένα πλήθος πρωτεϊνικών παραγόντων και τοξινών προκαλούν ισχυρή απάντηση από τον ξενιστή, με έκκριση κυτοκινών. Το αποτέλεσμα είναι, να παρουσιάζεται εικόνα φλεγμονώδους αντίδρασης εντονότερη από αυτή που αναμένεται από έναν ανοσοκατεσταλμένο οργανισμό, όπως τα πρόωρα νεογνά. Στην ουσία, η ανοσολογική αντίδραση λειτουργεί σε βάρος του οργανισμού, αφού δεν έχει τη δυνατότητα να αντιμετωπίσει αποτελεσματικά την είσοδο και τον πολλαπλασιασμό του βακτηριδίου στους ιστούς του [68].

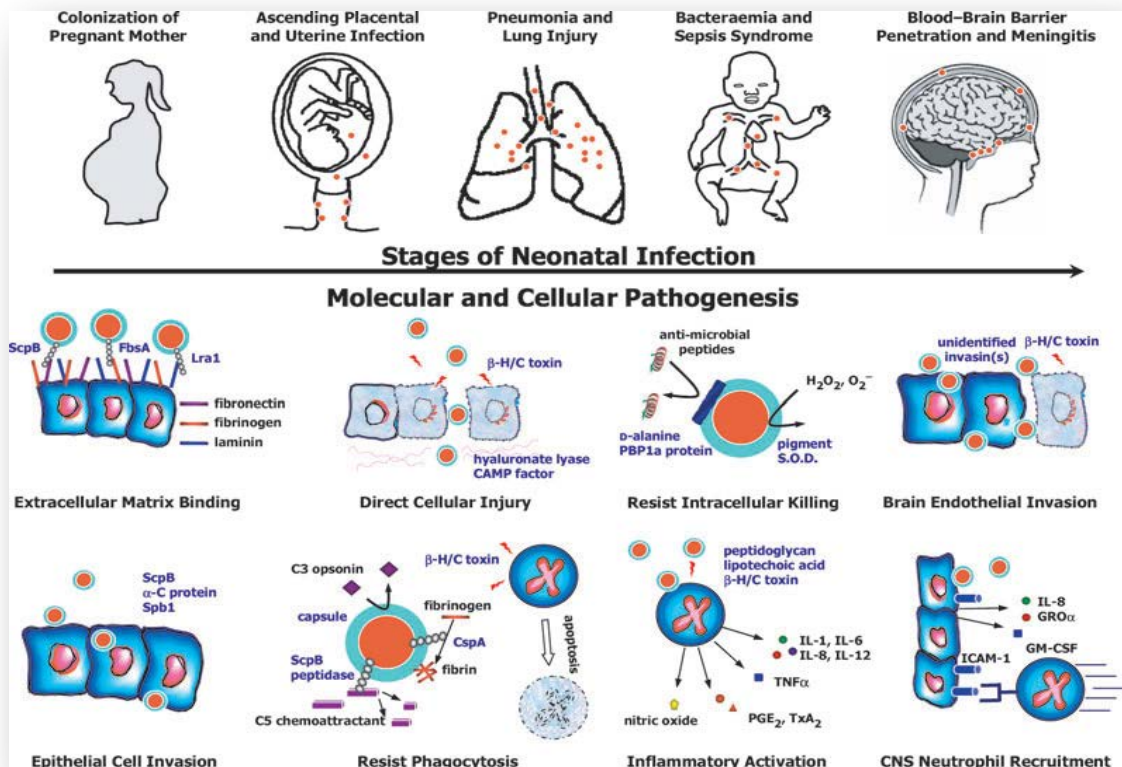
3.6.7 Ανθεκτικότητα στους μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας.

Έχει περιγραφεί σημαντικός αριθμός παθογόνων παραγόντων, οι οποίοι φαίνεται να εμποδίζουν την εξόντωση, μέσω της φαγοκυττάρωσης, του GBS. Κυριότερος παράγων είναι οι πολυσακχαρίτες τις κάψας, η δράση των οποίων συνδυάζεται με εκείνη των επιφανειακών πρωτεϊνών [69]. Στελέχη του οροτύπου II, τα οποία συνθέτουν και τους δύο πεπτιδικούς παράγοντες της πρωτεΐνης c, παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή στην φαγοκυττάρωση, σε αντίθεση με στελέχη που δε συνθέτουν την πρωτεΐνη c [69]. Εκτός άλλων, η αυξημένη δυνατότητα διείσδυσης και επιβίωσης σε κύτταρα του ξενιστή, ακόμη και στα φαγολυσοσώματα των φαγοκυττάρων, φαίνεται να είναι και το αίτιο της ικανότητας του GBS να διαπερνά τις μεμβράνες του πλακούντα, το πνευμονικό επιθήλιο του εμβρύου καθώς και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [70].

3.6.8 Παράγοντες του ξενιστή.

Η ανοσολογική απάντηση κατά την είσοδο του GBS στον πνευμονικό ιστό και στην κυκλοφορία βασίζεται κυρίως στα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα κύτταρα του οργανισμού. Η δράση των φαγοκυττάρων καθοδηγείται από την επισήμανση (οψονοποίηση) του εισβάλλοντος οργανισμού από ειδικά αντισώματα, με την παρουσία του συμπληρώματος [69,71].

Τα νεογνά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε λοιμώξεις, λόγω ποιοτικής και ποσοτικής ανεπάρκειας του παραπάνω μηχανισμού. Επίσης, όπως είναι γνωστό, η μεταφορά μέσω του πλακούντα των αντισωμάτων της μητέρας ξεκινά κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης, ενώ ποσοστό που αγγίζει το 60% των IgG αντισωμάτων μεταφέρεται τις τελευταίες 10 εβδομάδες της κύησης. Εκτός λοιπόν από τις περιπτώσεις που η μητέρα δεν έχει ειδικά αντισώματα εναντίον του GBS, τα πρόωρα νεογνά είναι προστατευμένα σε λιγότερο βαθμό έναντι λοιμώξεων από GBS, λόγω ανεπαρκούς ποσότητας αντισωμάτων [72].



Εικόνα 8. Επισκόπηση των σταδίων της μοριακής και κυτταρικής παθογένειας του GBS. [73]

3.7 Αντιμικροβιακή αντιμετώπιση της νεογνικής σήψης.

Λόγω της ταχείας εξέλιξης της νόσου, η αρχική αντιμετώπιση είναι εμπειρική. Το νεογνό που είναι ύποπτο για σήψη, πρέπει να υποβάλλεται αμέσως σε θεραπεία με αντιβιοτικά, αφού προηγουμένως ληφθούν δείγματα για εργαστηριακό έλεγχο, επειδή η εξέλιξη της μπορεί να είναι ραγδαία. Τα αντιβιοτικά πρώτης εκλογής για τη σήψη από GBS είναι ο συνδυασμός πενικιλίνης και αμινογλυκοσίδης.

Οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς (πχ κεφοταξίμη), παρόλο που αποτελούν μια λογική επιλογή έναντι των αμινογλυκοσιδών, λόγω εξαιρετικής διείσδυσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, θα πρέπει να αποφεύγονται. Και τούτο, γιατί αρκετές μελέτες αναφέρουν ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών, ως συνέπεια συνεχούς χορήγησής τους σαν θεραπεία εκλογής στην αντιμετώπιση της νεογνικής σήψης ή της μηνιγγίτιδας. Άλλωστε, ο αυξημένος κίνδυνος διεισδυτικής καντιντίασης αποτελεί μια ακόμη αντένδειξη στη συστηματική χρήση της κεφοταξίμης στην αντιμετώπιση νεογνικών λοιμώξεων [74,75].

Στρατηγικές πρόληψης

4.1 Εισαγωγή

Οι πρώτη συστηματική προσπάθεια πρόληψης των διεισδυτικών νεογνικών λοιμώξεων από GBS ήταν η χορήγηση, από του στόματος ή ενδομυϊκώς, αντιμικροβιακής αγωγής στις εγκύους, που παρουσίαζαν αποικισμό του κόλπου από GBS [76]. Η μείωση του βαθμού αποικισμού του κόλπου όμως αποδείχθηκε προσωρινή, αφού σταδιακά, μετά τη διακοπή λήψης της αντιμικροβιακής αγωγής, ο βαθμός αποικισμού επανερχόταν στα αρχικά επίπεδα. Επικρατέστερη ήταν η υπόθεση παραμονής του GBS στο ορθό, με αποτέλεσμα τον επαναποικισμό του κόλπου μετά τη διακοπή της αντιμικροβιακής αγωγής.

Η πρώτη μελέτη που έδειξε τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής χορήγησης αντιβιοτικών κατά τον τοκετό (Intrapartum Antibiotic Prophylaxis, IAP), δημοσιεύτηκε το 1979, προτείνοντας ότι μια μόνο δόση αμπικιλίνης, χορηγούμενη στη μητέρα κατά τον τοκετό, είναι αρκετή για την πρόληψη της μετάδοσης του GBS από τη μητέρα στο νεογνό [77]. Μελέτες που ακολούθησαν έδειξαν σαφώς αρνητική συσχέτιση μεταξύ της IAP και της εμφάνισης διεισδυτικής νεογνικής λοίμωξης από GBS.

Όσον αφορά στη θέσπιση και την υιοθέτηση στρατηγικών πρόληψης από την επιστημονική κοινότητα, η έρευνα των Boyer και Gotoff, που δημοσιεύτηκε στο *New England Journal of Medicine* το 1986, θεωρείται η σημαντικότερη. Η κυρίως μελέτη ήταν μια πλήρως τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή αγωγής IAP με αμπικιλίνη έναντι placebo, σε επιτόκους, που είχαν αναγνωριστεί ως φορείς του GBS, με δείγματα που είχαν ληφθεί από το ορθό και τον κόλπο, μεταξύ της 26^{ης} και 28^{ης} εβδομάδος της κύησης και:

- επρόκειτο να έχουν πρόωρο τοκετό

- ή είχε μεσολαβήσει χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 12 ωρών από τη ρήξη των μεμβρανών πριν την κύηση.

Η έρευνα διεκόπη μετά από την ανάλυση ενδιάμεσων αποτελεσμάτων, που έδειχναν σημαντική προστασία της ΙΑΡ έναντι της διεισδυτικής νεογνικής νόσου από GBS. Την απόφαση της διακοπής πήραν οι ερευνητές, λόγω των ηθικών ζητημάτων που προέκυπταν από τον αποκλεισμό χορήγησης ΙΑΡ σε γυναίκες της ομάδας ελέγχου [78].

4.2 Παράγοντες κινδύνου.

4.2.1 Αποικισμός της γεννητικής οδού της μητέρας από GBS.

Ο αποικισμός της μητέρας από GBS είναι ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου μετάδοσης και επακόλουθης διεισδυτικής λοίμωξης στο νεογνό. Έρευνες έχουν δείξει ότι, γυναίκες με θετική καλλιέργεια κατά τη διάρκεια της κύησης έχουν 25πλάσιο κίνδυνο να αποκτήσουν νεογνό με ΠΕΝ από GBS [79]. Το ποσοστό αποικισμού στις εγκύους κυμαίνεται από 10-35% σε μελέτες από διάφορες χώρες. Ταυτόχρονα, έχουν παρατηρηθεί φυλετικές διαφοροποιήσεις όσον αφορά στα ποσοστά αποικισμού. Σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί με επιλογή εγκύων διαφορετικής φυλετικής προέλευσης, έχουν παρατηρηθεί αυξημένα ποσοστά αποικισμού σε γυναίκες αφρικανικής καταγωγής. Πρόσφατη μελέτη που διεξάχθηκε στην Ολλανδία, έδειξε χαμηλότερα ποσοστά αποικισμού σε γυναίκες της Ασιατικής φυλής από αυτά των Ευρωπαίων γυναικών [79,80].

Πίνακας 8. Ποσοστό μητρικού αποικισμού από GBS σε διάφορες χώρες
[32]

<i>Χώρα</i>	<i>Ποσοστά (1996-2006)</i>
<i>Σουηδία</i>	25,4%
<i>Νορβηγία</i>	34,8%
<i>Γερμανία</i>	16%
<i>Μεγ. Βρετανία</i>	21,3%-13,59%
<i>Ολλανδία</i>	21%
<i>Ιταλία</i>	11,3-17,9%
<i>Ην. Πολιτείες</i>	21%
<i>Νέα Ζηλανδία</i>	20%

4.2.2 Προωρότητα και χαμηλό βάρος νεογνού:

Μελέτες έχουν δείξει ότι, νεογνά που γεννήθηκαν στις 37 εβδομάδες έχουν τριπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης ΠΕΝ από νεογνά που γεννήθηκαν στις 40 εβδομάδες. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί αντιστρόφως ανάλογη σχέση του βάρους κατά τη γέννηση και του κινδύνου εμφάνισης ΠΕΝ [81,82,83]. Η ανωριμότητα του ανοσοποιητικού, η αναστολή της μεταφοράς των IgG αντισωμάτων από τη μητέρα (που συμβαίνει κατά τις τελευταίες εβδομάδες της κύησης) καθώς και η ενδεχόμενη παθογένεια του GBS (που μπορεί να έχει

ήδη διαπεράσει τις μεμβράνες του πλακούντα και να έχει αποικήσει τους ιστούς του εμβρύου) στην πρόκληση του πρόωρου τοκετού, έχουν προταθεί ως αίτια της άμεσης αυτής σύνδεσης, που έχει παρατηρηθεί σε μελέτες διεθνώς. Ο παράγοντας αυτός κατέχει εξέχουσα θέση στις κατευθυντήριες οδηγίες για έναν επιπλέον λόγο. Δεδομένου ότι οι οδηγίες αναφέρουν τη λήψη δειγμάτων για καλλιέργεια όσο το δυνατόν αργότερα κατά την κύηση (35^η-37^η εβδομάδα), ο πρόωρος τοκετός αποτελεί και τη συνηθέστερη αιτία απουσίας αποτελεσμάτων καλλιέργειας.

4.2.3 Παράταση χρόνου Ρήξης Μεμβρανών – Τοκετού.

Το χρονικό διάστημα από τη ρήξη των μεμβρανών μέχρι τον τοκετό αποτελεί σημαντικά επιβαρυντικό παράγοντα για την εμφάνιση της ΠΕΝ στα νεογνά. Σύμφωνα με μελέτες, χρονικό διάστημα >18 ωρών ρήξης μεμβρανών πριν τον τοκετό, συμβαίνει στο 12,5% των τοκετών και παρουσιάζει OR 7,28 (95% CI) για την εμφάνιση ΠΕΝ στο νεογνό [81,82,83,84,85].

4.2.4 Πυρετός.

Θερμοκρασία της μητέρας $\geq 38^{\circ}\text{C}$ κατά τον τοκετό συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΠΕΝ από το νεογνό. Δεν υπάρχουν μελέτες συσχέτισης υψηλότερων θερμοκρασιών της μητέρας με περαιτέρω αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ΠΕΝ του νεογνού [71]. Η χορήγηση αντιβιοτικών με θερμοκρασίες $\geq 38^{\circ}\text{C}$ σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες, ενδεχομένως να αποτελεί και την αιτία της μη ύπαρξης δεδομένων.

4.2.5 Χorioαμνιονίτιδα.

Η εμφάνιση πυρετού από την επίτοκο σε συνδυασμό με εμβρυϊκή ταχυκαρδία, ευαισθησία της μήτρας, δύσοσμες κολπικές εκκρίσεις ή μητρική λευκοκυττάρωση παρουσιάζεται στο 1% - 3,8% των τοκετών [81,85]. Τα ανωτέρω συμπτώματα οφείλονται κυρίως σε χοριοαμνιονίτιδα, η οποία σχετίζεται με την εμφάνιση ΠΕΝ από το νεογνό με αυξημένη σχετική συχνότητα έως και 20% [82,86].

4.2.6 Βακτηριουρία (GBS).

Γυναίκες οι οποίες εμφανίζουν βακτηριουρία, παρουσιάζουν μεγαλύτερο βαθμό αποικισμού, με αποτέλεσμα να έχουν περισσότερες πιθανότητες να αποκτήσουν νεογνό με ΠΕΝ. Ενώ είναι σαφές ότι η βακτηριουρία κατά την κύηση αποτελεί δείκτη του βαθμού αποικισμού της μητέρας και άρα σημαντικό παράγοντα κινδύνου, τα συμπεράσματα των σχετικών μελετών δεν είναι διαφωτιστικά, ως προς τον ακριβή τρόπο σύνδεσης της βακτηριουρίας με την ΠΕΝ των νεογνών. Η πλειοψηφία των δεδομένων των σχετικών μελετών αφορά εγκύους με σημαντική βακτηριουρία ($>10^5$ CFU/ml ούρων) [87,88]. Μικρότερες συγκεντρώσεις GBS στα ούρα, ενώ είναι ενδεικτικές του αποικισμού της μητέρας από GBS, δεν έχουν συσχετιστεί ευρέως σε μελέτες με την ΠΕΝ σε νεογνά. Σύμφωνα με τις τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες του CDC (2010), ο σποραδικός έλεγχος για ασυμπτωματική βακτηριουρία είναι ευκαίος, χωρίς όμως να ξεκαθαρίζεται

αν η τακτική αυτή είναι χρήσιμη για την πρόληψη της ΠΕΝ ή ωφέλιμη από πλευράς αποδοτικότητας/κόστους.

4.2.7 Μητρικά αντισώματα.

Η ευαισθησία του νεογνού στον GBS εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το επίπεδο των αντι-καψιδικών IgG αντισωμάτων που μεταφέρονται από τη μητέρα διαμέσου του πλακούντα. Ο παράγοντας αυτός είναι άμεσα συνδεδεμένος με την προωρότητα του νεογνού, αφού η μεταφορά των IgG αντισωμάτων είναι χαμηλή πριν την 34^η εβδομάδα της κύησης [89,90].

4.2.8 Ιστορικό ΠΕΝ νεογνού ή μητρικού αποικισμού σε προηγμένα τοκετό, ως παράγοντας κινδύνου για επόμενο τοκετό.

Χωρίς να έχει ποσοτικοποιηθεί ο κίνδυνος εμφάνισης δεύτερου νεογνού με ΠΕΝ, είναι πιθανό ο αποικισμός της γεννητικής οδού της μητέρας να παραμένει και στο διάστημα μεταξύ των δύο τοκετών χωρίς να έχουν αναπτυχθεί επαρκείς ποσότητες αντισωμάτων. Επίσης Έχουν αναφερθεί λιγότερες περιπτώσεις γέννησης δύο νεογνών με ΠΕΝ από την ίδια μητέρα [91,92]. Πάντως, πρέπει να σημειωθεί ότι, περιπτώσεις βακτηριουρίας ή θετικής καλλιέργειας σε προηγούμενο τοκετό δεν συνιστούν παράγοντα κινδύνου ή ένδειξη χορήγησης ΙΑΡ. Στις δύο αυτές περιπτώσεις συστήνεται καλλιέργεια σε κάθε επόμενη κύηση. Δεδομένου όμως, ότι τα αίτια της ΠΕΝ δεν είναι πάντοτε ξεκάθαρα, το ατομικό ιστορικό γέννησης νεογνού με ΠΕΝ αποτελεί απόλυτη ένδειξη χορήγησης ΙΑΡ και στις μητέρες αυτές δεν απαιτείται νέα καλλιέργεια σε κάθε τοκετό [93].

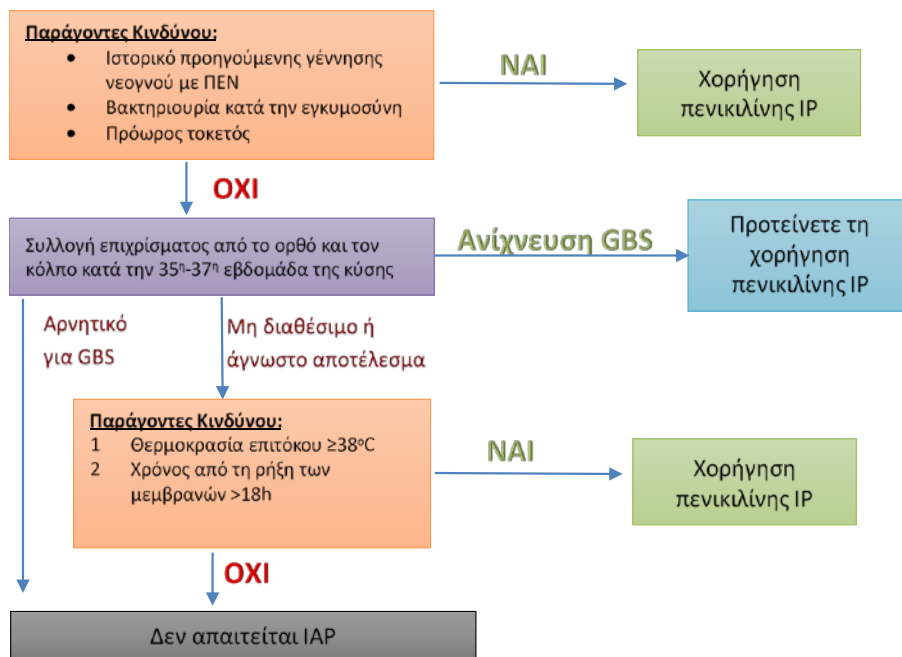
4.2.9 Λοιποί παράγοντες.

Η φυλή (αφρικανική φυλή), ο Διαβήτης της κύησης, η νεαρή ηλικία της μητέρας και οι συχνές γυναικολογικές εξετάσεις, έχουν σχετιστεί ασαφώς με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΠΕΝ στο νεογνό, από σποραδικές μη τυχαιοποιημένες μελέτες. Εντούτοις, η μικρή διαθεσιμότητα πληροφοριών καθώς και το γεγονός ότι, οι μη τυχαιοποιημένες μελέτες είναι πάντοτε επιρρεπείς στην επίδραση παραγόντων σύγχυσης, τα παραπάνω επιδημιολογικά χαρακτηριστικά δεν έχουν επηρεάσει τις κατευθυντήριες οδηγίες [93].

4.3 Η εξέλιξη και τα αποτελέσματα των στρατηγικών πρόληψης

4.3.1 Δεκαετία του 1990

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 εκδόθηκαν κατευθυντήριες οδηγίες για τη χορήγηση ΙΑΡ στη Βόρεια Αμερική. Εντούτοις οι οδηγίες δεν υιοθετήθηκαν ομόφωνα μέχρι το 1996, οπότε το CDC εξέδωσε κατευθυντήριες οδηγίες για τη χορήγηση ΙΑΡ, με κριτήριο τον έλεγχο διαλογής (screening) με καλλιέργεια επιχρίσματος από το ορθό και τον κόλπο μεταξύ 35^{ης} και 37^{ης} εβδομάδος της κύησης. Σε περιπτώσεις που αυτό δεν είναι εφικτό τη συστήνεται η αξιολόγηση ενός αριθμού παραγόντων κινδύνου (εικόνα 9).

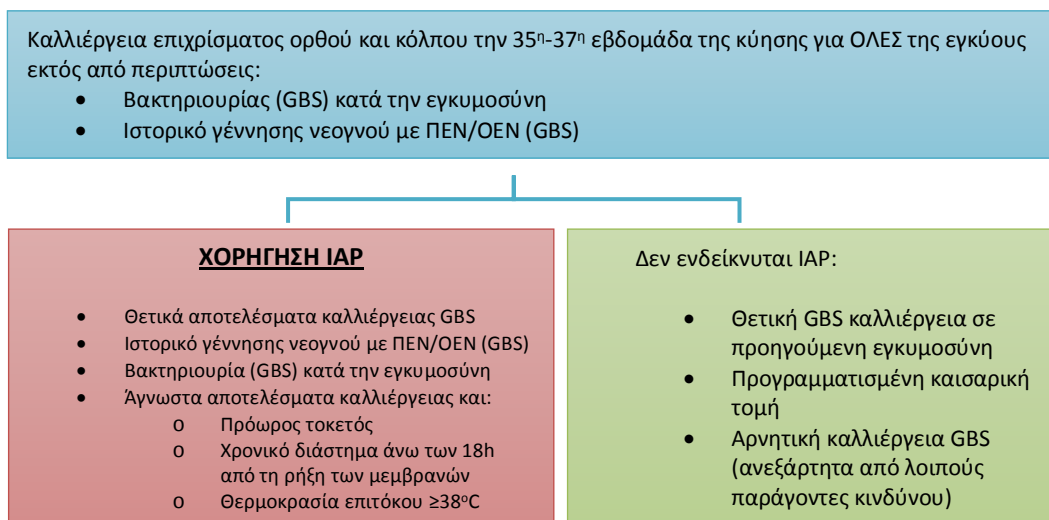


Εικόνα 9. Αλγόριθμος για την πρόληψη ΠΕΝ από GBS
Κατευθυντήριες οδηγίες του CDC 1996.

4.3.2 Δεκαετία του 2000

Τον Ιούλιο του 2002, πληθυσμιακή μελέτη που δημοσιεύτηκε στο *New England Journal of Medicine*, έδειξε ότι, η χρήση των αποτελεσμάτων καλλιέργειας από δείγματα που λαμβάνονται την 35^η-37^η εβδομάδα της κύησης, ήταν αποτελεσματικότερη για την πρόληψη της ΠΕΝ στις Ηνωμένες

Πολιτείες. Καθώς οι κατευθυντήριες γραμμές που εκδόθηκαν από το CDC το 1996 δε διαχώριζαν την αποτελεσματικότητα των δύο προσεγγίσεων στη διαλογή των εγκύων για χορήγηση ΙΑΡ, η μελέτη αυτή αποτέλεσε την πρώτη προσπάθεια άμεσης σύγκρισης των δύο μεθόδων. Από κάθε οπτική γωνία, η διαλογή βάσει καλλιέργειας επικράτησε της εφαρμογής της διαλογής βάσει παραγόντων κινδύνου. Επιπροσθέτως, στη συγκεκριμένη μελέτη, η αποτελεσματικότητα της ΙΑΡ αναδείχθηκε εξαιρετικά υψηλή (90%) στην πρόληψη της ΠΕΝ. Αυτό οδήγησε στην ομόφωνη υιοθέτηση των κατευθυντήριων γραμμών για τον έλεγχο διαλογής με καλλιέργεια την 35^η-37^η εβδομάδα κύησης για τη χορήγηση ΙΑΡ στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2002, με τις αντίστοιχες αναθεωρημένες οδηγίες να εκδίδονται και από το CDC [94]. Με βάση αυτές τις οδηγίες, η προσέγγιση σύμφωνα με τους παράγοντες κινδύνου εφαρμόζεται σε περιπτώσεις που, κατά την εισαγωγή για τοκετό δεν έχει πραγματοποιηθεί καλλιέργεια ή τα αποτελέσματά της είναι άγνωστα.



Εικόνα 10. Αλγόριθμος για την πρόληψη ΠΕΝ από GBS
Ανανεωμένες κατευθυντήριες οδηγίες του CDC 2002

4.4 Τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες

Το Νοέμβριο του 2008, το CDC οργάνωσε μία τεχνική ομάδα για την αναθεώρηση των κατευθυντήριων οδηγιών του 2002. Αργότερα, τον Ιούλιο του 2009, η ομάδα συναντήθηκε για τη συζήτηση των νέων δεδομένων (2002-2008) και την ανάπτυξη νέων κατευθυντήριων οδηγιών βάσει ενδείξεων, όπου ήταν εφικτό και σύμφωνα με τη γνώμη των ειδικών όπου τα δεδομένα δεν παρείχαν αρκετές ενδείξεις. Ως αποτέλεσμα, το Νοέμβριο του 2010 και σε ομοφωνία με τις ακαδημαϊκές κοινότητες των παιδιάτρων και γυναικολόγων των Ηνωμένων Πολιτειών, εκδόθηκαν οι αναθεωρημένες κατευθυντήριες οδηγίες για την πρόληψη της διεισδυτικής νόσου από GBS.

Οι κύριες αλλαγές στις νέες οδηγίες περιλαμβάνουν τα ακόλουθα βασικά σημεία:

- Εκτεταμένες οδηγίες εργαστηριακών οδηγιών για την ανίχνευση του GBS
- Διασαφήνιση των ορίων στη μέτρηση αποικιών GBS (CFU/ml) για το χαρακτηρισμό ενός δείγματος ούρων θετικού.
- Ενημερωμένους αλγορίθμους για τον έλεγχο διαλογής και τη χορήγηση IAP
- Μεταβολές στη δοσολογία της πενικιλίνης, καθώς και νέες οδηγίες θεραπευτικής προσέγγισης σε περιπτώσεις αλλεργίας στην πενικιλίνη
- Αναθεωρημένο αλγόριθμο για τη διαχείριση νεογνών με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΠΕΝ.

Πίνακας 9. Ενδείξεις για τη χορήγηση ή μη χορήγηση IAP
Τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες του CDC 2010

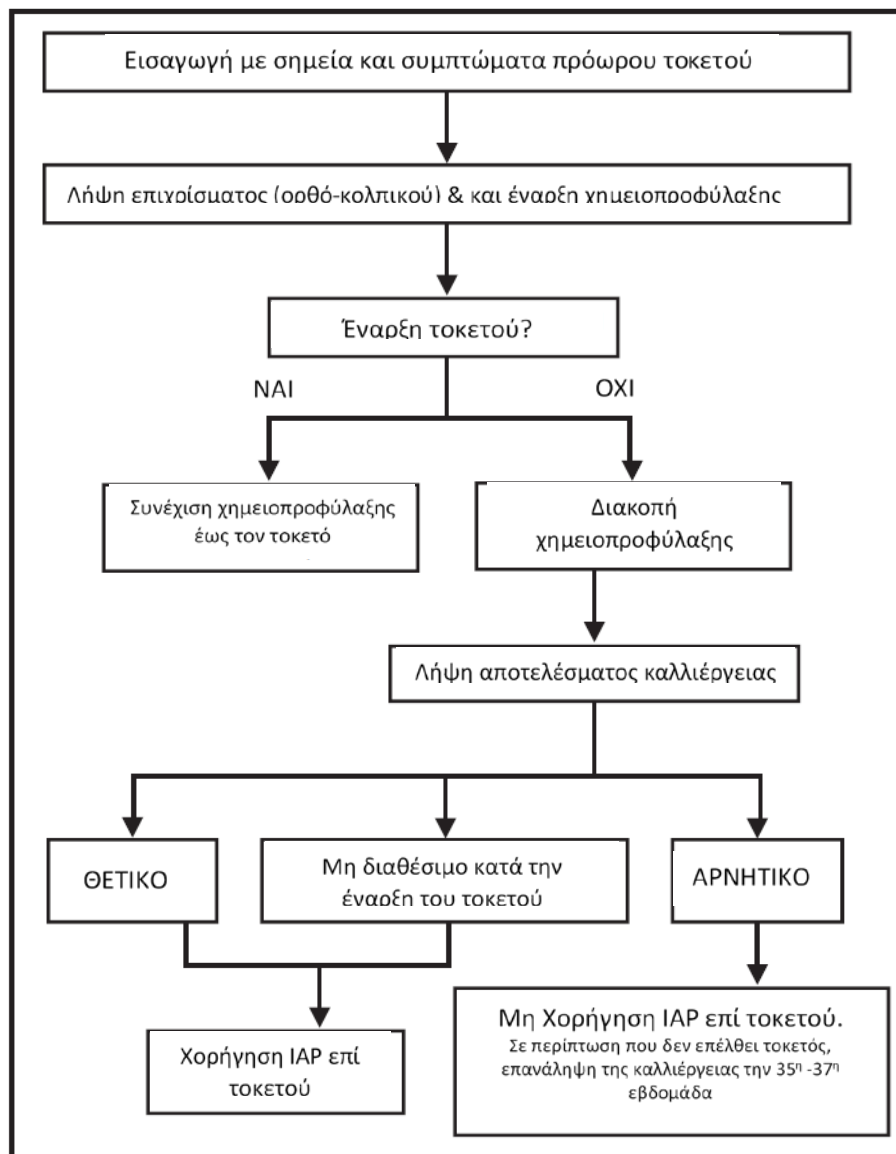
Ενδείξεις για χορήγηση IAP	Ενδείξεις για μη χορήγηση IAP
Ιστορικό γέννησης προηγούμενου νεογνού με ΠΕΝ	Αποικισμός με GBS σε προηγούμενη εγκυμοσύνη.
GBS βακτηριουρία κατά τη διάρκεια της παρούσας εγκυμοσύνης	GBS βακτηριουρία κατά τη διάρκεια προηγούμενης εγκυμοσύνης
Θετική καλλιέργεια † στην παρούσα εγκυμοσύνη *	Αρνητική καλλιέργεια † στην παρούσα εγκυμοσύνη, ανεξάρτητα από λοιπούς παράγοντες κινδύνου
Άγνωστο αποτέλεσμα καλλιέργειας και ένα από τα παρακάτω: – Πρόωρος τοκετός (<37 εβδομάδων)§ – Ρήξη μεμβρανών ≥18 hours – Θερμοκρασία επιτόκου ≥38.0°C ¶ – NAAT** κατά τη διάρκεια του τοκετού θετικό για GBS	Καισαρική τομή σε γυναίκες πριν την έναρξη των ωδινών και με άθικτες μεμβράνες, ανεξάρτητα από τα αποτελέσματα της καλλιέργειας ή τη διάρκεια της κύησης.
Συντημήσεις: NAAT = Nucleic acid amplification tests (Δοκιμασίες ενίσχυσης Ν. Οξέος) † Η καλλιέργεια θα πρέπει να έχει πραγματοποιηθεί κατά την 35η–37η εβδομάδα της κύησης. ¶ Σε υποψία αμνιονίτιδας, η IAP θα πρέπει να αντικατασταθεί από αντιβιοτικά ευρέος φάσματος, με αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή δράση έναντι του GBS. ** Σε περίπτωση που το NAAT έχει αρνητικό αποτέλεσμα και υφίσταται ένας από τους άλλους παράγοντες, ενδείκνυται η χορήγηση IAP	

4.4.1 Διαλογή των περιπτώσεων για χορήγηση IAP.

Σύμφωνα με τις τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες, τα κύρια σημεία του ελέγχου διαλογής συνοψίζονται στα εξής:

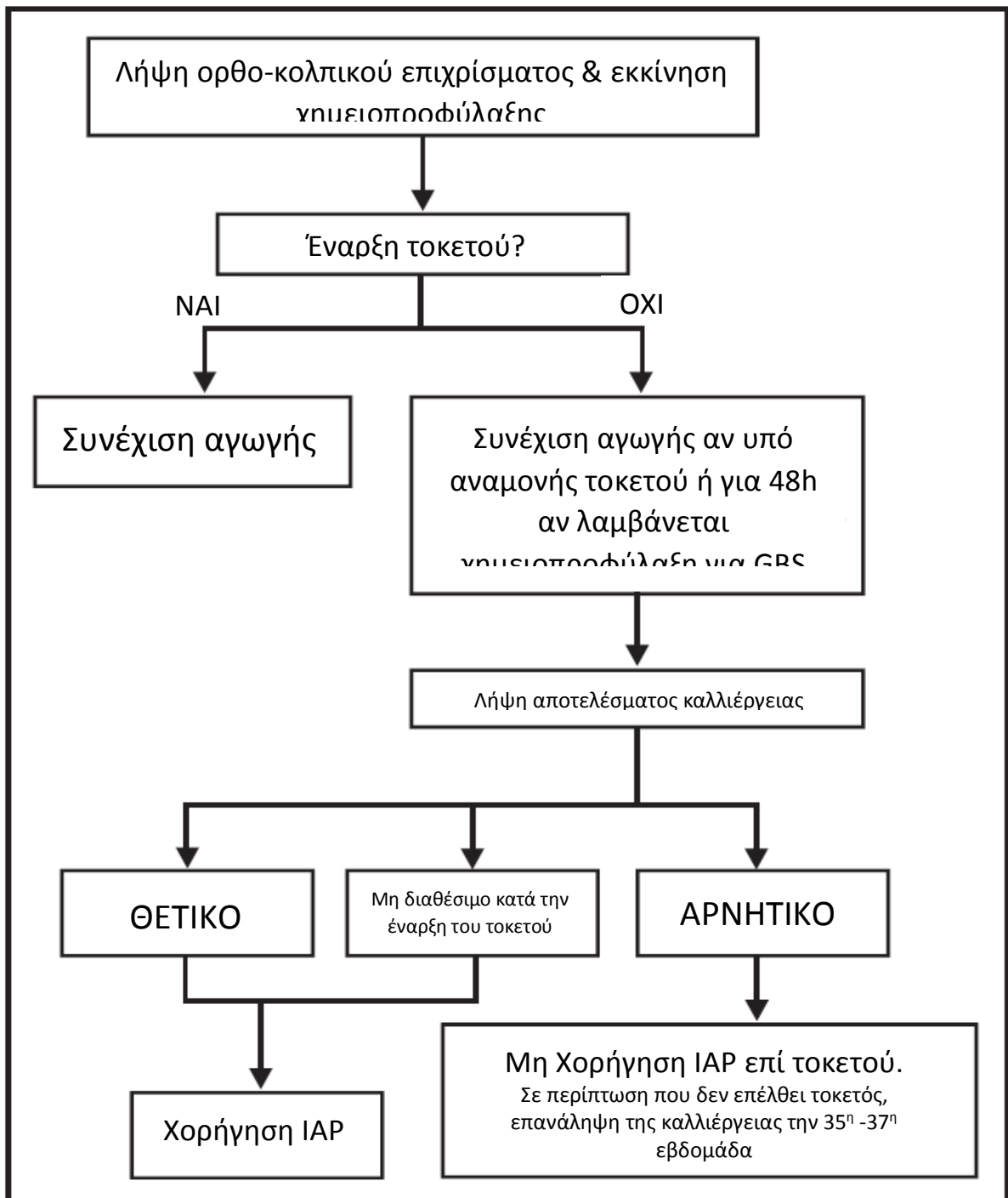
- Γυναίκες με βακτηριουρία σε οποιαδήποτε χρονική περίοδο της κύησης ή με ιστορικό γέννησης νεογνού που εμφάνισε ΠΕΝ, θα πρέπει να λαμβάνουν IAP, χωρίς να είναι απαραίτητη η λήψη καλλιέργειών κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης. Ταυτόχρονα με την επιλογή τους για χορήγηση IAP, οι γυναίκες που εμφανίζουν συμπτωματική βακτηριουρία θα πρέπει να ακολουθούν αγωγή σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα.
- Όλες οι υπόλοιπες γυναίκες θα πρέπει να υποβάλλονται σε καλλιέργεια επιχρίσματος από το ορθό και τον κόλπο κατά την 35^η-37^η εβδομάδα της κύησης.
- Η IAP θα πρέπει να χορηγείται σε όλες της γυναίκες που είχαν θετικά αποτελέσματα καλλιέργειας, εκτός από την περίπτωση που πραγματοποιείται καισαρική τομή υπό ελεγχόμενες συνθήκες (άθικτες μεμβράνες, πριν την έναρξη των ωδινών)
- Σε περιπτώσεις που τα αποτελέσματα της καλλιέργειας είναι άγνωστα, χορήγηση IAP γίνεται μόνο σε περιπτώσεις:
 - ο Πρόωρου τοκετού (κύηση <37 εβδομάδων)
 - ο Παρατεταμένου χρόνου από τη ρήξη των μεμβρανών (>18h)
 - ο Θερμοκρασία της επιτόκου $\geq 38,0^{\circ}\text{C}$
- Σε περιπτώσεις θετικής καλλιέργειας σε ασυμπτωματικές εγκύους (χωρίς ουρολοίμωξη), η αντιμικροβιακή θεραπεία θα πρέπει να αποφεύγεται διότι είναι αναποτελεσματική στην πρόληψη ενδεχόμενης ΠΕΝ του νεογνού.

- Ακόμη και οι γυναίκες που έχουν προγραμματιστεί για καισαρική τομή, θα πρέπει να υποβάλλονται σε καλλιέργεια την 35^η-37^η εβδομάδα της κύησης.
- Γυναίκες που υποβάλλονται σε καισαρική τομή υπό ελεγχόμενες συνθήκες δεν απαιτείται να λαμβάνουν IAP, ακόμη κι αν έχουν θετικά αποτελέσματα καλλιέργειας ή πρόωρο τοκετό.
- Η χρήση ταχέων μεθόδων ανίχνευσης (μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος, NAAT – Nucleic Acid Amplification Tests), όπου είναι διαθέσιμες, θα πρέπει να πραγματοποιείται σε περιπτώσεις αγνώστου αποτελέσματος καλλιέργειας και σε περιπτώσεις στις οποίες δεν εμφανίζεται κανένας άλλος παράγοντας κινδύνου (πρόωρος τοκετός, παρατεταμένη ρήξη μεμβρανών, πυρετός, θετικό ιστορικό). Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος ή εμφάνισης οποιουδήποτε άλλου παράγοντα κινδύνου πριν την παραλαβή των αποτελεσμάτων, χορηγείται IAP.



Εικόνα 11. Αλγόριθμος διαχείρισης υποπτευόμενου πρόωρου τοκετού για την πρόληψη ΠΕΝ

Κατευθυντήριες οδηγίες του CDC 2010



Εικόνα 12. Αλγόριθμος διαχείρισης περιπτώσεων με πρόωρη ρήξη των μεμβρανών για την πρόληψη ΠΕΝ
Κατευθυντήριες οδηγίες του CDC 2010.

4.4.2 Επιλογή της χρονικής περιόδου για τον έλεγχο διαλογής.

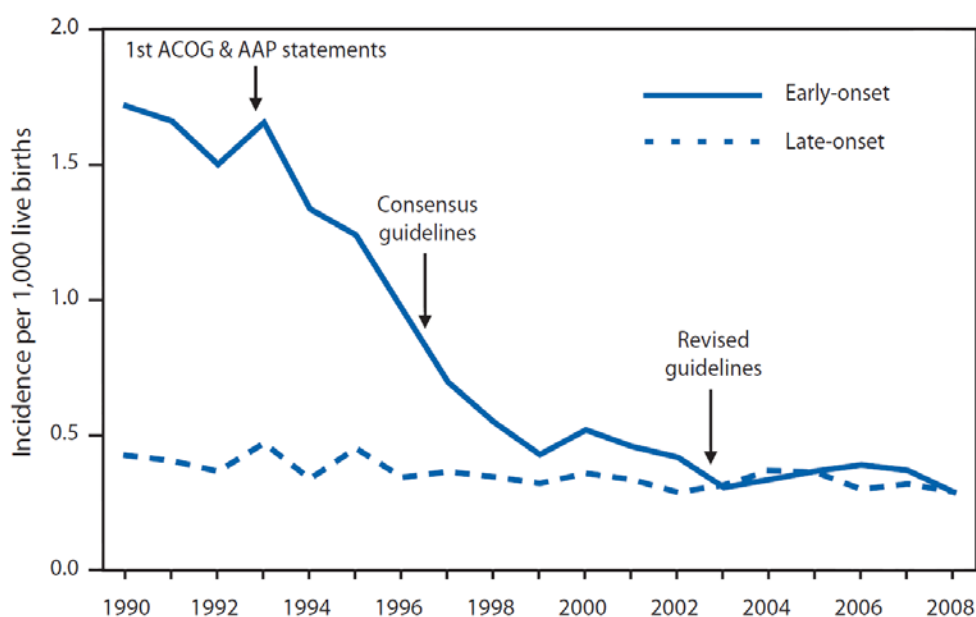
Δεδομένου ότι, τα επίπεδα και η κατάσταση του αποικισμού συχνά μεταβάλλονται με το χρόνο, η επιλογή της χρονικής περιόδου λήψης δειγμάτων για την καλλιέργεια είναι εξαιρετικής σημασίας. Καθώς λοιπόν ο αποικισμός μπορεί να είναι διαλείπων, έχει αποδειχθεί ότι η προγνωστική αξία καλλιεργειών στα πρώτα τρίμηνα της κύησης είναι εξαιρετικά χαμηλή [95]. Αντιθέτως, δείγματα που λαμβάνονται κατά τη χρονική περίοδο των 5 τελευταίων εβδομάδων της κύησης, παρουσιάζουν ενισχυμένη αρνητική προγνωστική αξία (95%-98%) [96].

4.5 Αποτελέσματα των εφαρμοζόμενων στρατηγικών πρόληψης.

Η εφαρμογή των στρατηγικών πρόληψης που ξεκίνησε τη δεκαετία του 1990 οδήγησε σε δραματική πτώση της συχνότητας εμφάνισης GBS-PEN στα νεογνά. Αξίζει να αναφερθεί ότι, πριν την εφαρμογή των προληπτικών στρατηγικών, το φορτίο της διεισδυτικής νόσου στα νεογνά από GBS ήταν εξαιρετικά υψηλό και αναλογούσε στο 70% των περιπτώσεων PEN και περίπου 20% των περιπτώσεων OEN [97,98]. Αναλυτικότερα, η επίπτωση της GBS-PEN κυμαινόταν από 0,4-6/1000 γεννήσεις ζώντων νεογνών, ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή. Ιδίως στις Ηνωμένες Πολιτείες, όπου από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 ξεκίνησε η ευρεία εφαρμογή των στρατηγικών πρόληψης, η συχνότητα μειώθηκε δραματικά από 1,7 το 1993 σε <0,4/1000 γεννήσεις ζώντων νεογνών το 2008 [99,100,101,102]. Σε Ευρωπαϊκές χώρες που εφαρμόστηκαν οι κατευθυντήριες οδηγίες, η πτώση της επίπτωσης ήταν επίσης σημαντική, όπως για παράδειγμα στην Ισπανία, όπου από 2,4/1000 το

1996 μειώθηκαν σε 0,45/1000 γεννήσεις ζώντων νεογνών το 2008. Εντούτοις, η συχνότητα εμφάνισης της ΟΕΝ σε παγκόσμιο επίπεδο παρέμεινε σχετικά σταθερή σε 0,4/1000 γεννήσεις ζώντων νεογνών τα τελευταία 20 χρόνια [100,103,104,105].

Σχετικά με την καταγραφή και την επιδημιολογική επιτήρηση των περιστατικών, αξίζει να αναφερθεί ότι, οι αναφερόμενες καταγραφές δεν έχουν γίνει σύμφωνα με τις νεότερες κατευθυντήριες οδηγίες για τη διαχείριση των δειγμάτων και τις προτεινόμενες διαδικασίες για συστηματικές καλλιέργειες, με ενδεχόμενο αποτέλεσμα ένα σημαντικό ποσοστό ψευδώς αρνητικών αναφορών. Επίσης, ο GBS είναι ευρέως αναγνωρισμένος ως αίτιο αυτόματων αποβολών και θνησιγένειας. Επειδή όμως η συσχέτιση δεν έχει ποσοτικοποιηθεί, είναι αδύνατον να αναγνωριστούν οφέλη από μελέτη των διαθέσιμων στοιχείων [99].



Εικόνα 13. Διάγραμμα από τις τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες του CDC 2010 που απεικονίζει τη δραματική πτώση συχνότητας εμφάνισης της ΠΕΝ από το 1990 έως σήμερα.

4.5.1 Αντιμικροβιακή αντοχή του GBS.

Η ευρεία χρήση αντιμικροβιακής αγωγής κατά των τοκετό τις τελευταίες δεκαετίες εγείρει ανησυχία για την εμφάνιση ανθεκτικών GBS στελεχών. Σύμφωνα με τις τρέχουσες πληροφορίες, τα ανιχνευόμενα στελέχη του GBS παραμένουν ευαίσθητα στην πενικιλίνη, την αμπικιλίνη και τις κεφαλοσπορίνες πρώτης γενιάς [106,107,108]. Εντούτοις, στελέχη με αυξανόμενη ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) έχουν ανιχνευθεί και αναφερθεί, συμπεριλαμβανομένων 14 μη παθογόνων στελεχών στην Ιαπωνία και 11 παθογόνων στελεχών στις Ηνωμένες Πολιτείες [109,110]. Διαφοροποιήσεις στην πρωτεΐνη δέσμευσης της πενικιλίνης (*PBP 2X*) ανιχνεύτηκαν σε 4 από τα στελέχη στις Ηνωμένες

Πολιτείες και σε όλα τα στελέχη από την Ιαπωνία. Οι τιμές τις MIC αναφέρονται στα όρια της ανθεκτικότητας ($\leq 0,12\mu\text{g/ml}$ για την πενικιλίνη και $\leq 0,25\mu\text{g/ml}$ για την αμπικιλίνη). Όμως η κλινική σημασία των μετρήσεων αυτών παραμένει ασαφής [111].

Το ποσοστό των στελεχών του GBS με *in vitro* αντοχή στην κλινδαμυκίνη ή την ερυθρομυκίνη έχει αυξηθεί τα τελευταία 20 χρόνια. Η μικροβιακή αντοχή μεταξύ των στελεχών του GBS στις Ηνωμένες Πολιτείες αναφέρθηκε σε ποσοστά από 25% έως 32% για την ερυθρομυκίνη και από 13% έως 20% για την κλινδαμυκίνη στις μελέτες που δημοσιεύτηκαν τα έτη 2006-2009. Η αντοχή στην ερυθρομυκίνη συνδέεται συχνά αλλά όχι πάντοτε με αντοχή στην κλινδαμυκίνη [112,113]. Εντούτοις, η συχνότητα εμφάνισης ΠΕΝ από ανθεκτικά στελέχη του GBS έχει παραμείνει σταθερή τα τελευταία χρόνια [114].

4.6 Εμβολιασμός.

Ο εμβολιασμός έναντι του GBS έχει μελετηθεί τα τελευταία χρόνια ως στρατηγική μείωσης του αποικισμού των γυναικών και της επακόλουθης επιμόλυνσης του νεογνού κατά την κύηση ή τον τοκετό [114,115,116]. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο. Έχει δειχθεί ότι γυναίκες, με ικανή ποσότητα ειδικών IgG αντισωμάτων απέναντι στους CPS, προσφέρουν προστασία από τη διεισδυτική νόσο στα νεογνά τους [116,117,118]. Κλινικές δοκιμές έχουν τεκμηριώσει καλή ανοχή και επαρκή ανοσοποίηση απέναντι στον ορότυπο III, σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Εντούτοις η κυκλοφορία ενός εμβολίου έναντι των επικρατέστερων στελεχών του GBS δε διαφαίνεται να πραγματοποιηθεί σύντομα.

Μέθοδοι ανίχνευσης

5.1 Εισαγωγή.

Όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, ο αποικισμός της μητέρας από GBS αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο των στρατηγικών πρόληψης της ΠΕΝ τα τελευταία 25 περίπου έτη. Επιπροσθέτως, η ανίχνευση ή όχι του GBS στα δείγματα τα οποία λαμβάνονται κατά την κύηση έχει πρωταρχικό ρόλο στους αλγόριθμους της κλινικής διαχείρισης. Εκτός από την καλλιέργεια, που χρησιμοποιείται για δεκαετίες για την ανίχνευση του GBS, έχουν αναπτυχθεί ποικίλες νέες τεχνικές ανίχνευσης, με διαγνωστική αξία εφάμιλλη ή και ανώτερη εκείνης της καλλιέργειας.

Στις τελευταίες αναθεωρημένες οδηγίες του CDC και για πρώτη φορά, γίνεται εκτενής αναφορά στις μεθόδους ανίχνευσης. Επίσης, γίνεται μια προσπάθεια πρότασης κατευθυντήριων οδηγιών για το χειρισμό των δειγμάτων και των βέλτιστων πρακτικών για την πραγματοποίηση της καλλιέργειας δειγμάτων για GBS.

Είναι προφανές πως, η διαγνωστική αξία της όποιας διαδικασίας έχει εξαιρετική σημασία, αφού συνδέεται άμεσα με το ποσοστό επιτυχίας της πρόληψης της ΠΕΝ καθώς και της αποδοτικής χρήσης των πόρων που διατίθενται για κάθε στρατηγικό σχεδιασμό. Αξίζει δε να σημειωθεί πως οποιαδήποτε στρατηγική που βασίζεται στη χημειοπροφύλαξη επηρεάζει και είναι ευάλωτη από την ανάπτυξη της μικροβιακής αντοχής.

Στο κεφάλαιο αυτό θα γίνει μια σύντομη περιγραφή των μεθόδων, που είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση του GBS καθώς και τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους.

5.2 Η καλλιέργεια

Η καλλιέργεια αποτελεί τη συνηθέστερη μέχρι σήμερα μέθοδο για την ανίχνευση του GBS και εξακολουθεί να είναι ευρέως αποδεκτή ως Gold Standard. Η κλασσική μέθοδος καλλιέργειας για τους GBS απαιτεί 48 ώρες για την ταυτοποίηση. Σε θετικό αποτέλεσμα απαιτούνται 24 ώρες επιπλέον για τη δοκιμασία ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε άγαρ εμπλουτισμένο με ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου (αιματούχο άγαρ). Οι αποικίες του GBS ανιχνεύονται από την αποδόμηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και την παραγωγή μιας χαρακτηριστικής ζώνης αιμόλυσης, η οποία ορίζεται ως Β-αιμόλυση. Η παρουσία του GBS μπορεί να επιβεβαιωθεί με την εφαρμογή χρώσης Gram, δοκιμασίας CAMP (ακρωνύμιο των Christie, Atkins, Munch-Petersen, 1944) ή μέσω μιας δοκιμασίας συγκόλλησης σε επιλεγμένες Β-αιμολυτικές αποικίες. Σε περίπτωση που το δείγμα του ασθενή περιέχει διάφορα στελέχη, μπορεί να μην ανιχνευθεί η Β – αιμόλυση. Επίσης υπάρχει κίνδυνος υπερανάπτυξης στα δείγματα ανταγωνιστικών παθογόνων, όπως οι Πρωτεΐς και οι Εντερόκοκκοι, με συνέπεια να παρατηρούνται συχνά ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τέλος, μετά την ανίχνευση της αιμόλυσης, είναι συχνά σκόπιμη η “follow up” εξέταση του υλικού, για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων

Μερικές παραλλαγές της μεθόδου καλλιέργειας του GBS έχουν εφαρμοσθεί, με σκοπό τη βελτίωση της επάρκειας της κλασσικής τεχνικής της καλλιέργειας. Κυριότερες από αυτές είναι, η χρήση ειδικών υλικών που περιέχουν χρωμογόνο, γεγονός που ενισχύει τις πιθανότητες ταυτοποίησης, η εφαρμογή ενός σταδίου εμπλουτισμού διάρκειας 18 -24 ωρών πριν από την καλλιέργεια και η προσθήκη αντιβιοτικού, όπως η κολιστίνη για την αποφυγή ανάπτυξης άλλων παθογόνων. Οι τρέχουσες οδηγίες του CDC, για την

εργαστηριακή επιβεβαίωση του GBS μέσω καλλιέργειας, παρουσιάζονται συνοπτικά στην εικόνα 14 [119 – 127].

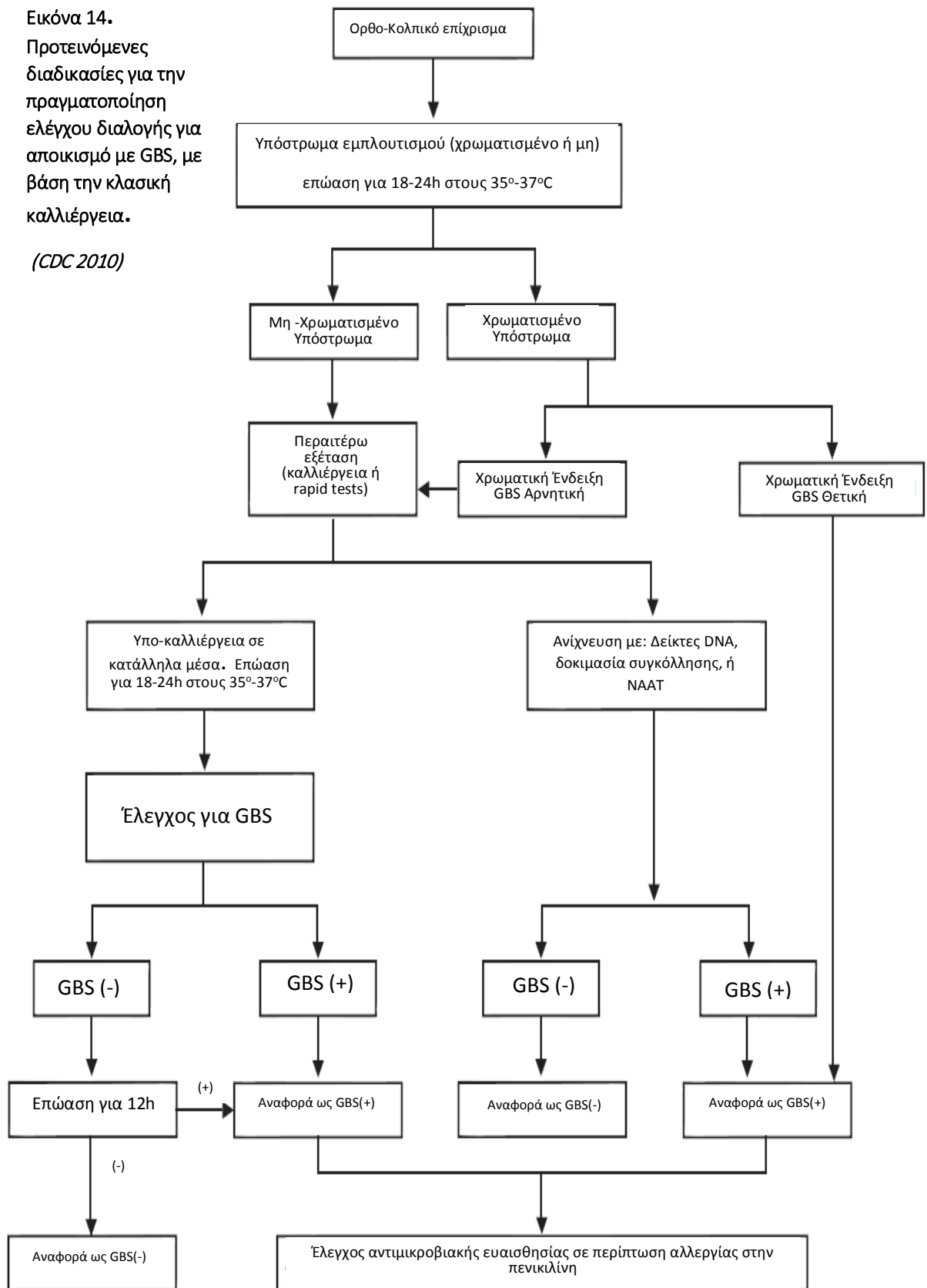
Μέχρι σήμερα πάντως, η καλλιέργεια αποτέλεσε και αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στη στρατηγική ενάντια στην ΠΕΝ των νεογνών από GBS. Αρνητικά της σημεία είναι: α) ο χρόνος για τη λήψη των αποτελεσμάτων (24h-48h) και β) η μεγάλη εξάρτηση της προγνωστικής της αξίας από το χρονικό σημείο λήψης του δείγματος, όπως φαίνεται στον πίνακα 10. Τα τελευταία χρόνια όμως έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι, πέραν των παραλλαγών της καλλιέργειας, που προτάσσονται ως αντικαταστάτες της κλασσικής αυτής μεθόδου.

Πίνακας 10. Προγνωστική αξία της καλλιέργειας για τον έλεγχο αποικισμού με GBS, ανάλογα με την εβδομάδα λήψης του δείγματος πριν τον τοκετό [120].

Διάστημα (εβδ)(-)	Θετική Προγνωστική Αξία	Αρνητική Προγνωστική Αξία
1	100%	98%
2	91%	96%
3	88%	97%
4	87%	97%
5	88%	95%
≥6	43%	80%

Εικόνα 14.
Προτεινόμενες
διαδικασίες για την
πραγματοποίηση
ελέγχου διαλογής για
αποικισμό με GBS, με
βάση την κλασική
καλλιέργεια.

(CDC 2010)



Όπως αναφέρθηκε στο πρώτο κεφάλαιο, τα στελέχη του GBS μπορεί να ταυτοποιηθούν με τη χρήση του αντιγόνου Lancefield τύπου Β. Ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμα τεστ συγκόλλησης και ανοσοδοκιμασίες για την ταχεία ανίχνευση του GBS χωρίς προηγούμενη καλλιέργεια. Εντούτοις, ενώ η ειδικότητα των μεθόδων αυτών είναι εξαιρετικά υψηλή, η ευαισθησία τους είναι χαμηλή, με αποτέλεσμα να μη θεωρούνται κατάλληλες για τη συστηματική χρήση σε ελέγχους διαλογής [128].

5.4 Δοκιμασίες υβριδισμού

Η δοκιμασία υβριδισμού πραγματοποιείται με δείκτες ειδικούς για το ριβοσωμιακό RNA του GBS. Η μέθοδος αυτή έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει ευαισθησία 94,7-100% και ειδικότητα 96,9-99,5% στην αναγνώριση του GBS, σε καλλιέργειες επωασμένες για 18-24 ώρες [129]. Δυστυχώς όμως, παρουσιάζεται δραματική πτώση της ευαισθησίας, όταν μειώνεται ο χρόνος επώασης. Συνεπώς, οι μέθοδοι αυτοί, ενώ αποτελούν σημαντική βελτίωση της διαγνωστικής αξίας της καλλιέργειας, αποτυγχάνουν να λύσουν ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματά της, το χρόνο επώασης.

5.5 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Οι μέθοδοι ενίσχυσης του νουκλεϊκού οξέος κερδίζουν συνεχώς έδαφος στην ανίχνευση παθογόνων οργανισμών παγκοσμίως. Προϋπόθεση των μεθόδων αυτών είναι η εκ των προτέρων γνώση του γονιδιώματος του οργανισμού, ώστε να γίνει η σωστή στόχευσή της υπό πολλαπλασιασμό αλληλουχίας, πράγμα που αποτελεί τροχοπέδη σε πολλές περιπτώσεις. Σε

περιπτώσεις όπως του GBS, όπου η βακτηριακή λύση αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εμπόδια, υπήρξε σημαντική καθυστέρηση μέχρι να βρεθούν αξιόπιστες λύσεις και να μελετηθούν, ώστε να υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για την αξιολόγησή τους. Επιπροσθέτως, το αυξημένο κόστος των μεθόδων αυτών στις περισσότερες περιπτώσεις, τις έχει αφήσει στο περιθώριο των στρατηγικών δοκιμασίας διαλογής σε αρκετές περιπτώσεις, παρόλο που τα διαγνωστικά τους χαρακτηριστικά είναι συχνά ανώτερα των παραδοσιακών μεθόδων.

Η ταυτοποίηση του GBS μπορεί να γίνει με την ανίχνευση ενός ειδικού γνωστού τμήματος του γενετικού του υλικού. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αυτό παρουσιάζει μια επιπλέον δυσκολία, λόγω της εξάρτησης της μεθόδου από την επιτυχή λύση του βακτηριδίου, η οποία είναι αρκετά δυσχερής λόγω του συνδυασμού του κυτταρικού τοιχώματος και της πολυσακχαριδικής κάψας του GBS. Μετά τη λύση του βακτηριδίου, το δείγμα θερμαίνεται στους 95 °C, με αποτέλεσμα την αποδιάταξη του DNA σε μονές αλυσίδες. Στη συνέχεια, μέσω της ψύξης στους 50°C - 60°C, επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών στις κατάλληλες θέσεις του μονόκλωνου DNA. Κατόπιν, η θερμοκρασία αυξάνεται περίπου στους 72 °C και ξεκινά η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών τμημάτων. Στη συνέχεια ο κύκλος επαναλαμβάνεται 25 με 40 φορές με αποτέλεσμα την ταχεία αύξηση των ανιχνευόμενων τμημάτων του γενετικού υλικού.

Μετά από έναν επιτυχημένο κύκλο PCR παράγονται αρκετά εκατομμύρια τμημάτων DNA. Η συμβατική PCR προϋποθέτει την ολοκλήρωση όλων των κύκλων και στη συνέχεια το διαχωρισμό των τμημάτων DNA με ηλεκτροφόρηση. Παραλλαγή της κλασικής αυτής μεθόδου είναι η PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR), κατά την οποία, η μέτρηση των

τμημάτων DNA που έχουν παραχθεί γίνεται σε κάθε κύκλο μέσω φθορίζοντων δεικτών.

Έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι PCR ανάλογα με το γονίδιο στόχο. Τα κοινότερα γονίδια στόχοι είναι το *cfb*, που κωδικοποιεί τον παράγοντα CAMP, το γονίδιο *sir*, που κωδικοποιεί την ανοσογόνο πρωτεΐνη Sir και το γονίδιο *ptsI* (φωσφοτρασφεράση) (106,107). Κάθε δοκιμασία μπορεί να διαφοροποιηθεί ως προς τη μέθοδο λύσης του βακτηριδίου και του γονιδίου στόχου.

Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να παράγουν αξιόπιστα αποτελέσματα σε χρονικό διάστημα από 45' έως 100' από τη λήψη των δειγμάτων. [130,131,132,133, 134].

III ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Σκοπός της μελέτης

Σκοποί της παρούσας εργασίας είναι

- Η μελέτη της συχνότητας του αποικισμού από GBS σε ασυμπτωματικές γυναίκες ηλικίας 22-36 ετών.
- Η μελέτη της συχνότητας του αποικισμού από GBS σε εγκύους γυναίκες ηλικίας 22-36 ετών.
- Η εκτίμηση της συχνότητας αποικισμού από GBS των εγκύων γυναικών σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά την εξέλιξη της κύησης και η αποτύπωση τυχόν μεταβολών στον αποικισμό μεταξύ πρώτου δευτέρου και τρίτου τριμήνου.
- Η αξιολόγηση διαφορών μεταξύ δειγμάτων από τον κόλπο και το ορθό στα αποτελέσματα της κλασσικής καλλιέργειας και των νεότερων μοριακών μεθόδων
- Η εκτίμηση της διαγνωστικής ακρίβειας της νεότερης τεχνικής ταχείας PCR, με άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου με εκείνα από την επεξεργασία με κλασσική καλλιέργεια 36 ωρών, σε δείγματα που έχουν ληφθεί από τον κόλπο και το ορθό στο χρονικό διάστημα μεταξύ 35^{ης} -37^{ης} εβδομάδας της κύησης.
- Η αξιολόγηση της νεότερης τεχνικής ταχείας PCR με στόχο το γονίδιο *cfb*, ως επόμενη μέθοδο εκλογής ανίχνευσης του αποικισμού από GBS, για τον έλεγχο διαλογής των εγκύων και επίτοκων γυναικών και την πρόληψη της νεογνικής στρεπτοκοκκικής νόσου.

Υλικό και μέθοδοι

7.1 Ασθενείς

Μελετήθηκαν συνολικά 1227 τυχαία επιλεγμένες γυναίκες ηλικίας 22 έως 38 ετών ($m=29.99$ $\sigma=4,916$). Οι ασθενείς της μελέτης προέρχονται από τη Β' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Αρεταίειο Νοσοκομείο και προσήλθαν για τακτικό γυναικολογικό και προγεννητικό έλεγχο.

Η στρωματοποίηση του πληθυσμού προς μελέτη έγινε ως εξής:

- 370 τυχαία επιλεγμένες γυναίκες ηλικίας 22-38 ετών ($m=30.24$ $\sigma=4.955$)
- 205 τυχαία επιλεγμένες γυναίκες ηλικίας 22-38 ετών ($m=29,61$ $\sigma=4,900$) σε εγκυμοσύνη 1^{ου} τριμήνου
- 200 τυχαία επιλεγμένες γυναίκες ηλικίας 22-38 ετών ($m=29,75$ $\sigma=5,029$) σε εγκυμοσύνη 2^{ου} τριμήνου
- 452 τυχαία επιλεγμένες γυναίκες ηλικίας 22-38 ετών ($m=30,06$ $\sigma=4,916$) σε εγκυμοσύνη 3^{ου} τριμήνου και μεταξύ 35^{ης} και 37^{ης} εβδομάδος

Κριτήρια αποκλεισμού αποτέλεσαν:

- Ηλικία <20 και >40 ετών
- Προηγούμενη εγκυμοσύνη με ιστορικό νεογνικής νόσου από GBS
- Αντιμικροβιακή αγωγή
- Συμπτώματα/επιπλοκές κύησης

7.2 Πρωτόκολλο

Από το σύνολο των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη, ζητήθηκε γραπτή συναίνεση για τη συμμετοχή, κατά την προσέλευσή τους στην κλινική για εξέταση. Η μελέτη διήρκεσε 36 μήνες.

Για κάθε εξεταζόμενη ελήφθησαν δύο δείγματα από τον κόλπο και δύο δείγματα από το ορθό, τα οποία τοποθετήθηκαν άμεσα σε υλικό μεταφοράς Stuart και στάλθηκαν στο μικροβιολογικό εργαστήριο για ανάλυση.

7.3 Μέθοδοι επεξεργασίας

Το σύνολο των δειγμάτων επώαστηκε σε ζωμό Todd-Hewitt (Difco, Detroit, MI, USA) με συμπλήρωμα ναλιδιξικού οξέος και γενταμικίνης στους 36°C, 5% CO₂ για 24 ώρες.

Τα ζεύγη δειγμάτων των 370 μη εγκύων γυναικών καθώς και των 857 εγκύων γυναικών την επόμενη ημέρα ανακαλλιεργήθηκαν σε αιματούχο άγαρ 5% (Bioprepate, Keratea-Attiki, Greece) με επώαση στους 36°C, 5% CO₂ για 24 ώρες.

Τα δείγματα παρατηρήθηκαν ανά 24 ώρες για τις επόμενες 2 ημέρες.

Η ταυτοποίηση έγινε με βάση:

- τη μορφολογία των αποικιών
- τη χρώση Gram
- τη δοκιμασία καταλάσης

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση:

- συγκολλητινοαντίδραση latex με ειδικούς αντιορούς AVIPATH[®] STREP (Omega Diagnostics Ltd., Scotland, UK)
- αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK2 (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) με τη χρήση της κάρτας AST-ST01.

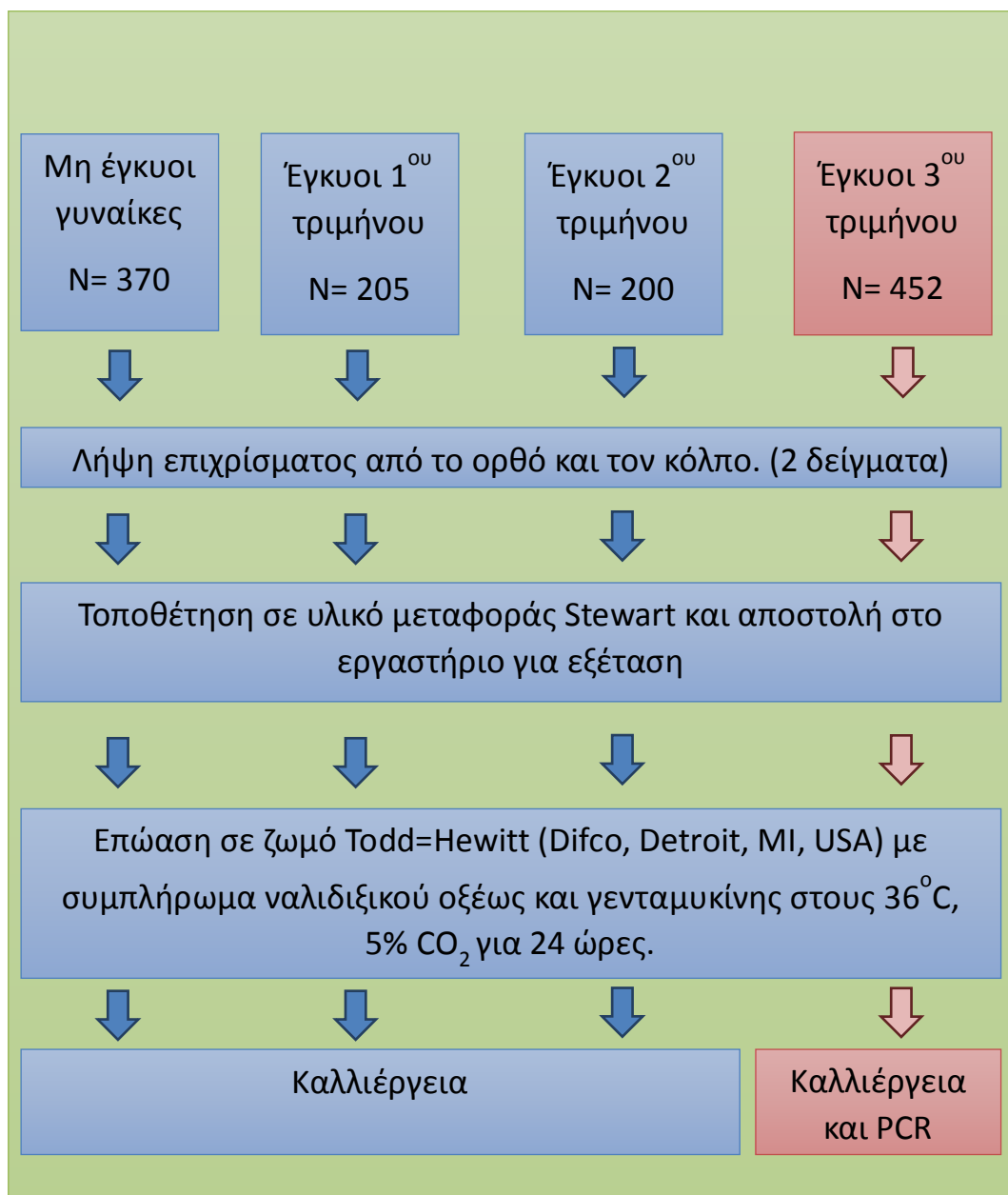
Τα ζεύγη δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τις 452 έγκυες γυναίκες τρίτου τριμήνου (35-37^η εβδομάδα κύησης) ελέγχθηκαν επιπρόσθετα μέσω PCR με γονίδιο στόχο το cfb που κωδικοποιεί τον παράγοντα Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP).

Μετά την επώαση σε ζωμό Todd-Hewitt (Difco, Detroit, MI, USA), τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και το κατακρήμνισμα εκπλύθηκε με διάλυμα 1X PBS και επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA (10 mM Tris-HCL, 0,1 mM EDTA, pH 7.5). Το παραγόμενο διάλυμα υποβλήθηκε σε εξαγωγή DNA κατά το πρωτόκολλο του εμπορικού κιτ QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Valencia, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

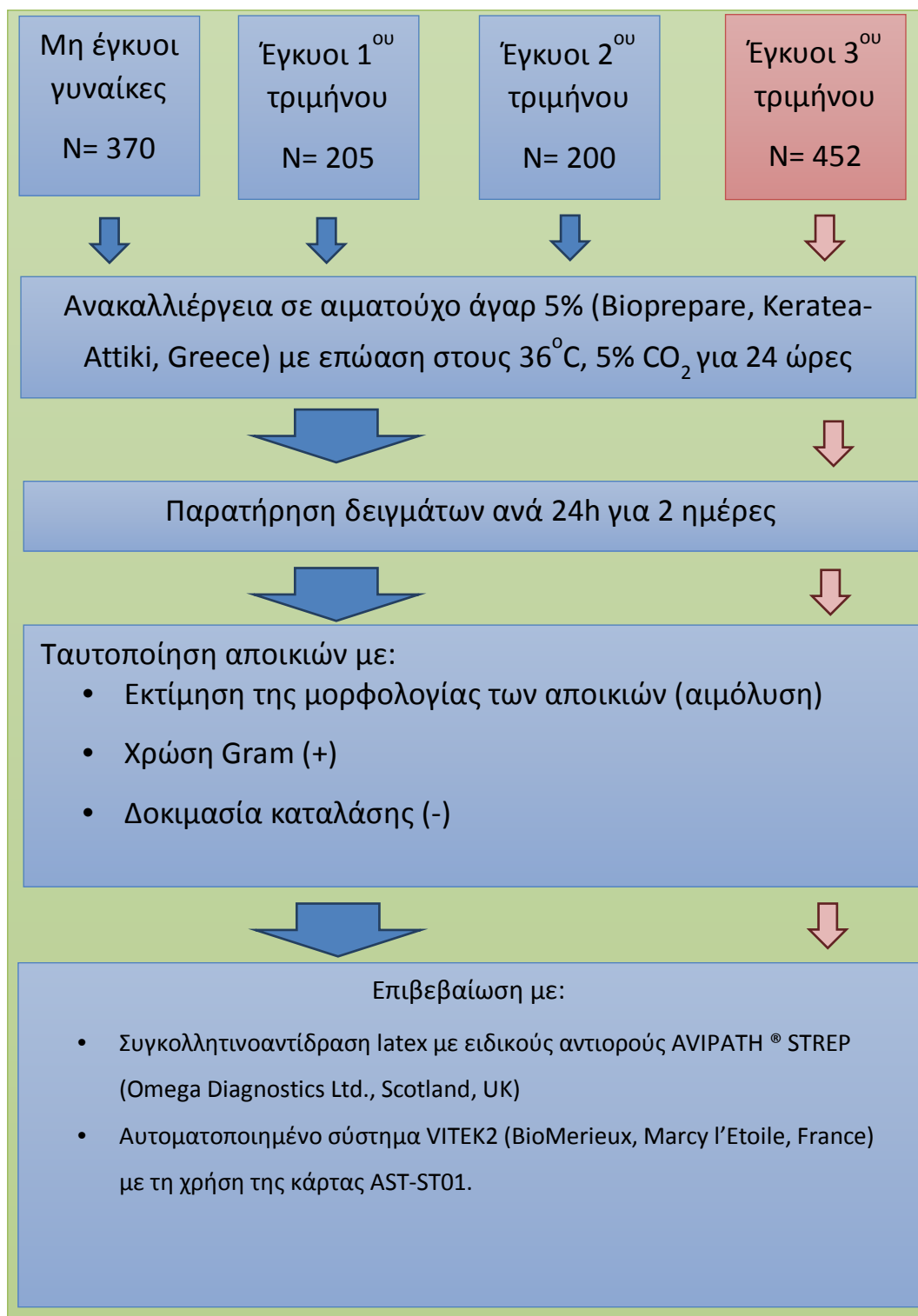
Χρησιμοποιήθηκαν 50 μ L του μείγματος [20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCL, 2,5 mM MgCl₂, 0,4 mM του κάθε δεσοξυνουκλεοτιδίου, 0,4 μ M κάθε εκκινητή και 1x U Platinum Taq polymerase (Invitrogen)] τα οποία προστέθηκαν σε 22 μ L του εκχυλίσματος DNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι Sag 59 και Sag 190. Η ενίσχυση του DNA επιτεύχθηκε με την παρέλευση 5 λεπτών στους 94°C, ακολουθούμενη από 45 κύκλους των 30 δευτερολέπτων στους 94°C, και 30 δευτερόλεπτα στους 72°C, με τη χρήση του GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA).

Τα προϊόντα της ενίσχυσης ανιχνεύθηκαν με ηλεκτροφόρηση με τη χρήση 10 μ L του ενισχυμένου δείγματος σε γέλη αгарόζης 2% με

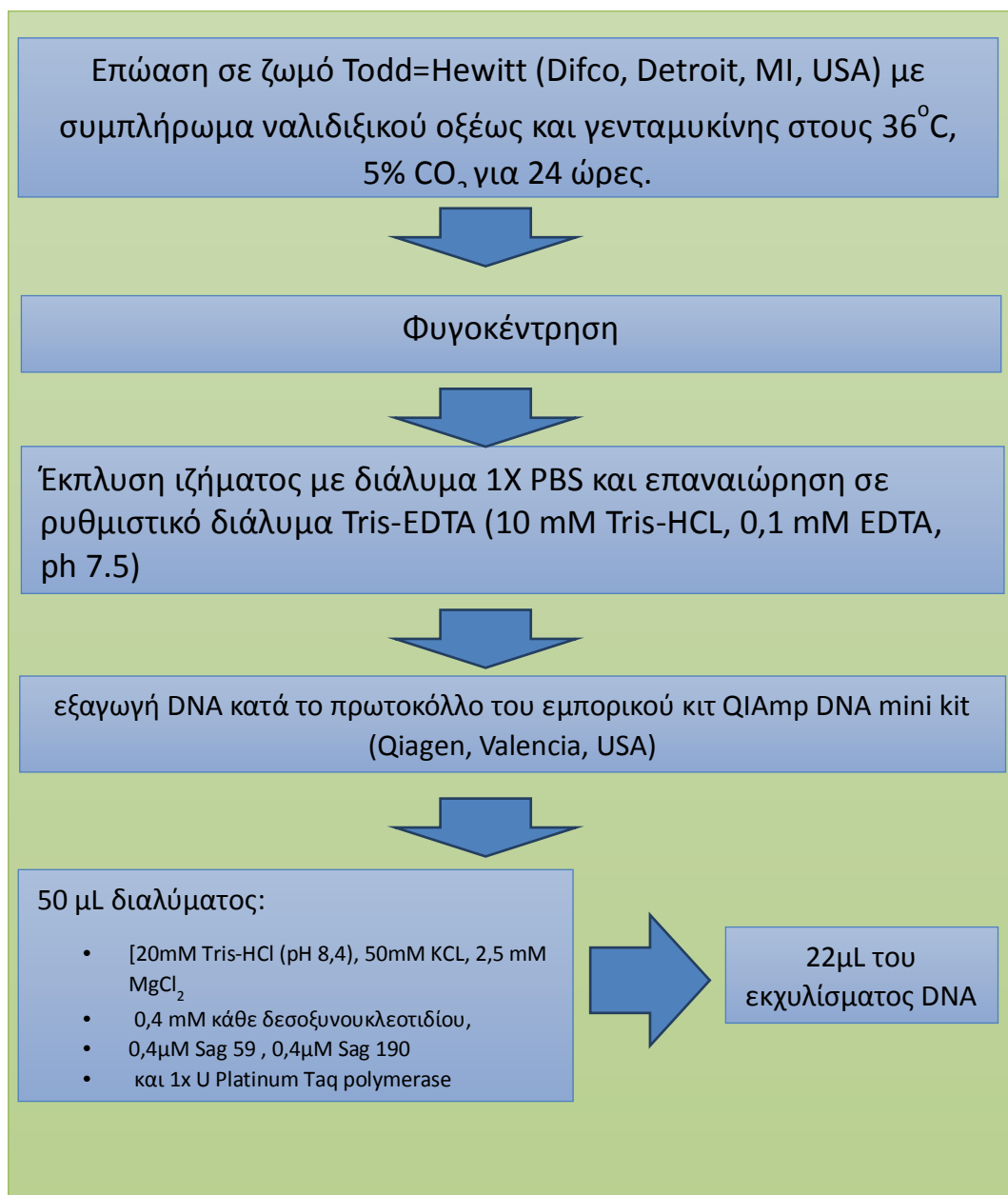
περιεκτικότητα 0,4mg/ml σε βρωμίδιο του εθιδίου. Δείγματα με ανίχνευση του αμπλικονίου 153 θεωρήθηκαν θετικά για παρουσία GBS.



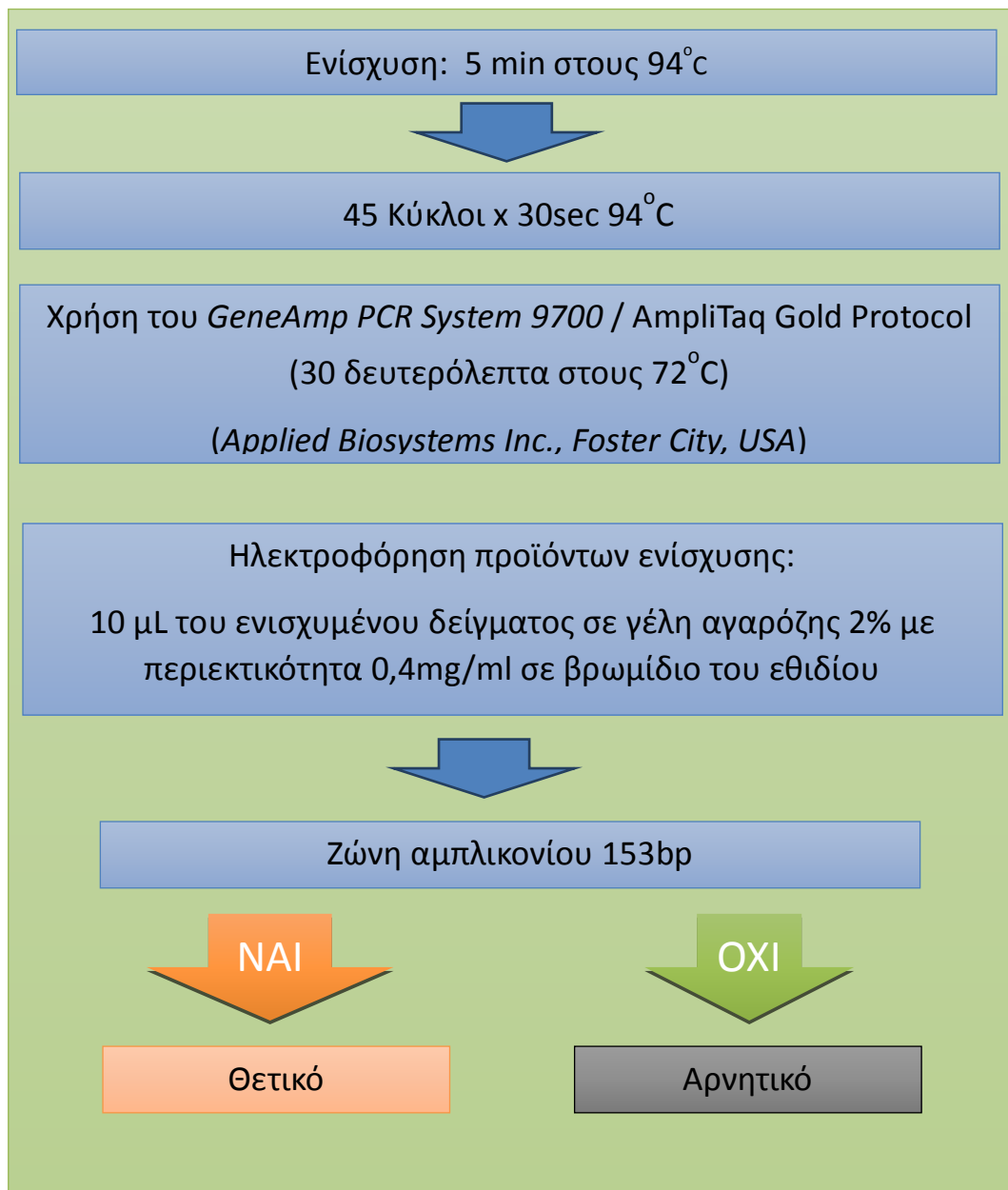
Εικόνα 15. Διαδικασία επεξεργασίας των δειγμάτων



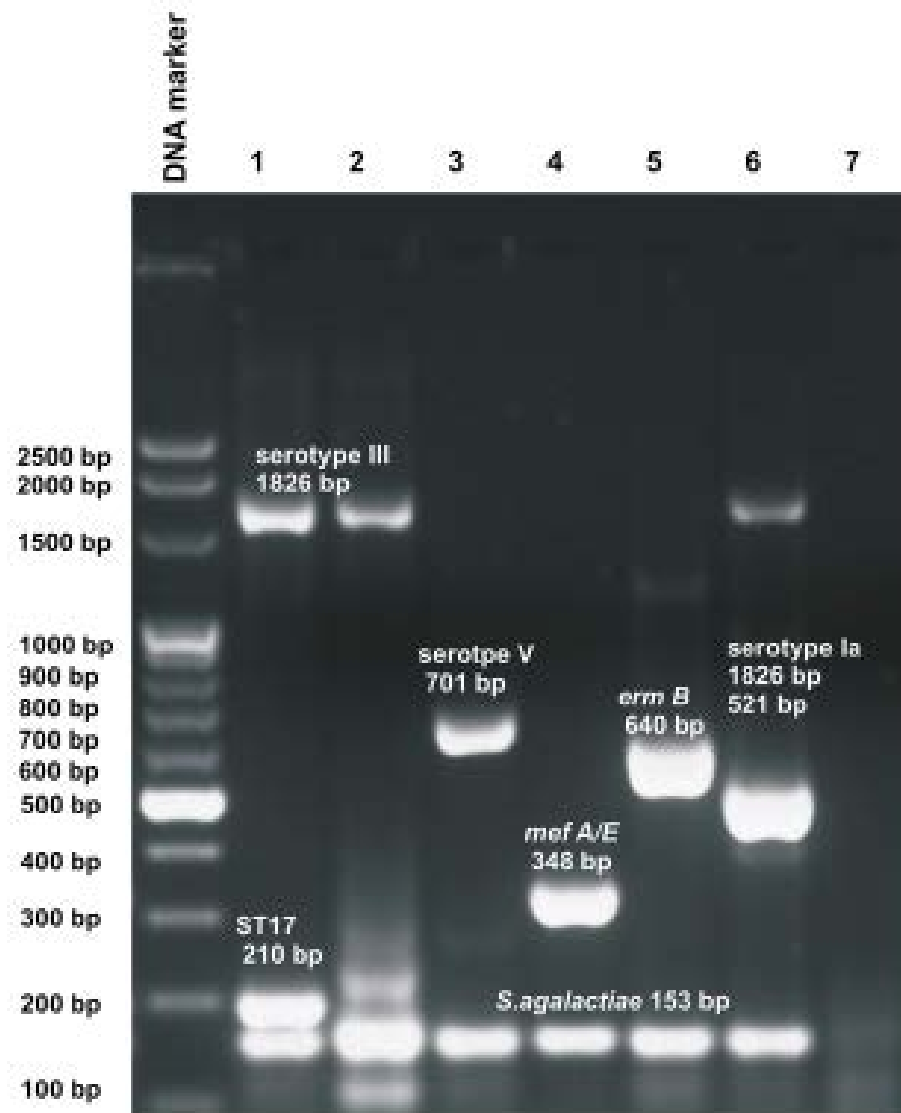
Εικόνα 16. Μεθοδολογία καλλιέργειας



Εικόνα 17. Μεθοδολογία PCR.



Εικόνα 18. Μεθοδολογία PCR (συνέχεια)



Εικόνα 19. Ζώνες ηλεκτροφόρησης. Αποτελέσματα με το αμπλικόνιο 153 θεωρήθηκαν θετικά.

Οι δύο ομάδες προσωπικού που έφεραν εις πέρας την καλλιέργεια και την PCR εργάστηκαν ανεξάρτητα χωρίς να τους γνωστοποιηθούν τα αποτελέσματα της άλλης μεθόδου. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με βάση τα αποτελέσματα της καλλιέργειας που θεωρείται η μέθοδος εκλογής (golden standard) για την ανίχνευση του GBS.

7.4 Στατιστική Ανάλυση. Μέθοδοι που εφαρμόσθηκαν

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πακέτο SPSS 22.0 (Chicago, IL, USA). Για τις περιγραφικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τα ενσωματωμένα στο πακέτο περιγραφικά στατιστικά εργαλεία (frequency analysis, cross tabulations).

Για την αναγνώριση στατιστικά σημαντικών δυσαναλογιών στον αποικισμό από GBS των τεσσάρων ομάδων των γυναικών που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε το Pearson's chi square test με εξαίρεση την ηλικία. Λόγω του μη παραμετροποιημένου εύρους ηλικιών η μεταβλητή της ηλικίας εισήχθη ως συνεχής μεταβλητή και πραγματοποιήθηκε ανάλυση διασποράς (ANOVA) για την ανάλυση των μέσων.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των ομάδων αλλά και μεταξύ PCR και καλλιέργειας μεταξύ των 452 εγκύων γυναικών τρίτου τριμήνου έγινε, αφενός μεν με μη παραμετρικά τεστ για τη σύγκριση αναλογιών και αφετέρου με την περιγραφική ανάλυση χρησιμοποιώντας το δείκτη συμφωνίας k (Cohen's kappa). Η μέτρηση της ασυμφωνίας με τα μη παραμετρικά τεστ

υποστηρίζεται από τη χρήση του δείκτη συμφωνίας k , δεδομένου ότι τα αποτελέσματα που συγκρίνονται, αφορούν ομάδες με διαφορετικούς πληθυσμούς (370 μη έγκυες, 200 έγκυες πρώτου τριμήνου, 205 δευτέρου τριμήνου και 452 τρίτου τριμήνου).

Σε περιπτώσεις σύγκρισης αναλογιών σε διαφορετικούς πληθυσμούς ο δείκτης συμφωνίας k παρουσιάζει ανθεκτικότερα αποτελέσματα, δεδομένου ότι συνυπολογίζει την παράμετρο της τυχαίας συμφωνίας μεταξύ των αναλογιών, λαμβάνοντας υπόψη πάντοτε το μέγεθος των πληθυσμών που μελετούνται.

Δεδομένου ότι η καλλιέργεια θεωρείται η ενδεδειγμένη μέθοδος ανίχνευσης του GBS, ορίστηκε ως το “*golden standard*” και ο υπολογισμός της ευαισθησίας και ειδικότητας καθώς και της αρνητικής και θετικής προγνωστικής αξίας της PCR έγιναν με βάση τα αποτελέσματα από την καλλιέργεια για τα ίδια δείγματα.

Αποτελέσματα και ανάλυση

Μελετήθηκαν συνολικά 1.227 έγκυοι και μη γυναίκες σε διάστημα 36 μηνών. Για κάθε γυναίκα που συμμετείχε στη μελέτη ελήφθησαν δύο κολπικά και δύο επιχρίσματα από το ορθό. Τα δείγματα από τις μη εγκύους γυναίκες καθώς και των εγκύων 1^{ου} και 2^{ου} τριμήνου εξετάστηκαν μόνο με τη μέθοδο της καλλιέργειας. Τα δείγματα των 452 εγκύων στο 3^ο τρίμηνο εξετάστηκαν επιπλέον με PCR με γονίδιο στόχο το cfb που κωδικοποιεί τον παράγοντα Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP).

Δεδομένου ότι η καλλιέργεια θεωρήθηκε η μέθοδος εκλογής (golden standard) και άρα η μέθοδος σύγκρισης για την εκτίμηση της διαγνωστικής αξίας της PCR, η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων έγινε με τις παρακάτω τεχνικές που παρουσιάζουν εξαιρετικά σημαντικά αυξημένα ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας σε σχέση με την απλή καλλιέργεια (117, 118):

- Συγκολλητινοαντίδραση latex με ειδικούς αντιορούς AVIPATH[®] STREP (Omega Diagnostics Ltd., Scotland, UK)
- Αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK2 (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) με τη χρήση της κάρτας AST-ST01.

8.1 Συνοπτική αποτύπωση των αποτελεσμάτων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Συνοπτικά αποτελέσματα της μελέτης.

Ομάδα / Επίχρισμα	Καλλιέργεια Μη έγκυος (n=370)	Καλλιέργεια 1^ο Τρίμηνο (n=205)	Καλλιέργεια 2^ο Τρίμηνο (n=200)	Καλλιέργεια 3^ο Τρίμηνο (n=452)	PCR 3^ο Τρίμηνο (n=452)
Κολπικό	49 (13.2 %)	27 (13.2 %)	30 (15.0 %)	83 (18.4 %)	102 (22.6 %)
Ορθό	53 (14.3 %)	28 (13.7 %)	33 (16.5 %)	82 (18.1 %)	96 (21.2 %)

Από τη συνοπτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται διαφορές στις συχνότητες μεταξύ των τριμήνων κύησης, μεταξύ των δειγμάτων από το ορθό και των δειγμάτων από τον κόλπο, καθώς μεταξύ της καλλιέργειας και της PCR. Για την εξαγωγή συμπερασμάτων, οι παράγοντες που αναλύθηκαν σε σχέση με τις συχνότητες αποικισμού είναι η ηλικία, το τρίμηνο της κύησης, η μέθοδος συλλογής του επιχρίσματος και η μέθοδος ανίχνευσης του GBS.

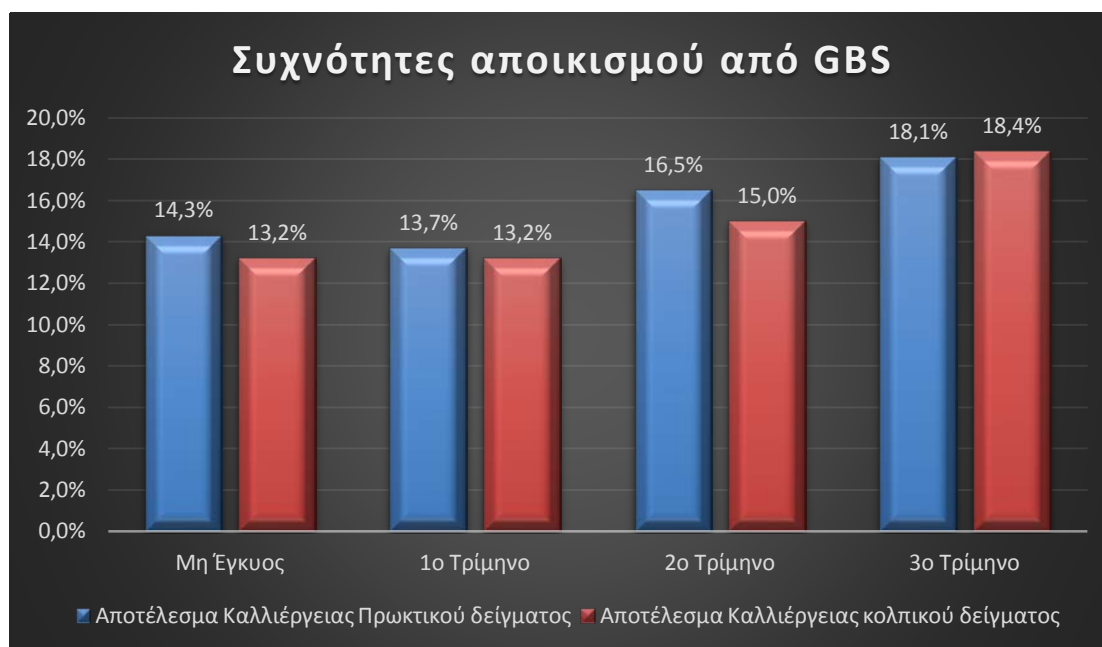
8.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 22.0 (Chicago, IL, USA).

8.2.1 Συχνότητα αποικισμού

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι συχνότητες θετικών για GBS επιχρισμάτων από τον κόλπο και το ορθό με τη μέθοδο της καλλιέργειας. Η υπολογιζόμενη μέση τιμή για τις εγκύους γυναίκες ανεξαρτήτως τριμήνου υπολογίζεται σε 16,33% και των μη εγκύων γυναικών 14,3%. Τα ποσοστά αυτά ενώ έρχονται σε συμφωνία με την πλειοψηφία των μελετών για τον επιπολασμό του μητρικού αποικισμού από GBS [6,15,19,32,43,46,134], παρατηρούνται σαφώς αυξημένα από προηγούμενες μελέτες στην Ελλάδα που εκτιμούσαν το ποσοστό αποικισμού σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά [128].

Διάγραμμα 1. Συχνότητες αποικισμού από GBS (Καλλιέργεια)



Η πρώτη παρατήρηση των συχνοτήτων οδηγεί σε αδρά συμπεράσματα όσον αφορά σε διαφορές στη συχνότητα των θετικών αποτελεσμάτων σε σχέση με την **πληθυσμιακή ομάδα** (ηλικία κύησης), καθώς και τον **τύπο του επιχρίσματος** που χρησιμοποιήθηκε. Οι δύο αυτές παράμετροι αναλύονται ακολούθως.

8.2.2 Συχνότητα αποικισμού σε εγκύους και μη καθώς και μεταξύ των τριμήνων κύησης.

Η ανάλυση της επίπτωσης του αποικισμού από GBS για τις 4 ομάδες γυναικών που μελετήθηκαν, έγινε με την εισαγωγή των μεγεθών ως μη διατάξιμες κατηγορικές μεταβλητές. Η στατιστική μέθοδος που

χρησιμοποιήθηκε είναι το χ^2 τεστ του Pearson ($\alpha=0,05$) (contingency 2x2 tables). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 12 και 13.

Πίνακας 12. Αποτελέσματα καλλιέργειας σε αριθμούς και συχνότητες ανά ομάδα.

			Ομάδα				Σύνολο
			Μη έγκυος	1ο τρίμην ο	2ο Τρίμη νο	3ο Τρίμη νο	
Αποτέλε σμα	Αρνητικ ό	Σύνολο	317	177	167	369	1030
		% εντός αποτελεσμάτων καλλιέργειας	30,8%	17,2%	16,2%	35,8%	100,0%
		% εντός Πληθυσμού	85,7%	86,3%	83,5%	81,6%	83,9%
	Θετικό	Σύνολο	53	28	33	83	197
		% εντός αποτελεσμάτων καλλιέργειας	26,9%	14,2%	16,8%	42,1%	100,0%
		% εντός Πληθυσμού	14,3%	13,7%	16,5%	18,4%	16,1%
Συνολικά		Σύνολο	370	205	200	452	1227
		% εντός αποτελεσμάτων καλλιέργειας	30,2%	16,7%	16,3%	36,8%	100,0%
		% εντός Πληθυσμού	100,0%	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0%

Πίνακας 13. Στατιστική ανάλυση σε πίνακες 2x2.

Έναντι 3 ^{ου} τριμήνου.	Αδρή διαφορά	χ^2	p	CI (95%)
Μη έγκυος	-5,2%	4.076	.0435	0,1438 – 10,1136
Πρώτο Τρίμηνο	-5,2%	2.727	.0987	-1.0585 - 10.7140
Δεύτερο Τρίμηνο	-3,4%	1.116	.0987	-3.1052 - 9.1505

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποδίδει οριακά σημαντική στατιστικά διαφορά στη συχνότητα αποικισμού γυναικών στο 3^ο τρίμηνο κύησης, σε σχέση με τις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας που δεν κυοφορούν με το 95% διάστημα εμπιστοσύνης να παραμένει άνω του μηδενός (**Lower CI 0,1438**) και την τιμή **p=0.043**. Στις περιπτώσεις, η μέθοδος του Pearson για την εκτίμηση της στατιστικής χ^2 αποτελεί αρκετά αυστηρό κριτήριο, λαμβάνοντας υπόψη μόνον τις αναμενόμενες συχνότητες στους πληθυσμούς που μελετώνται σε πίνακες 2x2. Όπως όμως θα παρουσιαστεί στη συνέχεια, η ηλικιακή κατανομή δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των ομάδων των γυναικών.

Σε κάθε περίπτωση και όπως γίνεται σαφές από το διάγραμμα 1, ανεξάρτητα από την ανάλυση σε πίνακες 2x2 για τις τέσσερις ομάδες γυναικών, είναι εμφανής η τάση **αύξησης της συχνότητας αποικισμού** η οποία συμβαδίζει με την παρέλευση των εβδομάδων κύησης με **κορύφωση στα δείγματα των 35-37 εβδομάδων**.

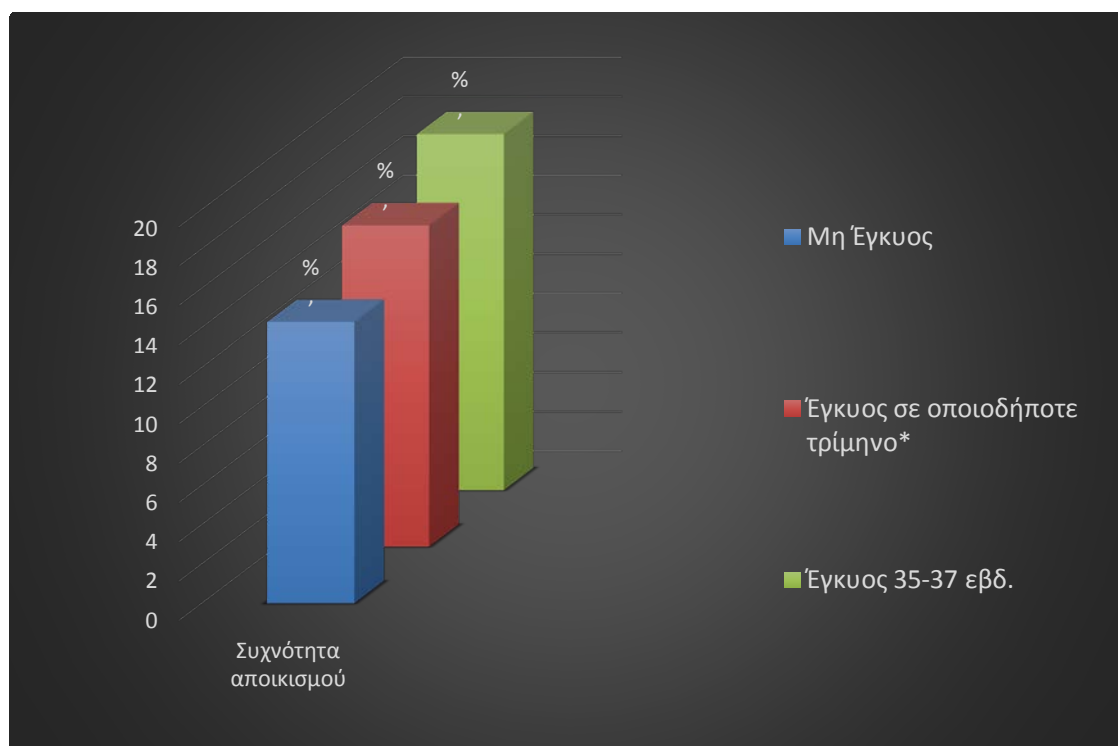
Δεδομένου ότι, σύμφωνα με τις τρέχουσες οδηγίες (CDC 2010), ο έλεγχος για αποικισμό από GBS είναι καθολικός στο 3^ο τρίμηνο της κύησης, η κλινική αξία μιας προσπάθειας ακριβούς σύγκρισης της συχνότητας αποικισμού μεταξύ γυναικών σε οποιοδήποτε τρίμηνο κύησης και ασυμπτωματικών μη εγκύων γυναικών είναι χαμηλή. Εντούτοις, το ανωτέρω αποτέλεσμα αποτελεί σημαντικό παράγοντα στήριξης αυτών των οδηγιών.

Πίνακας 14. Σύγκριση σε πίνακα 2x2 για τις ομάδες εγκύων (n=857) και μη εγκύων (n=370) που μελετήθηκαν

Αδρή Διαφορά	3.093 %
CI (95%)	-1.3907 to 7.1387
χ^2	1.896
Sig.	P = 0.1686

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των δύο ομάδων γυναικών (εγκύους και μη), δεν αποδίδουν στατιστική διαφορά στη συχνότητα αποικισμού από GBS. Συγκρίνοντας τις τιμές **p=0.168** και **p=0.043** όταν στη μελέτη συμπεριληφθούν **μόνον** οι γυναίκες στην 35-37^η ομάδα κύησης, γίνεται εμφανές ότι το χρονικό σημείο που θα επιλεγθεί για τη λήψη του επιχρίσματος θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν αργότερα.

Διάγραμμα 2. Συχνότητες αποικισμού (*weighted)

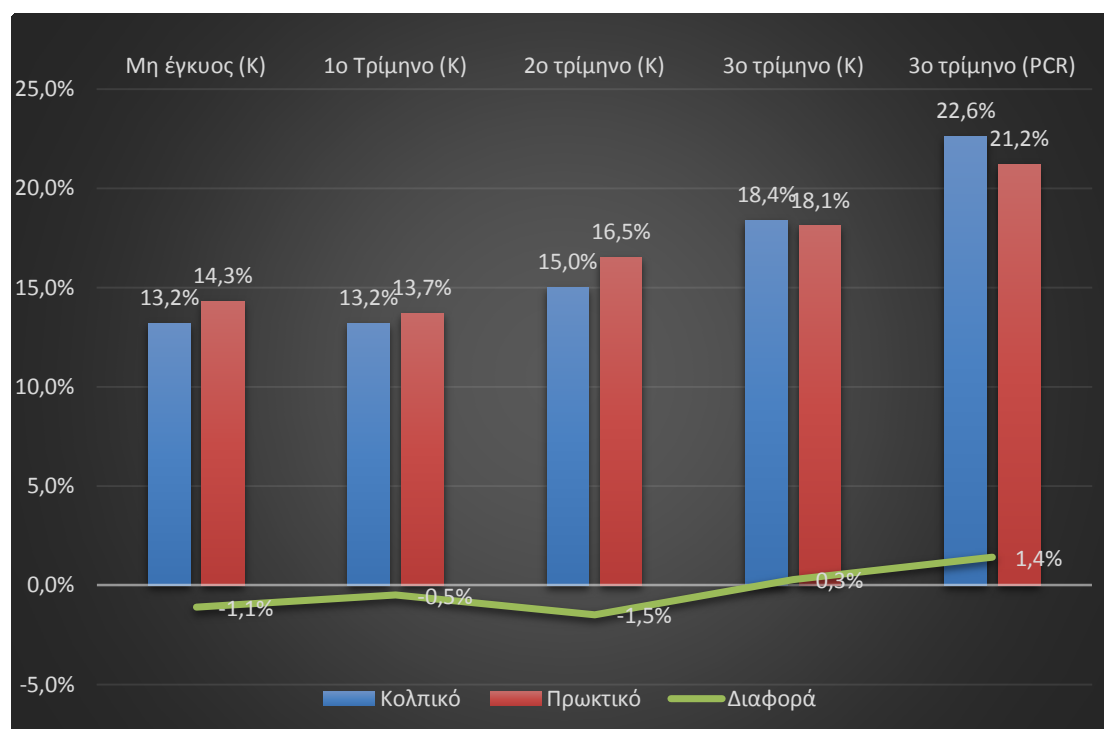


8.2.3 Σύγκριση μεθόδων συλλογής δειγμάτων.

Η χρησιμότητα της λήψης επιχρίσματος από το ορθό ή συνδυασμού πρωκτικού και κολπικού έχει συζητηθεί εκτενώς στην παλαιότερη και πρόσφατη βιβλιογραφία [16,20,36,37,66, 103,108,127,128]. Η μέθοδος που επιλέχθηκε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων στο σύνολο των δειγμάτων είναι η εκτίμηση του συντελεστή συμφωνίας kappa (Cohen's kappa). Για τη μέθοδο της PCR στις 452 γυναίκες στην 35-37 εβδομάδα κύησης

πραγματοποιήθηκε ανάλυση συχνοτήτων για την εκτίμηση της στατιστικής σημασίας στη διαφορά μεταξύ θετικών αποτελεσμάτων ανάμεσα στα κολπικά και πρωκτικά δείγματα με τη μέθοδο χ^2 (Campbell 2007, Richardson 2011). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.

Διάγραμμα 3: Συχνότητες θετικών αποτελεσμάτων και σύγκριση διαφοράς συχνοτήτων μεταξύ κολπικού και πρωκτικού επιχρίσματος.



Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, η συλλογή δειγμάτων από το ορθό παρουσιάζει ελαφρώς αυξημένες συχνότητες ανίχνευσης του GBS,

τάση η οποία όμως αντιστρέφεται κατά το τρίτο τρίμηνο κύησης και σε αυξημένο βαθμό στις περιπτώσεις που τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της PCR. Στις πρώτες τρεις κατηγορίες όλα τα κολπικά δείγματα που βρέθηκαν θετικά, επιβεβαιώθηκαν και από τα αντίστοιχα αποτελέσματα των δειγμάτων από το ορθό. Αντιστοίχως, στις γυναίκες 3^{ου} τριμήνου, όλα τα δείγματα από το ορθό που βρέθηκαν θετικά, επιβεβαιώθηκαν από τα αντίστοιχα κολπικά. Παρόλο που στη συντριπτική πλειοψηφία των μελετών η λήψη επιχρίσματος και από το ορθό προσδίδει μεγαλύτερη ακρίβεια στην ανίχνευση του GBS, με αποτέλεσμα οι τρέχουσες οδηγίες (CDC 2010) να συστήνουν τη λήψη συνδυασμού κολπικού και πρωκτικού επιχρίσματος, θεωρήθηκε χρήσιμη η σύντομη ανάλυση των διαφορών στις συχνότητες με τη μέθοδο της βαθμολόγησης και σύγκρισης των μέσων.

Για την αποφυγή αναγωγών στα θετικά αποτελέσματα που θα πρόσθετε συγχυτικούς παράγοντες υπεράνω στατιστικού υπολογισμού (διαφορετικός αριθμός συνολικών δειγμάτων καθώς και σημαντική συχνότητα αρνητικών αποτελεσμάτων σε όλες τις ομάδες), η κάθε ομάδα αναλύθηκε ξεχωριστά. Άλλωστε οι στατιστικές μέθοδοι σύγκρισης συχνοτήτων δεν εφαρμόζονται σε περιπτώσεις που οι τιμές των συχνοτήτων προς μελέτη τέμνουν τον άξονα Χ, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3. Τα αποτελέσματα της κάθε ομάδας μπήκαν σε υπολογιστικούς πίνακες και σε κάθε αποτέλεσμα αποδόθηκαν τιμές βαθμολογίας όπως στον πίνακα 15.

Πίνακας 15. Απόδοση βαθμολογιών (scores) στους συνδυασμούς αποτελεσμάτων.

	Κολπικό επίχρισμα (-)	Κολπικό επίχρισμα (+)
Πρωκτικό επίχρισμα (-)	2	-1
Πρωκτικό επίχρισμα (+)	1	2

Με την παραπάνω επιλογή των βαθμολογιών (scores) για κάθε αποτέλεσμα και την τομή του οριζόντιου άξονα για τη βαθμολογία των δοκιμασιών, που έδωσαν αρνητικό πρωκτικό και θετικό κολπικό αποτέλεσμα, διευκολύνεται ο έλεγχος της αρχικής υπόθεσης ότι υπάρχει διαφορά στα ποσοστά των δύο μεθόδων μεταξύ των ομάδων των γυναικών που μελετήθηκαν αλλά και των μεθόδων ανάλυσης των δειγμάτων PCR και καλλιέργειας.

Οι απόδοση των βαθμολογιών έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα.

Πίνακας 16. Υπολογισμός στατιστικών χαρακτηριστικών για την κατανομή των βαθμολογιών σε κάθε κατηγορία.

	<i>Μη έγκυες</i>	<i>1^ο τρίμηνο</i>	<i>2^ο τρίμηνο</i>	<i>3^ο τρίμηνο (καλλιέργεια)</i>	<i>3^ο τρίμηνο (PCR)</i>
<i>Μέσος</i>	1,9892	1,9951	1,9850	1,9934	1,9602
<i>N</i>	370	205	200	452	452
<i>Τυπική απόκλιση</i>	,10355	,06984	,12186	,14111	,34372

Για κάθε ομάδα πραγματοποιήθηκε ξεχωριστή δοκιμασία. Τα αποτελέσματα σύγκρισης των μέσων (t-tests ανεξάρτητων δειγμάτων) παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες 7 μέχρι 10 για κάθε κατηγορία. Τα συνοπτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 21.

Πίνακας 17. Αποτελέσματα σύγκρισης αποκλίσεων των δύο μεθόδων λήψης δείγματος μεταξύ της ομάδας των **μη εγκύων** και των ομάδων εγκύων γυναικών.

	1 ^ο τρίμηνο	2 ^ο τρίμηνο	3 ^ο τρίμηνο (καλλ.) 3 ^ο τρίμηνο (PCR)	
Αδρή διαφορά	0.006	-0.004	0.004	-0.029
Τυπική απόκλιση	0.008	0.010	0.009	0.019
Διάστημα εμπιστοσύνης (95%)	-0.0100 0.0218	-0.0232 0.0148	-0.0131 0.0215	-0.0654 0.0074
t-statistic	0.729	-0.434	0.477	-1.566
B.E.	573	568	820	820
α	p = 0.4663	p = 0.6646	p = 0.6335	p = 0.1178

Πίνακας 18. Αποτελέσματα σύγκρισης αποκλίσεων των δύο μεθόδων λήψης δείγματος μεταξύ της ομάδας εγκύων 1^{ου} τριμήνου και των λοιπών ομάδων εγκύων γυναικών.

	2 ^ο τρίμηνο		3 ^ο τρίμηνο (καλλ.)		3 ^ο τρίμηνο (PCR)	
Αδρή διαφορά	0.004		-0.004		-0.029	
Τυπική απόκλιση	0.010		0.010		0.024	
Διάστημα εμπιστοσύνης (95%)	-0.0162	0.0246	-0.0236	0.0151	-0.0766	0.0186
t-statistic	0.403		-0.428		-1.197	
B.E.	655		403		655	
α	p = 0.6869		p = 0.6690		p = 0.2318	

Πίνακας 19. Αποτελέσματα σύγκρισης αποκλίσεων των δύο μεθόδων λήψης δείγματος μεταξύ της ομάδας εγκύων 2^{ου} τριμήνου και των λοιπών ομάδων εγκύων γυναικών.

	3 ^ο τρίμηνο (καλλ.)	3 ^ο τρίμηνο (PCR)
Αδρή διαφορά	-0.008	0.025
Τυπική απόκλιση	0.012	0.025
Διάστημα εμπιστοσύνης (95%)	-0.0310 0.0142	-0.0243 0.0739
t-statistic	-0.730	0.993
B.E.	650	650
α	p = 0.4657	p = 0.3212

Πίνακας 20. Αποτελέσματα σύγκρισης αποκλίσεων των δύο μεθόδων λήψης δείγματος μεταξύ καλλιέργειας και PCR σε εγκύους 3^{ου} τριμήνου.

Αδρή διαφορά	0.033
Τυπική απόκλιση	0.017
Διάστημα εμπιστοσύνης (95%)	-0.0011 0.0675
t-statistic	1.900
B.E.	902
α	p = 0.0578

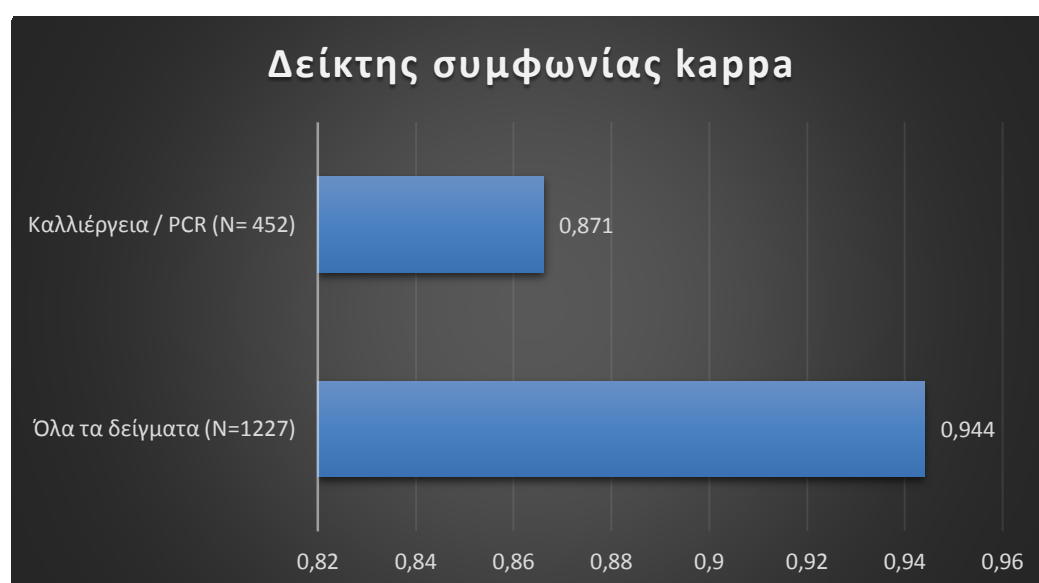
Πίνακας 21. Συνοπτικά αποτελέσματα σύγκρισης αποκλίσεων των δύο μεθόδων λήψης δείγματος.

	Ομάδα μη εγκύων	Ομάδα εγκύων 1 ^{ου} τριμήνου	Ομάδα εγκύων 2 ^{ου} τριμήνου	Ομάδα εγκύων 3 ^{ου} τριμήνου (cult.)
Ομάδα εγκύων 1 ^{ου} τριμήνου	p = 0.4663			
Ομάδα εγκύων 2 ^{ου} τριμήνου	p = 0.6646	p = 0.6690		
Ομάδα εγκύων 3 ^{ου} τριμήνου (Καλλιέργεια)	p = 0.6335	p = 0.6869	p = 0.4657	
Ομάδα εγκύων 3 ^{ου} τριμήνου (PCR)	p = 0.1178	p = 0.2318	p = 0.3212	p = 0.0578

Στον παραπάνω πίνακα φαίνεται σαφώς ότι, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική απόκλιση των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας για τις μη εγκύους και τις εγκύους, ανεξαρτήτως τριμήνου κυήσεως, σε σχέση με τον τύπο επιχρίσματος που χρησιμοποιήθηκε. Η χαμηλότερη συμφωνία φαίνεται να παρατηρείται μεταξύ των δειγμάτων πρωκτικού και κολπικού επιχρίσματος, όταν συγκρίνεται η μέθοδος της καλλιέργειας με την PCR, καθώς το 95% διάστημα εμπιστοσύνης βρίσκεται οριακά κάτω από το μηδέν

(χαμ. CI -0,0011 $p = 0.0578$). Για την ευκολότερη παρουσίαση του παραπάνω αποτελέσματος, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του δείκτη συμφωνίας kappa, αρχικά μεταξύ όλων των δειγμάτων και στη συνέχεια μόνο μεταξύ καλλιέργειας και PCR. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 4.

Διάγραμμα 4. Συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ κολπικών και πρωκτικών επιχρισμάτων συνολικά και μόνον μεταξύ καλλιέργειας και PCR.



Μολονότι η πτώση του δείκτη συμφωνίας kappa από ,944 σε ,871 δεν προκαλεί μετάβαση σε επίπεδα στατιστικά σημαντικής ασυμφωνίας (τουλάχιστον $< ,700$) γίνεται σαφές ότι, η μέθοδος της καλλιέργειας έχει σημαντικότερα επίπεδα συμφωνίας μεταξύ των δύο τύπων επιχρισμάτων. Σε αντίθεση, η μέθοδος της PCR παρουσιάζει απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων σε ποσοστό 1,4% γεγονός όμως που δεν προκαλεί στατιστικώς σημαντική διαφορά εντός των αποτελεσμάτων της ίδιας μεθόδου ($p = .6110$ CI 95% -3.9937 – 6.7847).

Παρόλο που το παραπάνω παρουσιάζει από πρώτη όψη αντίθεση με την κοινή παραδοχή ότι, για την πιο αξιόπιστη ανίχνευση του GBS θα πρέπει να λαμβάνεται δείγμα και από το ορθό, οι τυχόν διαφορές που προκύπτουν, μπορεί να οφείλονται σε τυχαίες μικροδιαφορές στην ηλικία, τον τρόπο και το χρόνο λήψης των δειγμάτων και των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν. Εξάλλου όπως θα αποδειχθεί παρακάτω, οι συχνότητες που μετρήθηκαν για τα πρωκτικά δείγματα, τελικώς ευνοούν τις στατιστικές της διαγνωστικής ακρίβειας της PCR.

8.2.4 Ηλικιακή κατανομή αποτελεσμάτων.

Η ανάλυση των στοιχείων σχετικά με την ηλικιακή κατανομή των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στους παρακάτω πίνακες και διαγράμματα.

Πίνακας 22 . Αναλυτική παρουσίαση ηλικιακής κατανομής του συνόλου των γυναικών που μελετήθηκαν.

Ηλικία	Μη έγκυος	1ο τρίμηνο	2ο τρίμηνο	3ο τρίμηνο	Επί συνόλου
22 Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	20 23,0%	19 21,8%	19 21,8%	29 33,3%	87 100,0%
23 Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	15 24,2%	12 19,4%	15 24,2%	20 32,3%	62 100,0%
24 Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	19 34,5%	11 20,0%	8 14,5%	17 30,9%	55 100,0%
25 Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	33 39,3%	10 11,9%	9 10,7%	32 38,1%	84 100,0%
26 Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	15 22,4%	11 16,4%	12 17,9%	29 43,3%	67 100,0%
27 Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	28 36,8%	12 15,8%	8 10,5%	28 36,8%	76 100,0%
28 Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	22 32,4%	10 14,7%	8 11,8%	28 41,2%	68 100,0%
29 Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	22 26,2%	16 19,0%	15 17,9%	31 36,9%	84 100,0%
30 Αριθμός	20	15	12	28	75

	% Εντός εύρους ηλικιών	26,7%	20,0%	16,0%	37,3%	100,0%
31	Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	16 23,5%	10 14,7%	15 22,1%	27 39,7%	68 100,0%
32	Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	21 29,2%	11 15,3%	15 20,8%	25 34,7%	72 100,0%
33	Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	20 27,4%	16 21,9%	7 9,6%	30 41,1%	73 100,0%
34	Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	22 29,7%	13 17,6%	14 18,9%	25 33,8%	74 100,0%
35	Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	22 38,6%	7 12,3%	11 19,3%	17 29,8%	57 100,0%
36	Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	28 35,9%	10 12,8%	10 12,8%	30 38,5%	78 100,0%
37	Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	16 23,9%	14 20,9%	9 13,4%	28 41,8%	67 100,0%
38	Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	31 38,8%	8 10,0%	13 16,3%	28 35,0%	80 100,0%
Σύνολα	Αριθμός % Εντός εύρους ηλικιών	370 30,2%	205 16,7%	200 16,3%	452 36,8%	1227 100,0%

Πίνακας 23. Αναλυτικά στοιχεία ηλικιακών κατανομών επί του συνόλου των γυναικών που μελετήθηκαν.

Επί συνόλου γυναικών				(t-test) Εντός συνόλου	
Ομάδα	Μέσος	N	Τυπ. απόκλιση	95% CI	p
Μή έγκυος	30,24	370	4,95566	29.7334 – 30.7466	.3325
1ο Τρίμηνο	29,61	205	4,90026	28.9352 – 30.2848	.2682
2ο Τρίμηνο	29,75	200	5,02906	29.0488 – 30.4512	.5000
3ο Τρίμηνο	30,06	452	4,84136	29.1655 – 30.0605	.0985
Επί Συνολ	29,99	1227	4,91618		

Πίνακας 24. Αναλυτικά στοιχεία ηλικιακών κατανομών επί των θετικών δειγμάτων.

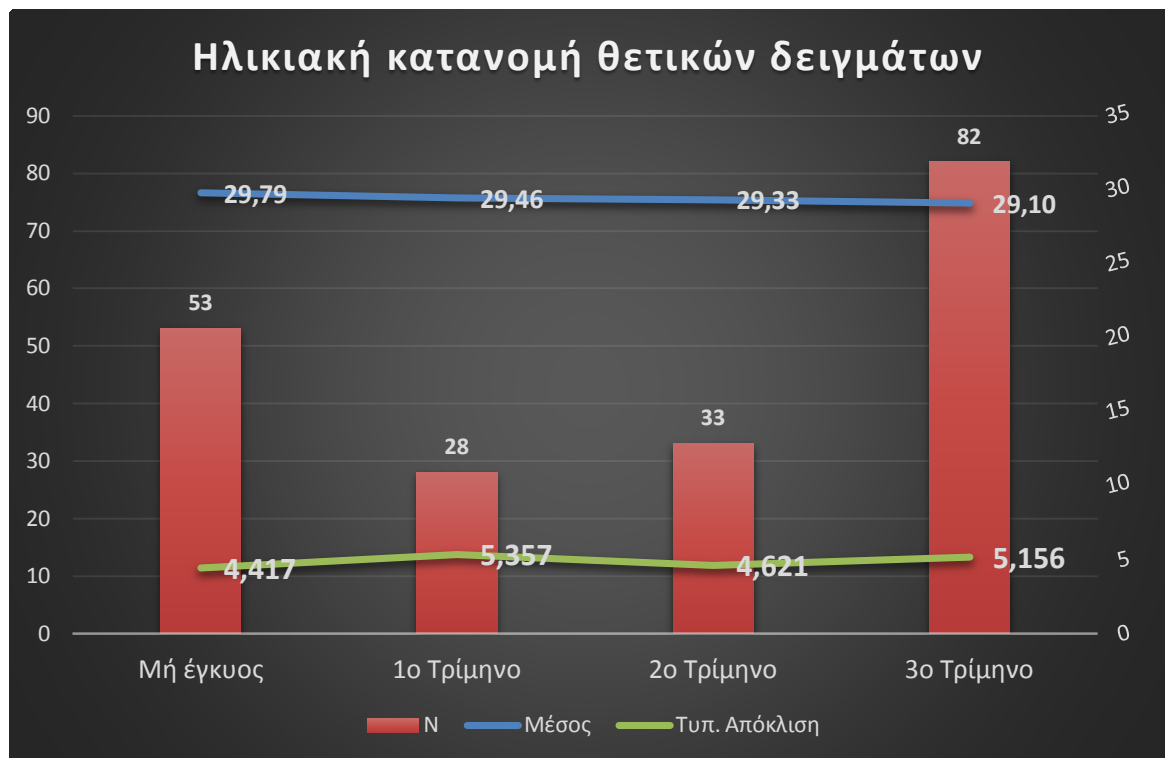
Επί συνόλου θετικών δειγμάτων				(t-test) Εντός των θετικών	
Ομάδα	Μέσος	N	Τυπ. απόκλιση	95% CI	p
Μή έγκυος	29,79	53	4,417	28.5725 – 31.0075	-
1ο Τρίμηνο	29,46	28	5,357	27.3828 – 31.5372	.7452
2ο Τρίμηνο	29.33	33	4.621	27.6915 – 30.9685	.5710
3ο Τρίμηνο	29,10	82	5,156	28.2000 – 30.4658	.4244
Επί συνόλου	29,79	196	5,066		

Διάγραμμα 5. Αποτύπωση ηλικιακών κατανομών στο σύνολο (sum) □ και σε θετικά αποτελέσματα □.



Για τη σύγκριση της ηλικιακής κατανομής των θετικών αποτελεσμάτων με την αντίστοιχη του συνόλου των γυναικών που μελετήθηκαν και για ακριβέστερα αποτελέσματα (προτιμότερη για μικρό εύρος τιμών) προτιμήθηκε η μη παραμετροποίηση της μεταβλητής της ηλικίας σε ομάδες. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε ανάλυση διασποράς (ANOVA) για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Τα αναλυτικά στοιχεία για τις μελετούμενες γυναίκες που εμφάνισαν αποικισμό από GBS παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.

Διάγραμμα 6. Αποτύπωση ηλικιακών κατανομών επί θετικών αποτελεσμάτων.



Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς έδειξαν ότι δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ηλικιακών ομάδων και τον αποικισμό από GBS, στο σύνολο των γυναικών που μελετήθηκαν ($p = .078$ $F_{stat} = 2.305$).

8.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων της μεθόδου PCR

Όπως αποτυπώνεται στους παρακάτω πίνακες, η μέθοδος της καλλιέργειας απέδωσε 83 θετικά (18,4%) και 369 αρνητικά (81,6%) επί του συνόλου των κολπικών δειγμάτων και 82 θετικά (18,1%) και 370 αρνητικά (81,9%) επί του συνόλου των δειγμάτων από το ορθό.

Η PCR απέδωσε αυξημένο ποσοστό θετικών αποτελεσμάτων σε σχέση με την καλλιέργεια 102 (22,6%) θετικά και 350 αρνητικά (77,4%) για τα κολπικά δείγματα και 96 (21,2%) θετικά και 356 (78,8%) αρνητικά στα δείγματα από το ορθό. Επιπλέον, όλα τα δείγματα που προέκυψαν αρνητικά μέσω καλλιέργειας, προέκυψαν αρνητικά και από την PCR.

Πίνακας 25. Αποτελέσματα καλλιέργειας και PCR για τα κολπικά δείγματα.

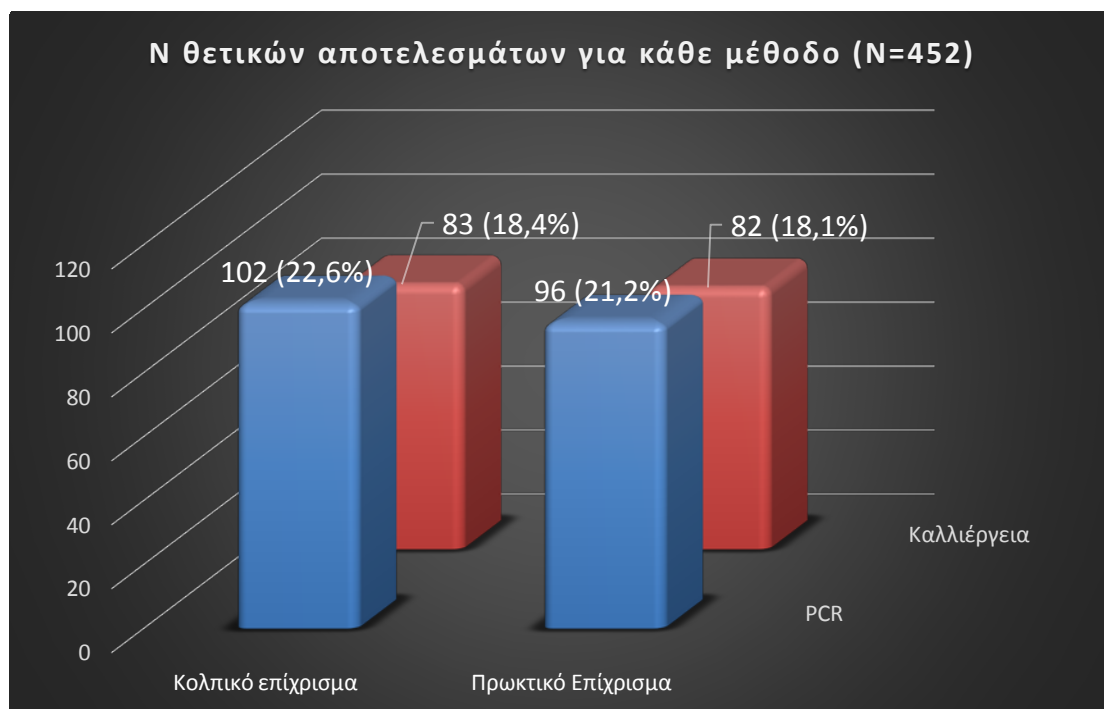
PCR	Καλλιέργεια		
	Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
Θετικό	83	19	102
Αρνητικό	0	350	350
Σύνολο	83	369	452

Πίνακας 26. Αποτελέσματα καλλιέργειας και PCR για τα πρωκτικά δείγματα.

PCR	Καλλιέργεια		
	Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
Θετικό	82	14	96
Αρνητικό	0	356	356
Σύνολο	82	370	452

Η PCR απέδωσε αυξημένο ποσοστό θετικών αποτελεσμάτων σε σχέση με την καλλιέργεια 102 (22,6%) θετικά και 350 αρνητικά (77,4%) για τα κολπικά δείγματα και 96 (21,2%) θετικά και 356 (78,8%) αρνητικά στα δείγματα από το ορθό. Επιπλέον, όλα τα δείγματα που προέκυψαν αρνητικά μέσω καλλιέργειας, προέκυψαν αρνητικά και από την PCR.

Διάγραμμα 7. Γραφική απεικόνιση των θετικών αποτελεσμάτων για τα δείγματα από τον κόλπο και το ορθό και για κάθε μέθοδο εξέτασης.



Τα στατιστικά μεγέθη ευαισθησίας, ειδικότητας θετικής και αρνητικής προγνωστικής αξίας καθώς και η διαγνωστική ακρίβεια υπολογίστηκαν για την PCR ορίζοντας την καλλιέργεια ως ενδεδειγμένη μέθοδο (golden standard).

Πίνακας 27. Αποτύπωση των στατιστικών μεγεθών για τη μέθοδο PCR.

	Πρωκτικό επίχρισμα		Κολπικό επίχρισμα	
<i>Στατιστική</i>	<i>Τιμή</i>	<i>95% CI</i>	<i>Τιμή</i>	<i>95% CI</i>
<i>Ευαισθησία</i>	100.00%	95.60% -- 100.00%	100.00%	95.65% – 100.00%
<i>Ειδικότητα</i>	96.74 %	94.37% – 98.30%	94.85 %	92.08% – 96.87%
<i>Θετικός λόγος πιθανοφάνειας</i>	30.67	17.58 – 53.50	19.42	12.53 – 30.09
<i>Αρνητικός λόγος πιθανοφάνειας</i>	0.00		0.00	
<i>Επίπτωση νόσου</i>	18.22%	14.76% – 22.11%	18.36%	14.90% – 22.25%
<i>Θετική προγνωστική αξία</i>	87.23%	79.66% – 92.26%	81.37%	73.82% – 87.13%
<i>Αρνητική προγνωστική αξία</i>	100.00 %		100.00 %	
<i>Διαγνωστική ακρίβεια</i>	97.33%	95.39% – 98.61%	95.80%	93.51% – 97.45%

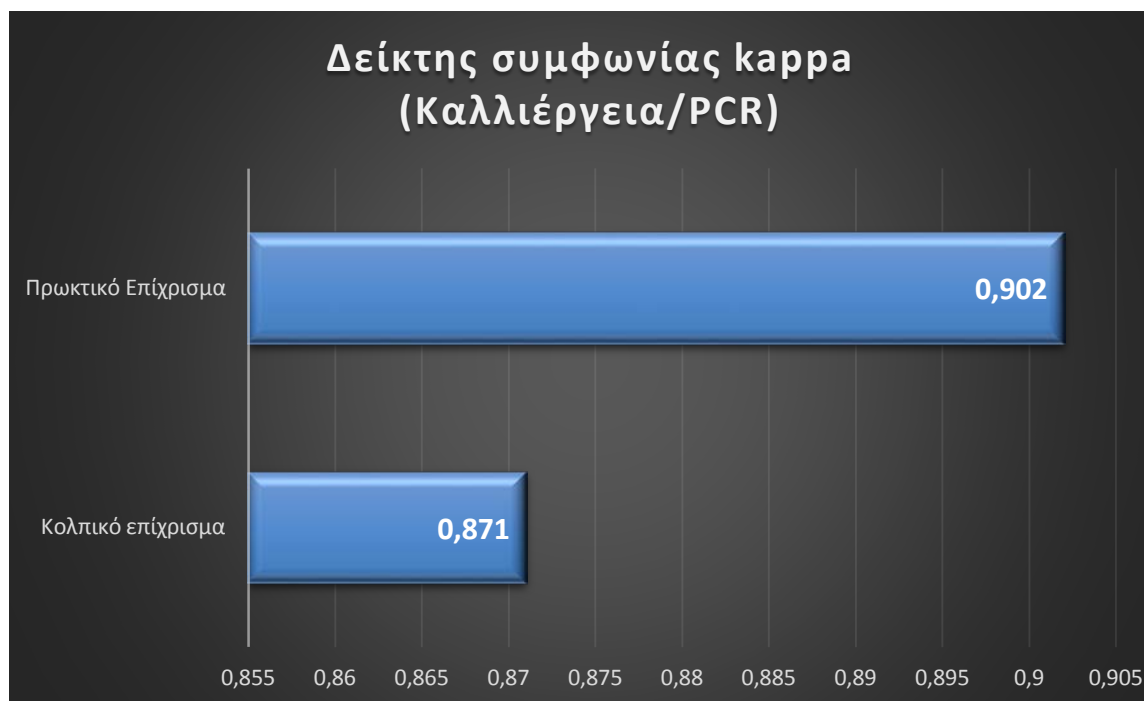
Τα υψηλά επίπεδα συμφωνίας με την ενδεδειγμένη μέθοδο της καλλιέργειας προσδίδουν στην PCR εξαιρετικά διαγνωστικά χαρακτηριστικά,

αποδίδοντας ευαισθησία 100% (95% CI: 95.65% -- 100.00% για τα κολπικά δείγματα και 95,60% -- 100.00% αντίστοιχα για τα δείγματα από το ορθό). Η ειδικότητα ανέρχεται σε 96,74 (95% CI: 94.37% -- 98.30%) για τα δείγματα από το ορθό και 94,85 (95% CI: 92.08% -- 96.87%) για τα κολπικά δείγματα αντίστοιχα.

Η αρνητική προγνωστική αξία υπολογίζεται στο 100.00% ανεξαρτήτως τύπου επιχρίσματος και η θετική προγνωστική αξία στο 87.23% (95% CI: 79,66% -- 92,26%) για τα δείγματα από το ορθό και 81,37 (95% CI: 73,82% -- 87,13%) για τα κολπικά δείγματα αντίστοιχα.

Δεδομένου του τρόπου επιλογής του υπό μελέτη πληθυσμού καθώς και ότι οι μέθοδοι χ^2 στατιστικής ανάλυσης αποδίδουν εκτιμήσεις συγκρίνοντας μόνον τις εμφανιζόμενες συχνότητες με τις αναμενόμενες από το συνολικό δείγμα, για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας και της PCR, επιλέχθηκε η χρήση της ανάλυσης του δείκτη συμφωνίας kappa (Cohen's kappa). Η επιλογή έγινε με σκοπό να αποκλειστούν περιπτώσεις τυχαίας συμφωνίας μεταξύ των δειγμάτων. Ο υπολογισμός και η γραφική απεικόνιση του δείκτη συμφωνίας φαίνονται στο διάγραμμα 8.

Διάγραμμα 8. Τιμές του δείκτη συμφωνίας k για τα επιχρίσματα από τον κόλπο και το ορθό αντίστοιχα.



Τα ποσοστά συμφωνίας μεταξύ των μεθόδων είναι εξαιρετικά υψηλά, λαμβάνοντας υπόψη ότι η καλλιέργεια έδωσε σχεδόν όμοια θετικά αποτελέσματα για τα δείγματα από τον κόλπο ($n=83$) και το ορθό ($n=82$). Η PCR αντιθέτως παρουσίασε ελαφρώς μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των κολπικών δειγμάτων ($n=102$) και των δειγμάτων που ελήφθησαν από το ορθό ($n=96$). Όπως φαίνεται όμως από το διάγραμμα 6.9, η διαφορά αυτή απέχει αρκετά από το να χαρακτηριστεί στατιστικά σημαντική ($p=0.611$ 95%CI -

3.9937 – 6.7847). Σε αυτό συμβάλλει και το γεγονός ότι, το σύνολο των αρνητικών πρωκτικών δειγμάτων επικαλύφθηκαν πλήρως από τα αρνητικά κολπικά δείγματα (Πιν. 16, 17).

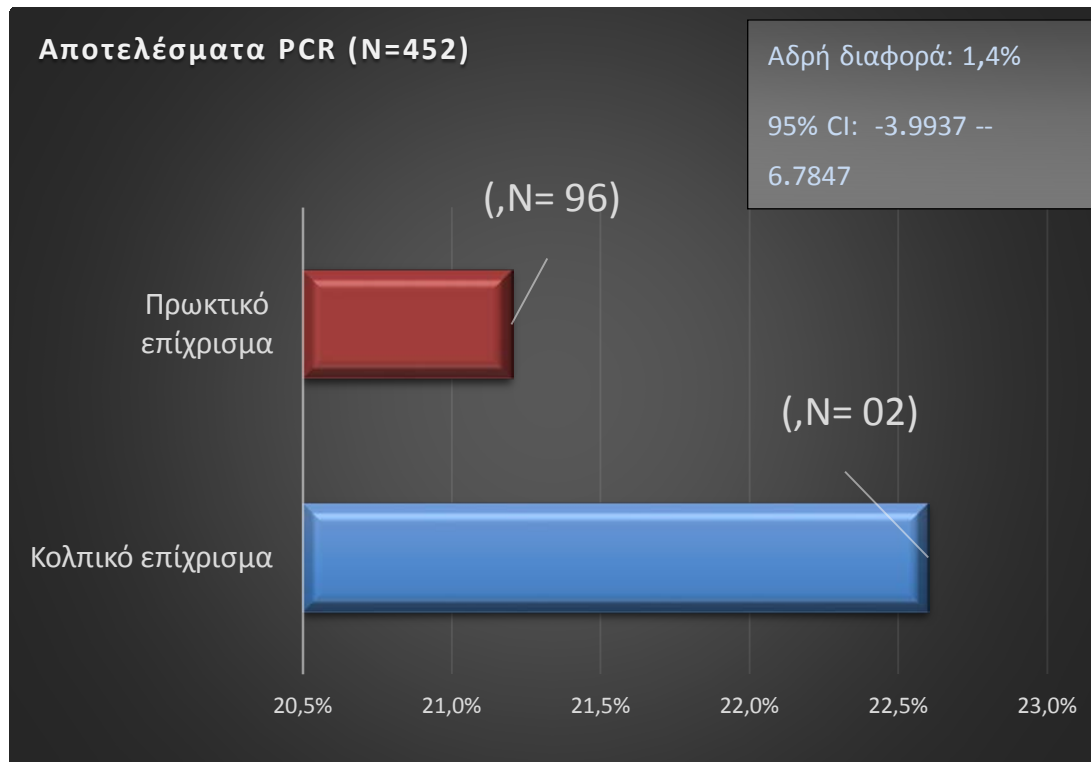
Πίνακας 28. Ανάλυση αποτελεσμάτων καλλιέργειας σε εγκύους 3^{ου} τριμήνου.

Πρωκτικό				
		Αρνητικό	Θετικό	Σύνολο
Κολπικό	Αρνητικό	369	0	369
	Θετικό	1	82	83
	Σύνολο	370	82	452

Πίνακας 29. Ανάλυση αποτελεσμάτων καλλιέργειας σε εγκύους 3^{ου} τριμήνου.

Πρωκτικό				
		Αρνητικό	Θετικό	Σύνολο
Κολπικό	Αρνητικό	348	0	348
	Θετικό	8	96	102
	Σύνολο	356	96	452

Διάγραμμα 9. Απεικόνιση της διαφοράς στα θετικά αποτελέσματα της PCR μεταξύ των δειγμάτων που ελήφθησαν από το ορθό και τον κόλπο



Συζήτηση

Η ανίχνευση του αποικισμού από GBS αποτελεί κρίσιμο τομέα των εργαστηριακών ελέγχων διαλογής, για τον προσδιορισμό των εγκύων που πρέπει να λάβουν χημειοπροφύλαξη κατά τον τοκετό. Η αρνητική προγνωστική αξία, που για την PCR υπολογίζεται σε 100%, αποτελεί την κρισιμότερη παράμετρο για τους ελέγχους διαλογής. Το γεγονός αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό, διότι μια 100% ευαίσθητη μέθοδος διαλογής αποκλείει τις περιπτώσεις ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων και άρα αποτελεί **οριστική ένδειξη**, για το σε ποιες εγκύους δεν είναι αναγκαία η χορήγηση χημειοπροφύλαξης.

Αντιθέτως, και με τις δύο μεθόδους συλλογής των δειγμάτων η PCR απέδωσε μεγαλύτερο αριθμό θετικών αποτελεσμάτων, 102 θετικών κολπικών και 96 θετικών πρωκτικών δειγμάτων έναντι 83 και 82 αντίστοιχα από την καλλιέργεια, γεγονός που οδηγεί σε υπολογισμό της θετικής προγνωστικής αξίας σε 87,23% (95% CI: 79,66% -- 92,26%) για δείγματα που συλλέχθηκαν από τον πρωκτό και 81,23% (95% CI: 73,82% -- 87,13%) για τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τον κόλπο.

Όσο η παραδοσιακή καλλιέργεια αποτελεί τη μέθοδο εκλογής και με βάση τα αποτελέσματα της υπολογίζονται η θετική και αρνητική προγνωστική αξία των νεότερων μεθόδων, μοιραία θα προκύπτουν ερωτηματικά σχετικά με το ποσοστό των περιπτώσεων που η καλλιέργεια αποτυγχάνει να ανιχνεύσει τον αποικισμό από GBS. Ο τρόπος και ο χρόνος συλλογής των δειγμάτων, ο βαθμός του αποικισμού και τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν σε

παλαιότερες μελέτες, ενδεχομένως να επηρεάζουν τα αποτελέσματα. Αυτό έχει σαν συνέπεια περιπτώσεις αποικισμού που θεωρήθηκαν διαλείπουσες ή παροδικές, να ήταν στην πραγματικότητα συνεχείς, με μόνη μεταβολή τις παραμέτρους των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τη συλλογή και την επώαση των δειγμάτων ή το βαθμό του αποικισμού.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης η μέθοδος της PCR παρουσίασε μεγαλύτερη ασυμφωνία μεταξύ των δειγμάτων που ελήφθησαν από το ορθό και εκείνων που ελήφθησαν από τον κόλπο, **1,4%** για την PCR έναντι **0,3%** για την καλλιέργεια (Διάγραμμα 6.8) χωρίς όμως να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=.0578$ **95% CI: -0.0011 -- 0.0675**). Παράμετροι που δε μελετήθηκαν, όπως η μέθοδοι συλλογής και τα χρησιμοποιούμενα μέσα ενδέχεται να επηρεάζουν διαφορετικά τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας η τάση αντιστρέφεται για την καλλιέργεια, από **-0,5%** στο πρώτο τρίμηνο σε **0,3%** στο τρίτο τρίμηνο (Διάγραμμα 6.3). Το γεγονός αυτό οδηγεί στην υπόθεση μεταβολής της κατανομής του GBS, κατά τη διάρκεια της κύησης, από το ορθό προς τον κόλπο για της εγκύους που είναι αποικισμένες. Η παραπάνω διαφορά βέβαια, ακόμη και για τα δείγματα εντός των αποτελεσμάτων της PCR (1.4%), δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p= .611$ **95% CI: -3.9937 – 6.7847**). Σε αυτό φυσικά συμβάλλει το γεγονός ότι, στα αποτελέσματα και των δύο μεθόδων στις εγκύους του 3^{ου} τριμήνου τα αρνητικά δείγματα από το ορθό επικαλύφθηκαν πλήρως από εκείνα που είχαν ληφθεί από τον κόλπο.

Η μεγαλύτερη μείωση των θετικών αποτελεσμάτων για την PCR (n=8) έναντι της καλλιέργειας (n=1) αποδίδει στην πρώτη σημαντικότερο βαθμό διαγνωστικής ακρίβειας **97,33% (95%CI 95.39% – 98.61%)** για τα δείγματα του

ορθού, έναντι **95,80% (95% CI 93.51% – 97.45%)** για τα δείγματα του κόλπου. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι, εκτίμηση του βαθμού αποικισμού καθώς και παράγοντες της μικροβιακής χλωρίδας του ορθού και του κόλπου που ενδεχομένως να προκάλεσαν καταστολή της ανάπτυξης του GBS, δεν εκτιμήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Από τα παραπάνω όμως γίνεται σαφές ότι η σκοπιμότητα του ορισμού, εφόσον υπάρχει, ενός ποσοτικού ουδού ανίχνευσης του GBS για κάθε διαγνωστική μέθοδο θα ήταν εξαιρετικά χρήσιμη.

Δεδομένου ότι, στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται περιπτώσεις εμφάνισης νεογνικής νόσου από GBS μετά από αρνητική καλλιέργεια της μητέρας, η αυξημένη συχνότητα θετικών αποτελεσμάτων για την PCR μπορεί να σημαίνει αυξημένη ευαισθησία και άρα αποτελεσματικότερη ανίχνευση του GBS σε περιπτώσεις που η καλλιέργεια αποτυγχάνει. Το κέρδος αυτό είναι σαφώς υπολογίσιμο αφού ο χαμηλός βαθμός αποικισμού δε σημαίνει και χαμηλότερο κίνδυνο για την εμφάνιση νεογνικής νόσου από GBS. Σε κάθε περίπτωση και λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, εφόσον τα μέχρι σήμερα δεδομένα δεν παρέχουν επαρκείς πληροφορίες για την ακριβή περιγραφή της τάσης κατανομής πληθυσμών του GBS μεταξύ κόλπου και ορθού κατά τη διάρκεια της κύησης, η μέθοδος για την απόδοση των ακριβέστερων αποτελεσμάτων κρίνεται η ήδη συνιστώμενη (CDC 2010), που απαιτεί συλλογή συνδυασμού επιχρίσματος από τον κόλπο και το ορθό κατά την 35-37^η εβδομάδα κύησης. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την τάση αύξησης της συχνότητας των θετικών αποτελεσμάτων που συμβαδίζει με την πάροδο της ηλικίας της κύησης και κορυφώνεται στα δείγματα που ελήφθησαν μεταξύ 35^{ης} και 37^{ης} εβδομάδος.

Κατά συνέπεια, η προγνωστική αξία οποιουδήποτε διαγνωστικού ελέγχου βελτιώνεται όσο αργότερα κατά τη διάρκεια της κύησης πραγματοποιηθεί η λήψη του δείγματος, με ιδανικό χρονικό σημείο λίγες ώρες πριν τον τοκετό. Η μέθοδος της PCR, λόγω εξαιρετικά μικρής χρονικής διάρκειας που απαιτείται για τη λήψη αποτελεσμάτων, έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί σε δείγματα που συλλέγονται κατά την είσοδο της επίτοκου στο μαιευτήριο και άρα να μειώσει στο ελάχιστο τις περιπτώσεις: α) που η επίτοκος έχει άγνωστο ιστορικό αποικισμού από GBS β) πρόωρου τοκετού και γ) που η γυναίκα αποικίστηκε μετά τη δειγματοληψία. Η επώαση των δειγμάτων για 24 ώρες, που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, θεωρείται ότι, παρόλο που στερεί από την PCR το συγκριτικό αποτέλεσμα της ταχείας ανίχνευσης, αυξάνει την προγνωστική της αξία σε βαθμό συγκρίσιμο με την πραγματοποίησή της λίγες ώρες πριν τον τοκετό. Μπορούμε λοιπόν με ασφάλεια να υποθέσουμε ότι, τα αποτελέσματα δεν θα μεταβληθούν στατιστικώς σημαντικά, σε περίπτωση που θα παραληφθεί το στάδιο της επώασης.

Το αυξημένο κόστος της PCR έχει αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα στην εφαρμογή της σε ελέγχους διαλογής. Αρκετές μελέτες την έχουν χαρακτηρίσει ως μη συμφέρουσα οικονομικά από πλευράς εργαστηριακής υποδομής για μια μικρή βελτίωση των αποτελεσμάτων. Σε διευρυμένες μελέτες όμως στις οποίες έχει συνυπολογιστεί το κόστος των άμεσων και έμμεσων συνεπειών της νεογνικής νόσου από GBS, το κόστος της PCR σε σχέση με τα οφέλη ισορροπεί μακροχρόνια.

Αξίζει τέλος να αναφερθεί ότι με τη χρήση της μεθόδου της PCR, δεν είναι δυνατό να εκτιμηθεί η ευαισθησία του GBS σε αντιβιοτικά, πληροφορία χρήσιμη σε περιπτώσεις εγκύων που παρουσιάζουν αλλεργία στην

πενικιλίνη. Εντούτοις, στελέχη του GBS με επιβεβαιωμένη αντοχή στην πενικιλίνη την αμπικιλίνη ή την κεφαζολίνη δεν έχουν ακόμη αναφερθεί [135]. Επιπροσθέτως, υπάρχει ευρεία διαθεσιμότητα εναλλακτικών σκευασμάτων για γυναίκες με αλλεργία στην πενικιλίνη όπως η κεφουροξίμη, η σεφακλόρη και η κεφτριαξόνη [136]

Συμπεράσματα

Η συχνότητα αποικισμού εγκύων γυναικών και γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας από GBS που προέκυψε από τη μελέτη, τοποθετεί την ομάδα που εξετάστηκε στα κατώτατα υπολογιζόμενα όρια για τις χώρες της Ανατολικής Ευρώπης (19,7% 29,3%) και στα ανώτατα όρια των χωρών της Δυτικής Ευρώπης ενώ έρχεται σε συμφωνία με την πλέον πρόσφατη μελέτη (2017) για την συχνότητα αποικισμού σε παγκόσμιο επίπεδο (18% 95%CI: 17% -- 19%) [137,138]. Επιπροσθέτως, η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει την κοινή διαπίστωση στη διεθνή βιβλιογραφία ότι, η συχνότητα αποικισμού της μητέρας από GBS παρουσιάζει αυξητική τάση, που ακολουθεί την ηλικία της εγκυμοσύνης με κορύφωση τις τελευταίες ημέρες πριν τον τοκετό. Είναι σαφές από τα παραπάνω ότι, η συχνότητα εμφάνισης (18.1% -- 21,4%) παραμένει αμετάβλητη, το οποίο ουσιαστικά σημαίνει ότι μία στις πέντε εγκύους στην Ελλάδα θα είναι αποικισμένη από GBS κατά την 35^η-37^η εβδομάδα της κύησής της. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο GBS αποτελεί το κυρίαρχο αίτιο νεογνικής σήψης στο Δυτικό κόσμο, γίνεται ξεκάθαρη η αξία μιας μεθόδου που θα ανιχνεύει τον αποικισμό της μητέρας έγκαιρα και με ακρίβεια.

Η μέθοδος της καλλιέργειας αποτέλεσε για πολλά χρόνια την ενδεδειγμένη μέθοδο για την ανίχνευση του GBS στις εγκύους με εξαιρετικά αποτελέσματα. Σε συνδυασμό με τις κατευθυντήριες οδηγίες για τον καθολικό έλεγχο των εγκύων 3^{ου} τριμήνου και τη χορήγηση χημειοπροφύλαξης κατά τον τοκετό, η επίπτωση της πρώιμης έναρξης νεογνικής νόσου από GBS μειώθηκε στις αρχές του 2000 σε 0,3 – 1 ανά 1000 γεννήσεις (CDC), όπου και παραμένει για αρκετά χρόνια. Δεδομένης της καθολικής αποτελεσματικότητας της αντιμικροβιακής προφυλακτικής αγωγής,

είναι βέβαιο ότι, νεότερες και αποτελεσματικότερες τεχνικές ανίχνευσης μπορεί να συνεισφέρουν σημαντικά στην περαιτέρω μείωση της συχνότητας της Π.Ε.Ν. από GBS.

Οι νεότερες μοριακές τεχνικές (PCR) αποδεικνύονται στη συντριπτική πλειοψηφία των μελετών παγκοσμίως, ακριβέστερες από την παραδοσιακή καλλιέργεια. Το αυξημένο κόστος, η έλλειψη κατάλληλων υποδομών και εκπαιδευμένου προσωπικού σε αρκετά εργαστήρια αποτελούν ορισμένους από τους παράγοντες που καθυστερούν την εφαρμογή τους ως μέθοδο εκλογής, για την ανίχνευση του GBS σήμερα. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη όμως ότι, σύμφωνα με το νόμο των “μειούμενων απολαβών”, η πτώση της συχνότητας ψευδών αποτελεσμάτων από τα μικρά ποσοστά της καλλιέργειας στα ουσιαστικά ανύπαρκτα των νεότερων μοριακών μεθόδων (αρνητική διαγνωστική αξία 100%) ήταν κάτι εξαιρετικά χρονοβόρο και δύσκολο και άρα για να εφαρμοστεί θα έχει δυσανάλογα υψηλό κόστος για την βελτίωση των ποσοστών που θα επιφέρει.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη η μέθοδος PCR με στόχο το γονίδιο *fbpA* παρουσίασε άριστη ευαισθησία (100%) εξαιρετικά υψηλή ειδικότητα (96,74%) σε συνδυασμό με ελάχιστο χρόνο εκτέλεσης. Μπορεί λοιπόν να αποτελέσει για εγκαταστάσεις με κατάλληλες υποδομές και εκπαιδευμένο προσωπικό αρχικά εναλλακτική, και στο μέλλον μέθοδο εκλογής για την ανίχνευση του GBS στις επίτοκες γυναίκες.

Περίληψεις

11.1 Περίληψη

Εισαγωγή: Ο Στρεπτόκοκκος της ομάδας Β, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα παθογόνα αίτια για την πρόκληση επιθετικής λοιμώδους νόσου σε νεογνά. Οι έλεγχοι διαλογής και η χορήγηση χημειοπροφύλαξης στη μητέρα έχουν μειώσει σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης της νεογνικής νόσου από GBS όμως η σταθεροποίηση της επίπτωσης υποθέτει ότι οι τρέχουσες μέθοδοι έχουν φτάσει στα όρια της ακρίβειάς τους. Κατά την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί ταχείες διαγνωστικές μέθοδοι οι οποίες σε σύγκριση με την παραδοσιακή μέθοδο της καλλιέργειας θα μπορούσαν σε συνδυασμό με την έγκαιρη χορήγηση χημειοπροφύλαξης να εξαλείψουν τη νεογνική νόσο από GBS.

Σκοπός: Σκοπός της μελέτης είναι η εκτίμηση της συχνότητας αποικισμού εγκύων γυναικών από GBS καθώς και η εκτίμηση της θετικής και αρνητικής προγνωστικής αξίας κατά την 35^η – 37^η εβδομάδα νεότερης τεχνικής ταχείας PCR με στόχο το γονίδιο *cfb* σε σχέση με την παραδοσιακή καλλιέργεια.

Υλικά και μέθοδοι: Μελετήθηκαν συνολικά 1227 γυναίκες, 370 μη έγκυοι, 205 έγκυοι 1^{ου} τριμήνου, 200 έγκυοι 2^{ου} τριμήνου και 452 3^{ου} τριμήνου. Για κάθε γυναίκα ελήφθησαν 2 δείγματα, ένα από το ορθό και ένα από τον κόλπο τα οποία εξετάστηκαν ξεχωριστά με τη μέθοδο της παραδοσιακής καλλιέργειας και επιβεβαιώθηκαν με δοκιμασία συγκολλητινοαντίδρασης και αυτοματοποιημένου συστήματος VITEK2. Τα δείγματα από τις 452 εγκύους 3^{ου} τριμήνου εξετάστηκαν εκτός από την παραδοσιακή καλλιέργεια και με τη μέθοδο PCR με στόχο το γονίδιο *cfb*. Ο υπολογισμός των στατιστικών χαρακτηριστικών της PCR έγινε λαμβάνοντας ως ενδεδειγμένη μέθοδο εκείνη

της παραδοσιακής καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 22.0.

Αποτελέσματα: Η συχνότητα αποικισμού των εγκύων και μη γυναικών που παρατηρήθηκε στη μελέτη συμφωνεί με τις τρέχουσες συστηματικές μελέτες για τις Χώρες του Δυτικού κόσμου και υπολογίστηκε σε 14,3% για τις μη εγκύους, 13,7% για τις εγκύους 1^{ου} τριμήνου, 16,5% για τις εγκύους 2^{ου} τριμήνου και 18,1% για τις εγκύους 3^{ου} τριμήνου. Μεταξύ των εγκύων δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά όσον αφορά το τρίμηνο κύησης και την ηλικία. Η λήψη δείγματος από τον πρωκτό απέδωσε ελαφρώς μεγαλύτερο αριθμό θετικών αποτελεσμάτων για την πλειοψηφία των δειγμάτων που εξετάστηκαν με εξαίρεση τις γυναίκες 3^{ου} τριμήνου, χωρίς όμως να παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική ασυμφωνία. Η μέθοδος cfbPCR χαρακτηρίστηκε από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα 100% (95% CI: 95.65% -- 100.00) και 96,74 (95% CI: 94.37% -- 98.30%) με θετική προγνωστική αξία 87.23% (95% CI: 79,66% -- 92,26%) και αρνητική προγνωστική αξία 100% (95% CI: 100%-).

Συμπεράσματα: Ο αποικισμός των εγκύων κατά τις τελευταίες εβδομάδες της κύησης από GBS όπως αποδεικνύεται από συστηματικές αλλά και την παρούσα μελέτη εμφανίζεται σε συχνότητες που αγγίζουν την μία στις πέντε εγκύους. Δεδομένου ότι ο GBS αποτελεί την κυριότερη αιτία νεογνικής σήψης στο Δυτικό κόσμο, είναι κρίσιμης σημασίας όλες οι επίτοκες να έχουν περάσει έναν ακριβή έλεγχο διαλογής ώστε να έχει εκτιμηθεί ο κίνδυνος μετάδοσης στο νεογνό και να χορηγηθεί έγκαιρα χημειοπροφύλαξη. Η μέθοδος της cfbPCR χαρακτηρίζεται από υψηλή διαγνωστική ακρίβεια, ταχεία λήψη και συνέπεια αποτελεσμάτων. Δεδομένου ότι η συχνότητα εμφάνισης νεογνικής νόσου κυμαίνεται σε αρκετά χαμηλά επίπεδα (0,3-1/1000 γεννήσεις),

περαιτέρω μείωση της επίπτωσης απαιτεί εξαιρετικά ακριβείς, συνεπείς και ταχείες διαγνωστικές μεθόδους. Το συμπέρασμα της μελέτης είναι ότι η cfbPCR έχει τα χαρακτηριστικά να αποτελέσει είτε εναλλακτική είτε μία εκ των νεότερων μεθόδων εκλογής για την ανίχνευση του GBS στις επίτοκες γυναίκες.

11.2 Summary

Introduction: Group B streptococcus (GBS) is an important cause of neonatal infections and one of the leading causes of aggressive infectious disease in neonates. Maternal colonization screening tests combined with administration of chemoprophylaxis have substantially reduced the incidence of Early Onset Disease (EOD) in neonates from GBS. However, although antimicrobial susceptibility of GBS is almost 100%, EOD incidence has reached a plateau which suggests that current screening tests have reached their efficiency limit. The last decade, a series of rapid and accurate diagnostic tests have been developed for the detection of GBS, the use of which as screening methods could eliminate EOD from GBS in neonates.

Aim of the study: Aim of the study is to evaluate the prevalence of maternal GBS colonization in each trimester and compare cfbPCR results to the ones from traditional culture.

Materials and methods: Vaginal and rectal samples collected from 857 pregnant (205 at 1st trimester, 200 at the 2nd trimester and 452 at the 3rd trimester) and 370 non-pregnant women were examined using traditional culture. Samples collected from the 452 pregnant women between the 35th and 37th week of gestation were also assayed by culture and PCR method

targeting the *cfb* gene. CfbPCR sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, were calculated using the culture as the golden standard. Statistical analysis was performed using IBM SPSS 22.0 statistical software package.

Results: GBS colonization frequency was calculated at 14,3% for non-pregnant women of reproductive age, 13,7% for pregnant women at the 1st trimester, 16,5% for women at the 2nd trimester, and 18,1% for pregnant women at the 3rd trimester respectively. The measured frequencies are with accordance with large systematic European and International studies. No statistically significant difference in GBS colonization was observed between different ages and gestation trimesters. Rectal samples yielded slightly higher positive rates for the majority of the groups apart from the large group of women pregnant at the 3rd trimester. No statistically significant discrepancy was observed between results from the two sampling methods though. *cfb*PCR presented high sensitivity and specificity values 100% (95% CI: 95.65% -- 100.00) and 96,74 (95% CI: 94.37% -- 98.30%) respectively and consequently high positive and negative predictive value 87.23% (95% CI: 79,66% -- 92,26%) and 100% (95% CI: 100%-) respectively.

Conclusions: Maternal GBS colonization during the last weeks of pregnancy as shown by large systematic European and International studies and confirmed by our results nears frequencies of 1 in 5 pregnant women. Taking in to account that GBS infection is one of the leading causes of neonatal sepsis in developed countries, the need for accurate and rapid screening methods becomes apparent. Our results suggest that *cfb*PCR is a rapid, highly specific and sensitive GBS colonization detection method. Due to the fact that GBS EOD incidence in neonates is relatively low (0.3 – 1/1000 births), further

reduction or elimination of EOD frequencies requires an extremely consistent and accurate screening method. Our conclusion is that cfbPCR appears to exhibit the key attributes to become a worthy alternative or perhaps the next gold standard method for antepartum and intrapartum GBS colonization detection.

IV ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 Loudon I. Deaths in childbed from the eighteenth century to 1935. *Med Hist.* 1986;30:1–41
- 2 Raju TN. Ignac Semmelweis and the etiology of fetal and neonatal sepsis. *J Perinatol.* 1999;19:307–310.
- 3 Noakes TD, Borresen J, Hew-Butler T, et al. Semmelweis and the aetiology of puerperal sepsis 160 years on: an historical review. *Epidemiol Infect.* 2008;136:1–9.
- 4 Pasteur ON THE GERM THEORY. *Science.* 1881;2:420–422.
- 5 Baxter AG. Louis Pasteur's beer of revenge. *Nat Rev Immunol.* 2001;1:229–232.
- 6 Breed, Robert S. The Present Status of Systematic Bacteriology. July 27, 2008.
- 7 Kilian M. Streptococcus and enterococcus. In: Greenwood D, Slack R, Peutherer J, Barer M, editors. *Medical Microbiology.* 17 ed. Elsevier; 2007. p. 178-93.
- 8 Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J Exp Med* 1933;47:571-95.
- 9 Lancefield RC, Hare R. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci. *J Exp Med.* 1935;61:335–349.
- 10 Lancefield RC, Freimer EH. Type-specific polysaccharide antigens of group B streptococci. *J Hyg (Lond)* 1966;64(2):191-203.
- 11 Fry RM. Fatal infections by hemolytic Streptococcus group B. *Lancet.* 1938;1:199–201.
- 12 Ferrieri P, Baker CJ, Hillier SL, et al. Diversity of surface protein expression in group B streptococcal colonizing & invasive isolates. *Indian J Med Res* 2004;119 Suppl:191-6.
- 13 Hood M, Janney A, Dameron G. Beta hemolytic streptococcus group B associated with problems of the perinatal period. *Am J Obstet Gynecol.* 1961;82:809–818

- 14 Eickhoff TC, Klein JO, Daly AK, et al. Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic streptococci. *N Engl J Med*. 1964;271:1221–1228.
- 15 Cieslewicz MJ, Kasper DL, Wang Y, et al. Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci. *J Biol Chem* 2001;276(1):139-46.
- 16 Slotved HC, Sauer S, Konradsen HB. False-negative results in typing of group B streptococci by the standard lancefield antigen extraction method. *J Clin Microbiol* 2002;40(5):1882-3.
- 17 Kong F, Gowan S, Martin D, et al. Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol* 2002;40(1):216-26.
- 18 Bergseng H, Rygg M, Bevanger L, et al. Invasive group B streptococcus (GBS) disease in Norway 1996-2006. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008.
- 19 Larsson C, Lindroth M, Nordin P, et al. Association between low concentrations of antibodies to protein alpha and Rib and invasive neonatal group B streptococcal infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006;91(6):F403-F408.
- 20 Wilkinson HW, Eagon RG. Type-specific antigens of group B type Ic streptococci. *Infect Immun* 1971;4(5):596-604.
- 21 Bevanger L. The Ibc proteins of group B streptococci: isolation of the alpha and beta antigens by immunosorbent chromatography and test for human serum antibodies against the two antigens. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1985;93(2):113-9.
- 22 Bevanger L, Kvam AI, Maeland JA. A *Streptococcus agalactiae* R protein analysed by polyclonal and monoclonal antibodies. *APMIS* 1995;103(10):731-6.
- 23 Smith BL, Flores A, Dechaine J, et al. Gene encoding the group B streptococcal protein R4, its presence in clinical reference laboratory isolates & R4 protein pepsin sensitivity. *Indian J Med Res* 2004;119

Suppl:213-20.

- 24 Maeland JA, Bevanger L, Lyng RV. Antigenic determinants of alpha-like proteins of *Streptococcus agalactiae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11(6):1035-9.
- 25 Wastfelt M, Stalhammar-Carlemalm M, Delisse AM, et al. Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure. *J Biol Chem* 1996;271(31):18892-7.
- 26 Michel JL, Madoff LC, Olson K, et al. Large, identical, tandem repeating units in the C protein alpha antigen gene, *bca*, of group B streptococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(21):10060-4.
- 27 Cheng Q, Carlson B, Pillai S, et al. Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci. *Infect Immun* 2001;69(4):2302-8
- 28 Madoff LC, Michel JL, Gong EW, et al. Protection of neonatal mice from group B streptococcal infection by maternal immunization with beta C protein. *Infect Immun* 1992;60(12):4989-94.
- 29 Brodeur BR, Boyer M, Charlebois I, et al. Identification of group B streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity. *Infect Immun* 2000;68(10):5610-8
- 30 Seepersaud R, Hanniffy SB, Mayne P, et al. Characterization of a novel leucine-rich repeat protein antigen from group B streptococci that elicits protective immunity. *Infect Immun* 2005;73(3):1671-83.
- 31 P. Glaser, C. Rusniok, C. Buchrieser, et al, eds (2002). "Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease." *Molecular Microbiology*, Volume 45, Issue 6, 1499–1513.
- 32 Håkon Bergseng, Aspects of Group B streptococcus (GBS) disease in the newborn Epidemiology, characterisation of invasive strains and evaluation of intrapartum screening, Doctoral theses at NTNU, 2009:45
- 33 Bryan Larsen, Gilles R. G. Monif, Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clinical Infectious Diseases J.* 2001;32:e69-77

- 34 Keith LG, England D, Bartizal F, Brown E, Fields C. Microbial flora of the external os of the premenopausal cervix. *Br J Vener Dis* 1972;48:51–6.
- 35 DeBoer JM, Plantema FHF. Ultrastructure of the in situ adherence of *Mobiluncus* to vaginal epithelial cells. *Can J Microbiol* 1988; 34:757–66.
- 36 Harris JW, Brown JH. The bacterial content of the vagina and uterus on the fifth day of the normal puerperium. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1928; 43:190–200.
- 37 Thadepalli H, Savage EW Jr, Salem FA. Cyclic changes in cervical microflora and their effect on infections following hysterectomy. *Gynecol Obstet Invest* 1982; 14:176–83.
- 38 Tashjian JH, Coulam CB, Washington JA. Vaginal flora in asymptomatic women. *Mayo Clin Proc* 1976; 51:557–61.
- 39 Romera et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome J.* 2014, 2:4
- 40 Baltimore RS. Late, late-onset infections in the nursery. *Yale J Biol Med* 1988;61(6):501-6.
- 41 Vergnano S, Sharland M, Kazembe P, et al. Neonatal sepsis: an international perspective. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90(3):F220-F224.
- 42 Bizzarro MJ, Raskind C, Baltimore RS, et al. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. *Pediatrics* 2005;116(3):595-602.
- 43 Melin P. Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Sep;17(9):1294-303. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03576.x. Epub 2011 Jun 14.
- 44 Tessin I, Trollfors B, Thiringer K. Incidence and etiology of neonatal septicaemia and meningitis in western Sweden 1975-1986. *Acta Paediatr Scand* 1990;79(11):1023-30.
- 45 Hufnagel M, Burger A, Bartelt S, et al. Secular trends in pediatric

bloodstream

infections over a 20-year period at a tertiary care hospital in Germany. *Eur J Pediatr* 2008;167(10):1149-59.

- 46 Jiang JH, Chiu NC, Huang FY, et al. Neonatal sepsis in the neonatal intensive care unit: characteristics of early versus late onset. *J Microbiol Immunol Infect* 2004;37(5):301-6.
- 47 Hufnagel M, Liese C, Loescher C, et al. Enterococcal colonization of infants in a neonatal intensive care unit: associated predictors, risk factors and seasonal patterns. *BMC Infect Dis* 2007;7:107.
- 48 Geres JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 1991, 18: 361-81.
- 49 Spellerberg B, Brandt C. Streptococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007: 412-29.
- 50 Larsen JW, Sever JL. Group B Streptococcus and pregnancy: a review. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:440-50.
- 51 Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* 2000;342:15-20.
- 52 Schrag SJ, Zell ER, Lynfield R, et al. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. *N Engl J Med* 2002;347:233-9.
- 53 Chu YW, Tse C, Tsang GK, So DK, Fung JT, Lo JY. Invasive group B Streptococcus isolates showing reduced susceptibility to penicillin in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1407-9.
- 54 Colbourn T, Asseburg C, Bojke L, et al. Prenatal screening and treatment strategies to prevent group B streptococcal and other bacterial infections in early infancy: cost-effectiveness and expected value of information analyses. *Health Technol Assess* 2007;11(29):1-226, iii.
- 55 Heath PT, Nik Yusoff NK, Baker CJ. Neonatal meningitis. *Arch Dis Child*

Fetal Neonatal Ed 2003;88(3):F173-F178.

- 56 Doctor BA, Newman N, Minich NM, et al. Clinical outcomes of neonatal meningitis in very-low birth-weight infants. *Clin Pediatr (Phila)* 2001;40(9):473-80.
- 57 Colbourn TE, Asseburg C, Bojke L, et al. Preventive strategies for group B streptococcal and other bacterial infections in early infancy: cost effectiveness and value of information analyses. *BMJ* 2007;335(7621):655.
- 58 Adriaanse AH, Lagendijk I, Muytjens HL, et al. Neonatal early onset group B streptococcal infection. A nine-year retrospective study in a tertiary care hospital. *J Perinat Med* 1996;24(5):531-8.
- 59 Beckmann C, Waggoner JD, Harris TO, et al. Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infect Immun* 2002;70(6):2869-76.
- 60 Wibawan IT, Lammler C, Pasaribu FH. Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells. *J Gen Microbiol* 1992;138(6):1237-42.
- 61 Tamura GS, Kuypers JM, Smith S, et al. Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infect Immun* 1994;62(6):2450-8.
- 62 Valentin-Weigand P, Chhatwal GS. Correlation of epithelial cell invasiveness of group B streptococci with clinical source of isolation. *Microb Pathog* 1995;19(2):83-91.
- 63 Platt MW. In vivo hemolytic activity of group B streptococcus is dependent on erythrocyte-bacteria contact and independent of a carrier molecule. *Curr Microbiol* 1995;31(1):5-9.
- 64 Liu GY, Doran KS, Lawrence T, et al. Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(40):14491-6.
- 65 Hill HR, Bohnsack JF, Morris EZ, et al. Group B streptococci inhibit the

- chemotactic activity of the fifth component of complement. *J Immunol* 1988;141(10):3551-6.
- 66 Hensler ME, Miyamoto S, Nizet V. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin directly impairs cardiomyocyte viability and function. *PLoS ONE* 2008;3(6):e2446.
 - 67 Henneke P, Berner R. SIRS and group-B streptococcal sepsis in newborns: pathogenesis and perspectives in adjunctive therapy. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11(5):333-42.
 - 68 Krueger M, Nauck MS, Sang S, et al. Cord blood levels of interleukin-6 and interleukin-8 for the immediate diagnosis of early-onset infection in premature infants. 176. *Biol Neonate* 2001;80(2):118-23.
 - 69 Boyer KM, Gotoff SP. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. *N Engl J Med.* 1986 Jun 26;314(26):1665-9.
 - 70 Anderson DC, Hughes BJ, Edwards MS, et al. Impaired chemotaxis by type III group B streptococci in neonatal sera: relationship to diminished concentration of specific anticapsular antibody and abnormalities of serum complement. *Pediatr Res* 1983;17(6):496-502.
 - 71 Baker CJ, Webb BJ, Kasper DL, et al. The role of complement and antibody in opsonophagocytosis of type II group B streptococci. *J Infect Dis* 1986;154(1):47-54.
 - 72 Cornacchione P, Scaringi L, Fettucciari K, et al. Group B streptococci persist inside macrophages. *Immunology* 1998;93(1):86-95.
 - 73 Edwards MS, Nizet V, Baker CJ. Group B streptococcal infections. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Baker CJ, editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 6 ed. Elsevier Saunders; 2006. p. 403-64
 - 74 Doran KS, Nizet V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Mol Microbiol*

2004;54(1):23-31.

- 75 Main EK, Slagle T. Prevention of early-onset invasive group B streptococcal disease in a private hospital setting: the superiority of culturebased protocols. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:1344-54.
- 76 Rouse DJ, Goldenberg RL, Cliver SP, Cutter GR, Mennemeyer ST, Fargason CA Jr. Strategies for the prevention of early-onset neonatal group B streptococcal sepsis: a decision analysis. *Obstet Gynecol* 1994;83:483-94.
- 77 Lewin EB, Amstey MS. Natural history of group B streptococcus colonization and its therapy during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1981;139(5):512-5.
- 78 Yow MD, Mason EO, Leeds LJ, et al. Ampicillin prevents intrapartum transmission of group B streptococcus. *JAMA* 1979;241(12):1245-7.
- 79 Valkenburg-van den Berg AW, Sprij AJ, Oostvogel PM, et al. Prevalence of colonisation with group B Streptococci in pregnant women of a multi-ethnic population in The Netherlands. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;124(2):178-83.
- 80 Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP. The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. *Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Obstet Gynecol* 1991;77(4):604-10.
- 81 Benitz WE, Gould JB, Druzin ML. Risk factors for early-onset group B streptococcal sepsis: estimation of odds ratios by critical literature review. *Pediatrics* 1999;103(6):e77.
- 82 Yancey MK, Duff P, Kubilis P, et al. Risk factors for neonatal sepsis. *Obstet Gynecol* 1996;87(2):188-94.
- 83 Schuchat A, aver-Robinson K, Plikaytis BD, et al. Multistate case-control study of maternal risk factors for neonatal group B streptococcal disease. The Active Surveillance Study Group. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13(7):623-9.
- 84 Boyer KM, Gadzala CA, Kelly PD, et al. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. *J Infect Dis*

1983;148(5):802-9.

- 85 *Hafner E, Sterniste W, Rosen A, et al. Group B streptococci during pregnancy: a comparison of two screening and treatment protocols. Am J Obstet Gynecol 1998;179:677-81.*
- 86 *Mecredy RL, Wiswell TE, Hume RF. Outcome of term gestation neonates whose mothers received intrapartum antibiotics for suspected chorioamnionitis. Am J Perinatal 1993;10(5):365-8.*
- 87 *Doran KS, Nizet V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. Mol Microbiol 2004;54(1):23-31.*
- 88 *Wood EG, Dillon HC, Jr. A prospective study of group B streptococcal bacteriuria in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1981;140:515-20.*
- 89 *Baker CJ, Edwards MS, Kasper DL. Role of antibody to native type III polysaccharide of group B Streptococcus in infant infection. Pediatrics 1981;68(4):544-9.*
- 90 *Baker CJ, Kasper DL. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. N Engl J Med 1976;294(14):753-6.*
- 91 *Faxelius G, Bremme K, Kvist-Christensen K, et al. Neonatal septicemia due to group B streptococci--perinatal risk factors*
- 92 *Carstensen H, Christensen KK, Grennert L, et al. Early-onset neonatal group B streptococcal septicaemia in siblings. J Infect 1988;17(3):201-4.*
- 93 *Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease Revised Guidelines from CDC, 2010*
- 94 *Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. MMWR Recomm Rep 2002;51(RR-11):1-22.*
- 95 *Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP, et al. Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. VIP Study Group. Am J Obstet Gynecol 1996;174:1354-60.*

- 96 Lin FYC, Brenner RA, Johnson YR, et al. The effectiveness of riskbased intrapartum chemoprophylaxis for the prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:1204-10.
- 97 Baker C. Group B streptococcal infections. In: Stevens DL, Kaplan EL, eds, *Streptococcal infections*. New York, NY: Oxford University Press, 2000; 222–237.
- 98 Heath PT, Schuchat A. Perinatal group B streptococcal disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21: 411–24. Epub 2007 Mar 2.
- 99 Phares CR, Lynfield R, Farley MM et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005. *JAMA* 2008; 299: 2056–2065.
- 100 Van Dyke MK, Phares CR, Lynfield R et al. Evaluation of universal antenatal screening for group B streptococcus. *N Engl J Med* 2009; 360: 2626–2636.
- 101 Superior Health Council. Guidelines from the Belgian Health Council, 2003 (SHC 7721): prevention of perinatal group B streptococcal infections. Brussels, Belgium: Service Public Federal Sante' publique, Se'curite' de la Chaîne alimentaire et Environnement, 2003
- 102 Paoletti LC, Madoff LC, Kasper DL. Surface structures of group B Streptococcus important in human immunity. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti J, Portony DA, Rood JJ, eds, *Gram-positive pathogens*. Washington, DC: ASM Press, 2000; 137–153.
- 103 Sutkin G, Krohn MA, Heine RP et al. Antibiotic prophylaxis and non group B streptococcal neonatal sepsis. *Obstet Gynecol* 2005; 105: 581–586.
- 104 Verani JR, Schrag SJ. Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges. *Clin Perinatol* 2010; 37: 375–392
- 105 Schuchat A. Group B streptococcus. *Lancet* 1999; 353: 51–6.
- 106 Hoogkamp-Korstanje JA, Gerards LJ, Cats BP. Maternal carriage and neonatal acquisition of group B streptococci. *J Infect Dis*

1982;145:800–3.

- 107 Chen KT, Puopolo KM, Eichenwald EC, Onderdonk AB, Lieberman E. No increase in rates of early-onset neonatal sepsis by antibiotic-resistant group B *Streptococcus* in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:1167–71.
- 108 Panda B, Iruretagoyena I, Stiller R, Panda A. Antibiotic resistance and penicillin tolerance in ano-vaginal group B streptococci. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22:111–4.
- 109 Kimura K, Suzuki S, Wachino J, et al. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2890–7.
- 110 Dahesh S, Hensler ME, Van Sorge NM, et al. Point mutation in the group B streptococcal *pbp2x* gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2915–8.
- 111 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI M100-S20. Wayne, PA; 2010.
- 112 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI M100-S20. Wayne, PA; 2010.
- 113 Castor ML, Whitney CG, Como-Sabetti K. Antibiotic resistance patterns in invasive group B streptococcal isolates. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2008;72:7505.
- 114 Baker CJ, Rench MA, Edwards MS, Carpenter RJ, Hays BM, Kasper DL. Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B *Streptococcus*. *N Engl J Med* 1988;319:1180–5.
- 115 Schuchat A, Wenger JD. Epidemiology of group B streptococcal disease: risk factors, prevention strategies, and vaccine development. *Epidemiol Rev* 1994;16:374–402.
- 116 Easmon CS, Hastings MJ, Deeley J, Bloxham B, Rivers RP, Marwood R. The effect of intrapartum chemoprophylaxis on the vertical transmis-

- sion of group B streptococci. *Br J Obstet Gynaecol* 1983;90:633–5.
- 117 Kasper DL, Paoletti LC, Wessels MR, et al. Immune response to type III group B streptococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *J Clin Invest* 1996;98:2308–14.
 - 118 Edwards MS. Group B streptococcal conjugate vaccine: a timely concept for which the time has come. *Human Vaccines* 2008;4:444–8.
 - 119 Laboratory practices for prenatal Group B streptococcal screening and reporting- Connecticut, Georgia, and Minnesota, 1997-1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;48(20):426-8.
- Jonathan P. Faro, Karen Bishop, Gerald Riddle, Mildred M. Ramirez, Allan R. Katz Mark A. Turrentine, and Sebastian Faro. Accuracy of an Accelerated, Culture-Based Assay for Detection of Group B Streptococcus. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2013; 2013: 367935.
- 120 Smith D, Perry JD, Laine L, Galloway A, Gould FK. Comparison of BD GeneOhm real-time polymerase chain reaction with chromogenic and conventional culture methods for detection of group B Streptococcus in clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2008;61(4):369–372.
 - 121 Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2002;51:1–22.
 - 122 Verani JR, McGee L, Schrag SJ, Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

MMWR Recomm Rep. 2010 Nov 19; 59(RR-10):1-36.
 - 123 Schwartz J, Robinson-Dunn B, Makin J, Boyanton BL. Evaluation of the BD MAX GBS assay to detect Streptococcus group B in LIM broth-enriched antepartum vaginal-rectal specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012;73:97–98.
 - 124 Church DL, Baxter H, Lloyd T, Miller B, Elsayed S. Evaluation of StrepB Carrot Broth versus Lim broth for detection of group B Streptococcus colonization status of near-term pregnant

- women. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(8):2780–2782.
- 125 Adler A, Block C, Engelstein D, Hochner-Celnikier D, Drai-Hassid R, Moses AE. Culture-based methods for detection and identification of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women—what are we missing? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;27(3):241–243.
 - 126 Bou G, Figueira M, Canle D, Cartelle M, Eiros JM, Villanueva R. Evaluation of group B *Streptococcus* differential agar for detection and isolation of *Streptococcus agalactiae*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005;11(8):676–678.
 - 127 Te Witt R, Oostvogel PM, Yahiaoui R, Wu Y, van Belkom A, Muller AE. In vitro evaluation of the performance of Granada selective enrichment broth for the detection of group B streptococcal colonization. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2012;31(3):357–363.
 - 128 MICHAEL K. YANCEY, MD, ANNE SCHUCHAT, MD, LINDA K. BROWN, MD, VERONICA LEE VENTURA, MD, AND GLENN R. MARKENSON, MD
The Accuracy of Late Antenatal Screening Cultures in Predicting Genital Group B Streptococcal Colonization at Delivery *Obstet Gynecol* 2996;88:822-5)
 - 129 Baker CJ. Inadequacy of rapid immunoassays for intrapartum detection of group B streptococcal carriers. *Obstet Gynecol* 1996;88(1):51-5.
 - 130 Kircher SM, Meyer MP, Jordan JA. Comparison of a modified DNA hybridization assay with standard culture enrichment for detecting group B streptococci in obstetric patients. *J Clin Microbiol* 1996;34(2):342-4.
 - 131 Bergseng H, Bevanger L, Rygg M, et al. Real-time PCR targeting the sip gene for detection of group B *Streptococcus* colonization in pregnant women at delivery. *J Med Microbiol* 2007;56(Pt 2):223-8.
 - 132 Bergeron MG, Ke D, Menard C, et al. Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery. *N Engl J Med*

2000;343(3):175-9.

- 133 Davies HD, Miller MA, Faro S, et al. Multicenter study of a rapid molecular-based assay for the diagnosis of group B *Streptococcus* colonization in pregnant women. 155. *Clin Infect Dis* 2004;39(8):1129-35.
- 134 Gavino M, Wang E. A comparison of a new rapid real-time polymerase chain reaction system to traditional culture in determining group B streptococcus colonization. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197(4):388-4.
- 135 Schuchat A., Zywicki S. S., Dinsmoor M. J., Mercer B., Romaguera J., O'Sullivan M. J., et al. Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: a multicenter case-control study. *Pediatrics*, 2000. 105(1 Pt 1): p. 21–6.
- 136 Piccinelli G., Biscaro V., Gargiulo F., Caruso A., and De Francesco M. A., Characterization and antibiotic susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolates causing urinary tract infections. *Infect Genet Evol*, 2015. 34: p. 1–6.
- 137 Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries.
Barcaite E¹, Bartusevicius A, Tameliene R, Kliucinskas M, Maleckiene L, Nadisauskiene R
Acta Obstet Gynecol Scand. 2008;87(3):260-71.
- 138 Neal J Russell Anna C Seale Megan O'Driscoll Catherine
O'Sullivan Fiorella Bianchi-Jassir Juan Gonzalez-Guarin Joy E Lawn
Carol J Baker Linda Bartlett Clare Cutland
Maternal Colonization With Group B *Streptococcus* and Serotype
Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses
Clinical Infectious Diseases, Volume 65, Issue suppl_2, 6 November
2017