

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Infezioni da streptococco di gruppo B**

A cura di Lucilla Baldassarri

*Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**07/28**

Istituto Superiore di Sanità  
**Infezioni da streptococco di gruppo B.**  
A cura di Lucilla Baldassarri  
2007, ii, 41 p. Rapporti ISTISAN 07/28

*Streptococcus agalactiae* (GBS) è uno dei principali responsabili di infezioni gravi quali sepsi, meningiti, polmoniti nel neonato, oltre che agente eziologico di infezioni in adulti diabetici o malati cronici. Viene presentato lo stato delle conoscenze in questo ambito, con indicazioni specifiche sulle procedure diagnostiche e sulle possibilità di controllo e prevenzione delle infezioni sostenute da questo microorganismo. È riportata, quale esempio, l'esperienza del gruppo di Studio per la Prevenzione delle Infezioni da GBS dell'Emilia Romagna, che ha messo in opera, nell'ultimo triennio, una rete di controllo nella Regione che ha permesso di ottimizzare le procedure per lo screening e la profilassi.

*Parole chiave:* Streptococchi gruppo B, Patogenesi, Terapia, Vaccini.

Istituto Superiore di Sanità  
**Group B streptococcal infections.**  
Edited by Lucilla Baldassarri, Roberta Creti e Graziella Orefici  
2007, ii, 41 p. Rapporti ISTISAN 07/28 (in Italian)

*Streptococcus agalactiae* (GBS) is responsible for a large percentage of severe infections in neonates and adults with underlying diseases. Here is reviewed what is currently known on the subject, with specific reference to the diagnostic procedures and to the strategies for prevention and control of infections due to this microorganism. As an example, we have reported the experience of a Study Group operating in the region Emilia Romagna that, in the last three years, has set up a network to control the spread of GBS infections through the optimization of screening and prophylactic procedures.

*Key words:* Group B streptococci, Pathogenesis, Therapy, Vaccines

Per informazioni su questo documento scrivere a: [lucilla.baldassarri@iss.it](mailto:lucilla.baldassarri@iss.it).

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Baldassarri L. (Ed.). *Infezioni da streptococco di gruppo B*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/28).

---

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2007

# INDICE

<b>Infezioni da streptococco di gruppo B</b> .....	1
Bibliografia .....	2
<b>Infezioni da streptococco beta emolitico di gruppo B in età pediatrica: epidemiologia e aspetti clinici</b> .....	3
Colonizzazione materna .....	3
Colonizzazione neonatale .....	4
Fattori di rischio .....	4
Infezione neonatale .....	5
Patogenesi .....	5
Incidenza .....	6
Aspetti clinici .....	7
Diagnosi .....	8
Terapia .....	9
Profilassi materna .....	10
Controversie della profilassi neonatale .....	10
Bibliografia .....	11
<b>Patogenesi e fattori di virulenza</b> .....	15
Patogenesi .....	15
Fattori di virulenza .....	16
Capsula .....	16
Emolisina .....	17
C5a- .....	18
Acido .....	18
Bibliografia .....	18
<b>Diagnosi microbiologica</b> .....	21
Collezione, trasporto e conservazione dei campioni .....	21
Urinocoltura .....	22
Analisi del latte materno .....	22
Isolamento .....	23
Identificazione .....	23
Identificazione fenotipica .....	23
Identificazione sierologica .....	24
Bibliografia .....	25
<b>Prevenzione delle infezioni da GBS</b> .....	26
Vaccini polisaccaridici e glicoconiugati .....	26
Vaccini proteici .....	27
Nuovi approcci genomici .....	28
Bibliografia .....	29
<b>Infezioni da streptococco beta emolitico di gruppo B: l'esperienza dell'Emilia Romagna</b> .....	32
Disegno dello studio .....	32
Infezioni precoci e tardive in Emilia Romagna .....	33
Conclusioni .....	35
Bibliografia .....	37

**Allegato 1**

Procedura per la raccolta e il trattamento dei campioni clinici per la coltivazione  
dello streptococco di gruppo B e saggio di sensibilità alla clindamicina ed eritromicina ..... 38

**Allegato 2**

Indicazioni per la profilassi intra-parto ..... 39

**Appendice**

Gruppo di studio per la prevenzione dell'infezione da streptococco di gruppo B  
della Regione Emilia Romagna ..... 40

## INFEZIONI DA STREPTOCOCCO DI GRUPPO B

Lucilla Baldassarri

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

*S. agalactiae*, detto anche streptococco di Gruppo B, (group B streptococcus, GBS) sulla base della classificazione fatta da Lancefield nel 1933, era inizialmente conosciuto come patogeno veterinario agente della mastite bovina molto tempo prima che fosse riconosciuto la sua importanza come patogeno umano. Nel 1938 Fry riporta tre casi di febbre puerperale fatale da GBS (1) ma fino al 1960 le infezioni da GBS non erano frequentemente riscontrate. Dal 1960 è stato sempre più frequentemente associato ad infezioni sia della madre che del neonato finché negli anni '70 è divenuto chiaro che l'incidenza sia di sepsi che di meningiti neonatali da GBS, ma anche le infezioni in adulti sia in gravidanza che non, stava aumentando (2). La ragione di questo aumento è tuttora non chiara. Dopo un primo periodo in cui l'emergenza di GBS non aveva sostituito quella del classico patogeno neonatale, *E.coli*, in USA è diventato il più importante patogeno dei neonati con incidenze che, negli anni '80, raggiungevano il 3/1000 nati vivi e una mortalità intorno al 50%. Negli anni '90, grazie ai grandi sforzi effettuati per la messa in opera di strategie e protocolli per la prevenzione di cui si parlerà più oltre, l'incidenza della malattia nella sua forma precoce e della mortalità sono state grandemente ridotte. Tuttavia l'infezione ad insorgenza tardiva, spesso fonte di pesanti reliquati neurologici, nonché le infezioni negli adulti, non hanno subito alcuna riduzione e, nonostante i notevoli contributi alle conoscenze apportati dagli studi in vitro, in modelli animali e di genetica molecolare, la patogenesi nei bambini più grandi e negli adulti rimane elusiva.

È ormai universalmente accettato che nella maggior parte dei casi la trasmissione dalla madre portatrice al neonato si verifichi in utero per via ascendente in prossimità del parto o durante il parto (29-72%) (3) Più raramente la trasmissione può essere, oltre che verticale dalla madre, anche orizzontale, con acquisizione da altri bambini quando nel nido siano presenti soggetti colonizzati e/o in caso di sovraffollamento o attraverso le mani del personale sanitario. Solo in percentuale relativamente bassa, fortunatamente, la trasmissione dà luogo a malattia neonatale (4, 5). In caso di presenza di fattori di rischio o di mancate notizie sulla positività del tampone viene ormai solitamente effettuata una profilassi intrapartum con antibiotico idoneo. Tuttavia, anche in presenza di terapia antibiotica adeguata, lo sviluppo delle infezioni invasive è ancora collegato ad un elevato tasso di mortalità (6).

Purtroppo, anche in presenza di profilassi antibiotica adeguata, non tutti i casi di malattia neonatale possono essere prevenuti (sia le manifestazioni infettive "in utero" che le infezioni ad insorgenza tardiva non vengono prevenute dalla profilassi) e oltre ai costi umani, quelli delle infezioni acute neonatali o delle meningiti rimangono elevati. Inoltre la profilassi anche se largamente efficace, non è scevra da possibili rischi (ritardo nella colonizzazione naturale da gram positivi nel neonato, eccessiva diffusione del trattamento antibiotico delle gravide, possibile sviluppo di resistenze).

Per questo motivo oggi la ricerca si rivolge ad altre soluzioni che possano essere alternative alla profilassi antibiotica come la vaccinazione delle madri. Un vaccino efficace inoltre consentirebbe di prevenire le infezioni negli adulti a rischio, nei quali non è infrequente il riscontro oltre che di infezioni della pelle (nelle ulcere diabetiche), di infezioni delle vie urinarie, batteriemie, polmoniti e peritoniti (7, 8, 9) e che sembrano essere in aumento negli ultimi anni (8).

## Bibliografia

1. Fry RM. Fatal infections by haemolytic streptococcus group B. *Lancet* 1938;i:199-201.
2. Schuchat A. Group B streptococcal disease: from trials and tribulations to triumph and trepidation. *Clin Infect Dis* 2001;33:751-6.
3. Schuchat A. Group B Streptococcus. *Lancet* 1999;353:51-6.
4. Zangwill KM, Schuchat A, Wegner JD. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. *MMWR CDC* 1992;41(SS6):25-32.
5. Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* 2000;342:15-20.
6. Farley MM, Harvey RC, Stull T, Smith JD, Schuchat A, Wenger JD. A population based assessment of invasive disease due to group B streptococcus in non pregnant adults. *N Engl J Med* 1993;328:1807-11.
7. Harrison LH, Ali A, Dwyer DM, Libonati JP, Reeves MW, Elliott JA, Billmann L, Lashkerwala T, Johnson JA. Relapsing invasive group B streptococcal infection in a adults. *Ann Int Med* 1995;123:421-7.
8. Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in The United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:479-513.
9. Schrag S, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, Hadler JL, Danila R, Cieslak PR, Schuchat A. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* 2000;342:15-20.

# **INFEZIONI DA STREPTOCOCCO BETA EMOLITICO DI GRUPPO B IN ETÀ PEDIATRICA: EPIDEMIOLOGIA E ASPETTI CLINICI**

Alberto Berardi (a), Licia Lugli (a), Chiara Bottura (a), Roberta Chierici (b), Rossana Colla (c), Ezio Di Grande (d), Alessandra Groppi (e), Battista Guidi (e), Giuseppe Montini (f), Bruno Mordini (g), Lidia Ricci (g), Giovanna Testa (h), Milena Toniato (c), Claudia Venturelli (i), Marina Visani (l), Alessandro Volta (m) e con la collaborazione del Gruppo per la Prevenzione delle Infezioni da Streptococco B della Regione Emilia Romagna.

(a) *Terapia Intensiva Neonatale, Azienda Ospedaliera Policlinico, Modena*

(b) *Terapia Intensiva Neonatale, Ospedale S. Anna, Ferrara*

(c) *Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Civile Guastalla*

(d) *Pediatria, Ospedale Civile Sassuolo*

(e) *Pediatria, Ospedale Civile, Pavullo*

(f) *Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Morgagni-Pierantoni, Forlì*

(g) *Laboratorio di Microbiologia, Ospedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia*

(h) *Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Infermi, Rimini*

(i) *Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Policlinico Modena*

(l) *Laboratorio di Microbiologia, Ospedale S. Maria Delle Croci, Ravenna*

(m) *Nido, Ospedale Franchini, Montecchio*

Lo streptococco beta emolitico di gruppo B (SGB) è un cocco Gram positivo, principale responsabile di severe infezioni batteriche verticali (sepsi, meningiti, polmoniti) e infezioni sistemiche o focali nel lattante (1). Oltre che in età pediatrica lo SGB causa batteriemie, sepsi, endometriti, amnioniti, infezioni urinarie nelle partorienti e severe infezioni nei diabetici o malati cronici.

## **Colonizzazione materna**

Lo SGB è un costituente comune della microflora genitale, con serbatoio primario localizzato nel tratto gastrointestinale inferiore, da cui può colonizzare ad intermittenza le vie genitali o urinarie (1, 2). La colonizzazione vaginale della gravida è il prerequisito per la trasmissione madre-neonato dell'infezione precoce.

Negli Stati Uniti lo SGB viene isolato nel 10-40% delle gravide, mentre in Europa la colonizzazione sembra meno frequente (1,5-30%) (3). La stima della colonizzazione è comunque fortemente influenzata da fattori quali la popolazione esaminata, le modalità di raccolta del tampone e i metodi colturali utilizzati. Popolazioni appartenenti ad etnie diverse hanno differenti frequenze di colonizzazione. Ad esempio, studi trasversali statunitensi hanno dimostrato che la frequenza è più alta nelle donne ispaniche, caraibiche od afro-americane rispetto alle bianche o alle asiatiche (4).

Si distingue una colonizzazione ad alta carica (cosiddetta colonizzazione "densa" o "heavy"), svelata nei comuni terreni di coltura in agar-sangue ed associata all'84% circa delle infezioni neonatali precoci. La colonizzazione *heavy* influenza l'outcome della gravidanza, con maggior rischio di rottura di membrane, di parto pretermine o di basso peso neonatale (5). La

colonizzazione a bassa carica, o “light”, svelabile solo con terreni selettivi, interessa circa 1/3 delle gravide ed è responsabile del 13% circa delle infezioni precoci (6) (Tabella 1).

**Tabella 1. Relazione tra colonizzazione vaginale materna intrapartum e insorgenza di infezione (da Benitz WE 2002, modificata)**

Stato di rischio	Prevalenza (%)	Trasmissione dell'infezione precoce	Odds ratio	Casi di infezione /100 nati
SGB	85,3	0	1,00	2,7
Colonizzazione <i>light</i>	4,7	9,5	97,1	13,2
Colonizzazione <i>heavy</i>	10	23,9	247	83,9
Colonizzazione <i>in toto</i>	14,7	19,9	204	97,3

La colonizzazione generalmente non produce sintomi e può essere continua, transitoria o intermittente. È stato di recente evidenziato come alcune donne persistentemente colonizzate possano presentare fluttuazioni nel tempo della densità di colonizzazione che ne rendono difficoltosa l'identificazione. Durante i periodi in cui il germe è presente a bassa carica solo metodiche altamente sensibili permettono di dimostrare che la colonizzazione non è intermittente ma continua (7).

È importante anche la sede in cui viene strisciato il tampone. Quando lo SGB è isolato dal retto indica colonizzazione più stabile, persistente (8) e spiega la patogenicità del germe sulle vie urinarie o la difficoltà di stabile eradicazione dal tratto genitale con trattamento antibiotico.

Rispetto alla cervice, il terzo inferiore della vagina (introito vaginale) è la sede che permette di identificare il maggior numero di portatrici. Virtualmente, pressoché tutte le donne colonizzate vengono identificate prelevando campioni sia dall'introito vaginale che dal retto. Quanto più le colture sono raccolte in prossimità del parto, tanto più concordano con la colonizzazione al momento del travaglio (9, 10).

## Colonizzazione neonatale

Dal 40 al 73% dei nati da madri colonizzate in sede genitale si colonizza sulle mucose nelle prime ore di vita (14). Il rischio è maggiore se la carica materna è più alta, mentre il trattamento antibiotico durante il travaglio, specialmente se viene iniziato almeno 2 ore prima del parto, lo minimizza (15).

Il taglio cesareo elettivo in assenza di travaglio e con membrane integre non si associa a colonizzazione neonatale e presumibilmente nemmeno ad infezione (16).

Sedi appropriate in cui ricercare la colonizzazione sono il canale auricolare, il faringe, la cute ombelicale ed il retto. Il rischio di infezione invasiva è maggiore quando sono colonizzati più distretti (17).

## Fattori di rischio

La probabilità di trasmissione dell'infezione al neonato è condizionata dalla colonizzazione vaginale, particolarmente se questa è densa (Tabella 2). In aggiunta, 5 condizioni ostetriche si associano strettamente all'infezione precoce: 1) il travaglio o la rottura di membrane prima del



termine (< 37 settimane), con rischio inversamente proporzionale all'età gestazionale; 2) la rottura prolungata delle membrane (cioè la rottura che precede di oltre 18 ore il parto); 3) la febbre in travaglio ( $T^{\circ} > 38^{\circ}$ ) non giustificata da affezioni extrauterine, che rappresenta un surrogato della corioamnionite; 4) la batteriuria da SGB in gravidanza, marker di colonizzazione genitale *heavy* e infine 5) l'aver avuto in precedenza un nato affetto da infezione invasiva da SGB (18).

Da notare che donne con fattori di rischio ma screening prenatale negativo hanno un rischio di trasmissione molto inferiore rispetto alle donne colonizzate ma senza fattori di rischio (0,9/1.000 vs 5,1/1.000). Un rischio altissimo hanno infine i nati da madre colonizzata con uno o più fattori di rischio (40,8/1.000) (19).

Condizioni materne non comuni sembrano associarsi ad un rischio particolarmente elevato (Tabella 2) (20, 21)

**Tabella 2. Fattori associati ad un rischio infettivo presumibilmente molto elevato (modificata da Benitz WE 2002)**

Condizione clinica	Prevalenza approssimativa	Frequenza approssimativa di trasmissione
PPROM* in gravida colonizzata	< 0,5%	33-50%
Corioamnionite materna	1-4%	6-20%
Gemello con infezione invasiva da Streptococco B	< 0,1%	Sconosciuta

\* PPRM = rottura pretermine (< 37 settimane di gestazione) e prematura (prima della comparsa del travaglio) delle membrane

## Infezione neonatale

### Patogenesi

Nel bambino l'infezione da SGB ha distribuzione bimodale. La forma *precoce* (cosiddetta "early-onset" o EOD) si trasmette per via verticale e si manifesta durante la prima settimana, generalmente con esordio dei sintomi entro le prime 12 ore di vita (22-24). Raramente viene acquisita dal neonato per via transplacentare, la modalità di trasmissione è perciò generalmente ascendente, per aspirazione fetale di liquido amniotico contaminato ed esiste una relazione fra la durata della rottura delle membrane e il rischio di infezione. Più raramente l'infezione può verificarsi a membrane integre, probabilmente a seguito di micro rotture prima del parto. Infine il neonato può infettarsi mediante il contatto con secrezioni vagino-anali infette nel canale del parto. I nati esposti attraverso questa ultima via generalmente si colonizzano, ma non sviluppano malattia.

L'infezione precoce è frequentemente associata a complicazioni ostetriche materne e può essere prevenuta attraverso la somministrazione di antibiotici in travaglio (chemoprofilassi intrapartum o IAP). Nella Figura 1 è schematizzata la patogenesi dell'infezione neonatale precoce.

L'infezione *tardiva* (cosiddetta "late-onset" o LOD) compare dai 7 ai 90 giorni di vita, generalmente con un acme alla fine del primo mese o l'inizio del secondo. Dà luogo a meningiti, sepsi senza focus o più raramente a infezioni focali (a carico delle ossa, delle articolazioni, dei tessuti molli, ecc.). L'unico fattore di rischio fino ad oggi ipotizzato è la prematurità (25).

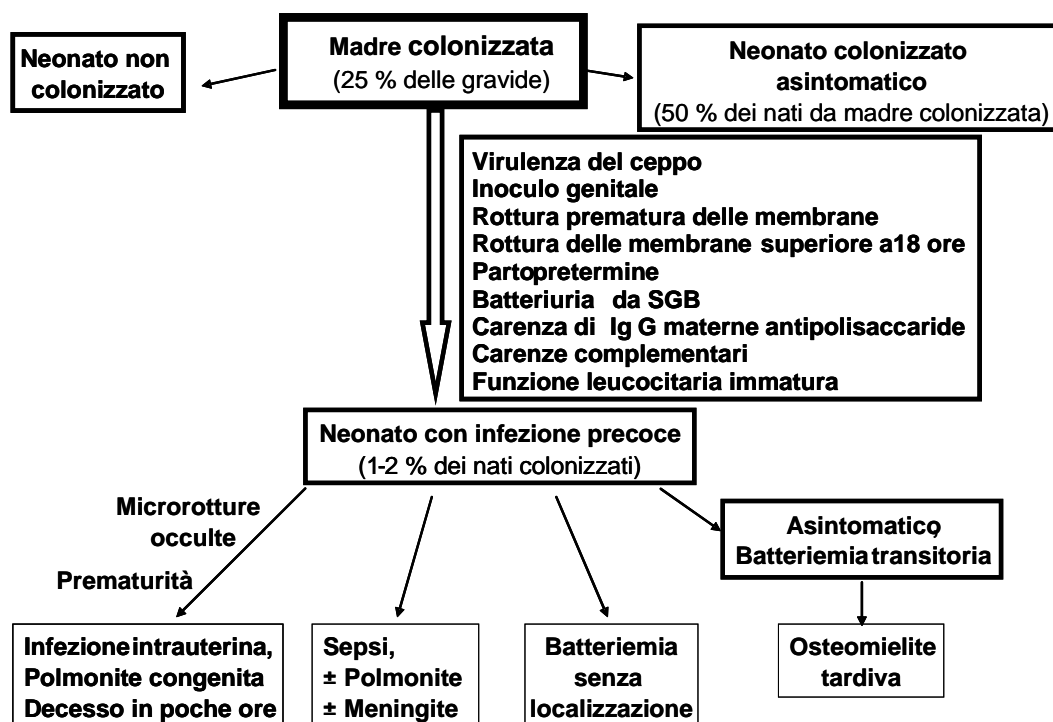


Figura 1. Patogenesi dell'infezione precoce (modificata da Edwards MS 2005)

Fino ad oggi non esiste possibilità di prevenzione e sembrano particolarmente esposti i nati da madre priva degli anticorpi specifici contro il polisaccaride capsulare. La maggior parte delle infezioni tardive è causata dal sierotipo III, che frequentemente determina meningite.

Il modo di acquisizione è più incerto; una parte dei nati colpiti acquisiscono la colonizzazione mucosa durante il passaggio nel canale del parto (in metà dei casi lo streptococco isolato dal sangue neonatale è identico a quello vagino-rettale materno) (26) oppure da neonato a neonato, attraverso il contatto delle mani del personale dei nidi (17, 27, 28). A distanza di alcune settimane le virosi respiratorie, alterando la barriera mucosa, potrebbero favorire il passaggio del germe in circolo. In altri casi le infezioni sono di origine nosocomiale e colpiscono nati prematuri dopo un prolungato periodo di ricovero (4, 29). Raramente infine è possibile isolare da latte materno SGB identici a quelli ritrovati nel sangue neonatale (30, 31), ma sebbene sia ammessa questa forma di contagio, la precisa patogenesi ne è incerta.

## Incidenza

In epoca pre-profilassi l'incidenza annuale dell'infezione neonatale precoce negli Stati Uniti era compresa tra 0,76 e 5,46/1.000 nati, mentre l'infezione tardiva era circa 4 volte meno frequente (20, 32). A partire dagli anni '90, grazie alle strategie di prevenzione, l'incidenza dell'infezione precoce si è ridotta marcatamente e nelle aree di sorveglianza attiva è scesa fino allo 0.34 /1000 nati (Figura 2). Al contrario, l'incidenza dell'infezione tardiva non è cambiata in

modo significativo, perciò attualmente il rapporto tra precoci e tardive è circa 1:1. Nonostante gli sforzi, negli Stati Uniti si verificano ancora circa 2.500 infezioni invasive e 100 decessi/anno nei bambini sotto i 3 mesi di vita (33, 34).

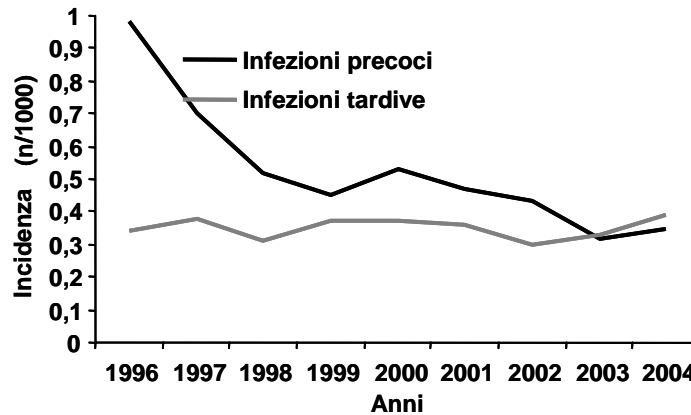


Figura 2. Incidenza di infezioni precoci e tardive da SGB suddivise per anno nelle aree di sorveglianza attiva statunitensi (modificata da CDC 2005)

In Europa, nonostante la minor diffusione delle strategie preventive, l'infezione precoce sembra meno frequente. Ad esempio in Inghilterra, dove lo screening o la profilassi delle gravide sono occasionali, l'incidenza sarebbe di 0,5-1 /1.000 nati. Queste differenze potrebbero essere dovute ad una più bassa frequenza di colonizzazione vaginale o una ridotta stima diagnostica (35). Comunque la conoscenza dell'intero territorio europeo è nel complesso frammentaria e ulteriori studi sono auspicabili. Nella Tabella 1 vengono riportati alcuni recenti studi europei; come mostrato, l'incidenza delle infezioni precoci è, rispetto agli studi statunitensi pre-profilassi, piuttosto bassa. Anche le infezioni tardive sembrano più rare che negli Stati Uniti (5).

Le informazioni relative alla realtà italiana sono estremamente limitate, sia per quanto riguarda le infezioni precoci che per le tardive. La bassa incidenza osservata potrebbe in parte riflettere l'incostante esecuzione di colture profonde nella valutazione diagnostica iniziale dei nati con sospetta sepsi (36-38).

## Aspetti clinici

L'**infezione precoce** (*early onset*) è di solito acquisita poco prima del parto, i sintomi esordiscono perciò in circa metà dei casi alla nascita (basso punteggio di APGAR) o entro le prime 4 ore di vita. In contrasto, l'infezione contratta durante il passaggio nel canale del parto si manifesta più tardivamente, ma di solito non oltre le 72 ore di vita (39). L'esordio precocissimo si associa a prognosi peggiore.

In circa tre quarti dei casi sono colpiti nati a termine, anche se il rischio di ammalare è inversamente proporzionale all'età gestazionale. Il travaglio o la rottura delle membrane prima del termine possono essere infatti avviati dall'infezione ascendente. Inoltre i pretermine sono più colpiti a causa dell'immunodeficit.

L'infezione precoce può essere asintomatica (batteriemia), determinare sepsi senza precisa localizzazione oppure distress respiratorio, talvolta associato a polmonite o a un quadro radiologico sovrapponibile alla malattia delle membrane ialine (40).

Altri possibili segni sono l'ipotensione, l'ipoperfusione cutanea, l'ipotonia, la cianosi, la letargia (soprattutto nel pretermine), l'irritabilità (soprattutto nel nato a termine), la tachicardia (frequente segno d'esordio dello shock settico) (41).

Non eccezionalmente l'infezione esordisce alla nascita con una grave asfissia, causata dallo shock insorto in utero (42, 43). La meningite è oggi rara tra le EOD, diversamente dagli anni '70.

L'infezione non trattata può rapidamente portare a shock settico, insufficienza multiorgano, coagulazione intravascolare disseminata, emorragie polmonari ed intracraniche.

La mortalità delle infezioni precoci, un tempo elevata, si aggira in Europa tra il 5 ed il 20%. Hanno una prognosi peggiore i nati pretermine, con un basso punteggio di Apgar al 5° minuto, con presenza di shock all'esordio, rottura delle membrane > 12 ore e ritardo nell'inizio della terapia antibiotica (44).

L'**infezione tardiva** (*late onset*) si manifesta dopo la prima settimana di vita, generalmente entro il 3° mese, con batteriemie, sepsi senza localizzazione o infezioni focali (ossee, articolari, dei tessuti molli o delle vie urinarie). L'infezione tardiva si associa spesso a meningiti, gravate da sequele neurosensoriali a lungo termine nel 25-50% dei casi (45).

Spesso tra i sintomi di esordio vi è la febbre e il torpore, mentre le convulsioni, raramente presenti all'inizio, possono manifestarsi fin nella metà dei casi. Più raramente, altri organi e tessuti possono essere interessati: il cuore (miocardite, endocardite, pericardite), l'orecchio (mastoidite), i seni nasali (etmoidite), la pleura (empiema), i tessuti molli (cellulite), l'occhio (endoftalmite). Il germe invade inizialmente il sangue attraverso le vie respiratorie o altre mucose e successivamente diffonde per via ematica ai tessuti. In Europa la mortalità delle infezioni tardive è simile a quella delle precoci (Tabella 1) mentre negli Stati Uniti è più bassa. I nati colpiti da infezione invasiva possono avere ricadute a distanza di settimane dal termine della terapia.

L'**infezione ultra-tardiva** (*late-late onset*) è quella che esordisce dopo il 90° giorno di vita. Costituisce il 20% circa delle infezioni tardive e si manifesta con batteriemie senza focus, sepsi o infezioni focali. Colpisce generalmente nati con infezione da HIV o grandi pretermine a lungo ospedalizzati (46).

## Diagnosi

I sintomi dell'infezione neonatale da SGB possono essere poco specifici, sovrapponibili a quelli di malattie metaboliche, cardiopatie congenite, patologie del sistema nervoso centrale o di altre infezioni, batteriche o virali: difficoltà respiratoria, colorito grigiastro, irritabilità, difficoltà di alimentazione, febbre, apnea, letargia, bradicardia, convulsioni.

La diagnosi di infezione invasiva viene posta in caso di positività delle colture ottenute da liquidi corporei normalmente sterili (sangue, liquor, liquidi prelevati da cavità sierose), mentre l'isolamento del germe da cute o superfici mucose (essudato auricolare, congiuntivale, nasofaringeo, liquido di lavaggio bronchiale, succo gastrico) permette il sospetto clinico ma non accerta l'infezione.

Per una diagnosi rapida di infezione può ricercarsi il polisaccaride dello streptococco B tramite anticorpi legati a particelle di latex. La determinazione può essere eseguita su sangue, liquor o urina e non è influenzata da una eventuale terapia antibiotica. La massima sensibilità si ottiene quando il test è eseguito su liquor (identifica il 72-89% dei nati con meningite). In caso di positività del solo test urinario occorre però cautela nel porre diagnosi di infezione, a meno che la raccolta non sia avvenuta in condizioni di rigorosa sterilità, perché è frequente la

contaminazione dei contenitori con germi di provenienza cutanea o mucosa. Il test urinario presenta troppi falsi positivi e viene per lo più sconsigliato (42, 47).

Il marker di Laboratorio più affidabile per differenziare il distress respiratorio e l'infezione da SGB è il rapporto neutrofili immaturi/totali, la cui lettura è però influenzata dall'esperienza dell'operatore. La proteina C reattiva non sembra un marker precoce né specifico, ma può documentare la risposta alla terapia antibiotica, guidarne la durata e fornire informazioni prognostiche (48, 49).

## Terapia

La terapia antibiotica in caso di sospetta infezione precoce deve iniziare con l'associazione di ampicillina ed aminoglicoside, che garantisce una copertura contro la maggior parte dei patogeni ed un effetto battericida sinergico contro lo streptococco. In caso di sospetta meningite le dosi di ampicillina vanno raddoppiate, per ottenere la sterilizzazione del liquor nel minor tempo possibile.

Confermata l'infezione da streptococco e visionato l'antibiogramma, la terapia può essere proseguita con la sola penicillina G, che rimane l'antibiotico di prima scelta; in caso di meningite la durata non deve essere inferiore ai 14 giorni e le dosi vanno raddoppiate, perché solo il 10-20% dei livelli sierici raggiungono il liquor. La RMN o la TAC possono documentare esiti parenchimali o complicanze che richiedono ulteriore trattamento, quali ventricolite o cerebriti. Possibili schemi terapeutici per le infezioni invasive sono indicati nella Tabella 5 (50).

Nel sospetto di infezione tardiva si può iniziare una terapia empirica con ampicillina e cefalosporina di terza generazione. Se il nato è già in terapia con vancomicina, si deve associare penicillina G o ampicillina, perché in vitro la vancomicina ha attività inibitoria piuttosto che battericida sullo streptococco.

Le terapie di supporto da associare alla terapia antibiotica (ventilazione meccanica, somministrazione di surfattante, correzione dell'anemia, della discoagulopatia, trattamento dello shock), sono comuni a quelle di altre infezioni neonatali e pediatriche.

**Tabella 5. Terapia antibiotica suggerita in caso di infezione invasiva (modificata da Baker CJ, 1997)**

Tipo di infezione	Dosi antibiotiche (Kg/d)	Durata della terapia
Sospetta meningite (terapia iniziale empirica)	Ampicillina (300 mg/Kg/d) + gentamicina (5-7 mg/Kg/d, oppure dosi secondo il peso nel pretermine)	Finché non è documentata la sterilità del liquor e la suscettibilità alla penicillina
Sospetta sepsi (terapia iniziale empirica)	Ampicillina (150 mg/Kg/d) + gentamicina (5-7 mg/Kg/d, oppure dosi secondo il peso nel pretermine)	Fino a negatività dell'emocoltura e normalizzazione dei markers di Laboratorio
Batteriemia	Ampicillina (dosi come nella sepsi) Oppure Penicillina G (200.000 U/Kg/d)	10 giorni
Meningite	Penicillina G (400.000-500.000 U/Kg/d)	Almeno 14 giorni
Artrite	Penicillina G (200.000-300.000 U/Kg/d)	2-3 settimane
Osteomielite	Penicillina G (200.000-300.000 U/Kg/d)	3-4 settimane
Endocardite	Penicillina G (200.000-300.000 U/Kg/d)	4 settimane

## Profilassi materna

Esistono differenti modalità di prevenzione dell'infezione, ma al momento quella più praticata e vantaggiosa è il trattamento antibiotico della donna durante il travaglio (chemoprofilassi intrapartum), che riduce la colonizzazione neonatale e previene la maggior parte delle infezioni. Lo shock anafilattico materno e il possibile aumento di resistenze antibiotiche sono i due maggiori rischi legati alla chemoprofilassi.

La profilassi non è indicata per tutte le donne. Alcuni paesi europei (Norvegia, Danimarca, Olanda, Regno Unito), basandosi sull'epidemiologia dell'infezione e sul rapporto costo/benefici somministrano la profilassi alle donne con fattori di rischio, senza suggerire screening culturali. Negli Stati Uniti invece viene suggerito uno screening culturale universale a 35-37 settimane di gestazione. La profilassi viene effettuata nelle gravide con batteriuria da SGB, con precedenti nati affetti da infezione invasiva o con colonizzazione in sede vagino-rettale. Se lo stato prenatale non è noto la profilassi va eseguita in caso di parto pretermine, rottura prolungata di membrane o febbre in travaglio. Recenti analisi delle strategie preventive hanno rilevato che l'approccio basato sui fattori di rischio è una misura preventiva meno efficace dell'approccio culturale, identificando 50% circa in meno di gravide a rischio (51)

La profilassi dovrebbe essere iniziata in travaglio il più precocemente possibile, somministrando penicillina e.v. ogni 4 ore fino al parto. Per lo spettro antibatterico ristretto la penicillina è da preferire all'ampicillina, che è un'accettabile alternativa; antibiotici ad ampio spettro dovrebbero essere utilizzati in caso di corioamnionite.

La profilassi non va somministrata in caso di parto cesareo programmato, a termine, o in presenza di negatività dello screening materno, anche se vi sono fattori di rischio.

In caso di reazioni allergiche non anafilattiche si può usare la cefazolina. Poiché la resistenza dello SGB ai macrolidi (clindamicina, eritromicina) è in aumento, nelle donne ad alto rischio di anafilassi da beta lattamici va utilizzata la vancomicina quando non è nota la sensibilità del germe ai macrolidi oppure quando ne è stata documentata la resistenza.(11)

## Controversie della profilassi neonatale

Uno degli aspetti più controversi è l'approccio al neonato senza i sintomi dell'infezione ma a rischio, per la presenza di colonizzazione materna o di fattori di rischio ostetrici. Non si può raccomandare un approccio sicuro e le linee guida statunitensi forniscono un algoritmo generico (Figura 3), che non prevede scelte specifiche per i molti scenari possibili (completamento o meno della profilassi materna, presenza di colonizzazione vaginale e/o fattori di rischio). La probabilità di ammalare è infatti variabile, molto più elevata se la colonizzazione materna si associa ai fattori di rischio, ognuno dei quali ha un diverso peso. Si è anche visto che, quando la profilassi materna è stata completata (cioè iniziata almeno 4 ore prima del parto), i nati sono quasi sicuramente protetti, ma a questa regola possono fare eccezione i nati da madre con corioamnionite o febbre in travaglio. In questi nati viene perciò suggerito di attuare una profilassi antibiotica fino a che non si è esclusa l'infezione. Controversa rimane l'utilità della somministrazione i.m. alla nascita di penicillina G in singola dose in neonati da madre non profilassata (52, 53).

L'algoritmo della Figura 3 prevede accertamenti diagnostici nei nati a rischio la cui madre non abbia potuto completare la profilassi e terapie antibiotiche empiriche nei nati da madre con corioamnionite. Gli accertamenti proposti sono comuni, ma presi singolarmente poco sensibili o specifici. La gran parte delle sepsi insorge precocissimamente, cioè entro le prime 12 ore di vita;

per questo motivo nel nato asintomatico, in alternativa agli esami di Laboratorio, altri suggeriscono l'osservazione clinica serrata (24, 54).

È comunque necessario un periodo di osservazione clinica non inferiore alle 48 ore prima della dimissione

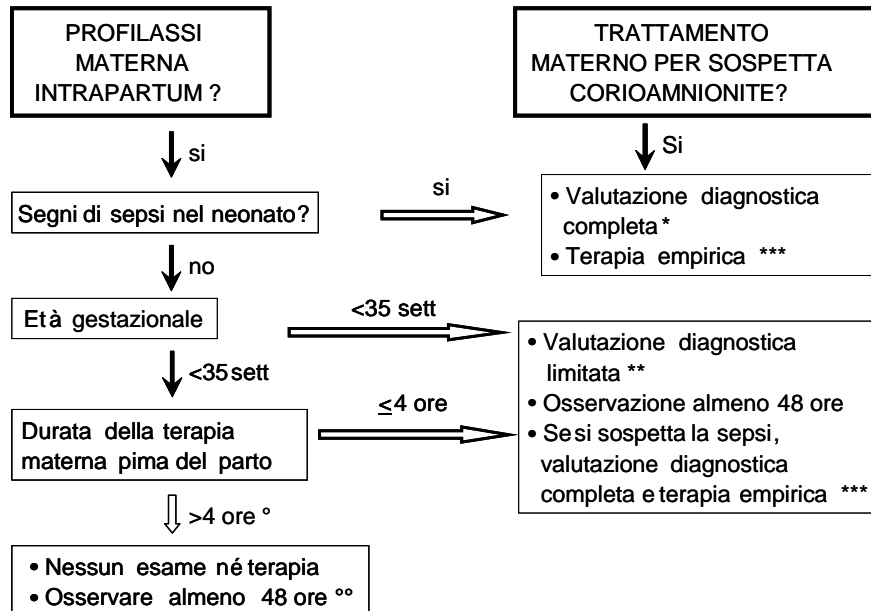


Figura 3. Algoritmo per la gestione del neonato (modificata da CDC 2002)

\* Prevede: emocromo completo con formula leucocitaria, emocoltura e radiografia del torace se il neonato presenta distress respiratorio. In caso di segni di sepsi la puntura lombare dovrebbe essere praticata, se possibile.

\*\* Emocromo completo con formula leucocitaria ed emocoltura.

\*\*\* La durata della terapia è funzione degli esiti dell'emocoltura, dei reperti liquorali e del decorso clinico. In assenza di dati a favore dell'infezione, il trattamento può essere anche di sole 48 ore.

° Si applica solo alla penicillina, ampicillina o cefazolina, quando somministrate alle dosi stabilite.

°° Un neonato apparentemente sano con età gestazionale  $\geq 38$  settimane e la cui madre abbia ricevuto da 4 o più ore la profilassi intrapartum può essere dimesso dopo 24 ore se gli altri criteri per la dimissione sono soddisfatti e se vi è una buona compliance familiare; altrimenti va osservato in ospedale almeno 48 ore e finché tali criteri non sono realizzati. Nel caso in cui non sia stata iniziata alcuna profilassi materna, nonostante l'indicazione, non vi sono dati sufficienti per raccomandare una singola condotta neonatale.

## Bibliografia

1. Anthony BF, Okada DM. The emergence of group B streptococci in infections of the newborn infant. *Ann Rev Med* 1977;28:355-69.
2. Anthony BF, Okada DM, Hobel CJ. Epidemiology of group B streptococcus: longitudinal observations during pregnancy. *J Infect. Dis* 1978;137:524-30.
3. Trijbels-Smeulders MA, Kollee LA, Adriaanse AH, Kimpen JL, Gerards LJ. Neonatal group B streptococcal infection: incidence and strategies for prevention in Europe. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:172-3.

4. Edwards MS, Baker CJ. Group B Streptococcal infections. In: Remington JS, Klein JO. (Ed.). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders; 2005. p. 1091-156.
5. Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP, Eschenbach DA, Blackwelder WC, Lou Y, Gibbs RS, Rettig PJ, Martin DH, Edelman R. Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome: VIP Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1354-60.
6. Benitz WE. Perinatal treatment to prevent early onset group B streptococcal sepsis. *Semin Neonatol* 2002;7:301-14.
7. Hansen SM, Uldbjerg N, Kilian M, Sorensen UB. Dynamics of Streptococcus agalactiae colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J Clin Microbio*. 2004;42:83-9.
8. Dillon HC, Gray E, Pass MA, Gray BM. Anorectal and vaginal carriage of group B streptococci during pregnancy. *J Infect Dis* 1982;145:794-9.
9. Boyer KM, Gadzala CA, Kelly PD, Gotoff SP. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. *J Infect Dis* 1983;148:802-9.
10. Yancey MK, Schuchat A, Brown LK, Ventura VL, Markenson GR. The accuracy of late antenatal screening cultures in predicting genital group B streptococcal colonization at delivery. *Obstet Gynecol*. 1996;88:811-5
11. Center for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: Revised guidelines from CDC. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:1-22.
12. Bergeron MG, Ke D, Menard C, Picard FJ, Gagnon M, Bernier M, Ouellette M, Roy PH, Marcoux S, Fraser WD. Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery. *N Eng J Med* 2000;343:175-79.
13. Haberland CA, Benitz WE, Sanders GD, Pietzsch JB, Yamada S, Garber AM. Perinatal screening for group B streptococci: a cost-benefit analysis of rapid polymerase chain reaction. *Pediatrics* 2002;110:471-80.
14. American Academy of Pediatrics. Guidelines for prevention of group B streptococcal infection by chemoprophylaxis. *Pediatrics* 1992;90:775-8.
15. De Cueto M, Sanchez MJ, Sampedro A, Miranda JA, Herruzo AJ, Rosa-Fraile M. Timing of intrapartum ampicillin and prevention of vertical transmission of group B streptococcus. *Obstet Gynecol* 1998;91:112-14.
16. Berardi A, Rossi K, Pizzi C, Baronciani D, Venturelli C, Ferrari F, Facchinetti F. Absence of neonatal streptococcal colonization after planned cesarean section. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2006;85:1012-3.
17. Pass MA, Gray BM, Khare S, Dillon HC Jr. Prospective studies of group B streptococcal infections in infants. *J Pediatr* 1979;95:437-43.
18. Center for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1996;45:1-24.
19. Boyer K, Gotoff SP. Antimicrobial prophylaxis of neonatal group B streptococcal sepsis. *Clin Perinatol* 1998;15:831-50.
20. Benitz WE, Gould JB, Druzin ML. Risk factors for early-onset group B streptococcal sepsis: estimation of odds ratio by critical literature review. *Pediatrics* 1999;103(6):e76.
21. Benitz WE. Perinatal treatment to prevent early onset group B streptococcal sepsis. *Semin Neonatol* 2002;7(4):301-14.
22. American Academy of Pediatrics and COID/COFN. Revised guidelines for prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) infection. *Pediatrics* 1997;99:489-96.



23. Lin FY, Brenner RA, Johnson YR, Azimi PH, Philips JB 3rd, Regan JA, Clark P, Weisman LE, Rhoads GG, Kong F, Clemens JD. The effectiveness of risk-based intrapartum chemoprophylaxis for the prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:1204-10.
24. RCOG. Prevention of early onset neonatal Group B streptococcal disease. *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Guidelines* 2003;36:1-10. Disponibile all'indirizzo: [http://www.rcog.org.uk/resources/public/pdf/groupb\\_strep\\_no36.pdf](http://www.rcog.org.uk/resources/public/pdf/groupb_strep_no36.pdf); ultima consultazione 21/9/2007.
25. Lin FY, Weisman LE, Troendle J, Adams K. Prematurity is the major risk factor for late-onset group B streptococcus disease. *J Infect Dis* 2003;188:267-71.
26. Dillon HC, Khare S, Gray BM. Group B streptococcal carriage and disease: a 6 year prospective study. *J Pediatr* 1987;110:31-6
27. Steere AC, Aber RC, Warford LR, Murphy KE, Feeley JC, Hayes PS, Wilkinson HW, Facklam RR. Possible nosocomial transmission of group B streptococci in a newborn nursery. *J Pediatr* 1975;87:784-87.
28. Boyer KM, Vogel LC, Gotoff SP, Gadzala CA, Stringer J, Maxted WR. Nosocomial transmission of bacteriophage type 7/11/12 group B streptococci in a special care nursery. *Am J Dis Child*. 1980;134:964-6.
29. Noya FJ, Rench MA, Metzger TG, Colman G, Naidoo J, Baker CJ. Unusual occurrence of an epidemic of type Ib/c group B streptococcal sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Infect Dis* 1987;155(6):1135-44.
30. Bingen E, Denamur E, Lambert-Zechovsky N, Boissinot C, Brahimi N, Aujard Y, Blot P, Elion J. Mother-to-infant vertical transmission and cross-colonization of *Streptococcus pyogenes* confirmed by DNA restriction fragment length polymorphism analysis. *J Infect Dis* 1992;165(1):147-50.
31. Olver WJ, Bond DW, Boswell TC, Watkin SL. Neonatal group B streptococcal disease associated with infected breast milk. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2000;83:F48-49.
32. Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:497-513.
33. MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, hadler JL, Danila R, Cieslak PR, Schuchat A. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Eng J Med* 2000;342:15-20.
34. Center for Disease Control and Prevention, Early-onset and late-onset neonatal group B streptococcal disease – United States, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005;54:1205-8.
35. Law MR, Palomaki G, Alfirevic Z, Gilbert R, Heath P, McCartney C, Reid T, Schrag S. The prevention of neonatal group B streptococcal disease: a report by a working group of the Medical Screening Society. *J Med Screen* 2005;12:60-8.
36. Vergani P, Patane L, Colombo C, Borroni C, Giltri G, Ghidini A. Impact of different prevention strategies on neonatal group B streptococcal disease. *Am J Perinatol* 2002;19:341-8.
37. Berardi A, Lugli L, Rossi K, Tridapalli E, Facchinetti F, Ferrari F, and Emilia-Romagna GBS Prevention Working Group. Neonatal Group B streptococcal infections in a North Italian area. In: ESPR European Society for Pediatric Research Siena, Italy August 31-September 3, 2005 *Pediatr Res* 2005;58:360.
38. Berardi A, Rossi K, Lugli L, Tridapalli E, Ferrari F. Prophylaxis of group B streptococcal infections in the birth centers of Emilia Romagna. *Pediatr Med Chir* 2004;26(4):228-32.
39. Siegel JD. Prophylaxis for neonatal group B streptococcus infection. *Semin Perinatol* 1999;22:33-4.
40. Baker CJ. Early onset group B streptococcal disease. *J Pediatr* 1978;93:124-5.

41. Graves GR, Rhodes PG. Tachycardia as a sign of early onset neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis* 1984;3:404-6.
42. Anthony BF. Infezioni da streptococco di gruppo B. In: Feigin RD *et al* (Ed.). *Trattato di Infettivologia Pediatrica*. Terza Edizione. Torino: Centro Scientifico Editore; 1992. p.1473-90
43. Isaacs D. *Handbook of neonatal infections. A practical guide*. First Edition. London: WB Saunders; 1999.
44. Lannering B, Larsson NE, Rojas J. Early onset group B streptococcal disease. Seven year experience and clinical scoring system. *Acta Paediatr Scand* 1983;72:597-602.
45. Yagupsky P, Menegus MA, Powell KR. The changing spectrum of group B streptococcal disease in infants: an eleven- year experience in a tertiary care hospital. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:801-8.
46. Hussain SM, Luedtke GS, Baker CJ, Schlievert PM, Leggiadro RJ. Invasive group B streptococcal disease in children beyond early infants *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:278-81.
47. Sanchez PJ, Siegel JD, Cushion NB, Threlkeld N. Significance of a positive urine group B streptococcal LA test in neonates. *J Pediatr* 1990;116:601-6.
48. Manroe BL, Rosenfeld CR, Weinberg AG, Browne R. The differential leukocyte count in the assessment and outcome of early-onset neonatal group B streptococcal disease *J Pediatr* 1977;91:632-7.
49. Philip AGS. Response of C-reactive protein in neonatal group B streptococcal infection. *Pediatr Infect Dis J* 1985;4:145-8.
50. Baker CJ. Group B streptococcal infections. *Clin Perinatol* 1997;24:59-70.
51. Schrag SJ, Zell ER, Lynfield R, Roome A, Arnold KE, Craig AS, Harrison LH, Reingold A, Stefonek K, Smith G, Gamble M, Schuchat A; Active Bacterial Core Surveillance Team. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. *N Engl J Med* 2002;347:233-9.
52. Wendel GD Jr, Leveno KJ, Sanchez PJ, Jackson GL, McIntire DD, Siegel JD. Prevention of neonatal group B streptococcal disease: a combined intrapartum and neonatal protocol. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:618-26.
53. Velaphi S, Siegel JD, Wendel GD Jr, Cushion N, Eid WM, Sanchez PJ. Early-onset group B streptococcal infection after a combined maternal and neonatal group B streptococcal chemoprophylaxis strategy. *Pediatrics*. 2003;111:541-7.
54. Tumbaga F, Philip AG. Perinatal group streptococcal infections and the new guidelines: an update. *NeoReviews* 2006;7:e524-30.

## PATOGENESI E FATTORI DI VIRULENZA

Lucilla Baldassarri, Roberta Creti

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

Gli streptococchi sono batteri sferici gram-positivi disposti in coppie o catenelle. Sono molto diffusi in natura; alcuni costituiscono una gran parte della popolazione microbica normale orale e faringea, e possono essere rinvenuti lungo tutto il tratto intestinale, nonché a livello vaginale e cutaneo. Sono capsulati, immobili, asporigeni, Gram-positivi e ossidasi negativi (queste due proprietà insieme alla morfologia cellulare li distinguono dalle Neisserie, Gram negative e ossidasi positive) e catalasi negativi (che li distinguono dagli stafilococchi e micrococchi). A seconda della specie, sono più o meno esigenti dal punto di vista nutrizionale. La crescita è favorita dall'arricchimento dei terreni solidi con sangue e dall'incubazione in atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5%.

Il genere *Streptococcus* comprende un gruppo eterogeneo di microrganismi, raggruppati in circa 20 diverse specie. Sulla base delle loro caratteristiche di emolisi e dei polisaccaridi della parete sono stati divisi da Lancefield in gruppi, tuttavia soltanto per il gruppo A (*S. pyogenes*) e il Gruppo B (*S. agalactiae*) ad un singolo gruppo di Lancefield corrisponde una sola specie, perché in altri gruppi (C,G,D,F) sono comprese specie fra loro molto diverse. Sulla base del suo polisaccaride di gruppo quindi *S. agalactiae* è detto correntemente anche Streptococco di gruppo B, o GBS.

Inoltre in base ad altri antigeni polisaccaridici che partecipano a formare la sua capsula *S. agalactiae* è, attualmente suddiviso in 9 sierotipi differenti (Ia, Ib, II- III- VIII) di cui il tipo III sembra quello dotato di maggiore patogenicità.

### Patogenesi

Gli studi sul meccanismo patogenetico delle infezioni da streptococco di gruppo B si sono rivolti particolarmente allo studio dei fattori di superficie in grado di mediare la colonizzazione delle mucose e la penetrazione a livello della barriera emato-encefalica, allo scopo di individuare possibili target di composti vaccinali. GBS deve in primo luogo stabilire la colonizzazione vaginale nella madre incinta aderendo alle cellule epiteliali e resistendo alle difese immunitarie mucosali. Infatti, la colonizzazione materna del tratto genito-urinario e/o gastrointestinale, rappresenta il fattore di rischio più importante, e l'incidenza delle infezioni da GBS è maggiore nelle donne portatrici di una carica microbica elevata. Nella maggior parte delle popolazioni esaminate, *S. agalactiae* si ritrova nel 10-30% delle donne in gravidanza. Modelli in vitro hanno evidenziato come GBS sia in grado di aderire a cellule dell'epitelio vaginale, buccale, polmonare, ed endoteliale. Mediatori di questa capacità adesiva sono probabilmente l'acido lipoteicoico (LTA) oltre a strutture proteiche presenti sulla superficie di GBS, di diversa natura e con diverse affinità per i vari tipi cellulari.

Per accedere al feto, GBS può ascendere nella cavità amniotica mediante penetrazione delle membrane placentari e/o a causa della rottura delle membrane amniotiche. La proliferazione batterica all'interno del sacco amniotico permette ai batteri di raggiungere il polmone fetale per aspirazione di liquido amniotico infettato. Si possono verificare anche casi di infezioni in utero e conseguente aborto, per la capacità di GBS di penetrare anche membrane intatte. Infatti, in assenza di rottura delle membrane, GBS può infettare il neonato a seguito dell'attraversamento

delle cellule del corion, dell'amnios e della membrana basale placentare. Alternativamente, il neonato può acquisire il microrganismo durante il passaggio attraverso il canale del parto infetto.

La malattia precoce si sviluppa in genere nella prima settimana di vita (in alcuni casi entro le 24 ore), ed è caratterizzata da sepsi e polmonite. Lo stress respiratorio è caratteristico della malattia precoce, ed è mediato in parte dalle proprietà citotossiche della emolisina, dall'effetto infiammatorio dei componenti di parete di GBS, e dall'afflusso dei neutrofili dell'ospite. Anche il rilascio di fosfolipidi della parete cellulare in seguito a trattamento con penicillina durante il travaglio, potrebbe essere tra le cause dei sintomi respiratori osservati (7). Il quadro istologico include danno delle cellule epiteliali polmonari, infiltrato infiammatorio, emorragie alveolari e presenza di membrane ialine. La colonizzazione delle mucose polmonari del neonato è seguita rapidamente dalla polmonite, infrazione della mucosa polmonare e sepsi.

Le manifestazioni tardive della malattia da GBS si presentano entro tre mesi dalla nascita, generalmente sotto forma di meningite. In questo caso, l'invasione del torrente circolatorio è accompagnata dalla penetrazione dello spazio del fluido cerebrospinale, con conseguente inizio della risposta infiammatoria risultante nel quadro clinico della meningite. Numerose pubblicazioni hanno dimostrato la capacità di GBS di invadere e sopravvivere all'interno di tipi cellulari diversi; mediante microscopia elettronica, cellule batteriche sono state visualizzate all'interno di vacuoli intracitoplasmatici, suggerendo l' induzione della fagocitosi da parte di GBS (8, 9).

## **Fattori di virulenza**

### **Capsula**

La capsula di GBS è il determinante di virulenza meglio caratterizzato, con proprietà anti-fagocitiche dovute ai residui di acido ialico che impediscono la deposizione di C3 sulla superficie delle cellule (10), e la formazione di C5a (11). I polisaccaridi capsulari determinano altresì la conversione dalla forma attiva del componente C3 del complemento, cosiddetta C3b, alla forma inattiva iC3b sulla superficie batterica (12). Le variazioni della struttura del polisaccaride capsulare sono responsabili delle nove varianti antigeniche ad oggi conosciute (Ia, Ib, II-VIII). In generale, la capsula è composta da unità ripetute di glucosio, galattosio, N-acetilglucosamina e acido ialico. Il solo sierotipo VIII contiene ramnosio ma non N-acetilglucosamina, che manca anche nel sierotipo IV. Nei sierotipi Ia, Ib e III, lo zucchero terminale è rappresentato dall'acido ialico, che gioca un ruolo importante nella virulenza. Infatti, la rimozione di questo residuo porta ad una perdita di virulenza nel modello del ratto neonato e ad un'aumentata fagocitosi da parte dei neutrofili umani (13, 14). È stata osservata una stretta correlazione tra la mancanza di anticorpi anticapsula materni e sviluppo di infezioni invasive nel neonato (15).

Studi epidemiologici effettuati negli Stati Uniti ed in Europa hanno mostrato come i sierotipi Ia, II, III e V costituiscono la causa più frequente di infezione nell'uomo; di questi, i sierotipi Ia, III e V costituiscono la causa più frequente di meningite neonatale e delle infezioni a carico delle partorienti (16, 17; 18, 19). Il sierotipo V è la causa più frequente di infezione in tutti i gruppi di età, incluse le donne adulte non in gravidanza (20), mentre gli altri sierotipi sono isolati solo sporadicamente (21), sebbene la distribuzione possa variare a seconda del gruppo etnico e della regione geografica considerata. Ad esempio, in Giappone risultano più frequenti i sierotipi VI e VIII (22).

## Emolisina

Nel corso delle infezioni a sviluppo precoce, la presentazione più caratteristica è una polmonite grave, concordemente ai ritrovamenti istopatologici di un grave danno polmonare. Tra i fattori batterici in grado di provocare tale danno, vi è l'emolisina (codificata dal gene *cyE*), che è stata dimostrata avere un effetto litico sulle cellule polmonari. Descritta per la prima volta nel 1934 da Todd (23), l'emolisina è prodotta da una vasta maggioranza di ceppi di GBS. È stata osservata una forte correlazione, probabilmente dovuta ad uno stretto *linkage* genetico, dell'emolisina con la produzione di pigmento rosso-arancione, che è uno dei caratteri distintivi di GBS.

## Proteine di superficie

Tra i primi antigeni di superficie di GBS identificati negli anni '70 troviamo le proteine del complesso C, riscontrate per la prima volta nel sierotipo Ic (attualmente Ia/c) (24). Rebecca Lancefield dimostrò che la somministrazione di anticorpi verso questa proteina conferiva una protezione passiva a topi neonati inoculati con dosi letali di GBS che esprimeva lo stesso antigene. Una successiva caratterizzazione biochimica ed immunologica ha evidenziato che in realtà questo antigene era composto da due componenti proteiche, la componente  $\alpha$  sensibile a tripsina e pepsina e la componente  $\beta$ , sensibile alla pepsina ma resistente alla tripsina. Il complesso C è presente soprattutto nei sierotipi Ia, Ib e II ma raramente nei ceppi di sierotipo III che presentano un complesso proteico differente (complesso R) ugualmente protettivo in modelli di infezione animale.

I ceppi possono esprimere contemporaneamente sia la componente alfa che beta dell'antigene C ma non l'antigene C assieme all'antigene R. Oggi i componenti dei complessi proteici C e R sono stati purificati e caratterizzati. Si tratta di proteine ancorate alla superficie cellulare (LPXTG proteins) con ruoli differenti: la proteina di superficie beta interagisce con due componenti del sistema immunitario umano: la porzione Fc delle IgA seriche ed il fattore H, suggerendo un ruolo nell'evasione immunitaria. La componente alfa dell'antigene C e le proteine del complesso R costituiscono una famiglia di proteine di superficie (*alfa-like protein* (*alp*) *family*) caratterizzate da una porzione interna costituita da unità ripetitive identiche, il cui numero è variabile da ceppo a ceppo. Ad eccezione della proteina Alp2, esiste solo un tipo di modulo ripetitivo all'interno di ogni proteina (25, 26).

La regione ripetitiva può subire riduzioni di dimensioni durante il processo infettivo in vivo come meccanismo di evasione dell'immunità dell'ospite. A tutt'oggi sono state identificate sei membri della famiglia alfa-like: alfa, alp1, alp2, alp3, alp4, Rib. Nonostante l'omologia di sequenza del 40-60% tra i membri della famiglia, le cross-reattività sono estremamente limitate; ad es. la proteina Alfa non mostra cross-reattività con la proteina Rib, nonostante circa il 60% di identità di sequenza tra le porzioni N-terminali ed il 45% di identità tra le unità ripetitive.

Riguardo la funzione biologica, la proteina Alfa facilita l'ingresso del batterio nelle cellule epiteliali e attraverso gli strati cellulari della cervice umana legandosi ai glicosaminoglicani delle cellule ospiti. Le proteine sono codificate da geni allelici, implicando che un ceppo esprime solo un membro della famiglia *alfa-like* (26), probabilmente all'interno di elementi mobili. Una proteina quasi del tutto identica ad Alp3, denominata R28, è stata identificata in ceppi di *S. pyogenes*, responsabili di sepsi puerperale (27) ed una nuova variante della famiglia *alfa-like* è stata identificata in un ceppo clinico di *S. dysgalactiae* (28).

Questi antigeni sono stati utilizzati come possibili candidati nella formulazione di vaccini glicoconiugati per la prevenzione dell'infezione neonatale.

## C5a-peptidasi

La C5a peptidasi è una proteina di superficie di 128 KDa che taglia il componente chemotattico del complemento C5a, impedendo il reclutamento dei leucociti nel sito di iniezione (29); la stessa proteina avrebbe inoltre un ruolo quale adesina alle cellule epiteliali (30). La sequenza del gene responsabile, scpB, ne ha evidenziato la forte somiglianza (98% di identità) con il gene analogo in *Streptococcus pyogenes* (31).

## Acido Lipoteicoico

LTA è un altro componente di superficie di *S. agalactiae*, importante per l'adesione precoce alle cellule dell'ospite e nel rilascio di citochine proinfiammatorie da parte dei monociti. Quest'ultimo effetto è responsabile, sebbene non esclusivamente, del quadro clinico della sepsi, caratterizzata da una diminuita attività cardiaca, acidosi metabolica e collasso generalizzato di più organi. L'infezione da GBS induce infatti l'espressione di un set di geni altamente specifici e coordinati in grado di orchestrare il reclutamento e l'attivazione dei neutrofili. Tra i più importanti troviamo (IL)-8, Gro-alfa, Gro-beta, IL-6, il *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), il *myeloid cell leukemia sequence 1* (Mcl-1) e le molecole di adesione intercellulare ICAM-1. Un gene codificante per il glicolipide di ancoraggio dell'acido lipoteicoico alla membrana batterica, *iagA*, è stato identificato come il responsabile dell'invasione delle cellule della barriera emato-encefalica (9).

## Bibliografia

1. Fry RM. Fatal infections by haemolytic streptococcus group B. *Lancet* 1938;i:199-201.
2. Schuchat A. Group B streptococcal disease: from trials and tribulations to triumph and trepidation. *Clin Infect Dis* 2001;33:751-6.
3. Farley MM, Harvey RC, Stull T, Smith JD, Schuchat A, Wenger JD. A population based assessment of invasive disease due to group B streptococcus in non pregnant adults. *N Engl J Med* 1993;328:1807-11.
4. Harrison LH, Ali A, Dwyer DM, Libonati JP, Reeves MW, Elliott JA, Billmann L, Lashkerwala T, Johnson JA. Relapsing invasive group B streptococcal infection in adults. *Ann Int Med* 1995;123:421-7.
5. Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in The United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:479-513.
6. Schrag S, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, Hadler JL, Danila R, Cieslak PR, Schuchat A. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* 2000;342:15-20.
7. Lin FY, Troendle JF. Hypothesis: neonatal respiratory distress may be related to asymptomatic colonization with group B streptococci. *Pediatr Infect Dis* 2006;25:884-8.
8. Doran KS, Liu GY, Nizet V. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *J Clin Invest* 2003;112:736-44.
9. Dogan, B, Y. H. Schukken, C. Santisteban, and K. J. Boor. 2005. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. *J. Clin. Microbiol.* 43:5899-906.
10. Petterson K. Perinatal infection with group B streptococci. *Semin Fetal Neonat Med* 2007;12:193-7.

11. Amundson NR, Flores AE, Hillier SL, Baker CJ, Ferrieri P. DNA macrorestriction analysis of nontypeable group B streptococcal isolates: clonal evolution of nontypeable and type V isolates. *J Clin Microbiol* 2005;43:572-6.
12. Doran KS, Engelson EJ, Khosravi A, Maisey HC, Fedtke I, Equils O, Michelsen KS, Arditi M, Peschel A, Nizet V. Blood-brain barrier invasion by group B Streptococcus depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. *J Clin Invest* 2005;115:2499-507.
13. Campbell JR, Baker CJ, Edwards MS. Deposition and degradation of C3 on type III group B streptococci. *Infect Immun* 1991;59:1978-83.
14. Todd E. A comparative serological study of strptolysins derived from human and animal infections with note on pneumococcla hemolysin, tetanolysin, and streptococcal toxin. *J Pathol Bacteriol* 1934;39:299-321.
15. Michel JL, Madoff LC, Kling DE, Kasper DL, Ausubel FM. C proteins of group B streptococci. In: Dunny GM, Cleary PP, McKay LL. (Ed.). *Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci, and enterococci*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1991. p. 214-8.
16. Lindahl G, Stalhammar-Carleman M, Areschoung T. Surface proteins of *S. agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:102-27.
17. Lachenauer CS, Creti R, Michel JL, Madoff LC. 2000. Mosaicism in the alfa-like protein genes of group B streptococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;97:9630-5.
18. Stalhammar-Carleman M, Areschoung T, Larsson C, Lindhal G. The R28 protein of *S.pyogenes* is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells. *Mol Microbiol* 1999;33:208-19.
19. Creti R, Imperi M, Baldassarri L, Pataracchia M, Alfarone G, Orefici G. Lateral transfer of alfa-like protein gene cassettes among streptococci: identification of a new family member in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *Equisimilis*. *Lett Appl Microbiol* 2007;44:224-7.
20. Takahashi S, Aoyagi Y, Adderson EE, Okuwaki Y, Nohnsack JF. Capsular sialic acid limits C5a production on type III group B streptococci. *Infect Immun* 1999;67:1866-70.
21. Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK, Wessels MR. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect Immun* 1992;60:3986-93.
22. Shigeoka AO, Rote NS, Santos JS, Hill HR. Assessment of the virulence factors of group B streptococci: correlation with sialic acid content. *J Infect Dis* 1983;147:857-63.
23. Wessels MR, Haft RF, Heggen LM, Rubens CE. Identification of a genetic locus essential for capsule sialylation in type III group B streptococcus. *Infect Immun* 1992;60:392-400.
24. Baker CJ, Kasper JL. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N Engl J Med* 1976;753-6
25. Zaleznik DF, Rench MA, Hillier S, Krohn MA, Platt R, Lee ML, Flores AE, Ferrieri P, Baker CJ. Invasive diseases due to group B streptococcus in pregnant women and neonates from diverse population groups. *Clin Infect Dis* 2000;30:276-81.
26. Harrison LH, Elliott JA, Dwyer DM, Libonati JP, Ferrieri P, Billmann L, Schuchat A. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implication for vaccine formulation. *J Infect Dis* 1998;177:998-1002.
27. Hickman ME, Rench P, Ferrieri P, Baker J. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics* 1999;104:203-9.
28. Lachenauer C, Kasper DL, Shimada J, Ichiman Y, Ohtsuka H, Kaku M, Paletti LC, Ferrieri P, Madoff LC. Serotype VI e VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant japanese women. *J Infect Dis* 1999;179:1030-3.

29. Bohnsack JF, Widjaja K, Ghazizadeh S, Rubens CE, Hillyard DR, Parker CJ, Albertine KH, Hill HR. A role for C5 and C5a-ase in the acute neutrophil response to group B streptococcal infections. *J Infect Dis* 1997;175:847-55.
30. Cheng Q, Stafslien D, Purushothaman SS, Cleary PP. The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasion. *Infect Immun* 2002;70:2869-76.
31. Chmouryguina I, Suvorov A, Ferrieri P, Cleary PP. Conservation of the C5a peptidase genes in group A and group B streptococci. *Infect Immun* 1996;64:2387-90.



## DIAGNOSI MICROBIOLOGICA

Lucilla Baldassarri, Roberta Creti

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

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

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

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

### Collezione, trasporto e conservazione dei campioni

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

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

## Urinocoltura

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

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

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

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

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

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

## Analisi del latte materno

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

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

Per la conta delle CFU il latte deve essere rimescolato con agitazione manuale senza aprire il contenitore in modo da ripartire i microrganismi il più uniformemente possibile cercando di evitare la formazione di schiuma. Si devono quindi preparare 6 diluizioni in ragione 10 utilizzando acqua peptonata (1g peptone/L H<sub>2</sub>O) o tampone fosfato a pH 7,00 come diluente.

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

I terreni devono essere incubati per 24 ore in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> (come usualmente si procede per gli streptococchi) ed in aerobiosi.

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

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

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

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

## Isolamento

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

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

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

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

## Identificazione

### Identificazione fenotipica

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

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

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

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

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

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

## Identificazione sierologica

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

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

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

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

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

## Bibliografia

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

## PREVENZIONE DELLE INFEZIONI DA GBS

Margarit Immaculada Y Ros  
*Centro Vaccini Novartis, Siena, Italia.*

Sebbene l'introduzione dello screening ano/vaginale al terzo trimestre di gravidanza seguito da trattamento intrapartum con penicillina abbia ridotto l'incidenza della malattia nei neonati e di quella materna (1, 2), i bambini prematuri restano ad alto rischio di infezione. Inoltre, lo screening non viene effettuato in tutti i paesi: in Inghilterra ed in parte della Germania la profilassi antibiotica è basata unicamente sui fattori di rischio. Oltre ai costi elevati, si temono reazioni allergiche individuali e lo sviluppo di ceppi resistenti (3). D'altro lato, l'infezione septica negli anziani ha una rapida progressione, richiede trattamenti antibiotici complessi ed il tasso di mortalità può raggiungere il 25%.

Per tutti questi motivi, lo sviluppo di un vaccino per la prevenzione delle infezioni da GBS è considerato una priorità dalle autorità sanitarie di vari paesi. Ad esempio negli USA sono stati di recente finanziati da CDC ed NIH studi clinici di fase 2 su una formulazione basata sull'uso di polisaccaridi di capsula coniugati a proteine (vedi sotto).

### Vaccini polisaccaridici e glicoconiugati

I primi studi per lo sviluppo di un vaccino contro GBS risalgono agli anni '70, quando Baker e Kasper riportarono che il rischio di infezione neonatale invasiva è inversamente proporzionale ai livelli di anticorpi materni diretti contro i polisaccaridi capsulari (CPS) (4). Fu inoltre dimostrato che l'immunizzazione di topi femmina con CPS prima dell'accoppiamento, era in grado di conferire protezione sierotipo specifica ai topi neonati contro dosi letali di ceppi di GBS (5). Pertanto, un primo approccio per la prevenzione dell'infezione perinatale è stato quello di sviluppare un vaccino polisaccaridico che potesse stimolare la risposta immunitaria umorale materna e conferire protezione passiva a lungo termine al neonato, tramite il passaggio degli anticorpi attraverso la placenta e il latte materno (6).

Negli anni '80 sono state condotte le prime prove cliniche con polisaccaridi purificati di tipo III. Dai dati ottenuti è emerso che solo il 60% degli individui vaccinati mostrava risposte anticorpali significative (6, 7). È infatti noto che i vaccini polisaccaridici sono moderatamente protettivi negli adulti e inefficaci nei neonati (8). Per questo motivo, gli studi successivi si sono concentrati sullo sviluppo di un vaccino glicoconiugato. Grazie alla coniugazione dei polisaccaridi con proteine carrier è infatti possibile indurre una risposta immunitaria umorale più efficace e oltretutto in grado di indurre memoria, quindi non solo una protezione a breve termine (9).

Polisaccaridi dei sierotipi di GBS II, III e V coniugati alla tossina tetanica (TT) hanno dimostrato, in fase 1 e 2 dei trials clinici, di essere sicuri e immunogenici negli adulti sani (10, 11). Nonostante un vaccino costituito dalla combinazione di questi glicoconiugati sia in grado di proteggere contro la maggior parte dei sierotipi di GBS responsabili delle manifestazioni patologiche negli Stati Uniti, esso non offre protezione contro quei sierotipi patogeni che, come mostrato in Figura 1, sono prevalenti in altre parti del mondo (ad esempio contro i sierotipi VI e VIII, predominanti in Giappone (12)). Inoltre, dati di sequenza indicano che nei ceppi di GBS

può avvenire un cambiamento di serotipo per trasferimento orizzontale dei geni codificanti gli enzimi per la sintesi dei vari tipi di capsula (13).

Per ottenere un vaccino universale basato sulla componente polisaccaridica di GBS, sarebbe pertanto necessario combinare in un'unica formulazione i glicoconiugati relativi a tutti e 9 i serotipi esistenti. In ogni caso, tale vaccino non coprirebbe i ceppi non tipizzabili, il cui numero è in aumento negli Stati Uniti. Per questo motivo si è pensato allo sviluppo di un vaccino proteico capace di indurre una protezione a più ampio spettro.

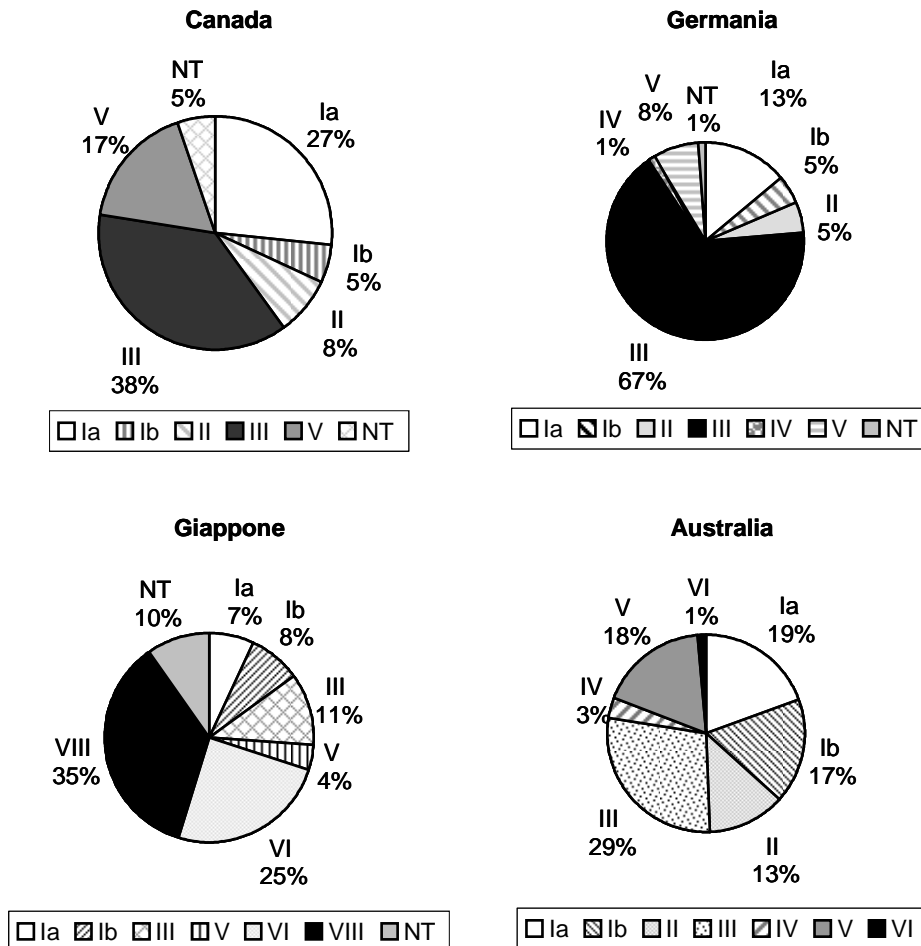


Figura 1. Distribuzione dei sierotipi tra i ceppi clinici di GBS isolati negli ultimi anni in Canada, Germania e Australia da neonati e in Giappone da donne colonizzate

### Vaccini proteici

Secondo quanto detto in precedenza, un vaccino ideale contro GBS dovrebbe includere proteine capaci di promuovere l'attivazione di una risposta immunitaria sierotipo-indipendente e protettiva nei confronti di almeno 80% degli isolati clinici. Gli studi volti allo sviluppo di questo tipo di vaccino si sono basati sulla ricerca di proteine esposte sulla superficie del batterio, in quanto più accessibili agli anticorpi. Le proteine localizzate sulla superficie sono inoltre potenzialmente implicate nei primi stadi dell'infezione, adesione alle cellule epiteliali e

interazione con la matrice extracellulare umana. Anticorpi specifici diretti contro di esse potrebbero quindi bloccare la colonizzazione e lo sviluppo della patologia (14).

Queste ricerche hanno portato all'identificazione di diversi potenziali antigeni, riportati in Tabella 1, alcuni dei quali sono però molto variabili in sequenza (ad esempio quelli appartenenti alla famiglia Rib, alfa e beta contengono un numero variabile di unità ripetitive) e quindi in grado di indurre anticorpi protettivi contro il ceppo omologo, ma di dare una protezione molto ridotta contro i ceppi eterologhi.

**Tabella 1. Proteine di superficie di *S. agalactiae* identificate come potenziali antigeni per lo sviluppo di un vaccino**

Antigene	Caratteristiche	Bibliografia
Proteina $\alpha$ C	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Appartiene alla famiglia delle proteine di superficie costituite da unità ripetitive</li> <li>– Resistente alla tripsina</li> <li>– Presenza del motivo di ancoraggio alla parete LPXTG</li> </ul>	Madoff <i>et al.</i> 1992 (15)
Proteina $\alpha$ C	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Appartiene alla famiglia delle proteine di superficie costituite da unità ripetitive</li> <li>– Lega la regione Fc delle IgA umane</li> <li>– Sensibile alla tripsina</li> <li>– Presenza del motivo LPXTG</li> </ul>	Madoff <i>et al.</i> 1992 (16)
Rib	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Appartiene alla famiglia delle proteine di superficie costituite da unità ripetitive</li> <li>– Resistente alla tripsina e pepsina</li> </ul>	Stalhammar-Carlemalm <i>et al.</i> 1993 (17)
SIP	<ul style="list-style-type: none"> <li>– 45Kda</li> <li>– Contiene peptide segnale</li> <li>– Sequenza altamente conservata</li> </ul>	Brodeur <i>et al.</i> 2000 (18)
C5a peptidasi	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Serina-proteasi</li> <li>– Inattiva il frammento C5a del complemento, fattore chemiotattico per i PMN</li> </ul>	Cheng <i>et al.</i> 2001 (19)

## Nuovi approcci genomici

Negli ultimi anni si sono aperte nuove prospettive per la ricerca di un vaccino universale contro GBS, grazie alla disponibilità di nuove tecnologie che hanno consentito di decifrare la sequenza genomica di interi microrganismi. Questa informazione può essere utilizzata per la predizione in silico di tutte le proteine potenzialmente localizzate sulla superficie del batterio, la loro espressione e purificazione da *E. coli*, seguita dalla selezione degli antigeni capaci di conferire protezione contro l'infezione, mediante saggi in vitro o in vivo su modelli animali. Questo approccio, denominato "reverse vaccinology" è stato seguito per la prima volta con successo nella scoperta di un vaccino contro il meningococco B (20)

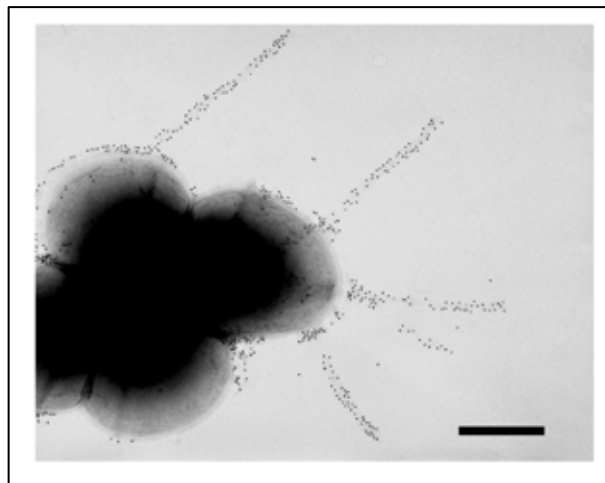
Le prime analisi bioinformatiche effettuate sulle sequenze genomiche di due isolati clinici di GBS (13, 21), hanno dato indicazione di un'elevata variabilità genetica all'interno di questa specie microbica. Questo dato è stato confermato dalla successiva analisi di 8 diversi genomi, che ha consentito di identificare, oltre ai 1811 geni presenti in tutti i ceppi di GBS, un gruppo di 765 geni (20% dell'intero genoma), presenti solo in alcuni dei ceppi esaminati (22). Dall'insieme di queste 2576 proteine conservate e variabili, sono state individuate mediante analisi bioinformatica 589 proteine potenzialmente esposte sulla superficie del microrganismo,



312 delle quali sono state espresse e purificate in *E. coli*. ed utilizzate per immunizzare animali di Laboratorio. La selezione dei migliori antigeni è stata effettuata mediante analisi citofluorimetrica dell'effettiva esposizione sulla superficie del batterio, saggi di battericidia in vitro e modelli animali dove è stata analizzata la capacità di conferire protezione ai neonati da parte di femmine di topo immunizzate prima dell'accoppiamento. Per queste analisi è stato utilizzato un pannello di ceppi rappresentativo della variabilità genetica di GBS. Questo approccio, che ha rivelato un'elevata variabilità anche a livello di espressione dei singoli antigeni nei diversi ceppi, ha portato all'identificazione di una combinazione di proteine capaci di indurre protezione contro un largo spettro di isolati clinici, ponendo la base per lo sviluppo di un vaccino universale (23).

La caratterizzazione di tre di questi nuovi antigeni ha consentito di scoprire strutture a forma di pilo che protrudono dalla superficie del batterio, mai osservate in precedenza in GBS (Figura 2). Successivi studi hanno dimostrato che queste strutture contenenti antigeni protettivi possono essere trasferite *in toto* nel microrganismo non patogeno *L. lactis*, con la conseguente possibilità di ottenere un vaccino multivalente di tipo mucosale (24).

In definitiva, le prospettive di un vaccino per l'eradicazione dell'infezione causata da questo importante patogeno sono ora più concrete. Per assicurare lo sviluppo di un vaccino efficace sarà comunque importante monitorare accuratamente la variabilità degli isolati clinici presenti a livello globale, in modo da includere le componenti polisaccaridiche e/o proteiche comuni al maggior numero possibile di varianti del microrganismo.



**Figura 2. Analisi al microscopio elettronico a trasmissione del ceppo di GBS JM9130013 dopo marcatura *immunogold*; sono visibili le strutture a forma di pilo contenenti antigeni protettivi**

## Bibliografia

1. Boyer KM, Gotoff SP. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. *N Engl J Med* 1986;26:1665-9.
2. Gibbs RS, Schrag S, Schuchat A. Perinatal infections due to group B streptococci. *Obstet Gynecol* 2004;104:1062-76.
3. Moore MR, Schrag SJ, Schuchat A. Effects of intrapartum antimicrobial prophylaxis for prevention of group-B-streptococcal disease on the incidence and ecology of early-onset neonatal sepsis. *Lancet Infect Dis* 2003;4:201-13.



























*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.  
Le richieste possono essere inviate a: [pubblicazioni@iss.it](mailto:pubblicazioni@iss.it).*

*Stampato da Litografia Chicca di Fausto Chicca  
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

*Roma, settembre 2007 (n. 3) 11° Suppl.*