

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej



DOROTA KAMIŃSKA

**CHARAKTERYSTYKA CZYNNIKÓW ZJADLIWOŚCI
ZWIĄZANYCH Z ADHEZJĄ ORAZ TWORZENIEM BIOFILMU
U SZCZEPÓW *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE***

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK FARMACEUTYCZNYCH

Promotor prof. dr hab. n. med. Marzena Gajęcka

Poznań, 2018

Słowa kluczowe: *Streptococcus agalactiae*, czynniki zjadliwości, biofilm

*Serdecznie dziękuję
Pani Prof. dr hab. Marzenie Gajęckiej
za wsparcie merytoryczne, udzielenie wielu cennych wskazówek
i mobilizację w trakcie pisania tej pracy*

*Dziękuję wszystkim Pracownikom
Katedry i Zakładu Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej
za życzliwość i pomoc podczas realizacji pracy*

*Pragnę serdecznie podziękować
moim Rodzicom oraz Mężowi
za cierpliwość, wsparcie oraz wiarę*

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

ATTC - Amerykańska Kolekcja Kultur Typowych (*ang.* American Type Culture Collection),

BibA – immunogenna adhezyna bakteryjna,

BMI – wskaźnik masy ciała (*ang.* body mass index),

BsaB – adhezyna powierzchniowa,

β-H/C – β-hemolizyna/cytolizyna (*ang.* β-hemolysin/cytolysin),

CAMP - czynnik Christie – Atkins –Munch Petersen,

CA – Columbia Agar z 5% krwia baranią,

CDC – Centrum Zwalczenia i Zapobiegania Chorób (*ang.* Centers for Disease Control and Prevention),

CPS - otoczka polisacharydowa (*ang.* capsular polysacharides),

dNTP - trifosforan deoksyrybonukleotydowy,

EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy,

EOD – wczesny zespół chorobowy (*ang.* early onset disease),

EUCAST - Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (*ang.* European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing),

FbsA, FbsB, FbsC – białka wiążące fibrynogen (*ang.* fibrynogen-binding proteins),

GBS - paciorkowce grupy B (*ang.* group B *Streptococcus*),

HK – kinaza histydynowa,

HvgA – hiperwirulentna adhezyna

LOD – późny zespół chorobowy (*ang.* late onset disease),

LLOD – opóźniony późny zespół chorobowy (*ang.* late, late onset disease),

Lmb – białko wiążące lamininę (*ang.* laminin-binding protein),

KORLD - Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów,

MIC – minimalne stężenie hamujące (*ang.* minimum inhibitory concentration),

MH-F – Mueller-Hinton agar z 5% odwłóknoną krwią końską i 20 mg/l β-NAD,

MLS_B I- indukcyjny mechanizm oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B,

MLS_B K- konstytutywny mechanizm oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B,

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (*ang.* polymerase chain reaction),

PTG – Polskie Towarzystwo Ginekologiczne,

pz – pary zasad,

RR – białko regulatorowe,

SodA – dysmutaza nadtlenkowa,

ScpB – paciorkowcowa peptydaza C5a (*ang.* Streptococcal C5a peptidase),

Srr – białka bogate w powtórzenia seryny (*ang.* serine-rich repeat proteins),

TBE - tris, kwas borowy, EDTA,

TCS lub **TCSTS** – dwuskładnikowy system regulacyjny (*ang.* two-component system lub *ang.* two componentic signal transduction system),

TE – Tris, EDTA,

Tm – temperatura topnienia (*ang.* temperature melting)

Spis treści

1. WSTĘP	11
2. CEL PRACY	12
3. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	13
3.1. Klasyfikacja paciorkowców	13
3.2. Charakterystyka <i>Streptococcus agalactiae</i>	15
3.2.1. <i>Streptococcus agalactiae</i> – od patogenu zwierzęcego do ludzkiego ..	15
3.2.2. Morfologia i cechy identyfikacyjne <i>Streptococcus agalactiae</i>	17
3.2.3. Epidemiologia i chorobotwórczość <i>Streptococcus agalactiae</i>	19
3.2.4. Czynniki zjadliwości <i>Streptococcus agalactiae</i>	22
3.2.5. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii	26
3.3. Biofilm bakteryjny	28
3.4. Wpływ mikrobioty pochwy na kolonizację <i>Streptococcus agalactiae</i>	29
3.5. Profilaktyka zakażeń okołoporodowych GBS oraz zalecenia dotyczące wykrywania nosicielstwa paciorkowców grupy B u kobiet ciążarnych	30
3.6. Lekowrażliwość <i>Streptococcus agalactiae</i>	33
4. MATERIAŁ I METODY	34
4.1. Badane szczepy bakteryjne	34
4.1.1. Szczepy wzorcowe	34
4.1.2. Szczepy kliniczne	35
4.1.3. Przechowywanie szczepów bakteryjnych	37
4.2. Odczynniki wykorzystywane do badań laboratoryjnych	38
4.3. Sprzęt i aparatura wykorzystywana do badań laboratoryjnych	39
4.4. Identyfikacja badanych szczepów <i>Streptococcus agalactiae</i>	39
4.4.1. Metoda aglutynacji lateksowej	40
4.4.2. Molekularna identyfikacja badanych szczepów z zastosowaniem reakcji PCR	41
4.4.2.1. Izolacja genomowego DNA	41
4.4.2.2. Przygotowanie reakcji PCR	42
4.4.2.3. Optymalizacja warunków reakcji PCR	42
4.4.2.4. Wizualizacja produktów reakcji PCR	43
4.5. Ocena zdolności badanych szczepów do wytwarzania biofilmu	43
4.6. Serotypowanie szczepów <i>Streptococcus agalactiae</i>	45

4.6.1. Optymalizacja pojedynczych reakcji PCR	46
4.6.2. Optymalizacja reakcji multiplex PCR	47
4.6.3. Sprawdzenie swoistości zastosowanych starterów	48
4.7. Ocena obecności różnych typów fimbrii – Pl-1, Pl-2a i Pl-2b	49
4.8. Wykrywanie genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp	50
4.9. Oznaczenie lekowrażliwości badanych szczepów	51
4.9.1. Ocena lekowrażliwości badanych szczepów metodą dyfuzyjno-krażkową oraz metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku	51
4.9.2. Oznaczanie mechanizmów oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B	52
4.10. Zastosowane metody statystyczne	53
5. WYNIKI	54
5.1. Identyfikacja badanych szczepów <i>Streptococcus agalactiae</i>	54
5.1.1. Identyfikacja badanych szczepów z użyciem testu lateksowego	54
5.1.2. Identyfikacja badanych szczepów z zastosowaniem specyficznej reakcji PCR	54
5.2. Ocena zdolności badanych szczepów do wytwarzania biofilmu	55
5.3. Serotypowanie szczepów <i>Streptococcus agalactiae</i>	61
5.3.1. Sprawdzenie swoistości zastosowanych starterów	61
5.3.2. Wyniki serotypowania badanych szczepów <i>Streptococcus agalactiae</i> ..	63
5.4. Ocena obecności różnych typów fimbrii – Pl-1, Pl-2a i Pl-2b	68
5.5. Wykrywanie genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp	72
5.6. Oznaczenie lekowrażliwości badanych szczepów	76
5.7. Analizy korelacji uzyskanych wyników	85
5.7.1. Ocena częstości występowania serotypów I-VII w grupie silnych, umiarkowanych i słabych producentów biofilmu	85
5.7.2. Porównanie obecności genów kodujących różne typy fimbrii wśród szczepów GBS reprezentujących różne serotypy	86
5.7.3. Porównanie obecności genów kodujących różne typy fimbrii wśród szczepów GBS będących silnymi, umiarkowanymi i słabymi producentami biofilmu	88
5.7.4. Porównanie obecności genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp wśród szczepów GBS reprezentujących różne serotypy	89

5.7.5. Ocena obecności genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp wśród szczepów GBS będących silnymi, słabymi i umiarkowanymi producentami biofilmu	90
5.7.6. Ocena częstości występowania oporności na erytromycynę wśród izolatów należących do różnych serotypów	90
6. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA.....	92
7. WNIOSKI	102
8. SPIS TABEL	103
9. SPIS RYCIN	105
10. SUPLEMENT	108
11. STRESZCZENIE	110
12. SUMMARY	112
13. PIŚMIENNICTWO	114

1. WSTĘP

Streptococcus agalactiae (*S. agalactiae*), zaliczany do paciorkowców grupy serologicznej B (*ang.* Group B Streptococcus, GBS), bytuje naturalnie w układzie pokarmowym i moczowo-płciowym zdrowych ludzi, ale może być również odpowiedzialny za wystąpienie różnych infekcji, w szczególności u noworodków i osób powyżej 60 r.ż. Zakażenia powodowane przez *S. agalactiae* u noworodków przebiegają najczęściej pod postacią zapalenia płuc i zakażenia krwi oraz zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Również u osób starszych objawy kliniczne zakażenia mogą być zróżnicowane i objawiać się zakażeniem skóry i tkanek miękkich, zakażeniem układu moczowego, bakteriecią, zapaleniem płuc, zapaleniem stawów oraz zapaleniem wsierdza.

Szczepy *S. agalactiae* charakteryzują się wysoką inwazyjnością, co wiąże się z posiadaniem przez te bakterie wielu czynników wirulencji, do których należą otoczka, białka o aktywności enzymatycznej, cytolizyny i adhezyny. Na podstawie różnic w strukturze wielocukrów otoczkowych oraz białkowego antygeny C, wśród szczepów GBS można wyróżnić dziesięć typów serologicznych oznaczonych jako Ia, Ib oraz II–IX. Częstość występowania poszczególnych serotypów otoczkowych jest różna. W Europie dominują serotypy I, II, III i V. Serotypy Ia, II, III i V są ważnym czynnikiem etiologicznym infekcji przede wszystkim u noworodków oraz kobiet ciężarnych [Weisner, 2004; Edwards 2005; Phares 2008]. Dzięki obecności różnych czynników adhezyjnych tj. białek powierzchniowych klasy alfa (Alp2, Alp3, Alp4, AlphaC, Epsilon i Rib), białek wiążących fibrynogen (FbsA, FbsB i FbsC) czy immunogennej adhezyny bakteryjnej (BibA), szczepy *S. agalactiae* wykazują zdolność do przylegania do różnych komórek nabłonka (pochwy, płuc), a także potrafią przekraczać barierę krew-mózg [Creti, 2004; Gherardi, 2007; Jiang i Wessels 2014]. Bakterie wiążąc się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej nabłonka okrężnicy, pochwy oraz dróg oddechowych mogą tworzyć na tych powierzchniach biofilm. Ważną rolę w adhezji do komórek gospodarza oraz w tworzeniu biofilmu odgrywają również trzy typy fimbrii (Pl-1, Pl-2a i Pl-2b).

Struktura biofilmu odgrywa ważną rolę w patogenezie zakażeń powodowanych przez te bakterie, chroni je przed wpływem niekorzystnych czynników zewnętrznych (zwiększona odporność na fagocytozę i oporność na środki przeciwbakteryjne). Wiedza na temat czynników środowiskowych i genetycznych regulujących tworzenie biofilmu przez *S. agalactiae* jest ograniczona.

2. CEL PRACY

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena zdolności szczepów *Streptococcus agalactiae* do formowania struktury biofilmu oraz charakterystyka czynników zjadliwości związanych ze zdolnością do adhezji i tworzenia biofilmu.

Badania prowadzono realizując następujące cele szczegółowe:

1. Ocena zdolności badanych szczepów do tworzenia biofilmu.
2. Ocena częstości występowania poszczególnych serotypów GBS wśród badanych szczepów.
3. Określenie częstości występowania wśród badanych szczepów wybranych czynników wirulencji związanych z adhezją.
4. Analizy korelacji uzyskanych wyników.

3. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

3.1. Klasyfikacja paciorkowców

Choroby wywoływane przez paciorkowce były opisywane dużo wcześniej niż wykryto i zidentyfikowano ich czynniki etiologiczne. Wprowadzenie terminu „streptococcus – paciorkowce” przypisuje się Billrothowi, który użył tej nazwy w 1874 roku. Pod koniec XIX wieku bakterie te były izolowane i opisywane przez wielu badaczy.

Początkowo klasyfikacja tych bakterii, ze względu na różnorodność chorób przez nie wywoływanych, była dla badaczy dużym problemem. Najczęściej paciorkowce były klasyfikowane/nazywane w zależności od źródła, z którego je izolowano - *Streptococcus erysipelatis*, *Streptococcus scarlatinae*, *Streptococcus puerperalis* czy *Streptococcus pyogenes*. Schottmüller w 1903 roku dokonał pierwszego podziału paciorkowców na podstawie ich typu hemolizy na podłożu krwawym. Podział ten pozwala odróżnić paciorkowce beta-hemolizujące, które są w większości chorobotwórcze dla człowieka od paciorkowców zieleniejących i niehemolizujących, które są w większości niechorobotwórcze. Był to jednak bardzo ogólny i mało dokładny podział [Jabłoński, 1979].

W 1933 r. Rebecca Lancefield dokonała podziału rodzaju *Streptococcus* na podstawie różnic w budowie wielocukru C wchodzącego w skład ściany komórkowej tych bakterii. Podzieliła ona paciorkowce beta-hemolizujące na grupy serologiczne A, B, C, D, F i G. Podział serologiczny ma dużą wartość ponieważ istnieje zależność pomiędzy przynależnością grupową a chorobotwórczością i pochodzeniem szczepów. Podział ten przyczynił się również do opracowania immunologicznych testów diagnostycznych dzielących paciorkowce na ww. grupy serologiczne (Tabela 1) [Lancefield, 1933; Stevens, 2000; Szewczyk 2013].

Tabela 1. Podział paciorkowców na grupy serologiczne [Szewczyk E, 2013]

Grupy serologiczne wg Lancefield	Wybrane gatunki o znaczeniu klinicznym
A	<i>S. pyogenes</i> niektóre szczepy <i>S. anginosus</i> i <i>S. constelatus</i>
B	<i>S. agalactiae</i>
C	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>
D	<i>S. bovis</i> (syn. <i>S. equinus</i>) <i>Enterococcus faecalis</i> * <i>Enterococcus faecium</i> *
F	niektóre szczepy grupy <i>S. milleri</i>
G	zwierzęce paciorkowce ropotwórcze np. <i>S. canis</i>

* w pierwotnym schemacie Lancefield do grupy D zaliczano enterokoki, które później wyodrębniono jako rodzaj *Enterococcus*.

Autorem odmiennego podziału paciorkowców był Sherman, który wyróżnił: paciorkowce ropotwórcze, paciorkowce zieleniejące, enterokoki i paciorkowce mleczne. Podstawą zaproponowanego podziału były właściwości hemolizujące, budowa antygenowa oraz inne właściwości biochemiczne drobnoustrojów [Jabłoński, 1979].

Obecnie obowiązuje podział paciorkowców na sześć grup filogenetycznych wyróżnionych na podstawie różnic w sekwencji podjednostki 16S rRNA (Tabela 2). W diagnostyce mikrobiologicznej stosowany jest też nadal podział zaproponowany przez R. Lancefield.

Tabela 2. Podział paciorkowców na grupy filogenetyczne [Szewczyk, 2013]

	Grupy filogenetyczne	Wybrane gatunki o znaczeniu klinicznym
I	Paciorkowce ropotwórcze	<i>S. pyogenes</i> <i>S. agalactiae</i> <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
II	Grupa <i>Streptococcus bovis</i>	<i>S. bovis</i> (<i>S. equinus</i>)
III	Grupa <i>Streptococcus mitis</i>	<i>S. mitis</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>S. oralis</i> <i>S. sanguis</i>
IV	Grupa <i>Streptococcus mutans</i>	<i>S. mutans</i> <i>S. sobrinus</i>
V	Grupa <i>Streptococcus salivarius</i>	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
VI	Grupa <i>Streptococcus milleri</i> / <i>Streptococcus anginosus</i>	<i>S. anginosus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. constelatus</i> subsp. <i>constelatus</i> <i>S. constelatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>
VII	Inne gatunki o nieustalonej przynależności	<i>S. pleomorphus</i>

3.2. Charakterystyka *Streptococcus agalactiae*

3.2.1. *Streptococcus agalactiae* - od patogenu zwierzęcego do ludzkiego

Badania nad paciorkowcem *S. agalactiae* zostały zapoczątkowane przez naukowców zajmujących się weterynarią, którzy poszukiwali czynnika etiologicznego choroby, charakteryzującej się stanem zapalnym wymion i oddawaniem przez krowy małej ilości, nienadającego się do picia mleka. Rolę paciorkowców (paciorkowiec bezmleczności) jako czynnika etiologicznego tej choroby odkryli w roku 1884 roku Nocard i Mollareau. W latach 1884-87 prowadzili doświadczenia, polegające na izolowaniu paciorkowców z wymion chorych krow. Wyizolowane bakterie namnażali na

podłożach stałych i płynnych, a następnie otrzymane hodowle wykorzystali do przeprowadzenia eksperymentalnych infekcji, które potwierdziły, iż bakterie te są czynnikiem etiologicznym zapalenia gruczołów mlecznych u bydła. Nazwa *S. agalactiae* została po raz pierwszy użyta w roku 1893 przez Kitta. Lehman i Neumann w roku 1896 sklasyfikowali tę bakterię do gatunku, podając nazwę systematyczną *S. agalactiae* [Köhler, 2004].

Przez wiele lat *S. agalactiae* uważany był za patogen wyłącznie zwierzęcy. Mimo, iż izolowany był z wymazów z pochwy od kobiet po porodzie, to nie wiązano go początkowo z zakażeniami u ludzi. Pierwsze doniesienia o zakażeniu człowieka spowodowanym przez *S. agalactiae* pojawiły się w latach 30. XX wieku. *S. agalactiae* jako przyczyna sepsy połogowej został po raz pierwszy opisany w 1935 roku, przez Lancefield i Hare [Lancefield i Hare, 1935]. W roku 1938 Fry odnotował trzy przypadki śmiertelnej sepsy połogowej spowodowanej przez ten drobnoustrój, jednak nadal infekcje u ludzi powodowane przez paciorkowce grupy B obserwowano rzadko [Fry, 1938; Stevens, 2000]. Dopiero z początkiem lat 60. XX wieku zaczęto obserwować rosnącą częstość zakażeń okołoporodowych powodowanych przez *S. agalactiae*. W 1958 roku Nyhan i Fousek opisali zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków spowodowane przez GBS. W roku 1960 doniesienia o zakażeniach okołoporodowych powodowanych przez paciorkowce grupy B opublikowali m.in. Eickhoff i wsp. oraz Butter i Moor [Stevens, 2000]. Dzięki powyższym badaniom wykazana została zależność pomiędzy występowaniem tej bakterii, a złym stanem zdrowia położnicy i noworodka.

Od początku lat 70. XX wieku w USA obserwowano znaczny wzrost udziału paciorkowca grupy B jako czynnika etiologicznego posocznicy noworodków i niemowląt [Barton, 1973; Franciosi, 1979]. W latach 80. XX wieku *S. agalactiae* stał się jedną z najczęstszych przyczyn posocznicy i zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków w wielu krajach rozwiniętych [Le Doare i Heath, 2013]. Zapoczątkowało to intensywne badania nad epidemiologią, patogenezą oraz profilaktyką zakażeń powodowanych przez tego paciorkowca. Badania mikrobiologiczne i epidemiologiczne wykazały, że do transmisji patogenu dochodzi drogą wertykalną z matki na dziecko w trakcie porodu, a źródłem drobnoustroju są skolonizowane drogi rodne matki [Allardice, 1982; Stevens, 2000; Koenig i Keenan, 2009; Melin, 2011].

Do tej pory nie zostało jednoznacznie wyjaśnione czy, i w jaki sposób doszło do przeniesienia patogenu zwierzęcego na człowieka. Zważywszy, iż paciorkowce grupy B zaczęły „nagle” w latach 60-70. XX wieku odgrywać znaczącą rolę w zakażeniach

okołoporodowych, po długiej historii wywoływanych przez nie chorób u bydła, postulowano, że paciorkowce te zostały przeniesione na człowieka od bydła. Przepuszczano, że wraz z zakażonym mlekiem krowim szczepy *S. agalactiae* skolonizowały przewód pokarmowy ludzi. Inna hipoteza uwzględniała w przeniesieniu *S. agalactiae* na człowieka rolę ryb morskich i słodkowodnych, ponieważ bakteria ta powoduje również zakażenia u ryb. Początkowo prowadzone badania sugerowały, że szczepy odzwierzęce, pochodzące zarówno od bydła, jak i od ryb są prawie identyczne ze szczepami ludzkimi, wskazując na wspólnych przodków. Wraz z rozwojem metod pozwalających badać pokrewieństwo drobnoustrojów hipotezy te zostały jednak obalone. Badania wykazały, że szczepy GBS izolowane od ludzi, bydła i ryb stanowią odrębne genetycznie populacje. Jednakże ostatnie badania z zastosowaniem najnowszych metod molekularnych wskazują, że serotyp Ia GBS może być zoofilny [Bisharat, 2004; Manning, 2010].

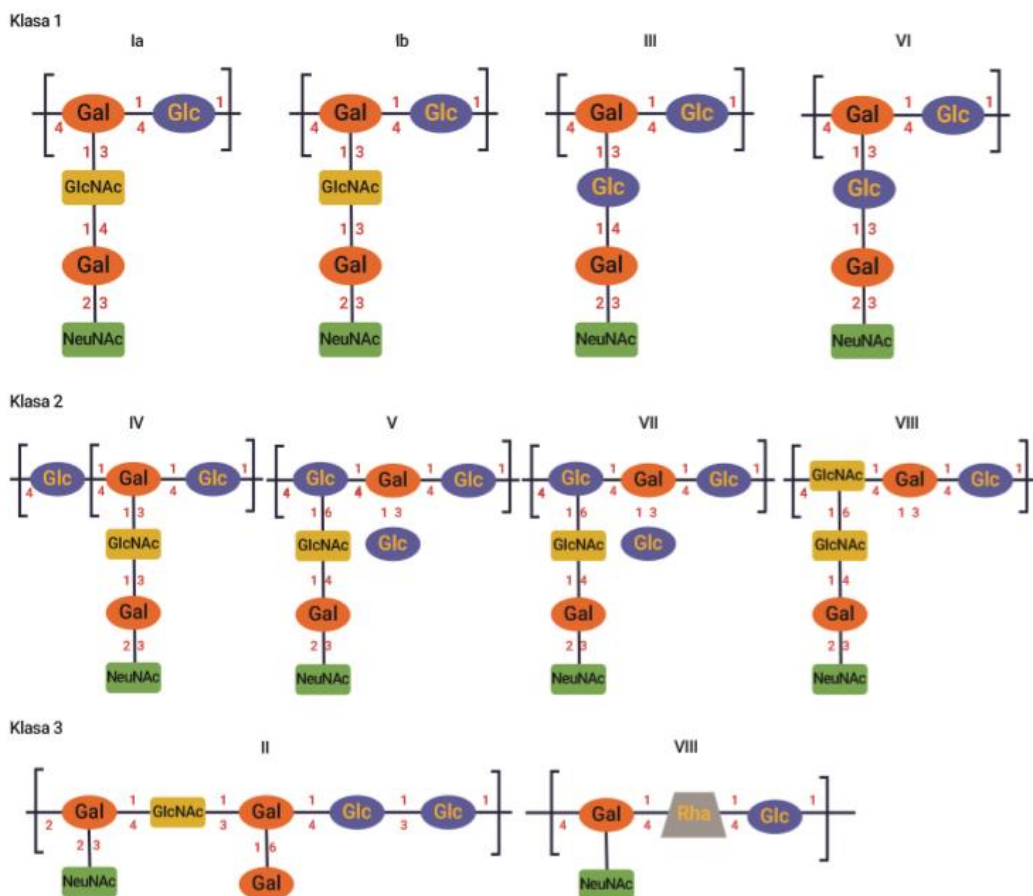
3.2.2. Morfologia i cechy identyfikacyjne *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae jest Gram-dodatnim ziarenkowcem, w obrazie mikroskopowym układającym się w pary lub krótkie łańcuszki. Należy do bakterii fakultatywnie beztlenowych, jest katalazo i oksydazo – ujemny. Charakteryzuje się brakiem zdolności ruchu, brakiem hydrolizy eskuliny, posiada zdolność hydrolizy kwasu hipurowego, wytwarza termostabilne białko zewnątrzkomórkowe, które działa synergistycznie z beta-hemolizyną *Staphylococcus aureus* dając dodatni wynik w teście Christie – Atkins – Munch Petersen (CAMP). Jest naturalnie oporny na bacytracynę i kotrimoksazol. Na podłożu krwawym rośnie w postaci małych, szarawych kolonii o średnicy 3-4 mm, często otoczonych wąską strefą hemolizy. Kolonie *S. agalactiae* mogą też wykazywać brak hemolizy lub heterogeny fenotyp ekspresji genu kodującego hemolizynę [Żabicka i Hryniewicz, 2008; Szewczyk, 2013]. Wymienione cechy, jak również stwierdzenie obecności wielocukru charakterystycznego dla paciorkowców grupy B na powierzchni komórek wykorzystywane są do identyfikacji *S. agalactiae*.

W oparciu o różnice w strukturze polisacharydów otoczkowych (*ang.* Capsular Polisacharyde, CPS) wyróżniono 10 serotypów *S. agalactiae*, oznaczonych jako Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII i IX. Serotyp IX opisany został jako ostatni w 2007 roku [Slotved, 2007]. Polimery otoczkowe ze względu na obecność w ich strukturze kwasu sjałowego są ważnym czynnikiem zjadliwości *S. agalactiae*. Częstość występowania poszczególnych

serotypów otoczkowych jest różna w zależności od regionu geograficznego. W Europie i Ameryce Północnej dominują serotypy Ia, Ib, II, III i V [Zaleznik, 1999; Gherardi, 2007; Barcaite, 2008; Ippolito, 2010; Lamagni, 2013; Florindo, 2014]. Serotypy IV i V dominują w Zjednoczonych Emiratach Arabskich i Egipcie [Amin, 2002; Shabayek, 2014]. W Japoni w latach 90-tych wśród szczepów izolowanych od kobiet ciężarnych dominowały serotypy VI i VIII (stanowiły łącznie około 60% izolatów) [Lachenauer 1999; Kimura, 2013], w ostatnich latach udział tych serotypów obniżył się do około 26%, wzrosła natomiast częstość izolacji serotypów I, III i V [Kimura, 2013]. Serotyp VIII jest rzadko identyfikowany poza Japonią. Najnowsze publikacje przedstawiają wyniki meta-analiz, z których wynika, że 97% inwazyjnych szczepów GBS izolowanych od noworodków należy do pięciu serotypów (Ia, Ib, II, III i V) [Madrid, 2017]. Równocześnie zaobserwowano pojawienie się inwazyjnych szczepów serotypu IV u noworodków i dorosłych [Teatero, 2015; Alhazmi, 2016].

Otoczka polisacharydowa *S. agalactiae* zbudowana jest z następujących elementów: N-acetyloglukozaminy, glukozy, galaktozy oraz cząsteczki kwasu sialowego. Wśród szczepów GBS występuje wysokie zróżnicowanie strukturalne wielocukrów. Na podstawie różnic w strukturze chemicznej wyróżnia się trzy klasy CPS (Rycina 1) [Lin, 2018]. W klasie pierwszej powtarzająca się jednostka składa się z dwóch cukrów zawierających łańcuch boczny, którego koniec posiada resztę kwasu sialowego. W klasie drugiej powtarzająca się jednostka składa się z trzech cukrów zawierających łańcuch boczny z resztą kwasu sialowego, natomiast klasa trzecia CPS nie wykazuje podobieństwa do innych CPS. Polisacharydy otoczkowe u bakterii reprezentujących różne serotypy, z wyjątkiem VI i VIII zawierają N-glukozaminę, natomiast serotypu VIII, jako jedyne zawierają ramnozę [Lin, 2018]. *S. agalactiae* charakteryzuje się także obecnością specyficznych białek powierzchniowych. Należą do nich białka α -C oraz β -C wchodzące w skład antygeny C, białka R1, R2, R3 oraz białka z rodziny Alp.



Rycina 1. Budowa polisacharydów otoczkowych GBS (opracowane na podstawie Lin i wsp. [Lin, 2018]).

3.2.3. Epidemiologia i chorobotwórczość *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae jest bakterią komensalną, która może kolonizować między innymi dystalny odcinek przewodu pokarmowego, układ moczowy i narządy płciowe u zdrowych ludzi. Kolonizacja może mieć charakter przejściowy, przewlekły lub nawracający. W badaniach przesiewowych stwierdzono kolonizację i bezobjawowe nosicielstwo w pochwie i odbycie u 10-40% kobiet w wieku rozrodczym [Żabicka i Hryniewicz, 2008; Brzychczy-Włoch, 2014]. Częstość kolonizacji przez paciorkowce grupy B wzrasta wraz z wiekiem - od 10% u noworodków do 20-40% u osób dorosłych. Oznacza to, że transmisja GBS występuje nie tylko w okresie okołoporodowym, lecz także w późniejszym życiu [Landwehr-Kenzel i Henneke, 2014].

Częstość kolonizacji *S. agalactiae* u kobiet w ciąży w Europie mieści się w zakresie od 6,5 do 40%. W Polsce szacuje się ją na około 20%, z niewielkimi wahaniami w zależności od regionu [Kowalska, 2003; Brzychczy-Włoch, 2008]. Wśród czynników predysponujących do kolonizacji pochwy przez GBS u kobiet wymienia się intensywną kolonizację przewodu pokarmowego, wysoki wskaźnik Body Mass Index, rasę czarną, wiek powyżej 36 r.ż., niski poziom witaminy D, dużą aktywność seksualną, niewłaściwe praktyki higieniczne, a także pracę zawodową w służbie zdrowia [Stapleton, 2005; Le Doare i Heath, 2013; Khan, 2015; Capan-Melser, 2015; Akoh, 2017]. Do czynników ryzyka zwiększających możliwość kolonizacji i rozwoju infekcji u noworodka zaliczyć można intensywną kolonizację dróg rodnych matki, poród trwający dłużej niż 12 godzin, czas od pęknięcia błon płodowych do porodu dłuższy niż 18 godzin, śródporodową temperaturę ciała matki wyższą niż 38°C, poród przedwczesny przed ukończeniem 37 tygodnia ciąży, masę urodzeniową dziecka mniejszą niż 2500 g oraz brak antybiotykowej profilaktyki okołoporodowej [Szwabowicz i Panasiuk, 2012]. Zaobserwowano również, że noworodki urodzone przez matki skolonizowane przez GBS, w porównaniu do noworodków matek niebędących nosicielami tego drobnoustroju, trzy razy częściej wymagają intensywnej opieki neonatologicznej [Brigsten, 2015]. Ponadto pojawiły się doniesienia o związku kolonizacji GBS ze zwiększonym ryzykiem wystąpieniem u dziecka astmy [Wu, 2016].

Około 10% wszystkich noworodków, przynajmniej czasowo, skolonizowanych jest przez GBS, natomiast tylko u 1% z nich stwierdza się chorobę inwazyjną [Landwehr-Kenzel i Henneke, 2014]. W większości przypadków bakterie *S. agalactiae* stają się elementem mikrobiomów dziecka lub są wypierane z zajmowanej niszy przez inne bakterie [Landwehr-Kenzel i Henneke, 2014]. Laclair i wsp. wykazali ochronną rolę naturalnej mikrobioty pochwy przed kolonizacją paciorkowcami grupy B [Leclair, 2010].

Pomimo wprowadzenia w Stanach Zjednoczonych i wielu krajach europejskich okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej, paciorkowce grupy B są nadal bardzo istotnym czynnikiem etiologicznym zakażeń okołoporodowych. Kobiety w ciąży są grupą, która jest szczególnie podatna na zakażenie *S. agalactiae*, ponieważ zmiany hormonalne i zmiany pH środowiska pochwy stwarzają korzystne warunki do namnażania tych bakterii. Wzrost liczby komórek *S. agalactiae* w pochwie może stanowić zagrożenie dla ciężarnej kobiety, płodu i noworodka.

Zakażenia *S. agalactiae* u kobiet w ciąży i po porodzie przebiegają najczęściej pod postacią zapalenia dróg moczowych. Jednak kolonizacja *S. agalactiae* może prowadzić

również do zakażenia wewnątrzmacicznego drogą wstępującą. Dochodzi wtedy do zapalenia błon płodowych, zapalenia błony śluzowej macicy lub posocznicy. Bakterie przenikają do płynu owodniowego, przez co może dojść do zgonu wewnątrzmacicznego, zapalenia płuc lub posocznicy w okresie noworodkowym. W przypadku infekcji wewnątrzmacicznych ryzyko zakażenia płodu wzrasta, jeśli dojdzie do pęknięcia błon płodowych [Heath, 2009].

U kobiet skolonizowanych *S. agalactiae* występuje statystycznie wyższe ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego. Ryzyko kolonizacji paciorkowcami grupy B u dzieci urodzonych przez matki nosicielki GBS wynosi 50-70%. Bakterie, w konsekwencji transmisji wertykalnej, w pierwszej kolejności kolonizują jamę ustną, a następnie układ oddechowy i dalsze odcinki przewodu pokarmowego noworodka. Zakażenia, w zależności od ich przebiegu i czasu wystąpienia objawów, dzieli się na wczesny zespół chorobowy (EOD, *ang.* Early Onset Disease), późny zespół chorobowy (LOD, *ang.* Late Onset Disease) oraz opóźniony późny zespół chorobowy (LLOD *ang.* Late, Late-Onset Disease). Im więcej komórek bakteryjnych trafia w trakcie porodu do organizmu noworodka, tym wyższe jest ryzyko wystąpienia u niego zarówno wczesnego, jak i późnego zespołu chorobowego [Heath, 2009; Le Doare i Heath, 2013].

Wczesny zespół chorobowy ujawnia się do siedmiu dni po porodzie i manifestuje się bakteriecią, zapaleniem płuc i zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych, śmiertelność noworodków wynosi wówczas 5-10%. EOD stanowi około 60-70% wszystkich przypadków okołoporodowych zakażeń GBS [Zaleznik, 1999; Weisner, 2004; Żabicka i Hryniewicz, 2008]. Ryzyko transmisji wertykalnej GBS, a tym samym wystąpienia EOD, zmniejsza istotnie okołoporodowa profilaktyka antybiotykowa [Le Doare i Heath, 2013; Russell, 2017]. Późny zespół chorobowy, który ujawnia się w ciągu 3-4 tygodni po porodzie, manifestuje się głównie zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych lub bakteriecią, rzadziej zapaleniem kości i stawów, a śmiertelność wynosi 2-6%. Opóźniony późny zespół chorobowy występuje u dzieci starszych niż 3 miesiące, manifestuje się najczęściej posocznicą z niską śmiertelnością [Żabicka i Hryniewicz, 2008; Melin, 2011].

W ostatnich latach obserwuje się wzrost liczby zakażeń u osób dorosłych, nie związanych z ciążą [Blancas, 2004; Phares, 2008; Skoff, 2009]. Zakażenia dotyczą przede wszystkim pacjentów w wieku powyżej 60 roku życia, z obniżoną odpornością, chorobami towarzyszącymi tj. cukrzyca, marskość wątroby, choroba nowotworowa, zaburzenia funkcji nerek, choroby układu sercowo-naczyniowego i oddechowego czy obecność protez stawowych. Przebiegają pod postacią bakteriemii, zapalenia skóry i tkanki podskórnej,

zapalenia płuc, zapalenia wsierdzia, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenia kości i stawów oraz zapalenia dróg moczowych [Blancas, 2004; Edwards, 2005; Huang, 2006; Skoff, 2009].

Początkowo w latach 1970-1980 we wszystkich rodzajach zakażeń inwazyjnych *S. agalactiae* rozpoznawany był serotyp III. Począwszy od lat dziewięćdziesiątych wzrosła rola innych serotypów. Za wczesne zakażenia noworodków w Stanach Zjednoczonych i Europie odpowiadają głównie serotypy Ia (35-40%) i III (25-30%), natomiast późne zakażenia wywoływane są głównie przez serotyp III (70%) i rzadziej przez serotypy Ia i V [Weisner, 2004]. Około 90% izolatów należących do serotypu III odpowiedzialnych za zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych to hiperwirulentny klon ST17. Serotypy Ia, III i V odpowiadają również za większość zakażeń inwazyjnych u kobiet w ciąży. Natomiast wśród szczepów izolowanych z zakażeń niezwiązanych z ciążą dominowały serotypy V i Ia, a w dalszej kolejności serotypy III i II [Edwards, 2005; Gherardi, 2007; Phares, 2008]. Przyczyny obserwowanych różnic w rozkładzie serotypów między dorosłymi z chorobą inwazyjną, nie będącymi w ciąży a kobietami w ciąży i noworodkami, nie zostały jeszcze wyjaśnione.

3.2.4. Czynniki zjadliwości *Streptococcus agalactiae*

Infekcja GBS jest procesem wieloetapowym, w który zaangażowane są różne czynniki zjadliwości, wymienione w Tabeli 3 [Rajgopal, 2009; Łysakowska, 2013; Landwehr-Kenzel i Henneke, 2014].

Tabela 3. Wybrane czynniki wirulencji *S. agalactiae* oraz ich rola w patogenezie zakażeń, zestawienie opracowane na podstawie Landwehr-Kenzel i Henneke [Landwehr-Kenzel i Henneke, 2014]

Czynnik wirulencji	Kolonizacja/ adhezja	Inwazja	Unikanie mechanizmów obronnych gospodarza	Neurotropizm
Białko wiążące fibrynogen (FbsA)	+	-	-	-
Białko wiążące fibrynogen (FbsB)	-	+	-	-
Białko wiążące fibrynogen (FbsC)	+	(+)	-	-
Białko wiążące lamininę (Lmb)	-	+	-	+
Białko powierzchniowe α -C (APC)	+	+	+	-
Białka bogate w powtórzenia seryny (Srr)	+	+	-	-
Fimbrie	+	+	+	+
Hiperwirulentna adhezyna (HvgA)	+	+	(+)	+
β -hemolizyna/cytolizyna (β -H/C)	+	+	+	+
Otoczka polisacharydowa (CPS)	-	-	+	-
Peptydaza C5a (ScpB)	-	-	+	-
Immunogenna adhezyna bakteryjna (BibA)	-	-	+	-
Czynnik H	-	-	+	-
Dysmutaza nadtlenkowa (SodA)	-	-	+	-

+ oznacza zbadaną rolę w patogenezie zakażeń, a (+) oznacza sugerowaną rolę

Białka wiążące fibrynogen FbsA, FbsB i FbsC zgodnie z ich nazwą odpowiedzialne są za zdolność wiązania szczepów GBS do ludzkiego fibrynogenu. Zdolność ta jest kluczowa w promowaniu kolonizacji i inwazji barier gospodarza. Wykazano, że mutanty GBS pozbawione białka FbsA, odpowiedzialnego za wiązanie do ludzkiego fibrynogenu, były bardziej wrażliwe na fagocytozę w porównaniu z typem dzikim posiadającym wymienione białko. Białko FbsA promuje przyczepność, natomiast FbsB pośredniczy w inwazji komórek gospodarza [Rajagopal, 2009; Buscetta, 2014]. Białko FbsC opisane początkowo jako adhezyna powierzchniowa BsaB może pełnić ważną rolę w inwazyjnych zakażeniach GBS. Sugeruje się, że białko FbsC bierze udział w formowaniu struktury biofilmu oraz w ochronie bakterii przed fagocytozą [Buscetta, 2014; Jiang i Wessels 2014].

W adhezji szczepów GBS do lamininy komórek gospodarza pośredniczy białko wiążące lamininę (Lmb). Mutanty GBS pozbawione Lmb wykazywały zmniejszoną przyczepność do ludzkiej lamininy i komórek mikronaczyniowych śródbłonna ludzkiego mózgu. Bakteryjne przyleganie do macierzy zewnątrzkomórkowej przez Lmb wydaje się ważne dla przenikania GBS poprzez nabłonek jelit i przez barierę krew-mózg [Spellerberg, 1999; Tenenbaum, 2007].

Przyleganie szczepów GBS do komórek gospodarza jest również ułatwione przez immunogenną adhezynę bakteryjną (BibA), która odgrywa ważną rolę w mechanizmie oporności na fagocytozę. Zaobserwowano cztery różne odmiany BibA kodowane przez szczepy GBS. Rola każdej z tych odmian w patogenezie GBS wymaga dalszych badań [Santi, 2007].

Poszczególne serotypy GBS charakteryzują się obecnością specyficznych białek powierzchniowych (β -C, R1, R3, R4 oraz białka z rodziny Alp). Na rodzinę białek Alp składają się: białko α -C oraz Epsilon, Alp1, Alp2, Alp3, Alp4 i Rib. Białka te również odgrywają istotną rolę w adhezji [Creti, 2004; Gherardi, 2007]. Ich geny charakteryzują się strukturą mozaikową, z niezmiennymi końcami 5' i 3' oraz wysoce zmiennym regionem wewnętrznym zawierającym tandemowe powtórzenia. Białko α -C kodowane przez gen *bca* ułatwia wnikanie bakterii do komórek gospodarza, w szczególności odpowiedzialne jest za inwazję do nabłonka szyjki macicy. Białko to wiąże się z glikozaminoglikanami lub α 1 β 1-integrzynami na powierzchni komórek nabłonka. Białko α -C ulega ekspresji na powierzchni serotypów Ia, Ib i II, natomiast rzadko u szczepów serotypu III [Baron, 2007; Bolduc, 2007; Łysakowska, 2013]. U większości szczepów odpowiedzialnych za zakażenia inwazyjne u noworodków stwierdza się obecność białka Rib [Stalhammar-Carlemalm, 1993; Sadowy, 2010].

Druga grupa czynników adhezyjnych zawierających powtórzenia tandemowe to białka bogate w powtórzenia seryny (Srr), które oddziałują z ludzką keratyną (Srr-1) oraz fibrynogenem [Seo, 2013]. Szczepy GBS serotypu Ia, Ib, II, V i niektóre szczepy serotypu III mają wspólne białko Srr zwane Srr-1, natomiast część szczepów serotypu III koduje białko Srr-2. Wykazano, iż szczepy GBS kodujące białko Srr-2 były bardziej zjadliwe w modelu mysim posocznicy noworodkowej w porównaniu ze szczepami Srr-1 [Rajagopal, 2009]. Ostatnio Sheen i wsp. na podstawie analizy izogenicznych mutantów GBS pozbawionych fimbrii i białek Srr, wykazali, że czynniki te związane są z przyleganiem do komórek gospodarza [Sheen, 2011].

Ważną rolę w adhezji do komórek gospodarza oraz tworzeniu biofilmu odgrywają również trzy typy fimbrii: PI-1, PI-2a i PI-2b. Struktury te kodowane przez geny umiejscowione w dwóch *loci* (PI-1 i PI-2) zostały po raz pierwszy opisane u *S. agalactiae* w 2005 roku przez zespół badaczy z Włoch. Zbudowane są one z głównej podjednostki - białka podstawowego BP, oraz dwóch białek pomocniczych - AP1 i AP2 [Lauer, 2005; Rosini, 2006]. Stwierdzono różnice strukturalne między *loci* PI-1 i PI-2. PI-1 to element o wielkości 16 kb, który znajduje się pomiędzy genami *sag0633* i *sag0652*, jest otoczony przez sekwencje powtórzone, co ułatwia horyzontalny transfer genów. PI-2a i PI-2b zlokalizowane są w tym samym miejscu pomiędzy genami *sag1410* i *sag1403*, w związku z czym nie występują jednocześnie [Rosini, 2006].

Fimbrie promują przyleganie do komórek nabłonka, tworzenie biofilmu oraz ułatwiają translokację przez barierę krew-mózg. Modele *in vitro* zakażenia GBS pokazały, że białka pomocnicze AP inicjują przyleganie do różnych tkanek, podczas gdy białka podstawowe BP ułatwiają inwazję i przemieszczanie się pomiędzy komórkami gospodarza. Każdy szczep ma jeden lub dwa rodzaje fimbrii [Maisey, 2007; Pezzicoli, 2008].

Stwierdzono, że fimbrie typu PI-1 odgrywają ważną rolę w unikaniu mechanizmów odporności wrodzonej gospodarza. Ponadto, fimbrie PI-1 wydają się nie odgrywać roli w procesie adhezji bakteryjnej do komórek nabłonka płuc, pochwy lub szyjki macicy [Jiang, 2012]. Zaobserwowano natomiast, że fimbrie PI-2a w przeciwieństwie do PI-1 i PI-2b biorą udział w adhezji i tworzeniu biofilmu [Konto-Ghiorgi, 2009; Rinaudo, 2010]. Jednakże Rinaudo i wsp. w badaniu z wykorzystaniem mutantów insercyjnych i delecyjnych obserwowali, że dość duża liczba szczepów mimo, że nie posiadała fimbrii 2a, była zdolna do tworzenia biofilmu. Prawdopodobnie u tych szczepów inne znane lub nieznanne jeszcze czynniki, które spełniają podobne funkcje (tj. właściwości adhezji) kompensują brak fimbrii [Rinaudo, 2010]. Fimbrie typu PI-2b wpływają na przeżycie wewnątrzkomórkowe bakterii w makrofagach, odgrywają rolę w promowaniu inwazyjności szczepów i interakcjach między bakteriami a komórkami gospodarza. Wykazano, że mutanty pozbawione PI-2b mają mniejszą zdolności do przylegania i inwazji komórek nabłonka i śródbłonka [Chattopadhyay, 2011; Lazzarin, 2017].

W badaniach prowadzonych na modelach mysich wykazano, że u myszy fimbrie typu 2a mają zasadnicze znaczenie dla zjadliwości GBS [Papaserghi, 2011], natomiast wszystkie trzy typy fimbrii wzbudzały syntezę przeciwciał, które chroniły badane myszy przed zakażeniem GBS [Margarit, 2009]. Rozwój badań nad wykorzystaniem fimbrii, jako

potencjalnych składników szczepionek przeciwko GBS jest jednak utrudniony ze względu na ich zmienną ekspresję u szczepów GBS [Margarit, 2009].

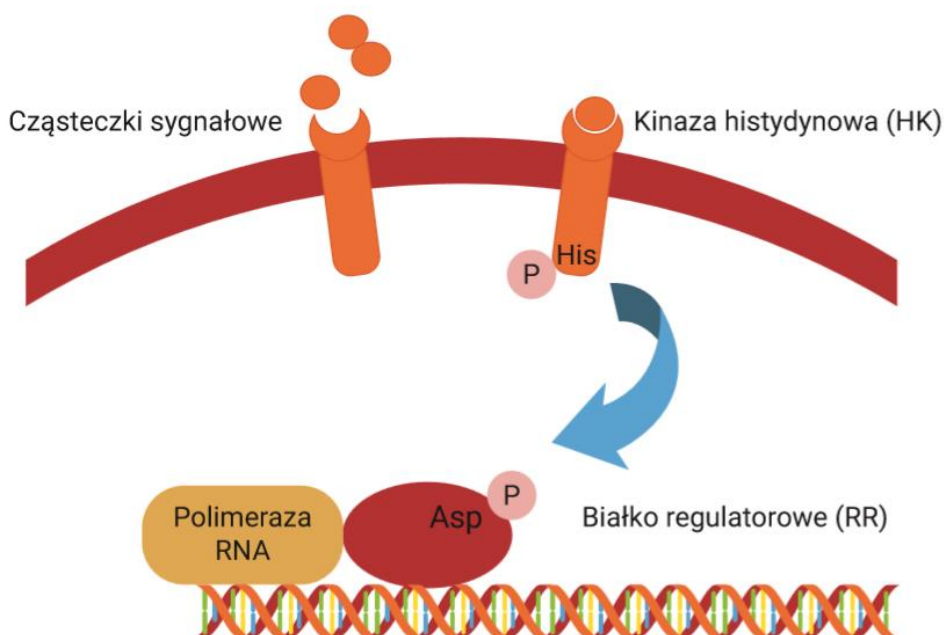
Szczepy *S. agalactiae* wytwarzają dwie toksyny: β -hemolizynę/cytolizynę (β -H/C) oraz czynnik Christie – Atkins –Munch Petersen (CAMP), które mają zdolność do niszczenia błon komórkowych i odgrywają ważną rolę w inwazji komórek gospodarza. β -H/C jest toksyną odpowiedzialną za pojawienie się charakterystycznej strefy β -hemolizy na podłożach z krwią baranią. Omawiana cytolizyna sprzyja inwazji bakterii do komórek nabłonka i śródbłonka płuc, jak również umożliwia przenikanie bariery krew-mózg [Hensler, 2005; Łysakowska, 2013]. Wykazano, iż szczepy GBS z niedoborem β -H/C wykazują osłabioną wirulencję w różnych modelach *in vivo* [Doran, 2003; Hansler, 2005]. Badania wykazały, że czynnik CAMP nie jest konieczny w patogenezie zakażeń - nie u wszystkich szczepów dochodzi do jego ekspresji [Rajagopal, 2009; Łysakowska, 2013].

W unikaniu mechanizmów obronnych gospodarza ważną rolę odgrywa otoczka polisacharydowa. Obecność w jej strukturze cząsteczki kwasu sialowego utrudnia prawidłowe zajście procesu fagocytozy poprzez hamowanie/inaktywację opsonizacji komórek bakteryjnych składową C3 układu dopełniacza [Marques, 1992]. Hamowanie fagocytozy jest dodatkowo wspierane przez peptydazę C5a (ScpB), która inaktywuje komponent C5a ludzkiego dopełniacza. Z opornością na fagocytozę związana jest również immunogenna adhezyna BibA oraz czynnik H [Santi, 2007].

3.2.5. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii

Komórki bakteryjne stale kontrolują warunki środowiska, w którym żyją i dostosowują się do zmian, jakie w nim zachodzą. Jest to możliwe dzięki różnorodnym mechanizmom regulacyjnym. Powszechnie u bakterii występują dwuskładnikowe systemy regulacyjne (*ang.* two-component system, TCS, lub *ang.* two componentic signal transduction system, TCSTS), które odpowiadają na sygnały zewnętrzne i wpływają na wiele procesów życiowych bakterii. Systemy regulacyjne dostosowują metabolizm bakterii do zmieniających się warunków środowiska oraz wpływają na ekspresję czynników wirulencji, co jest kluczowe dla przebiegu procesu patogenezy i unikania odpowiedzi ze strony układu immunologicznego gospodarza. Ponadto, systemy dwuskładnikowe zaangażowane są w kompetencję, koniugację oraz tworzenie biofilmu [Beier i Gross, 2006; Juda, 2007; Nowak i Tyski, 2012; Patras i Nizet, 2018].

Systemy dwuskładnikowe składają się ze związanego z błonami komórkowymi białka sensorowego - kinazy histydynowej oraz cytoplazmatycznego białka regulatorowego (Rycina 2). Kinaza histydynowa odbiera sygnał ze środowiska, dochodzi do autofosforylacji, a następnie do zmiany konformacyjnej białka regulatorowego, co umożliwia wiązanie się z DNA w rejonach promotorowych i wpływa na transkrypcję odpowiednich białek [Stock, 2000; Beier i Gross, 2006; Mascher, 2006; Nowak i Tyski, 2012].



Rycina 2. Schemat dwuskładnikowego systemu regulacyjnego u bakterii (opracowany na podstawie Gotoh i wsp. [Gotoh, 2010]).

Bakterie o większym genomie, zdolne do bytowania w różnych środowiskach i zasiedlania różnych nisz, a w szczególności bakterie chorobotwórcze, kodują zazwyczaj większą liczbę białek tworzących systemy dwuskładnikowe [Beier i Gross, 2006]. U szczepów GBS wykryto 20 systemów dwuskładnikowych, jednak rola jedynie czterech jest poznana – CovRS, DltRS, RgfCA i CiaRH [Łysakowska, 2013].

System CovRS (CsrRS) odgrywa kluczową rolę w kontroli wirulencji u szczepów GBS. Ściśle reguluje ekspresję fimbrii, BsaB, HvgA, jest zaangażowany w regulację

ekspresji β -H/C oraz wielu innych genów [Jiang, 2005; Lembo, 2010; Patras, 2013; Landwehr-Kenzel i Henneke, 2014; Jiang i Wessels, 2014]. Podsumowując, system CovRS podlega regulacji pod wpływem zmian warunków środowiska zewnętrznego i pozwala na adaptację bakterii/fenotypu bakterii do kolonizowanego miejsca infekcji.

3.3. Biofilm bakteryjny

Biofilm stanowi zorganizowaną, wielokomórkową społeczność mikroorganizmów przylegających do powierzchni ożywionych i nieożywionych, otoczoną zewnątrzkomórkowym śluzem. Tworzenie biofilmu jest procesem wieloetapowym, zależnym od wielu czynników genetycznych i środowiskowych. Struktura biofilmu chroni komórki bakteryjne przed mechanizmami obronnymi gospodarza (utrudnia fagocytozę, opsonizację), a także przed działaniem środków przeciwdrobnoustrojowych. Proces powstawania struktury biofilmu można podzielić na pięć etapów. Pierwszym etapem jest odwracalna adhezja drobnoustrojów. W fazie tej istotną rolę odgrywają oddziaływania międzycząsteczkowe, takie jak siły van der Waalsa, wiązania jonowe i wodorowe, temperatura oraz zewnątrzkomórkowe struktury bakteryjne, zwłaszcza fimbrie, na których występują grupy hydrofobowe. W drugiej fazie następuje adhezja nieodwracalna oraz rozpoczyna się proces wytwarzania zewnątrzkomórkowych polimerów. Na tym etapie formowania biofilmu kluczową rolę odgrywają różnego rodzaju adhezyny umiejscowione na powierzchni komórek bakteryjnych. Kolejnym etapem jest tworzenie mikrokolonii. Ważną rolę odgrywają na tym etapie sygnały stymulujące komórki bakteryjne do podziałów komórkowych i wzrostu. W czwartej fazie dochodzi do różnicowania mikrokolonii bakteryjnych w dojrzały biofilm. Ostatni etap w procesie powstawania biofilmu to dyspersja, polegająca na odrywaniu się pojedynczych komórek bakteryjnych, które mogą przemieszczać się i zasiedlać nowe nisze [Miller, 2001; Rinaudo, 2010; Abee, 2011; Ho, 2013].

Wiadomo, że ilość bakterii wytwarzających biofilm zmienia się w odpowiedzi na czynniki środowiskowe, takie jak substancje odżywcze, pH, temperatura i osmolarność. Struktura biofilmu zapewnia bakteriom większą oporność na antybiotyki i inne związki o działaniu przeciwbakteryjnym, umożliwia im przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiska i kolonizację nowych nisz ekologicznych.

Dotychczas tylko nieliczne eksperymenty wykazały tworzenie biofilmu przez szczepy GBS [Kaur, 2009; Rinaudo, 2010; Borges, 2012; Ho, 2013].

3.4. Wpływ mikrobioty pochwy na kolonizację *Streptococcus agalactiae*

Mikrobiota pochwy w warunkach fizjologicznych chroni ją przed patogenami oraz aktywuje odpowiedź immunologiczną gospodarza poprzez wytwarzanie różnych związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym [Petrova, 2015].

Najnowsze badania mikrobioty pochwy pozwoliły na wyodrębnienie pięciu grup społeczności drobnoustrojów w tym środowisku. Cztery spośród nich są zdominowane przez różne gatunki *Lactobacillus* (grupa I – *L. crispatus*, grupa II- *L. gasseri*, grupa III – *L. iners*, grupa V – *L. jensenii*). Natomiast w grupie IV, niezdominowanej przez jeden gatunek *Lactobacillus* wyodrębniono podgrupy A i B. Podgrupa IV – A charakteryzuje się zróżnicowaną mikrobiotą (*L. crispatus*, *L. iners*, inne *Lactobacillus* oraz różne gatunki bakterii beztlenowych). Podgrupa IV – B charakteryzuje się zróżnicowaną mikrobiotą bez obecności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (*Atopobium*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Sneathia*, *Gardnerella*, *Mobiluncus*) [Ravel, 2011; Kamińska i Gajęcka, 2017]. W czasie ciąży obserwuje się zmniejszenie różnorodności gatunków w obrębie mikroflory pochwy, z dominacją gatunków *Lactobacillus*, a w dalszej kolejności bakterii z rzędu *Clostridiales*, *Bacteroidales* i *Actinomycetales* [Aagaard, 2012; Nuriel-Ohayon, 2016; Kamińska i Gajęcka, 2017].

Wyniki badań dotyczących zależności pomiędzy mikrobiotą pochwy a kolonizacją *S. agalactiae* nie są jednoznaczne. W części doniesień na ten temat wykazano redukcję populacji *Lactobacillus* u kobiet skolonizowanych paciorkowcami grupy B [Altoparlak, 2004; Ronnqvist, 2006], natomiast inne badania nie dowodzą takich zmian [Brzywczy-Włoch, 2014; Rick, 2017]. Wykazano, że niektóre szczepy *Lactobacillus* mają zdolność w warunkach *in vitro* do hamowania przylegania GBS do komórek nabłonka pochwy [Zarate, 2006; Ortiz, 2014]. De Gregorio i wsp. zaobserwowali również *in vivo* na modelach mysich, że badane przez nich szczepy *Lactobacillus* ograniczały kolonizację GBS [De Gregorio, 2015; De Gregorio, 2016].

Paciorkowce grupy B posiadają kilka mechanizmów/czynników wirulencji, które pozwalają im przeżyć i konkurować z innymi składnikami mikrobiomu pochwy. Należy do nich niedawno opisany u GBS transporter manganu MntH, który chroni bakterie przed reaktywnymi formami tlenu i wspiera wzrost GBS w warunkach niskiego pH [Shabayek, 2016]. Ponadto, *S. agalactiae* jest z natury oporny na działanie nizyny, lantibiotyku wytwarzanego przez *Lactococcus lactis* [Khosa, 2016]. W badaniach *in vitro* wykazano, że *S. agalactiae* może także hamować wzrost innych drobnoustrojów, takich jak paciorkowce

grup A, B, C i G, *Gardnerella vaginalis* oraz *Lactobacillus* spp. [Chaisilwattana i Monif, 1995].

Dalsze badania nad interakcjami pomiędzy mikrobiota pochwy i *S. agalactiae* mogą przyczynić się do rozwoju nowych strategii zapobiegania zakażeniom okołoporodowym.

3.5. Profilaktyka zakażeń okołoporodowych GBS oraz zalecenia dotyczące wykrywania nosicielstwa paciorkowców grupy B u kobiet ciężarnych

Badania nad kolonizacją dróg rodnych kobiet przez *S. agalactiae* oraz nad czynnikami ryzyka wystąpienia wczesnych i późnych zakażeń okołoporodowych zostały zapoczątkowane w latach 80. XX wieku. Naukowcy intensywnie zajmowali się także zagadnieniem antybiotykowej profilaktyki okołoporodowej [Allardice, 1982; Boyer, 1986; Rekomendacje CDC, 2010]. Badania te stanowiły podstawę do opracowania przy udziale lekarzy klinicystów, naukowców oraz organizacji zdrowia publicznego rekomendacji dotyczących profilaktyki zakażeń okołoporodowych wywoływanych przez *S. agalactiae*. Zostały one wydane w 1990 przez Amerykańskie Towarzystwo Położników i Ginekologów oraz Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorób (*ang.* Centers for Disease Control and Prevention, CDC). Najnowsze wytyczne opracowane przez CDC zostały opublikowane w 2010 roku [Rekomendacje CDC, 2010]. Podobne rekomendacje zalecające badania przesiewowe oraz profilaktykę okołoporodową zostały wprowadzone w większości krajów europejskich: Niemcy (1996), Hiszpania (1998), Francja (2001), Belgia (2003), Szwajcaria (2007) [Melin, 2011]. W Polsce zalecenia dotyczące wykrywania nosicielstwa paciorkowców grupy B u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom u noworodków spowodowanym przez ten drobnoustrój zostały opracowane i wydane w 2008 roku [Kotarski, 2008], a od 2011 roku badania w kierunku nosicielstwa *S. agalactiae* u kobiet ciężarnych są obowiązkowe.

Opracowanie i wdrożenie do praktyki lekarskiej powyższych rekomendacji przyczyniło się do ograniczenia zachorowalności i śmiertelności wśród noworodków i niemowląt. W latach 80. XX wieku w USA co roku odnotowywano około 7600 przypadków zakażeń noworodków, z czego około 310 kończyło się zgonem. Dzięki wprowadzeniu standardów dotyczących wykrywania GBS u kobiet ciężarnych, poprawie jakości diagnostyki mikrobiologicznej, a także stosowaniu antybiotykowej profilaktyki

okołoporodowej udało się zmniejszyć umieralność noworodków z 15–25% w latach 80-tych do około 4–6% w ostatnich latach [Rekomendacje CDC, 2010].

Zgodnie z Rekomendacjami Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego (PTG) [Kotarski, 2008] wszystkie kobiety ciężarne powinny być poddane przesiewowym badaniom mikrobiologicznym w kierunku obecności GBS między 35 a 37 tygodniem ciąży. W celu stwierdzenia nosicielstwa należy pobrać wymaz z przedsionka pochwy oraz z odbytnicy. Po wyizolowaniu szczepów GBS, należy wykonać oznaczenie wrażliwości na erytromycynę i klindamycynę z oznaczeniem fenotypu MLS_B , a ze względu na to, iż wszystkie szczepy GBS są wrażliwe na penicylinę oznaczenie wrażliwości na ten antybiotyk może zostać pominięte. Zgodnie z cytowanymi rekomendacjami „próby eradykacji nosicielstwa podczas ciąży wiążą się z szybkim jego nawrotem po odstawieniu leku, dlatego nie wolno podejmować prób jego eradykacji antybiotykami i odstępować od profilaktyki okołoporodowej.

Oprócz stwierdzonego nosicielstwa GBS w 35-37 tygodniu ciąży, Rekomendacje PTG zalecają wdrożenie profilaktyki okołoporodowej u:

- „- kobiet, u których wynik badania mikrobiologicznego jest ujemny, ale w wywiadzie pacjentka podaje wystąpienie zakażenia okołoporodowego *S. agalactiae* u któregoś z poprzednich dzieci;
- kobiet, u których wynik badania mikrobiologicznego jest ujemny, ale wcześniej w obecnej ciąży stwierdzono obecność *S. agalactiae* w moczu;
- kobiet, u których poród rozpoczął się przed wykonaniem planowych badań na nosicielstwo *S. agalactiae* (przed 35-37 tyg.);
- kobiet, u których nieznane są wyniki badań nosicielstwa, ale które zgłosiły się do szpitala po 18h od pęknięcia błon płodowych;
- kobiet, u których nieznane są wyniki badań nosicielstwa, ale, u których temperatura ciała $\geq 38^\circ\text{C}$ ” [Kotarski, 2008].

Lekarz przygotowujący pacjentkę do porodu dokonuje wyboru antybiotyku do profilaktyki okołoporodowej, kierując się algorytmem doboru antybiotyku przedstawionym w omawianych Rekomendacjach. Zgodnie z zaleceniami, należy podać dożylnie penicylinę G lub ampicylinę. W sytuacji, gdy pacjentka jest uczulona na penicylinę, ale może przyjmować cefalosporyny należy dożylnie podać cefazolinę, natomiast gdy nie można zastosować tego antybiotyku stosuje się erytromycynę lub klindamycynę (w przypadku szczepu bez fenotypu MLS_B). Jeśli wyizolowany od pacjentki szczep wykazuje fenotyp MLS_B , zaleca się dożylnie stosowanie wankomycyny. W sytuacji,

gdy pacjentka jest uczulona na penicylinę, a nieznana jest informacja o obecności fenotypu MLS_B należy zastosować cefalosporynę, wankomycynę lub teikoplaninę.

Ponadto, w omawianych rekomendacjach znajdują się również zalecenia dotyczące postępowania z noworodkami matek, które zostały poddane profilaktyce okołoporodowej. Dzieci te „powinny być zawsze poddane obserwacji przez co najmniej 24h, zaś te u których pojawiają się oznaki zakażenia, powinny zostać poddane pełnej diagnostyce w kierunku zakażenia GBS (materiał mikrobiologiczny pobiera się z pępka i ucha noworodka) i leczone empirycznie” [Kotarski, 2008].

Zespół ekspertów złożony z mikrobiologów i ginekologów pod przewodnictwem prof. Heczko przedstawił: *Zalecenia dotyczące wykrywania nosicielstwa paciorkowców grupy B (GBS) u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom u noworodków spowodowanym przez ten drobnoustrój* [Heczko, 2008]. Opracowanie to zawiera m.in. informacje, jak należy prowadzić diagnostykę mikrobiologiczną w kierunku GBS.

Zgodnie z omawianymi zaleceniami wymazówki z materiałem pobranym z przedsionka pochwy i odbytu w kierunku GBS należy najpierw przenieść do wybiórczego podłoża bulionowego Todd-Hewitt, inkubować przez 18–24 godzin w temperaturze 35–37°C w atmosferze tlenowej bądź wzbogaconej 5% CO_2 . Następnie dokonujemy przesiewu na podłoże stałe z 5% odwłóknioną krwią baranią i inkubujemy przez kolejne 18–24 godziny w opisanych wyżej warunkach. Jeżeli po 18-24 godzinnej inkubacji nie stwierdzamy obecności GBS należy ją wydłużyć do 48 h i ponownie ocenić wzrost. Wstępną identyfikację należy oprzeć na cechach morfologicznych GBS (zwykle obserwujemy wąską strefę β -hemolizy), morfologii komórek barwionych metodą Grama oraz podstawowych testach biochemicznych (katalaza – ujemna, test CAMP – dodatni, zdolność do hydrolizy hipuranu). Przynależność wyizolowanych paciorkowców do grupy serologicznej B potwierdza się za pomocą lateksowego testu aglutynacyjnego do oznaczania grup serologicznych paciorkowców, stosując metodykę wskazaną przez producenta. W wątpliwych przypadkach należy przeprowadzić identyfikację gatunkową za pomocą komercyjnych testów biochemicznych dla paciorkowców lub metody PCR.

3.6. Lekowrażliwość *Streptococcus agalactiae*

Od lat 90-tych XX wieku trwają badania nad szczepionką przeciwko GBS, która ograniczyłaby kolonizację kobiet ciężarnych i zmniejszyła ryzyko transmisji bakterii na noworodka [Baker, 1988; Schuchat, 1994]. Do dziś brak jest jednak szczepionki skierowanej przeciwko zakażeniom o etiologii *S. agalactiae*. Praca nad opracowaniem uniwersalnej szczepionki jest utrudniona ze względu na występowanie z różną częstością 10 serotypów bakterii, charakteryzujących się dodatkowo dużą różnorodnością antygenową.

Paciorkowce *S. agalactiae* są wrażliwe na antybiotyki β -laktamowe (penicylinę, ampicylinę, cefalosporyny) oraz glikopeptydy (wankomycynę i teikoplaninę). W ostatnich latach pojawiają się jednak doniesienia o szczepach z obniżoną wrażliwością na penicylinę [Kimura 2008; Dahesh, 2008; Kasahara, 2010]. Za pojawienie się wśród szczepów GBS obniżonej wrażliwości na penicylinę G odpowiada mutacja genu *pbp2x* [Dahesh, 2008]. Ponadto Dahesh i wsp. (2008) u niewielkiego odsetka szczepów zaobserwowali obniżoną wrażliwość na cefalosporyny I generacji.

Wśród szczepów GBS obserwuje się oporność na tetracyklinę (ok. 90%) oraz narastającą oporność na erytromycynę i klindamycynę [Bigos, 2012; Capanna, 2013]. Oznaczanie wrażliwości na erytromycynę i klindamycynę jest szczególnie istotne w przypadku kobiet ciężarnych uczulonych na penicylinę, gdyż wówczas w profilaktyce okołoporodowej nie może być zastosowana standardowa terapia ampicyliną, penicyliną lub cefazoliną.

Mechanizm oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B może być związany z modyfikacją miejsca docelowego działania leku (mechanizm MLS_B konstytutywny lub indukcyjny) lub aktywnym wypompowywaniem leku z komórki (M-fenotyp). Mechanizm MLS_B polega na wytwarzaniu metylazy rybosomalnej kodowanej przez przez geny *erm* [*erm(A)*, *erm(B)*]. W zależności od typu genu *erm* i poziomu jego ekspresji, oporności na erytromycynę może towarzyszyć zachowanie wrażliwości na linkozamidy (klindamycynę i linkomycynę). M-fenotyp związany jest z obecnością pompy błonowej i wiąże się z aktywnością genu *mef(A)*. Mechanizm ten warunkuje oporność na erytromycynę i pozostałe makrolidy 14 i 15-członowe [Żabicka, 2009].

Pojawianie się szczepów z obniżoną wrażliwością na penicylinę oraz narastający odsetek szczepów klinicznych opornych na klindamycynę i erytromycynę, wskazują na potrzebę śledzenia lekowrażliwości szczepów GBS.

4. MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzone były zgodnie z następującym planem:

1. Pozyskanie szczepów *S. agalactiae* i ich identyfikacja.
2. Ilościowa ocena wytwarzania biofilmu.
3. Serotypowanie izolatów GBS z wykorzystaniem reakcji PCR.
4. Ocena obecności różnych typów fimbrii – Pl-1, Pl-2a i Pl-2b z wykorzystaniem technik PCR.
5. Wykrywanie genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp w reakcjach multipleks PCR.
6. Ocena lekowrażliwości badanych szczepów.
7. Analizy korelacji uzyskanych wyników.

Realizując przedstawione cele i plan badań korzystano z opisanych w niniejszym rozdziale materiału i metod.

4.1. Badane szczepy bakteryjne

4.1.1. Szczepy wzorcowe

W badaniach wykorzystano szczepy wzorcowe znajdujące się w kolekcji szczepów Katedry i Zakładu Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej oraz trzy szczepy o potwierdzonej przynależności do serotypów: Ia, Ib i II udostępnione do badań przez Katedrę Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Szczepy wzorcowe wykorzystane w badaniach przedstawia Tabela 4.

Tabela 4. Szczepy wzorcowe wykorzystane w badaniach

Szczepy wzorcowe	Zastosowanie
<i>S. agalactiae</i> UJ Ia	oznaczanie serotypu Ia
<i>S. agalactiae</i> UJ Ib	oznaczanie serotypu Ib
<i>S. agalactiae</i> UJ II	oznaczanie serotypu II
<i>S. agalactiae</i> ATCC 12403	oznaczanie serotypu III

<i>S. agalactiae</i> ATCC 49446	oznaczenie serotypu IV
<i>S. agalactiae</i> ATCC BAA-611	oznaczenie serotypu V
<i>S. agalactiae</i> ATCC BAA-2671	oznaczenie serotypu VI
<i>S. agalactiae</i> ATCC BAA-2670	oznaczenie serotypu VII
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	ocena wytwarzania biofilmu – kontrola dodatnia
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	oznaczenie lekowrażliwości metodą krążkowo-dyfuzyjną – szczep wzorcowy

4.1.2. Szczepy kliniczne

W badaniach wykorzystano 165 szczepów klinicznych *S. agalactiae* wyizolowanych od kobiet ciężarnych, noworodków oraz osób dorosłych z zakażeń innych niż okołoporodowe. Szczepy izolowano w Pracowni Bakteriologii Położniczo-Ginekologicznego Szpitala Klinicznego UMP w okresie od stycznia 2014 do grudnia 2016 roku. Charakterystyka badanych szczepów klinicznych przedstawiona jest w Tabeli 5 i Tabeli 6.

Tabela 5. Badane szczepy kliniczne *S. agalactiae*

Pochodzenie		Rodzaj materiału
Kobiety ciężarne (kolonizacja)	n=85	wymaz z pochwy (n= 85),
Noworodki (kolonizacja)	n=30	wymaz z ucha (n= 6), wymaz z gardła (n= 17), wymaz z odbytu (n= 7),
Noworodki (zakażenia inwazyjne)	n=6	krew (n= 6),
Osoby dorosłe niebędące w ciąży (zakażenia nieinwazyjne)	n=44	mocz (n=36), nasienie (n=4), wymaz z rany (n=3), ropa (n=1)

Tabela 6. Pochodzenie badanych szczepów klinicznych *S. agalactiae*

Nr szczepu	Material	Pacjent	Nr szczepu	Material	Pacjent
Kobiety ciężarne (kolonizacja)			Osoby dorosłe (zakażenia nieinwazyjne)		
1	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	86	mocz	osoba dorosła
2	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	87	mocz	osoba dorosła
3	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	88	mocz	osoba dorosła
4	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	89	mocz	osoba dorosła
5	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	90	mocz	osoba dorosła
6	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	91	mocz	osoba dorosła
7	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	92	mocz	osoba dorosła
8	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	93	mocz	osoba dorosła
9	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	94	mocz	osoba dorosła
10	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	95	mocz	osoba dorosła
11	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	96	mocz	osoba dorosła
12	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	97	mocz	osoba dorosła
13	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	98	mocz	osoba dorosła
14	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	99	mocz	osoba dorosła
15	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	100	mocz	osoba dorosła
16	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	101	mocz	osoba dorosła
17	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	102	mocz	osoba dorosła
18	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	103	mocz	osoba dorosła
19	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	104	mocz	osoba dorosła
20	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	105	mocz	osoba dorosła
21	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	106	mocz	osoba dorosła
22	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	107	mocz	osoba dorosła
23	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	108	mocz	osoba dorosła
24	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	109	mocz	osoba dorosła
25	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	110	mocz	osoba dorosła
26	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	111	mocz	osoba dorosła
27	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	112	mocz	osoba dorosła
28	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	113	mocz	osoba dorosła
29	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	114	mocz	osoba dorosła
30	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	115	mocz	osoba dorosła
31	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	116	mocz	osoba dorosła
32	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	117	mocz	osoba dorosła
33	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	118	mocz	osoba dorosła
34	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	119	mocz	osoba dorosła
35	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	120	mocz	osoba dorosła
36	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	121	mocz	osoba dorosła
37	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	122	wymaz z rany	osoba dorosła
38	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	123	nasienie	osoba dorosła
39	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	124	wymaz z rany	osoba dorosła
40	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	125	nasienie	osoba dorosła
41	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	126	ropa	osoba dorosła
42	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	127	nasienie	osoba dorosła
43	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	128	wymaz z rany	osoba dorosła
44	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	129	nasienie	osoba dorosła
45	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	Noworodki (kolonizacja)		
46	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	130	wymaz z gardła	noworodek
47	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	131	wymaz z gardła	noworodek

Materiał i metody

48	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	132	wymaz z gardła	noworodek
49	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	133	wymaz z odbytu	noworodek
50	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	134	wymaz z gardła	noworodek
51	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	135	wymaz z gardła	noworodek
52	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	136	wymaz z odbytu	noworodek
53	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	137	wymaz z gardła	noworodek
54	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	138	wymaz z gardła	noworodek
55	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	139	wymaz z gardła	noworodek
56	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	140	wymaz z odbytu	noworodek
57	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	141	wymaz z gardła	noworodek
58	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	142	wymaz z odbytu	noworodek
59	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	143	wymaz z ucha	noworodek
60	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	144	wymaz z gardła	noworodek
61	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	145	wymaz z ucha	noworodek
62	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	146	wymaz z gardła	noworodek
63	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	147	wymaz z gardła	noworodek
64	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	148	wymaz z ucha	noworodek
65	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	149	wymaz z gardła	noworodek
66	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	150	wymaz z gardła	noworodek
67	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	151	wymaz z odbytu	noworodek
68	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	152	wymaz z gardła	noworodek
69	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	153	wymaz z odbytu	noworodek
70	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	154	wymaz z gardła	noworodek
71	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	155	wymaz z ucha	noworodek
72	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	156	wymaz z gardła	noworodek
73	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	157	wymaz z ucha	noworodek
74	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	158	wymaz z odbytu	noworodek
75	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	159	wymaz z ucha	noworodek
76	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	Noworodki (zakażenia inwazyjne)		
77	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	160	krew	noworodek
78	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	161	krew	noworodek
79	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	162	krew	noworodek
80	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	163	krew	noworodek
81	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	164	krew	noworodek
82	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna	165	krew	noworodek
83	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna			
84	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna			
85	wymaz z pochwy	kobieta ciężarna			

4.1.3. Przechowywanie szczepów bakteryjnych

Szczepy wykorzystywane do badań (wzorcowe i kliniczne) przechowywano w mikrobankach (ProLab Diagnostic), w głębokim zamrożeniu (w temperaturze – 80°C).

4.2. Odczynniki wykorzystywane do badań laboratoryjnych

Do badań użyto następujących odczynników i podłoży mikrobiologicznych:

- bufor TBE 1x (Tris, Kwas borowy, EDTA) – przygotowany przez rozcieńczenie 10x stężonego TBE [toksyczność ostra],
- bufor TE pH=8,0 (Tris, EDTA) [toksyczność ostra],
- fiolet krystaliczny 0,1% (RAL Diagnostics) [toksyczność ostra, rakotwórczość, zagrożenie dla środowiska wodnego],
- alkohol etylowy 96%, 70% (POCH) [substancja łatwopalna],
- polimeraza II 500U, GPB Prest Taq (GenoPlast Biochemicals),
- 10 mM dNTP (GenoPlast Biochemicals),
- 10 x PCR Bufor (MG²⁺ plus) (GenoPlast Biochemicals),
- PCR Bufor (NH₄)₂SO₄ (GenoPlast Biochemicals),
- PCR Bufor KCL (GenoPlast Biochemicals),
- 50 mM MgCl₂ (GenoPlast Biochemicals),
- bromek etydyyny 10mg/ml (Sigma-Aldrich) [toksyczność ostra, działanie mutagenne],
- obciążacz, 6x DNA Loading Dye Solution (Thermo Fisher Scientific),
- DNA Ladder Gene Ruler 100 bp, 50 bp (Thermo Fisher Scientific),
- synteza starterów (Genomed),
- ExoSAP-IT® for PCR product Clean-Up (Affymetrix),
- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies),
- Hi-Di™ Formamide (Life Technologies) [substancja rakotwórcza, szkodliwe działanie na płód],
- EDTA (BioShop) [toksyczność ostra],
- krążki zawierające antybiotyki - penicylina (1 IU), erytromycyna (15µg), klindamycyna (2 µg), tetracyklina (30 µg), lewofloksacyna (5 µg), tigecyklina (15 µg) (OXOID),
- MIC Test Strip wakomycyna (OXOID),
- sól fizjologiczna w ampulkach (BioMerieux),
- ID color Catalase (BioMerieux),
- Columbia Agar z 5% krwią baranią (OXOID),
- Mueller Hinton Agar z krwią końską i NAD (OXOID),
- bulion Todd-Hewitt (BioMerieux),

- Mikrobank™ (ProLab Diagnostic),
- lateksowy test aglutynacyjny Streptococcal Grouping Kit (OXOID).

4.3. Sprzęt i aparatura wykorzystywana do badań laboratoryjnych

W trakcie prowadzenia badań korzystano z następującego sprzętu i aparatury laboratoryjnej:

- cieplarka (Alab-Alab Sp. z o.o.),
- zamrażarka -80⁰C (Panasonic),
- zamrażarka -20⁰C (Liebherr)
- waga analityczna XA 60/220 (Radwag®),
- wirówka, Centrifuge 5415R (Eppendorf®),
- wirówka, Centrifuge 5810R (Eppendorf®),
- wytrząsarka typu Vortex (Biosan),
- mikrowirówka (Labnet),
- termocykler, Mastercycler® gradient (Eppendorf®),
- termocykler T100 (Bio-Rad),
- aparat do elektroforezy, SUB-CELL® GT (Bio-Rad),
- transiluminator, Imagine® (Syngen),
- spektrofotometr NanoDrop, ND-1000 (Thermo Scientific),
- czytnik Infinite M200, (Tecan)[Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej UMP],
- kuchenka mikrofalowa (Romix),
- densytmierz, Densimat (BioMerieux),
- mikroskop optyczny Eclipse 50i (Nikon),
- pipety automatyczne o pojemności 2, 10, 100, 1000 µl (HTL),
- drobny sprzęt jednorazowego użytku: końcówki do pipet automatycznych, próbówki typu Eppendorf, płytki titracyjne, ezy, wymazówki, płytki do PCR-u itp.

4.4. Identyfikacja badanych szczepów *Streptococcus agalactiae*

Wstępną identyfikację szczepów przeprowadzano na podstawie oceny morfologii kolonii na podłożu Columbia Agar z 5% krwią baranią (CA) (Rycina 3), preparatu mikroskopowego wybarwionego metodą Grama oraz testu na katalazę. Następnie

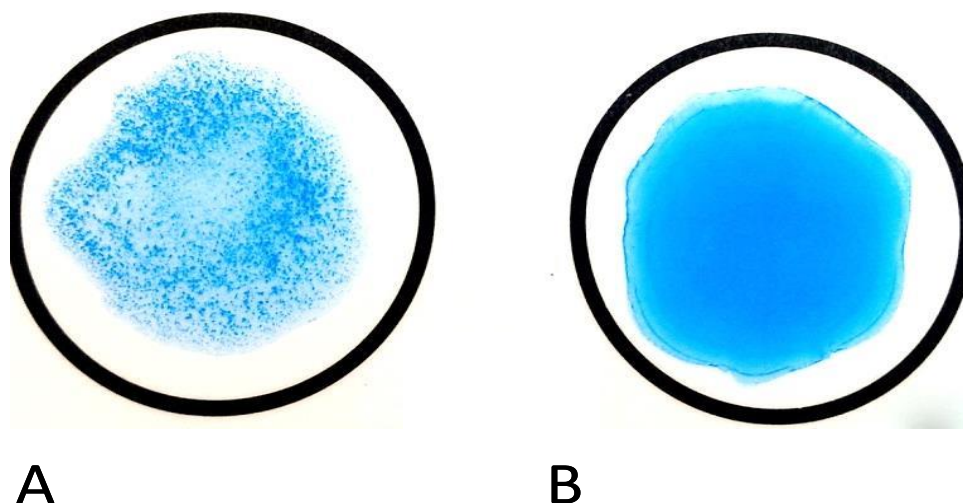
przynależność do grupy B paciorkowców badano przy pomocy lateksowego testu aglutynacyjnego (Rycina 4) oraz technikami PCR zgodnie z opisem przedstawionym w punkcie 3.4.2.



Rycina 3. Wzrost *S. agalactiae* na podłożu Columbia Agar z 5% krwią baranią (fot. Kamińska, 2017).

4.4.1. Metoda aglutynacji lateksowej

Test ten polega na aglutynacji cząsteczek lateksu opłaszczonych swoistymi dla grupy serologicznej B paciorkowców przeciwciałami z homologicznym, wyekstrahowanym z komórek wielocukrem C. Test wykonano zgodnie z instrukcją producenta. Enzym ekstrakcyjny oraz odczynnik lateksowy ogrzewano do temperatury pokojowej. Następnie z 24-godzinnej hodowli na podłożu CA prowadzonej w temp. 37°C pobierano 2-5 kolonii bakteryjnych i zawieszano w 0,4 ml enzymu. Otrzymaną zawiesinę inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37°C w cieplarni. Następnie na pole reakcyjne nanoszono 1 kroplę odczynnika lateksowego i 1 kroplę ekstraktu bakteryjnego, mieszano oba składniki. Wystąpienie aglutynacji widocznej gołym okiem w ciągu 30 sekund uznawano za wynik dodatni, a szczep kwalifikowano jako *S. agalactiae*. Przy braku swoistego antygeny otoczkowego nie obserwowano aglutynacji. Wynik porównywano z kontrolą ujemną – samym odczynnikiem lateksowym (Rycina 4).



Rycina 4. Lateksowy test aglutynacyjny, A – wynik dodatni testu, potwierdzający przynależność do grupy B paciorkowców, B – wynik ujemny (fot. Kamińska, 2016).

4.4.2. Molekularna identyfikacja badanych szczepów z zastosowaniem reakcji PCR

4.4.2.1. Izolacja genomowego DNA

DNA bakteryjny izolowano z badanych szczepów *S. agalactiae* stosując zmodyfikowaną metodę termiczną opracowaną w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej. Metoda ta polega na lizie ściany komórkowej bakterii poprzez naprzemienne ogrzewanie i ochładzanie zawiesiny bakteryjnej. Badane szczepy *S. agalactiae* przesiewano na podłoże CA i inkubowano 24 h w temperaturze 37°C. Następnie pobierano za pomocą ezy 2-3 kolonie bakteryjne i zawieszano w 20 µl buforu TE o pH=8,0 w probówce typu Eppendorf. Tak przygotowaną zawiesinę bakterii inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej i mieszano na wytrząsarce typu Vortex. W kolejnym etapie zawiesinę bakterii poddawano sześciokrotnie działaniu różnych temperatur naprzemiennie ogrzewając ją w kuchence mikrofalowej przez 30s i schładzając w temperaturze $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Po przeprowadzonej izolacji dokonano pomiaru stężenia uwolnionego DNA na spektrofotometrze NanoDrop. Uzyskane DNA bakteryjne przechowywano do dalszych badań w probówkach typu Eppendorf w temperaturze $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.4.2.2. Przygotowanie reakcji PCR

W celu identyfikacji molekularnej szczepów *S. agalactiae* użyto następujących sekwencji starterów: F: 5'TTTTCACCAGCTGTATTAGAAGTA3'; R 5'GTTCCCTGAACATTATCTTTGAT3', zastosowanych wcześniej przez Kong i wsp. [Kong F, 2005]. Specyficzność starterów sprawdzono w programie BLAST Assembled Ref Genomem ([www.http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). Wymienione startery zostały zsyntezowane przez firmę Genomed S.A. (Warszawa). Amplifikowano fragment genu *GBS cAMP* o wielkości 155 pz.

4.4.2.3. Optymalizacja warunków reakcji PCR

Reakcje PCR wykonano w 10 µl mieszaniny reakcyjnej składającej się z buforu optymalizującego reakcję z MgCl₂ (1x), dNTP Mix (0,2 mM każdy), pary starterów (10 µM), termostabilnej polimerazy Taq (1U) oraz wyizolowanego DNA (100-200 ng). Jako kontrolę ujemną stosowano mieszaninę reakcyjną z wodą zamiast DNA bakteryjnego, natomiast kontrolę dodatnią stanowiło DNA wyizolowane ze szczepów wzorcowych *S. agalactiae* (ATCC 12403, ATCC BAA-611). W celu optymalizacji temperatury wiązania starterów przeprowadzono reakcje PCR, stosując następujący gradient temperatur: 47,0°C, 47,1°C, 47,9°C, 49,2°C, 50,8°C, 52,6°C, 54,6°C, 56,5°C, 58,2°C, 59,8°C, 60,9°C, 61,5°C. Na tej podstawie wybrano optymalną temperaturę wiązania starterów. Reakcje PCR prowadzono stosując parametry przedstawione w Tabeli 7.

Tabela 7. Warunki poszczególnych etapów reakcji PCR

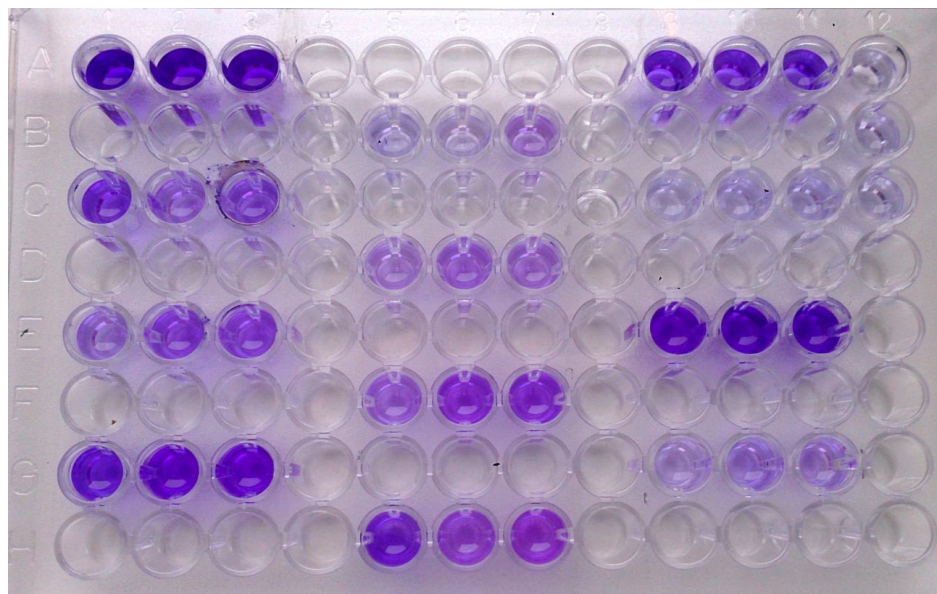
Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]
Denaturacja wstępna	94,0	180
Denaturacja	94,0	30
Przyłączanie starterów	Gradient temperatur/48,0	30
Wydłużanie starterów	72,0	60
Końcowe wydłużanie starterów	72,0	600
Przechowywanie	4,0	Do wyjęcia próbek

4.4.2.4. Wizualizacja produktów reakcji PCR

Uzyskane produkty reakcji PCR oceniano stosując rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w buforze TBE (1x). Na żel agarozowy nakładano po 5 μ l produktu PCR wymieszanego z 1,5 μ l obciążacza, każdorazowo stosowano wzorzec/marker wielkości DNA. Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 130V przez 35 minut, a następnie jej wyniki analizowano i archiwizowano przy użyciu transluminatora -aparatu z oprogramowaniem do analizy i dokumentacji obrazów elektroforetycznych.

4.5. Ocena zdolności badanych szczepów do wytwarzania biofilmu

Zdolność badanych szczepów do tworzenia biofilmu oceniano ilościową metodą spektrofotometryczną. W tym celu przygotowywano zawiesinę bakteryjną o gęstości 0,5 w skali McFarlanda w bulionie Todd-Hewitt z 24 godzinnej hodowli badanych szczepów na podłożu CA, prowadzonej w temperaturze 37°C. Następnie przenoszono po 200 μ l zawiesiny do dołków płytki titracyjnej i inkubowano 20 godzin w temp. 37°C. Po inkubacji usuwano zawiesinę bakteryjną, a dołki trzykrotnie przepłukiwano jałową wodą destylowaną. W kolejnym etapie do dołków dodawano 0,1% roztwór fioletu krystalicznego i barwiono przez 15 minut a następnie ponownie trzykrotnie przepłukiwano jałową wodą destylowaną. Płytki pozostawiono na noc z odkrytą pokrywą w celu osuszenia dołków. Następnie do dołków dodawano po 200 μ l 95% etanolu w celu rozpuszczenia zaabsorbowanego fioletu krystalicznego (Rycina 5) i po 15 minutach dokonano pomiaru absorbancji roztworu przy długości fali $\lambda=590$ nm na czytniku płytek Infinite M200. Oznaczenie dla każdego szczepu badanego, jak również dla kontroli pozytywnej i negatywnej wykonywano w trzech powtórzeniach. Kontrolę pozytywną stanowił szczep wzorcowy *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 o potwierdzonej zdolności do tworzenia biofilmu, a kontrolę negatywną bulion Todd-Hewitt bez zawiesiny bakteryjnej.



Rycina 5. Ocena zdolności badanych szczepów do wytwarzania biofilmu metodą spektrofotometryczną – płytka titracyjna po rozpuszczeniu zaabsorbowanego fioletu krystalicznego, przygotowana do odczytu (fot. Kamińska, 2016).

W niniejszej pracy, zastosowano kryteria oceny stopnia formowania biofilmu zaproponowane przez Borges i współpracowników (Tabela 8) [Borges, 2012].

Tabela 8. Przyjęte kryteria oceny stopnia formowania biofilmu [Borges, 2012]

Stopień formowania biofilmu	Wartość absorbancji przy 590 nm
Nieformujące	$\leq \text{ODc}$
Słabo formujące	$\leq 2 \times \text{ODc}$
Umiarkowanie formujące	$> 2 \times \text{ODc} \leq 4 \times \text{ODc}$
Silnie formujące	$> 4 \times \text{ODc}$

4.6. Serotypowanie szczepów *Streptococcus agalactiae*

Technikami PCR oznaczano przynależność badanych szczepów *S. agalactiae* do następujących serotypów: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI i VII, stosując startery scharakteryzowane w Tabeli 9. W celu określenia występowania najczęstszych serotypów *S. agalactiae* opracowano reakcje multipleks PCR, w której jednocześnie identyfikowano serotypy Ia, Ib, III i V. Obecność serotypów II, IV, VI i VII oznaczano w pojedynczych reakcjach PCR. W ramach niniejszej pracy zrezygnowano z identyfikacji serotypów VIII i IX, ze względu na brak możliwości uzyskania szczepów wzorcowych oraz ze względu na fakt, iż serotyp VIII jest bardzo rzadko identyfikowany poza Japonią, natomiast serotyp IX opisany został tylko w jednym badaniu [Slotved, 2007].

Tabela 9. Charakterystyka starterów do reakcji PCR zastosowanych do serotypowania badanych szczepów *S. agalactiae*

Serotyp/ GenBank Accession no.	Starter	Sekwencja (5'→3')	Wielkość produktu PCR (pz)	Optymalna T _m * [°C]	Ref.
Serotyp Ia <i>AB028896</i>	F	GGTCAGACTGGATTAATGGTATGC	521	55,7	[Poyart, 2007]
	R	GTAGAAATAGCCTATATACGTTGAATGC		55,5	
Serotyp Ib <i>AB050723</i>	F	TAAACGAGAATGGAATATCACAAACC	770	53,2	[Poyart, 2007]
	R	GAATTAACCTCAATCCCTAAACAATATCG		54,4	
Serotyp II <i>AY375362</i>	F	GAGAAGCCCAAGGATGGATT	188	51,8	KIZGIMF
	R	TCCACTATGCCTTTTGTAATAATTGG		50,6	
Serotyp III <i>AF163833</i>	F	CCACATATGAGAATAAGACTTGC	187	51,7	[Kong, 2005]
	R	CCAACATACAGACCAATAGTATTC		52,3	
Serotyp IV <i>AF355776.1</i>	F	TTTGCTTGTGAGCTACCTGGA	314	52,4	KIZGIMF
	R	TCTCCTCCCAATTCGTC		51,1	
Serotyp V <i>AF349539</i>	F	AACAGAGGCCAATCAGTTGC	247	51,8	KIZGIMF
	R	CTTCCAACGCCACCTCTAAA		51,8	
Serotyp VI <i>AF337958.1</i>	F	GGACTTGAGATGGCAGAAGGT	523	54,4	KIZGIMF
	R	CTCGTACAACTTCGCTTCCAC		54,8	
Serotyp VII <i>AY376403</i>	F	GGAGAGAACAATGTCCAGATTACG	369	55,7	KIZGIMF
	R	AGCTGGTCGTGATTTCTACACA		53,0	

* T_m – temperatura topnienia starterów (*ang.* melting temperature)

KiZGiMF – startery ze zbioru starterów zaprojektowanych w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej

4.6.1. Optymalizacja pojedynczych reakcji PCR

W pierwszym etapie przeprowadzono reakcje PCR w gradiencie temperatur: 47,0°C, 47,1°C, 47,9°C, 49,2°C, 50,8°C, 52,6°C, 54,6°C, 56,5°C, 58,2°C, 59,8°C, 60,9°C, 61,5°C. Zastosowano następujący skład mieszaniny reakcyjnej: bufor z MgCl₂ (1x), dNTP Mix (0,2 mM każdy), pary starterów (10 μM), termostabilna polimeraza Taq (1U), DNA (100-200 ng) wyizolowane z odpowiednich szczepów wzorcowych. Jako kontrolę ujemną stosowano mieszaninę reakcyjną z wodą zamiast DNA bakteryjnego. Reakcje PCR prowadzono z wykorzystaniem warunków reakcji przedstawionych w Tabeli 10.

Pojedyncze reakcje PCR w celu wykrywania serotypów II, IV, VI i VII przeprowadzono stosując powyższy skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki opisane w Tabeli 10. Dla poszczególnych serotypów wybrano następujące temperatury wiązania starterów: II – 49,2°C; IV – 52,0°C; VI – 54,0°C, VII – 54,0°C. Produkty reakcji PCR wizualizowano zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 4.4.2.4.

Tabela 10. Warunki reakcji PCR w gradiencie temperatur oraz dla pojedynczych serotypów

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]
Denaturacja wstępna	94,0	180
Denaturacja	94,0	30
Przyłączanie starterów	Gradient temperatur	30
Wydłużanie starterów	72,0	60
Końcowe wydłużanie starterów	72,0	600
Przechowywanie	4,0	Do wyjęcia próbek

4.6.2. Optymalizacja reakcji multipleks PCR

Optymalizacja reakcji multipleks PCR polegała na doborze odpowiedniej temperatury hybrydyzacji starterów do matrycy oraz optymalnego składu buforu reakcyjnego (stężenia jonów Mg^{2+} , rodzaj buforu). W tym celu przeprowadzono pojedyncze reakcje PCR dla każdego serotypu stosując DNA wyizolowane z odpowiednich szczepów wzorcowych przedstawionych w Tabeli 6. Przeprowadzono reakcję PCR w gradencie temperatur: 47,0°C, 47,1°C, 47,9°C, 49,2°C, 50,8°C, 52,6°C, 54,6°C, 56,5°C, 58,2°C, 59,8°C, 60,9°C, 61,5°C. Skład wykorzystanej mieszaniny reakcyjnej: bufor z $MgCl_2$ (1x), dNTP Mix (0,2 mM każdy), pary starterów (10 μ M), termostabilna polimeraza Taq (1U), DNA (100-200 ng) wyizolowane z odpowiednich szczepów wzorcowych. Jako kontrolę ujemną stosowano mieszaninę reakcyjną z wodą zamiast DNA bakteryjnego. Reakcje PCR prowadzono stosując parametry przedstawione w Tabeli 10.

Przeprowadzone reakcje posłużyły do optymalizacji reakcji multipleks PCR. Zoptymalizowano reakcje multipleks PCR w 10 μ l mieszaniny reakcyjnej składającej się z: buforu optymalizującego reakcję [$(NH_4)_2SO_4$] (1x), $MgCl_2$ (2 mM), dNTP Mix (0,2 mM każdy), czterech par starterów (10 μ M), termostabilnej polimerazy Taq (1U) oraz wyizolowanego DNA (100-200 ng). Reakcje multipleks PCR prowadzono stosując parametry przedstawione w poniżej zamieszczonej Tabeli 11., wybrano temperaturę wiązania starterów 57°C. W celu wizualizacji produktów reakcji multipleks PCR zastosowano 2% żel agarozowy.

Tabela 11. Warunki reakcji multipleks PCR

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]
Denaturacja wstępna	96,0	180
Denaturacja	95,0	60
Przyłączanie starterów	57,0	45
Wydłużanie starterów	72,0	45
Końcowe wydłużanie starterów	72,0	600
Przechowywanie	4,0	Do wyjęcia próbek

4.6.3. Sprawdzenie swoistości zastosowanych starterów

Swoistość zastosowanych starterów sprawdzono stosując sekwencjonowanie produktów PCR metodą Sangera. W tym celu postępowano zgodnie z metodyką opracowaną w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej. Procedurę można podzielić na następujące etapy:

Etap 1 – oczyszczanie produktów PCR

Do 5 μ l produktu PCR dodawano 1,5 μ l odczynnika ExoSAP, a następnie próby poddano krótkiemu wirowaniu i inkubowano w termocyklerze stosując następujące parametry: 37°C/15 min, 85°C/15 min, przechowanie prób w 4°C.

Etap – 2 sekwencjonowanie

Przed przystąpieniem do złożenia mieszaniny reakcyjnej rozcieńczono produkty PCR wodą w proporcji 1:9 oraz przygotowano rozcieńczenia odpowiednich starterów, tak aby uzyskać stężenie 3,2 pmol. Następnie dla każdej próby przygotowano mieszaninę reakcyjną (oddzielnie dla starterów F i R) zawierającą: 2 μ l buforu (5x), 1,5 μ l rozcieńzonego produktu PCR, 1 μ l rozcieńzonego startera (oddzielnie F i R), 0,4 μ l odczynnika BigDye (Cycle Sequencing Kit) oraz dopełniono jałową wodą dejonizowaną do objętości 10 μ l. Sekwencjonowanie prowadzono stosując następujące warunki: 96°C/2 min, następnie 25 cykli: 96°C/10 s, 50°C/5 s, 60°C/4 min, po zakończeniu cykli próby przechowywano w 4°C.

Etap 3 – oczyszczanie prób po sekwencjonowaniu

W tym celu do każdej próby dodawano 2,5 μ l 125 mM EDTA w celu usunięcia niepożądanych jonów i 30 μ l 96% alkoholu etylowego w celu wytrącenia białek, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min. Po tym czasie próby wirowano przez 30 minut przy 3000g/4°C. Następnie odwracano płytkę z próbami i ponownie wirowano do 180g. W dalszej kolejności do prób dodano 30 μ l 70% alkoholu etylowego, wirowano przez 15 minut przy 1650g/4°C. Następnie odwracano płytkę i wirowano próby przy prędkości 180g przez 1 minutę. Po wirowaniu do prób dodawano po 12 μ l formamidu (Hi-Di) i przechowywano w chłodziarce w 4°C.

Etap 4 – odczyt i analiza wyników

Rodziały otrzymanych produktów sekwencjonowania zostały przeprowadzone w firmie Genomed. Wyniki odczytano za pomocą programu Sequencher 4.1.4., a następnie porównano je z sekwencjami referencyjnymi, wykorzystując oprogramowanie BLAST z bazy danych NCBI.

4.7. Ocena obecności różnych typów fimbrii – Pl-1, Pl-2a i Pl-2b

Startery zastosowane w reakcjach PCR zostały zaprojektowane z wykorzystaniem programu Primer3 ([www.http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)) i sprawdzone pod kątem odpowiednich parametrów z wykorzystaniem funkcji Primer-BLAST (*ang. Basic Local Alignment Search Tool*) dostępnej w internetowej bazie NCBI (*ang. National Center for Biotechnology Information*). Specyficzność starterów sprawdzono w programie BLAST Assembled Ref Genomes <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Sekwencje oligonukleotydowe zaprojektowanych starterów przedstawia Tabela 12.

Tabela 12. Sekwencje zastosowanych starterów oraz dane sekwencji referencyjnych dla genów kodujących fimbrie

Fimbrie/ GenBank Accession no.	Starter	Sekwencja (5'→3')	Wielkość produktu PCR (pz)	Optymalna T _m * [°C]
Pl-1 <i>EU929540.1</i>	F	AACCACTAGCAGGCGTTGTCTTTG	298 pz	51,8
	R	TGAGCCCGGAAATTCTGATATGCC		48,0
Pl-2a <i>EU929374.1</i>	F	GCCGTTAGATGTTGTCTTCGTACT	575 pz	54,4
	R	TTTACTGCGGTCCCAAGAGCTTC		54,4
Pl-2b <i>EU929426.1</i>	F	AAGTCTTGACCAAGGATACGACGC	314 pz	53,8
	R	ATCGTGTTACTTGCCCTGCGTA		51,1

* T_m – temperatura topnienia starterów (*ang. melting temperature*)

Obecność różnych typów fimbrii (Pl-1, Pl-2a, Pl-2b) wykrywano z zastosowaniem trzech pojedynczych reakcji PCR. Optymalizacja reakcji polegała na doborze odpowiedniej temperatury hybrydyzacji starterów do matrycy oraz optymalnego składu buforu reakcyjnego. W tym celu przeprowadzono reakcję PCR w gradiencie temperatur: 47,0°C, 47,1°C, 47,9°C, 49,2°C, 50,8°C, 52,6°C, 54,6°C, 56,5°C, 58,2°C, 59,8°C, 60,9°C, 61,5°C. W skład zastosowanych mieszanin reakcyjnych wchodziły: bufor z MgCl₂ (1x), dNTP Mix (0,2 mM każdy), para starterów (10 µM), termostabilna polimeraza Taq (1U), DNA bakteryjny (100-200 ng). Jako kontrolę ujemną stosowano mieszaninę reakcyjną z wodą zamiast DNA bakteryjnego. Reakcje PCR prowadzono w termocyklerze stosując dla każdej z nich takie same parametry przedstawione w zamieszczonej poniżej Tabeli 13. Produkty reakcji PCR wizualizowano zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.4.2.4.

Tabela 13. Warunki reakcji PCR

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]
Denaturacja wstępna	94,0	180
Denaturacja	94,0	30
Przyłączanie starterów	60,0	30
Wydłużanie starterów	72,0	60
Końcowe wydłużanie starterów	72,0	600
Przechowywanie	4,0	Do wyjęcia próbek

4.8. Wykrywanie genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp

Wykrywanie genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp przeprowadzono w reakcji multipleks PCR stosując zmodyfikowaną metodykę opisaną przez Creti R i wsp. [Creti, 2004]. Zastosowano startery przedstawione w Tabeli 14 oraz warunki reakcji opisane w Tabeli 15.

Tabela 14. Sekwencje starterów dla genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp [Creti, 2004]

Rodzaje białek	Starter	Sekwencja (5'→3')	Wielkość produktu PCR (pz)
Universal	F	TGATACTTCACAGACGAAACAACG	-
Alpha-C	R	TACATGTGGTAGTCCATCTTCACC	398 pz
Rib	R	CATACTGAGCTTTTAAATCAGGTGA	295 pz
Epsilon	R	CCAGATACATTTTTTACTAAAGCGG	200 pz
Alp2/3	R	CACTCGGATTACTATAATATTTAGCAC	334 pz
Alp4	R	TTAATTTGCACCGGATTAACACCAC	110 pz

W czasie optymalizacji warunków reakcji zmodyfikowano skład mieszaniny reakcyjnej. Zastosowana mieszanina zawierała: bufor SO₄Mg (1x), dNTP Mix (0,2 mM każdy), 6 starterów (400 nM każdego), termostabilną polimerazę Taq (1U), bakteryjny DNA (100-200 ng), do końcowej objętości 10 µl dopełniono wodą dejonizowaną. Wizualizację produktów reakcji PCR przeprowadzono stosując elektroforezę w żelu

agarozowym zgodnie z opisem przedstawionym w punkcie 3.4.2.4. Zmieniono stężenie żelu na 2%.

Tabela 15. Warunki reakcji multiplex PCR zgodnie z Creti i wsp. [Creti, 2004]

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]
Denaturacja wstępna	96,0	180
Denaturacja	95,0	60
Przyłączanie starterów	58,0	45
Wydłużanie starterów	72,0	45
Końcowe wydłużanie starterów	72,0	600
Przechowywanie	4,0	Do wyjęcia próbek

4.9. Oznaczenie lekowrażliwości badanych szczepów

4.9.1. Ocena lekowrażliwości badanych szczepów metodą dyfuzyjno-krażkową oraz metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku

Ocenę lekowrażliwość szczepów *S. agalactiae* na antybiotyki i chemioterapeutyki wykonano metodą dyfuzyjno-krażkową oraz poprzez wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów (MIC) za pomocą metody dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku, zgodnie z zaleceniami EUCAST oraz wytycznymi Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORDL) [www.korld.edu.pl]. Antybiogramy wykonano na podłożu Mueller-Hinton agar + 5% odwłókniona krew końska i 20 mg/L β -NAD (MH-F). Z 24 godzinnej hodowli bakteryjnej na podłożu CA przygotowano zawiesinę o gęstości 0,5 McFarlanda, którą jałową wymazówką rozprowadzono równomiernie na powierzchni podłoża MH-F. Na tak przygotowane podłoże nałożono krążki z następującymi antybiotykami i chemioterapeutykami: penicylina (1 IU), erytromycyna (15 μ g), klindamycyna (2 μ g), lewofloksacyna (5 μ g), tigeicyklina (15 μ g). Dla szczepów izolowanych z zakażeń inwazyjnych oznaczono wartość MIC wankomycyny stosując pasek Test Strip wankomycyna (OXOID). Natomiast dla szczepów izolowanych z moczu stosowano krążki z penicyliną (1 IU), tetracykliną (30 μ g) i lewofloksacyną (5 μ g). Płytki antybiogramowe

inkubowano 18-20 godzin w temperaturze $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ w atmosferze 5% CO_2 . Odczytu wielkości strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków dokonano od przodu płytki, po zdjęciu wieczka w świetle odbitym. Wartość MIC odczytywano w miejscu przecięcia eliptycznej strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów z określoną wartością stężenia antybiotyku na pasku. W celu przeprowadzenia kontroli jakości jednocześnie ze szczepami badanymi oznaczenie lekowrażliwości wykonano dla szczepu wzorcowego *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości dokonano zgodnie z zaleceniami EUCAST oraz KORDL [www.korld.edu.pl].

4.9.2. Oznaczanie mechanizmów oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B

Oznaczenie wykonano metodą dwóch krążków na podłożu MH-F zgodnie z zaleceniami EUCAST oraz wytycznymi KORDL [www.korld.edu.pl]. Zawiesinę bakteryjną o gęstości 0,5 McFarlanda наносono na podłoże jałową wymazówką, następnie nakładano krążki z erytromycyną (15 μg) i klindamycyną (2 μg) w odległości 12-16 mm (od krawędzi do krawędzi krążków) i inkubowano 20-24h w temp. $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, w atmosferze 5% CO_2 .

Identyfikacja i interpretacja oznaczania mechanizmów oporności metodą dwóch krążków:

- 1) Indukcyjny mechanizm oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B (MLS_B I) – gdy obserwujemy strefę zahamowania wzrostu wokół krążka z erytromycyną wskazującą na średnią wrażliwość lub oporność oraz spłaszczenie strefy przy krążku z klindamycyną od strony erytromycyny (tzw. D strefa),
- 2) Konstytutywny mechanizm oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B (MLS_B K) – gdy strefa zahamowania wzrostu wokół krążka z erytromycyną wskazuje na oporność i strefa zahamowania wzrostu wokół krążka z klindamycyną wskazuje na oporność lub średnią wrażliwość,
- 3) Fenotyp M – gdy obserwujemy strefę zahamowania wzrostu wokół krążka z erytromycyną wskazującą na średnią wrażliwość lub oporność oraz strefę wskazującą na wrażliwość wokół krążka z klindamycyną przy braku spłaszczenia strefy zahamowania wzrostu.

Zgodnie ze stanowiskiem Zespołu ds. oznaczania lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST u ziarenkowców Gram-dodatnich w przypadku wykrycia indukcyjnego mechanizmu oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy należy

„raportować izolat jako oporny na klindamycynę, wynik badania bakteriologicznego uzupełnić komentarzem „Wykryto mechanizm MLS_B indukcyjny”. W przypadku wykrycia konstytutywnego mechanizmu oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B należy „raportować izolat jako oporny na klindamycynę, wynik badania bakteriologicznego uzupełnić komentarzem: „Wykryto mechanizm MLS_B konstytutywny – szczep oporny na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B.” [www.korld.edu.pl].

4.10. Zastosowane metody statystyczne

Analizę statystyczną wykonano w Excelu oraz pakiecie statystycznym R [<https://cran.r-project.org/>]. Do sprawdzenia zależności między zmiennymi skategoryzowanymi zastosowano test jednorodności χ^2 oraz dokładny dwustronny test Fishera. Test χ^2 należy do grupy testów nieparametrycznych. Można go stosować zarówno do porównywania dwóch, jak i większej liczby grup. Dane są zestawiane w postaci tablic kontyngencji, które podają ile razy zachodzi określona koincydencja wartości wyników pomiarów. Warunkiem stosowalności testu jest odpowiednio liczna populacja danych. Przyjmuje się, że można test ten stosować w przypadku populacji większych niż 30. Związane jest to z koniecznością podziału populacji na klasy. W sytuacji, gdy założenia testu χ^2 nie były spełnione sięgnięto po dokładny test Fishera, który służy do sprawdzenia czy rozkład przypadków pomiędzy kategoriami jednej zmiennej jest niezależny od ich rozkładu pomiędzy kategoriami drugiej zmiennej. Różnice uznawano za statystycznie istotne dla prawdopodobieństwa testowego $p < 0,05$ [Stanisz, 2001; Moczko, 1998].

5. WYNIKI

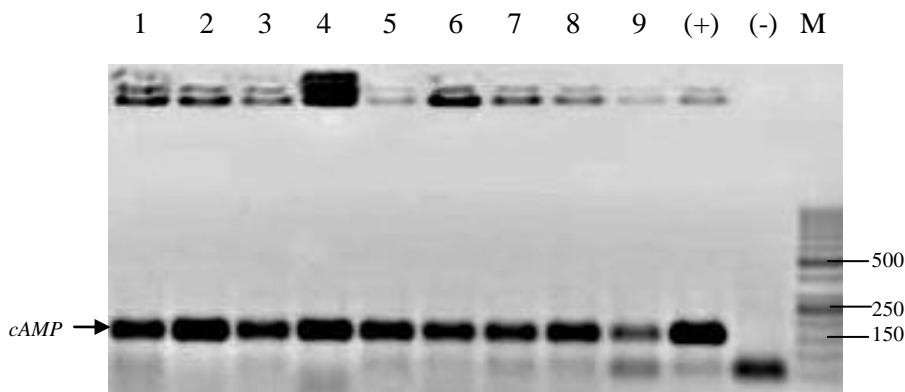
5.1. Identyfikacja badanych szczepów *Streptococcus agalactiae*

5.1.1. Identyfikacja badanych szczepów z użyciem testu lateksowego

Do badań zakwalifikowano 165 szczepów, które wykazywały charakterystyczną morfologię kolonii i wytwarzały katalazę. Następnie wykonano lateksowy test aglutynacyjny, na podstawie którego stwierdzono obecność swoistego antygeny otoczkowego u wszystkich badanych szczepów.

5.1.2. Identyfikacja badanych szczepów z zastosowaniem specyficznej reakcji PCR

Przynależność badanych szczepów do gatunku *S. agalactiae* została potwierdzona w reakcjach PCR dla 165 szczepów. U wszystkich izolatów stwierdzono obecność amplifikowanego fragmentu specyficznego dla *S. agalactiae*. Przykładowe wyniki przedstawia Rycina 6.



Rycina 6. Wynik elektroforezy produktów amplifikacji genu *cAMP* (wielkość produktu 155 pz): ścieżki 1-10 – badane próby, (+) kontrola dodatnia, (-) kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 50 bp).

5.2. Ocena zdolności badanych szczepów do wytwarzania biofilmu

Wszystkie spośród badanych szczepów *S. agalactiae* posiadały zdolność do tworzenia biofilmu. Jednakże siła formowania biofilmu była zróżnicowana. Ponad połowa badanych izolatów (n=86) wykazała zdolność do tworzenia biofilmu w stopniu umiarkowanym, 72 izolaty w stopniu słabym, natomiast siedem w stopniu silnym (Tabela 16 i 17).

Tabela 16. Wyniki absorbancji przy 590 nm oraz ocena zdolności badanych szczepów do formowania biofilmu

Nr szczepu	Absorbancja przy 590 nm			Średnia wartość absorbancji	Stopień formowania biofilmu*
Kobiety ciężarne (kolonizacja)					
1	0,258199990	0,282099992	0,27579999	0,272033324	Umiarkowany
2	0,28549999	0,341099994	0,311590001	0,312729995	Umiarkowany
3	0,383499986	0,461599994	0,393400013	0,412833331	Umiarkowany
4	0,343298996	0,236300001	0,265101012	0,281566670	Umiarkowany
5	0,254200011	0,221499994	0,199399993	0,225033333	Słaby
6	0,326799894	0,354400027	0,290789996	0,323996639	Umiarkowany
7	0,275200009	0,218999997	0,157600001	0,217266669	Słaby
8	0,349299988	0,215398895	0,350500008	0,305066297	Umiarkowany
9	0,298100104	0,341300022	0,347300012	0,328900046	Umiarkowany
10	0,580299685	0,456399796	0,494000018	0,510233166	Silny
11	0,321200112	0,289199996	0,363500007	0,324633372	Umiarkowany
12	0,201449999	0,293400011	0,216800014	0,237216675	Słaby
13	0,241999997	0,267520013	0,232499993	0,247340001	Umiarkowany
14	0,282499994	0,315699989	0,278299914	0,292166632	Umiarkowany
15	0,205698995	0,225640004	0,227402005	0,219580335	Słaby
16	0,331599993	0,311799994	0,378379992	0,340593326	Umiarkowany
17	0,256399989	0,339399993	0,368400007	0,321399997	Umiarkowany
18	0,264600001	0,313700011	0,270349988	0,282883333	Umiarkowany
19	0,406400013	0,442799885	0,437999995	0,429066631	Umiarkowany
20	0,296790001	0,265301000	0,271399996	0,277830332	Umiarkowany
21	0,298000003	0,391499906	0,380152000	0,356550636	Umiarkowany
22	0,395699991	0,316600012	0,324499945	0,345599983	Umiarkowany
23	0,315399987	0,279530008	0,253300006	0,282743334	Umiarkowany
24	0,422900057	0,353699995	0,362500001	0,379700018	Umiarkowany
25	0,315799995	0,252300005	0,347399993	0,305166664	Umiarkowany
26	0,236600003	0,262299989	0,246300002	0,248399998	Umiarkowany
27	0,313189997	0,319099989	0,278900004	0,303729997	Umiarkowany
28	0,537200007	0,545299071	0,595900013	0,559466364	Silny

Wyniki

29	0,256000912	0,234799976	0,370400212	0,287067033	Umiarkowany
30	0,296000224	0,2315245	0,375800124	0,301108283	Umiarkowany
31	0,310679989	0,289600077	0,329800005	0,310026690	Umiarkowany
32	0,420699994	0,45442999	0,454000002	0,443043329	Umiarkowany
33	0,186499958	0,167699943	0,253100018	0,202433306	Słaby
34	0,391200003	0,313499487	0,284000029	0,329566506	Umiarkowany
35	1,151799986	1,285500022	1,211421000	1,216240336	Słaby
36	0,407399992	0,447140008	0,415999993	0,423513331	Umiarkowany
37	0,250465000	0,288499997	0,258500004	0,265821667	Umiarkowany
38	0,164100006	0,160400003	0,149399996	0,157966668	Słaby
39	0,159600445	0,185040002	0,227430005	0,190690151	Słaby
40	0,352614995	0,404200014	0,38209500	0,379636670	Umiarkowany
41	0,133799800	0,150000006	0,182999998	0,155599935	Słaby
42	0,385057000	0,352499992	0,301099986	0,346218993	Umiarkowany
43	0,309103002	0,366243200	0,236599117	0,303981773	Umiarkowany
44	0,284399986	0,295899987	0,218600005	0,266299993	Umiarkowany
45	0,176499993	0,195199996	0,177300006	0,182999998	Słaby
46	0,219800006	0,198100001	0,197600005	0,205166670	Słaby
47	0,369500011	0,363499999	0,241400003	0,324800005	Umiarkowany
48	0,182799996	0,194439999	0,174300006	0,183846667	Słaby
49	0,491403003	0,373400011	0,435450009	0,433417674	Umiarkowany
50	0,177300001	0,1729999995	0,159699996	0,169999999	Słaby
51	0,175605307	0,246530004	0,200499967	0,207545093	Słaby
52	0,198634996	0,197600457	0,216400044	0,204211832	Słaby
53	0,383170001	0,332799995	0,319983301	0,345317766	Umiarkowany
54	0,286760014	0,259720013	0,269899359	0,272126462	Umiarkowany
55	0,423299971	0,383599995	0,407500202	0,404800056	Umiarkowany
56	0,142700002	0,180399999	0,163900003	0,162333334	Słaby
57	0,438419988	0,452432986	0,383400014	0,424750996	Umiarkowany
58	0,207910004	0,211200001	0,232100046	0,217070017	Słaby
59	0,312340002	0,330343003	0,37663999	0,339774332	Umiarkowany
60	0,136199996	0,149399996	0,134700020	0,140100004	Słaby
61	0,153600007	0,175400004	0,214000002	0,181000004	Słaby
62	0,204199995	0,188599998	0,152499998	0,181766664	Słaby
63	0,161200002	0,170000002	0,161899999	0,164366667	Słaby
64	0,186600000	0,203099996	0,169200003	0,186300000	Słaby
65	0,282700000	0,261200004	0,371199989	0,305033331	Umiarkowany
66	0,175099993	0,203200004	0,164550000	0,180949999	Słaby
67	0,280600011	0,287200004	0,209999993	0,259266670	Umiarkowany
68	0,202000007	0,188199997	0,224299997	0,204833334	Słaby
69	0,240599997	0,308099997	0,320300013	0,289666669	Umiarkowany
70	0,293199986	0,245900005	0,217700005	0,252266665	Umiarkowany
71	0,189200003	0,264299989	0,232199999	0,228566664	Słaby
72	0,270399998	0,274399996	0,238699996	0,261166663	Umiarkowany
73	0,218500003	0,215100005	0,204899997	0,212833335	Słaby

Wyniki

74	0,281199992	0,223100007	0,255199999	0,253166666	Umiarkowany
75	0,190699995	0,256099999	0,219999999	0,222266664	Słaby
76	0,178499997	0,198599994	0,217899993	0,198333328	Słaby
77	0,183899999	0,215599999	0,208900005	0,202800001	Słaby
78	0,352699996	0,328299999	0,296200005	0,325733333	Umiarkowany
79	0,211600005	0,236999994	0,182600000	0,210400000	Słaby
80	0,230800003	0,258600007	0,196999996	0,228800002	Słaby
81	0,194700003	0,211700007	0,174099997	0,193500002	Słaby
82	0,313699998	0,309800007	0,385899997	0,336466667	Umiarkowany
83	0,185399994	0,176599994	0,174600005	0,178866665	Słaby
84	0,203899994	0,232800007	0,182500005	0,206400002	Słaby
85	0,176599994	0,179700002	0,177699998	0,177999998	Słaby
Osoby dorosłe (zakażenia nieinwazyjne)					
86	0,242300004	0,216900006	0,210800007	0,223333339	Słaby
87	0,392299989	0,445099993	0,369399995	0,402266659	Umiarkowany
88	0,208100006	0,217500001	0,217500001	0,214366669	Słaby
89	0,259499997	0,207699999	0,164399996	0,210533331	Słaby
90	0,279500008	0,270999998	0,214200005	0,254900003	Umiarkowany
91	0,174300000	0,197300002	0,218500003	0,196700002	Słaby
92	0,332100004	0,285499990	0,307700008	0,308433334	Umiarkowany
93	0,559199977	0,606500030	0,592500006	0,586066671	Silny
94	0,235100001	0,231299996	0,172299996	0,212899998	Słaby
95	0,168400005	0,167400002	0,143600002	0,159800003	Słaby
96	0,281500002	0,338500013	0,340299992	0,320100002	Umiarkowany
97	0,352999992	0,389599998	0,424499989	0,389033324	Umiarkowany
98	0,297800003	0,365399987	0,358890001	0,340696664	Umiarkowany
99	0,524900019	0,596499979	0,538299978	0,553233325	Silny
100	0,332499992	0,298399994	0,276099989	0,302333325	Umiarkowany
101	0,399400007	0,347600002	0,362599999	0,369866669	Umiarkowany
102	0,249100004	0,286399990	0,307199996	0,280899997	Umiarkowany
103	0,222800002	0,191900000	0,181400001	0,198700001	Słaby
104	0,913800013	1,043400049	1,029200006	0,995466689	Silny
105	0,272100002	0,224600002	0,262899995	0,253200000	Umiarkowany
106	0,222999991	0,178499995	0,198400006	0,199966664	Słaby
107	0,178399994	0,223399999	0,182599996	0,194799996	Słaby
108	0,209500000	0,179000005	0,182400003	0,190300003	Słaby
109	0,192599997	0,206400007	0,151800007	0,183600004	Słaby
110	0,223900005	0,246399999	0,239899993	0,236733332	Słaby
111	0,146599997	0,134900004	0,150600013	0,144033338	Słaby
112	0,178499991	0,168800001	0,191100001	0,179466664	Słaby
113	0,207499996	0,208500004	0,203799996	0,206599999	Słaby
114	0,336100012	0,359299988	0,332599998	0,342666666	Umiarkowany
115	0,282900006	0,257699995	0,286499999	0,2757	Umiarkowany
116	0,152099997	0,169599995	0,184699997	0,168799996	Słaby
117	0,184599996	0,172900006	0,192200001	0,183233334	Słaby

Wyniki

118	0,348800004	0,328200012	0,315200011	0,330733342	Umiarkowany
119	0,310699991	0,281400014	0,299300014	0,297133334	Umiarkowany
120	0,332500001	0,367000014	0,344199997	0,347900007	Umiarkowany
121	0,244999994	0,274699987	0,241300002	0,253666661	Umiarkowany
122	0,267300010	0,210299999	0,212400004	0,230000004	Słaby
123	0,223199993	0,289499998	0,274300009	0,262333333	Umiarkowany
124	0,144199997	0,156100005	0,149100006	0,149800003	Słaby
125	0,207399994	0,192699999	0,190599993	0,196899995	Słaby
126	0,140200004	0,169499993	0,180600002	0,163433333	Słaby
127	0,304699987	0,387199998	0,298299998	0,330066661	Umiarkowany
128	1,498500028	1,543699980	1,584000025	1,542066677	Silny
129	0,333999991	0,347499996	0,250800014	0,310766667	Umiarkowany
Noworodki (kolonizacja)					
130	0,207200006	0,266600013	0,231199995	0,235000004	Słaby
131	0,298300006	0,365500021	0,310800007	0,324866678	Umiarkowany
132	0,161100000	0,201000005	0,198300004	0,186800003	Słaby
133	0,171200007	0,212699994	0,161200002	0,181700001	Słaby
134	0,388199991	0,337999989	0,394400017	0,373533332	Umiarkowany
135	0,273099999	0,252900004	0,217600007	0,247866667	Umiarkowany
136	0,240600012	0,213099995	0,193899995	0,215866667	Słaby
137	0,300999999	0,243200004	0,250499994	0,264899999	Umiarkowany
138	0,399999998	0,362699986	0,349000008	0,370566664	Umiarkowany
139	0,199599996	0,230699987	0,180999993	0,203766659	Słaby
140	0,160699993	0,151600003	0,153999999	0,155433332	Słaby
141	0,289799988	0,305500011	0,253400005	0,282900002	Umiarkowany
142	0,197799994	0,193700001	0,230500014	0,207333336	Słaby
143	0,457399979	0,371399997	0,389000014	0,405933333	Umiarkowany
144	0,252100003	0,190400004	0,188400000	0,210300002	Słaby
145	0,212600003	0,171599999	0,162000005	0,182066669	Słaby
146	0,363000004	0,313400000	0,291400002	0,322600002	Umiarkowany
147	0,341300011	0,290600002	0,298599988	0,310166667	Umiarkowany
148	0,143900007	0,198599994	0,141399994	0,161299999	Słaby
149	0,425500021	0,366600014	0,352599987	0,381566674	Umiarkowany
150	0,161100000	0,236499996	0,189299999	0,195633332	Słaby
151	0,171799996	0,221300008	0,158399994	0,183833333	Słaby
152	0,304000014	0,286299995	0,255499989	0,281933332	Umiarkowany
153	0,167699993	0,154499993	0,165999994	0,162733326	Słaby
154	0,365399988	0,304499992	0,342299998	0,337399993	Umiarkowany
155	0,279900006	0,261600000	0,240300000	0,260600002	Umiarkowany
156	0,488599986	0,488699991	0,547300012	0,508199996	Silny
157	0,332199991	0,304599999	0,321599991	0,319466657	Umiarkowany
158	0,284999996	0,340400010	0,297100008	0,307500005	Umiarkowany
159	0,374200013	0,385599997	0,350699991	0,370166667	Umiarkowany
Noworodki (zakażenia inwazyjne)					

Wyniki

160	0,217399987	0,20029999	0,212399995	0,210033324	Słaby
161	0,282600009	0,284999996	0,2664	0,278000002	Umiarkowany
162	0,391600001	0,472000007	0,403500003	0,422366670	Umiarkowany
163	0,216499999	0,198700006	0,193599993	0,202933333	Słaby
164	0,256499999	0,322700006	0,293599993	0,290933333	Słaby
165	0,358900011	0,303500015	0,378199986	0,346866670	Umiarkowany
KD**	1,059007098	1,044008450	1,029011990	1,044009179	
KD	1,059756999	1,055679027	1,049129579	1,054855202	
KD	1,056497832	1,039488732	1,017391811	1,037792792	
KD	1,033645921	1,072027252	1,056293375	1,053988849	
KD	1,104401775	1,043769300	1,024700911	1,057623996	
KD	1,023686477	1,068721120	1,052562900	1,048323499	
KD	1,066499982	1,043099999	1,018500018	1,042700000	
KD	1,073699980	1,032699990	1,053199978	1,053199983	
KU***	0,107299998	0,111599997	0,111400011	0,110100002	
KU	0,108499996	0,127800001	0,103600002	0,113300000	
KU	0,121099995	0,128199995	0,121700002	0,123666664	
KU	0,119200007	0,126000002	0,122699996	0,122633335	
KU	0,122000001	0,119999997	0,124000000	0,122000000	
KU	0,112300001	0,129499996	0,126399994	0,122733330	
KU	0,115000000	0,117600001	0,124100001	0,118900001	
KU	0,129999995	0,109300002	0,106600001	0,115300000	

* Interpretacja stopnia formowania biofilmu zgodnie z kryteriami opisanymi w Tabeli 8.

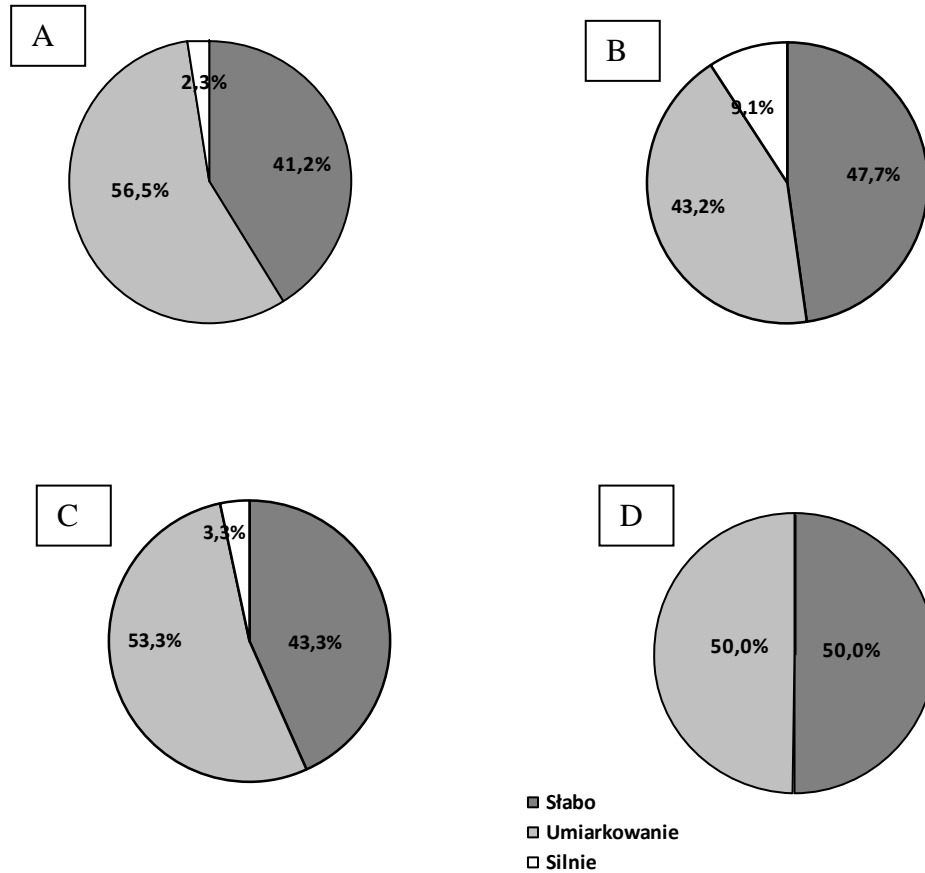
** KD - kontrolę dodatnią stanowił szczep *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, kontrola dodatnia wykonywana była na każdej płytce titracyjnej.

*** KU - kontrolę ujemną stanowił bulion Todd-Hewitt bez zawiesiny bakteryjnej, kontrola ujemna wykonywana była na każdej płytce titracyjnej.

Tabela 17. Procentowy udział szczepów wykazujących różną zdolność do formowania biofilmu

Stopień formowania biofilmu	Liczba szczepów	%
	(n=165)	
Nieformujące	0	0,00
Słabo formujące	72	43,64
Umiarkowanie formujące	86	52,12
Silnie formujące	7	4,24

Rycina 7 przedstawia ocenę stopnia formowania biofilmu z uwzględnieniem różnych materiałów, z których izolowano badane szczepy. W grupie szczepów izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych dominowały izolaty z umiarkowaną zdolnością do tworzenia biofilmu (n=48), w dalszej kolejności identyfikowano izolaty ze słabą zdolnością do tworzenia biofilmu (n=35). Dwadzieścia jeden szczepów izolowanych od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych (głównie z moczu) charakteryzowało się słabą zdolnością do tworzenia biofilmu, natomiast 19 izolatów tworzyło biofilm w stopniu umiarkowanym. Wśród szczepów izolowanych z kolonizacji od noworodków 16 wykazywało umiarkowaną, a 13 słabą zdolność do tworzenia biofilmu. Połowa szczepów (n=3) izolowanych z zakażeń inwazyjnych od noworodków charakteryzowała się umiarkowaną a druga połowa (n=3) słabą zdolnością do tworzenia biofilmu. Ponadto analizując zdolność do tworzenia biofilmu przez szczepy izolowane z różnych materiałów klinicznych zaobserwowano, iż spośród siedmiu szczepów wykazujących silną zdolność do formowania biofilmu dwa pochodziły z kolonizacji od kobiet ciężarnych (z pochwy), cztery od osób dorosłych z zakażeń innych niż okołoporodowe (trzy izolowano z moczu, jeden z wymazu z rany) natomiast jeden izolowano z wymazu z gardła od noworodka. Wśród szczepów izolowanych z zakażeń inwazyjnych od noworodków nie stwierdzono szczepów wykazujących silnej zdolności do tworzenia biofilmu. Stwierdzone różnice nie były statystycznie istotne (Suplement, Obliczenie 1).



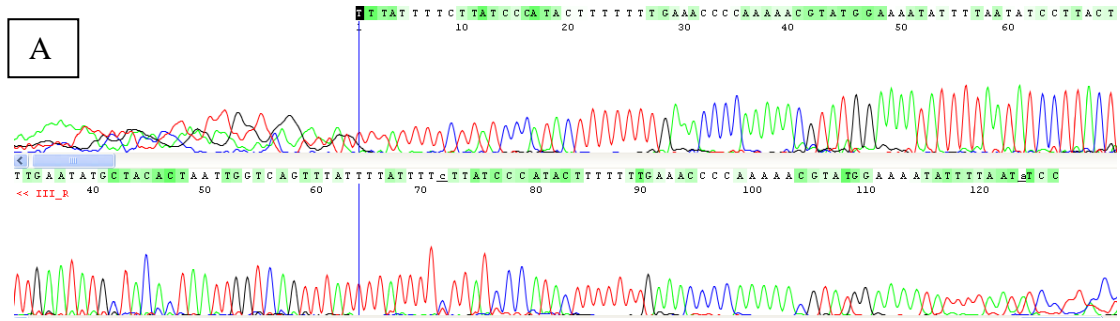
Rycina 7. Ocena stopnia formowania biofilmu dla szczepów *S. agalactiae*: A) izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych, B) od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych, C) z kolonizacji od noworodków, D) od noworodków z zakażeń inwazyjnych.

5.3. Serotypowanie szczepów *Streptococcus agalactiae*

5.3.1. Sprawdzenie swoistości zastosowanych starterów

W ramach badań wstępnych produkty reakcji PCR poddano sekwencjonowaniu w celu potwierdzenia zgodności ich sekwencji z sekwencjami referencyjnymi. Tabela 18 przedstawia procent zgodności uzyskanych wyników sekwencjonowania z sekwencjami referencyjnymi. Niewielkie różnice w porównaniu do sekwencji referencyjnej odnotowano jedynie w przypadku serotypu Ia i III uzyskując 99% podobieństwo, pozostałe

porównywane sekwencje były identyczne. Wyniki sekwencjonowania potwierdziły specyficzność zastosowanych do serotypowania starterów. Przykładowy fragment chromatogramu analizowanej sekwencji dla serotypu III oraz wynik otrzymany z porównania sekwencji referencyjnej z sekwencjami badanymi uzyskanymi w wyniku sekwencjonowania (dla szczepu klinicznego nr 27 i szczepu wzorcowego ATCC 12403) przedstawiono na Rycinie 8.



A

T T A T T T T C T T A T C C C A T A C T T T T T T T T G A A A C C C C A A A A A C G T A T G C A A A A T A T T T T A A T A T C C T T A C T

10 20 30 40 50 60

T T G A A T A T G C T A C A C T A A A T G C T C A C T T A T T T T A T T T T T T T T T T T A T C C C A T A C T T T T T T T G A A A C C C C A A A A A C G T A T G C A A A A T A T T T T A A T A T C C

<< III_R 40 50 60 70 80 90 100 110 120

B

ATCC
12403.....CCACATATGAGAATAAGACTTGCGGCATATTTTGAATATGCTACACTAATTGGTCAGTTT
Sek. ref. AF163833.1
...CCACATATGAGAATAAGACTTGCGGCATATTTTGAATATGCTACACTAATTGGTCAGTTT
Szczep ATCC12403....
CCACATATGAGAATAAGACTTGCGGCATATTTTGAATATGCTACACTAATTGGTCAGTTT

ATCC
12403.....ATTTTATTTTCTTATCCATACTTTTTTTGAAACCCCAAAAACGTATGGAAAATATTTTA
Sek. ref.
AF163833.1.....ATTTTATTTTCTTATCCATACTTTTTTTGAAACCCCAAAAACGTATGGAAAATATTTTA
Szczep nr 27
.....ATTTTATTTTCTTATCCATACTTTTTTTGAAACCCCAAAAACATATGGAAAATATTTTA

ATCC 12403.....ATATCCTTACTGTTGA
Sek. ref. AF163833.1ATATCCTTACTGTTGA
Szczep nr 27ATATCCTTACTGTTGA

Rycina 8. Przykładowy wynik sekwencjonowania A) Fragment chromatogramu analizowanej sekwencji genu dla serotypu III. B) Porównanie sekwencji referencyjnej z wynikami sekwencjonowania dla fragmentu DNA szczepu o serotypie III (szczep wzorcowy *S. agalactiae* ATCC 12403 oraz szczep kliniczny nr 27). Stwierdzono występowanie jednego wariantu sekwencji DNA u szczepu klinicznego w odniesieniu do sekwencji referencyjnej (substytucja w pozycji 7672 A>G).

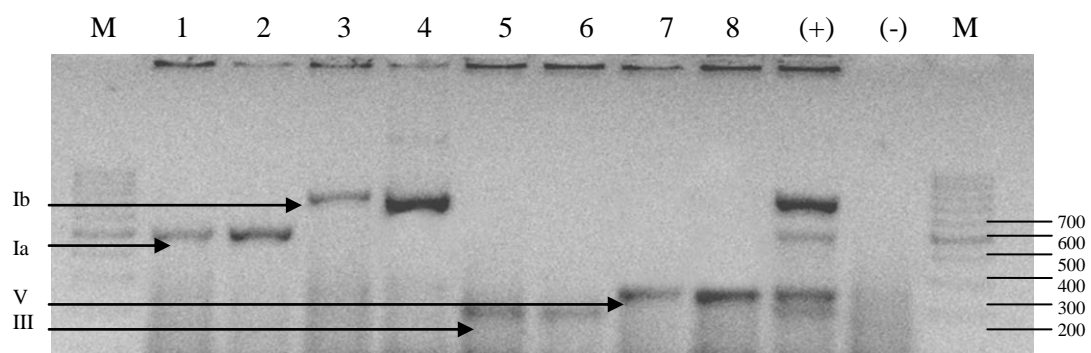
Tabela 18. Zgodność uzyskanych wyników sekwencjonowania badanych fragmentów genów z sekwencjami referencyjnymi z wykorzystaniem oprogramowania BLAST [w %; [www.http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)]

Serotyp	Zgodność [%]
Ia	99%
Ib	100%
II	100%
III	99%
IV	100%
V	100%
VI	100%
VII	100%

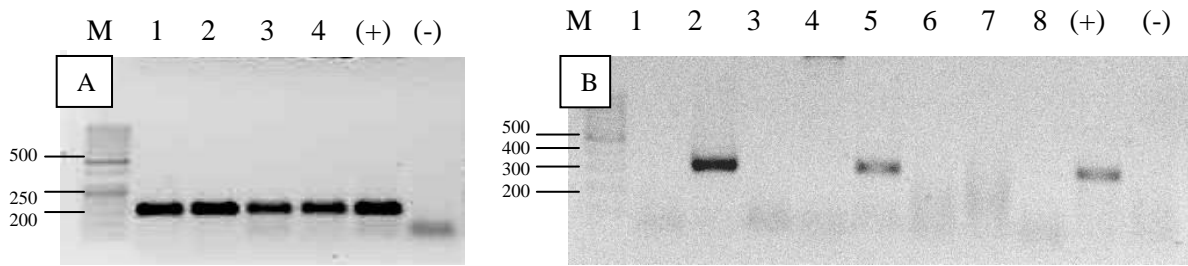
5.3.2. Wyniki serotypowania badanych szczepów *Streptococcus agalactiae*

Dla wszystkich badanych szczepów (n=165) określono serotyp (Tabela 19). Przykładowe wyniki reakcji PCR przeprowadzonych w celu określenia serotypów przedstawiono na Rycinach 9 i 10.

Najczęściej występującymi serotypami były serotyp III (32,73%), V (25,45%) oraz serotyp Ia (18,18%). Rozpoznane serotypy przedstawiono w Tabeli 19, a częstość ich występowania w Tabeli 20.



Rycina 9. Wynik elektroforezy produktów amplifikacji genów w reakcji multipleks PCR [serotyp Ia (521 pz), Ib (770 pz), III (187 pz) V (247 pz)]: ścieżki 1-8 – badane próby, (+) kontrola dodatnia, (-) kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 100 bp).



Rycina 10. Przykładowe wyniki elektroforezy produktów amplifikacji genów w pojedynczych reakcjach PCR: A) serotyp II (188 pz), ścieżki 1-4 – badane próby, (+) kontrola dodatnia, (-) kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 50 bp); B) serotyp IV (314 pz), ścieżki 1-8 – badane próby, (+) – kontrola dodatnia, (-) – kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 100 bp).

Tabela 19. Wyniki serotypowania badanych szczepów GBS izolowanych z materiałów klinicznych

Nr szczepu	Material	Serotyp	Nr szczepu	Material	Serotyp
Kobiety ciężarne (kolonizacja)			Osoby dorosłe (zakażenia nieinwazyjne)		
1	wymaz z pochwy	III	86	mocz	II
2	wymaz z pochwy	V	87	mocz	V
3	wymaz z pochwy	III	88	mocz	II
4	wymaz z pochwy	III	89	mocz	VII
5	wymaz z pochwy	III	90	mocz	III
6	wymaz z pochwy	III	91	mocz	IV
7	wymaz z pochwy	V	92	mocz	II
8	wymaz z pochwy	III	93	mocz	II
9	wymaz z pochwy	III	94	mocz	Ib
10	wymaz z pochwy	Ia	95	mocz	III
11	wymaz z pochwy	V	96	mocz	Ib
12	wymaz z pochwy	III	97	mocz	III
13	wymaz z pochwy	V	98	mocz	II
14	wymaz z pochwy	III	99	mocz	III
15	wymaz z pochwy	II	100	mocz	V
16	wymaz z pochwy	V	101	mocz	V
17	wymaz z pochwy	III	102	mocz	V
18	wymaz z pochwy	Ia	103	mocz	Ia
19	wymaz z pochwy	V	104	mocz	V
20	wymaz z pochwy	Ia	105	mocz	V
21	wymaz z pochwy	V	106	mocz	III
22	wymaz z pochwy	II	107	mocz	V
23	wymaz z pochwy	III	108	mocz	V
24	wymaz z pochwy	II	109	mocz	III
25	wymaz z pochwy	Ia	110	mocz	V
26	wymaz z pochwy	Ia	111	mocz	Ib

Wyniki

27	wymaz z pochwy	III	112	mocz	V
28	wymaz z pochwy	III	113	mocz	Ia
29	wymaz z pochwy	Ib	114	mocz	Ib
30	wymaz z pochwy	II	115	mocz	V
31	wymaz z pochwy	V	116	mocz	Ia
32	wymaz z pochwy	III	117	mocz	III
33	wymaz z pochwy	III	118	mocz	III
34	wymaz z pochwy	V	119	mocz	III
35	wymaz z pochwy	Ia	120	mocz	V
36	wymaz z pochwy	III	121	mocz	III
37	wymaz z pochwy	Ia	122	wymaz z rany	II
38	wymaz z pochwy	II	123	nasienie	V
39	wymaz z pochwy	III	124	wymaz z rany	V
40	wymaz z pochwy	III	125	nasienie	Ia
41	wymaz z pochwy	III	126	ropa	Ia
42	wymaz z pochwy	Ia	127	nasienie	Ia
43	wymaz z pochwy	II	128	wymaz z rany	III
44	wymaz z pochwy	Ia	129	nasienie	III
45	wymaz z pochwy	Ia	Noworodki (kolonizacja)		
46	wymaz z pochwy	III	130	wymaz z gardła	III
47	wymaz z pochwy	III	131	wymaz z gardła	III
48	wymaz z pochwy	V	132	wymaz z gardła	Ia
49	wymaz z pochwy	Ib	133	wymaz z odbytu	II
50	wymaz z pochwy	V	134	wymaz z gardła	III
51	wymaz z pochwy	V	135	wymaz z gardła	III
52	wymaz z pochwy	III	136	wymaz z odbytu	III
53	wymaz z pochwy	Ib	137	wymaz z gardła	Ia
54	wymaz z pochwy	II	138	wymaz z gardła	Ia
55	wymaz z pochwy	Ib	139	wymaz z gardła	Ia
56	wymaz z pochwy	III	140	wymaz z odbytu	IV
57	wymaz z pochwy	Ib	141	wymaz z gardła	V
58	wymaz z pochwy	V	142	wymaz z odbytu	III
59	wymaz z pochwy	III	143	wymaz z ucha	III
60	wymaz z pochwy	V	144	wymaz z gardła	III
61	wymaz z pochwy	III	145	wymaz z ucha	V
62	wymaz z pochwy	VI	146	wymaz z gardła	Ib
63	wymaz z pochwy	Ia	147	wymaz z gardła	III
64	wymaz z pochwy	Ia	148	wymaz z ucha	Ia
65	wymaz z pochwy	Ia	149	wymaz z gardła	Ia
66	wymaz z pochwy	V	150	wymaz z gardła	Ia
67	wymaz z pochwy	V	151	wymaz z odbytu	Ia
68	wymaz z pochwy	III	152	wymaz z gardła	V
69	wymaz z pochwy	VI	153	wymaz z odbytu	III
70	wymaz z pochwy	Ib	154	wymaz z gardła	II
71	wymaz z pochwy	III	155	wymaz z ucha	V
72	wymaz z pochwy	III	156	wymaz z gardła	V
73	wymaz z pochwy	IV	157	wymaz z ucha	IV
74	wymaz z pochwy	V	158	wymaz z odbytu	V
75	wymaz z pochwy	V	159	wymaz z ucha	V
76	wymaz z pochwy	III	Noworodki (zakażenia inwazyjne)		
77	wymaz z pochwy	III	160	krew	II
78	wymaz z pochwy	II	161	krew	II

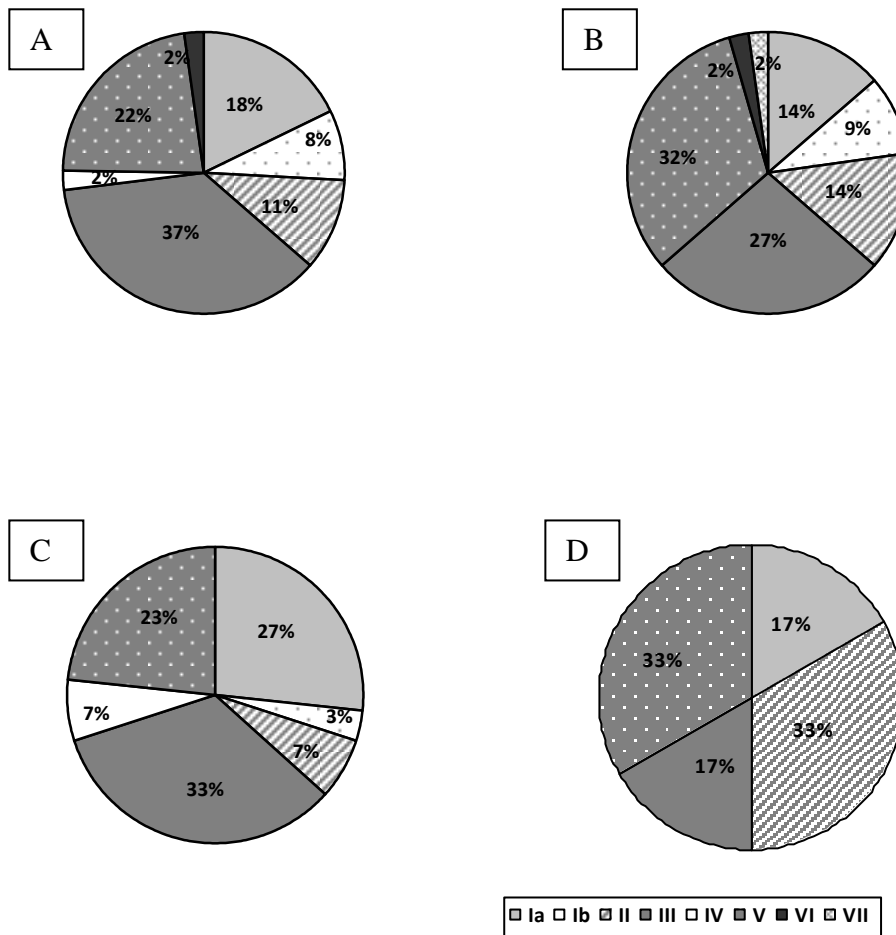
Wyniki

79	wymaz z pochwy	V	162	rew	III
80	wymaz z pochwy	Ib	163	rew	V
81	wymaz z pochwy	II	164	rew	Ia
82	wymaz z pochwy	VI	165	rew	V
83	wymaz z pochwy	Ia			
84	wymaz z pochwy	Ia			
85	wymaz z pochwy	III			

Tabela 20. Częstość zidentyfikowanych serotypów (I-VII) wśród badanych szczepów

Serotyp	Liczba szczepów	%
Ia	30	18,18
Ib	12	7,27
II	19	11,51
III	54	32,73
IV	4	2,42
V	42	25,45
VI	3	1,82
VII	1	0,61
Suma	165	100,00

Analizując udział zidentyfikowanych serotypów wśród badanych szczepów izolowanych z różnych materiałów klinicznych zaobserwowano dominację serotypu III wśród szczepów izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych oraz z kolonizacji od noworodków (odpowiednio 36,47% i 33,33%), wśród szczepów izolowanych od osób dorosłych z zakażeń innych niż okołoporodowe dominowały szczepy serotypu V (31,82%). W grupie szczepów izolowanych od noworodków z zakażeń inwazyjnych serotyp II i V występowały z równą częstością (33,33%) (Rycina 11). Różnice w częstości występowania poszczególnych serotypów w analizowanych materiałach klinicznych nie były istotne statystycznie (Suplement, Obliczenie 2).

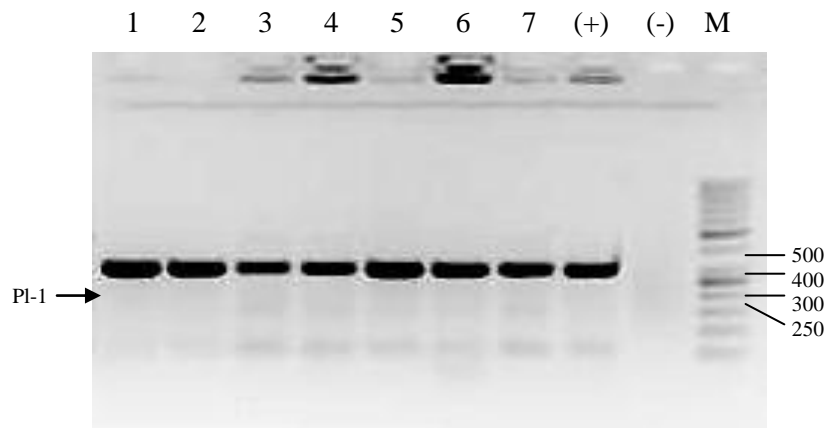


Rycina 11. Częstość występowania poszczególnych serotypów izolowanych z A) kolonizacji od kobiet ciężarnych, B) od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych, C) z kolonizacji od noworodków, D) od noworodków z zakażeń inwazyjnych.

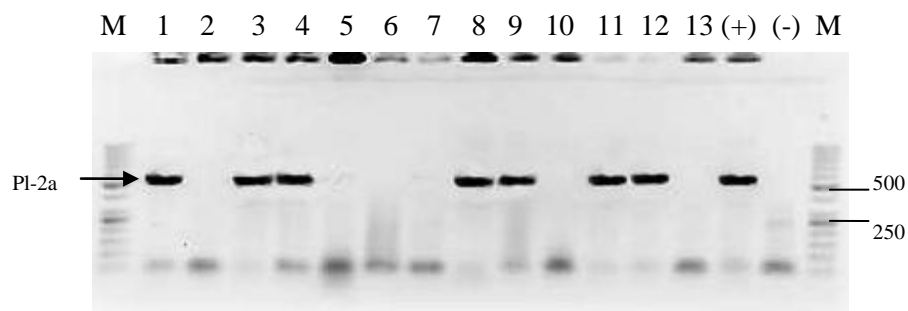
5.4. Ocena obecności różnych typów fimbrii – PI-1, PI-2a i PI-2b

Dla wszystkich badanych szczepów (n=165) rozpoznano rodzaj obecnych fimbrii. Przykładowe wyniki przeprowadzonych reakcji PCR znajdują się na Rycinach 12, 13 i 14.

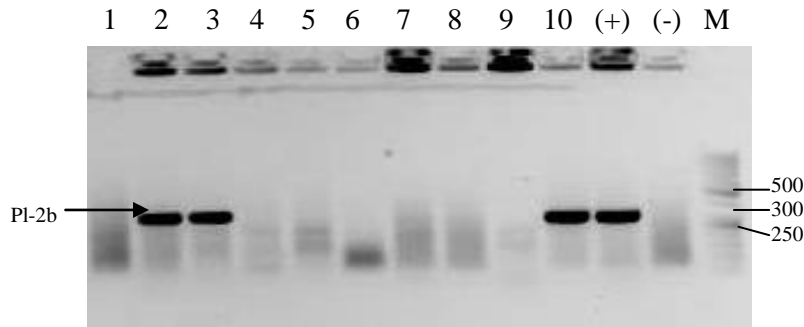
Każdy ze szczepów posiadał jeden lub dwa rodzaje fimbrii (Tabela 21). W badanej grupie 165 szczepów dominowały izolaty posiadające fimbrie typu PI-1 razem z PI-2a (n=88,), natomiast najmniej było izolatów posiadających tylko fimbrie typu PI-2b (n=4).



Rycina 12. Wynik elektroforezy produktów amplifikacji dla fragmentu genu kodującego fimbrie PI-1 (298 pz) ścieżki 1-7 – badane próby, (+) kontrola dodatnia, (-) kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 50 bp).



Rycina 13. Wynik elektroforezy produktów amplifikacji dla fragmentu genu kodującego fimbrie PI-2a (575 pz) ścieżki 1-13 – badane próby, (+) – kontrola dodatnia, (-) – kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 50 bp).



Rycina 14. Wynik elektroforezy produktów amplifikacji dla fragmentu genu kodującego fimbrie PI-2b (314 pz) ścieżki 1-10 – badane próby, (+) – kontrola dodatnia, (-) – kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 50 bp).

Tabela 21. Występowanie różnych typów fimbrii wśród badanych szczepów *S. agalactiae*

Nr szczepu	PI-1	PI-2a	PI-2b	Nr szczepu	PI-1	PI-2a	PI-2b
Kobiety ciężarne (kolonizacja)				Osoby dorosłe (zakażenia nieinwazyjne)			
1	+	+	-	86	+	+	-
2	+	+	-	87	-	+	-
3	+	+	-	88	+	+	-
4	+	+	-	89	+	-	+
5	+	-	+	90	+	+	-
6	+	+	-	91	+	-	+
7	+	+	-	92	+	+	-
8	+	+	-	93	+	+	-
9	+	+	-	94	+	+	-
10	-	+	-	95	+	-	+
11	+	+	-	96	+	+	-
12	+	-	+	97	+	+	-
13	-	+	-	98	+	+	-
14	+	+	-	99	+	+	-
15	+	+	-	100	+	+	-
16	+	+	-	101	+	+	-
17	+	-	+	102	+	+	-
18	-	+	-	103	-	+	-
19	+	+	-	104	+	+	-
20	-	+	-	105	+	+	-
21	+	+	-	106	+	-	+
22	+	+	-	107	+	+	-
23	+	+	-	108	+	+	-
24	+	+	-	109	+	-	+
25	-	+	-	110	+	-	+
26	-	+	-	111	+	+	-
27	+	-	+	112	+	+	-

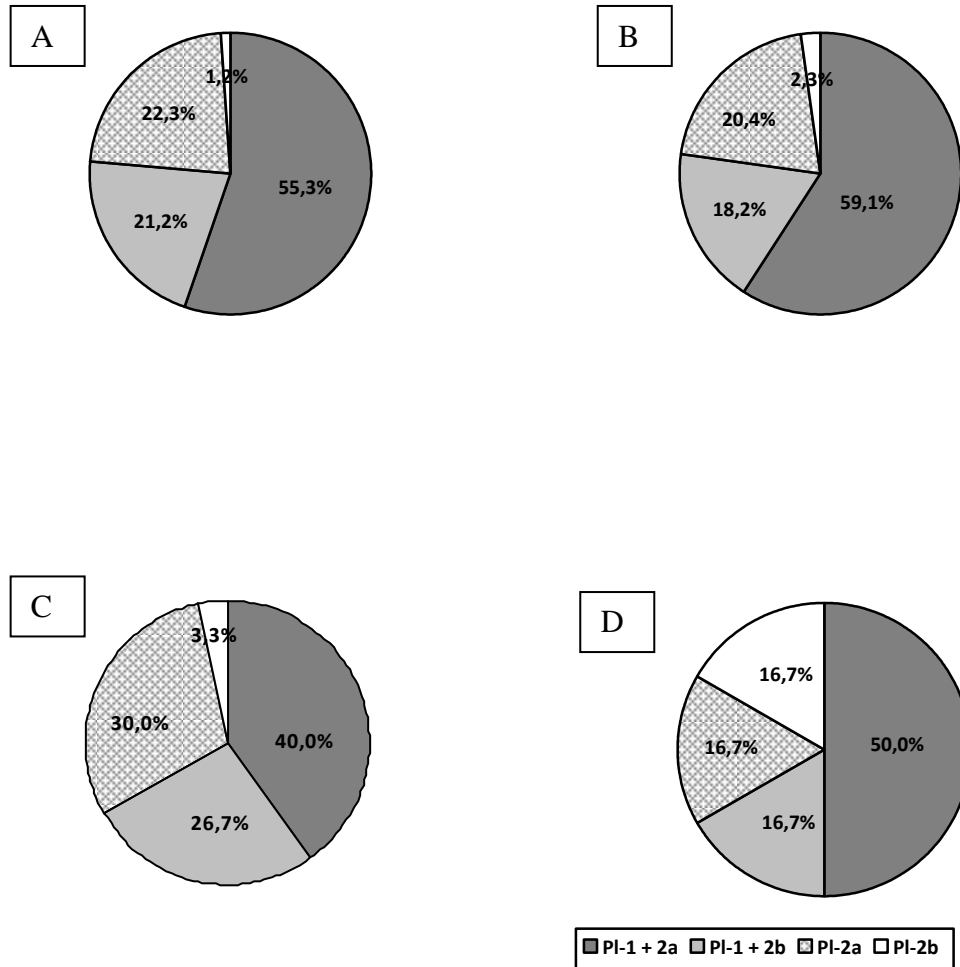
Wyniki

28	+	+	-	113	-	+	-
29	+	+	-	114	+	+	-
30	+	+	-	115	+	-	+
31	+	+	-	116	-	+	-
32	+	-	+	117	+	+	-
33	+	+	-	118	+	-	+
34	+	+	-	119	-	+	-
35	-	+	-	120	+	+	-
36	+	-	+	121	+	+	-
37	-	+	-	122	-	-	+
38	+	+	-	123	-	+	-
39	+	+	-	124	+	+	-
40	+	-	+	125	-	+	-
41	+	-	+	126	+	+	-
42	-	+	-	127	-	+	-
43	+	+	-	128	+	+	-
44	-	+	-	129	-	+	-
45	-	+	-	Noworodki (kolonizacja)			
46	+	-	+	130	+	-	+
47	+	-	+	131	-	-	+
48	+	+	-	132	-	+	-
49	+	+	-	133	+	+	-
50	+	+	-	134	+	-	+
51	+	+	-	135	+	-	+
52	+	+	-	136	+	+	-
53	-	+	-	137	-	+	-
54	+	+	-	138	-	+	-
55	+	+	-	139	-	+	-
56	+	-	+	140	+	+	-
57	+	+	-	141	+	+	-
58	+	+	-	142	+	-	+
59	+	-	+	143	+	+	-
60	+	+	-	144	+	-	+
61	+	-	+	145	+	+	-
62	+	+	-	146	+	+	-
63	-	+	-	147	+	-	+
64	-	+	-	148	+	+	-
65	-	+	-	149	-	+	-
66	+	+	-	150	-	+	-
67	+	+	-	151	-	+	-
68	+	-	+	152	-	+	-
69	+	+	-	153	+	-	+
70	+	-	+	154	+	+	-
71	-	+	-	155	+	+	-
72	+	+	-	156	+	+	-
73	+	-	+	157	+	-	+
74	+	+	-	158	+	+	-
75	+	+	-	159	-	+	-
76	+	+	-	Noworodki (zakażenia inwazyjne)			

Wyniki

77	+	-	+	160	-	-	+
78	+	-	+	161	+	+	-
79	+	+	-	162	+	-	+
80	-	-	+	163	+	+	-
81	+	+	-	164	-	+	-
82	+	+	-	165	+	+	-
83	-	+	-				
84	-	+	-				
85	-	+	-				

Analizując udział zidentyfikowanych typów fimbrii wśród badanych szczepów izolowanych z różnych materiałów klinicznych zaobserwowano dominację fimbrii Pl-1 razem z Pl-2a wśród czterech badanych grup szczepów: A) izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych (n=47), B) izolowanych od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych (n=26), C) z kolonizacji od noworodków (n=12) oraz D) izolowanych od noworodków z zakażeń inwazyjnych (n=3) (Rycina 15). Obserwowane różnice nie były statystycznie istotne (Suplement, Obliczenie 3).



Rycina 15. Występowanie różnych typów fimbrii wśród badanych szczepów: A) izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych, B) od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych, C) z kolonizacji od noworodków, D) od noworodków z zakażeń inwazyjnych.

5.5. Wykrywanie genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp

Przykładowy wynik elektroforezy produktów amplifikacji genów kodujących białka z rodziny Alp w reakcji multipleks PCR przedstawiono na Rycinie 16, natomiast Tabela 22 przedstawia występowanie badanych genów. Wśród badanych szczepów dominowały izolaty posiadające gen *rib* (n=72), w dalszej kolejności geny *alp2* lub *alp3* (n=48), *epsilon* (n=37) oraz *bca* (n=8). Nie stwierdzono obecności genów *alp4* (Tabela 22).



Rycina 16. Wynik elektroforezy produktów amplifikacji genów kodujących białka z rodziny Alp w reakcji multiplex PCR [*epsilon* (200 pz), *rib* (295 pz), *alp2/3* (334 pz) *bca* (398 pz), *alp4* (110 pz)] ścieżki 1-34 – badane próby, (+) – kontrola dodatnia, (-) – kontrola ujemna, M – wzorec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 100 bp).

Tabela 22. Występowanie genów kodujących białka z rodziny Alp

Nr szczepu	<i>epsilon</i>	<i>rib</i>	<i>alp2/3</i>	<i>bca</i>	<i>alp4</i>	Nr szczepu	<i>epsilon</i>	<i>rib</i>	<i>alp2/3</i>	<i>bca</i>	<i>alp4</i>
Kobiety ciężarne (kolonizacja)						Osoby dorosłe (zakażenia nieinwazyjne)					
1	-	-	+	-	-	86	-	-	-	+	-
2	-	-	+	-	-	87	-	+	-	-	-
3	-	-	+	-	-	88	-	+	-	-	-
4	-	+	-	-	-	89	-	-	+	-	-
5	-	+	-	-	-	90	-	-	+	-	-
6	-	-	+	-	-	91	+	-	-	-	-
7	-	-	+	-	-	92	-	-	-	+	-
8	-	+	-	-	-	93	-	+	-	-	-
9	-	+	-	-	-	94	-	+	-	-	-
10	-	+	-	-	-	95	-	+	-	-	-
11	-	-	+	-	-	96	-	+	-	-	-
12	-	+	-	-	-	97	-	-	+	-	-
13	-	+	-	-	-	98	-	-	+	-	-
14	-	-	+	-	-	99	-	-	+	-	-
15	-	-	-	+	-	100	-	-	+	-	-
16	-	-	+	-	-	101	-	-	+	-	-
17	-	+	-	-	-	102	-	-	+	-	-
18	+	-	-	-	-	103	+	-	-	-	-
19	-	-	+	-	-	104	-	-	+	-	-
20	-	+	-	-	-	105	-	-	+	-	-
21	-	-	+	-	-	106	-	+	-	-	-
22	-	+	-	-	-	107	-	-	+	-	-

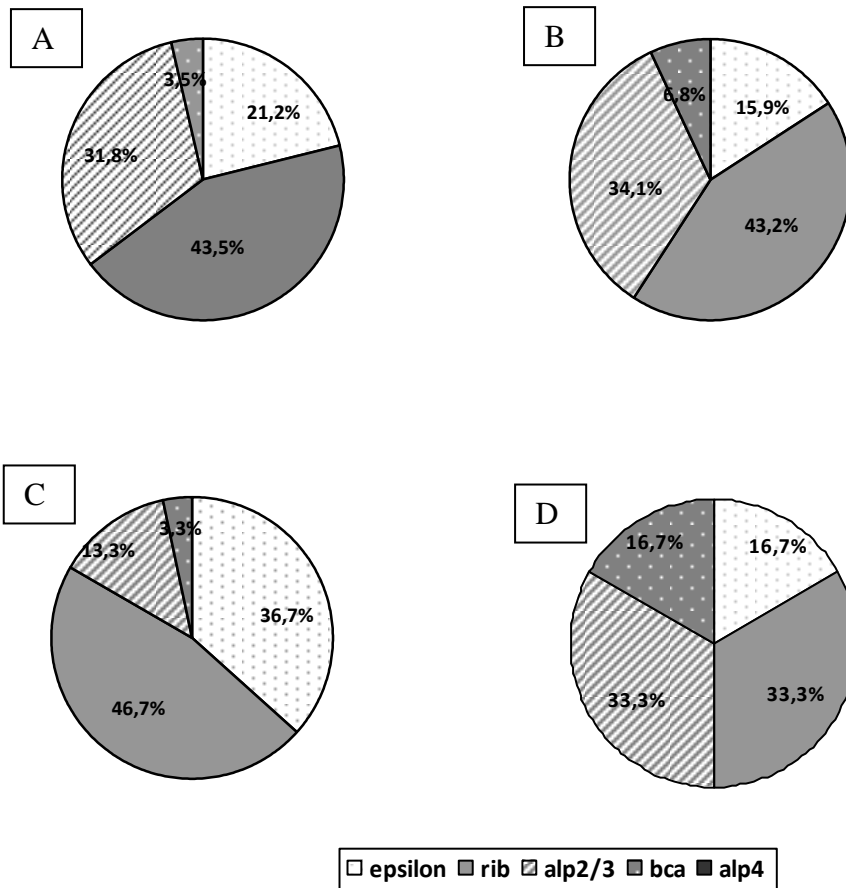
Wyniki

23	-	+	-	-	-	108	-	-	+	-	-
24	-	+	-	-	-	109	-	+	-	-	-
25	+	-	-	-	-	110	-	-	+	-	-
26	+	-	-	-	-	111	-	+	-	-	-
27	-	+	-	-	-	112	-	-	+	-	-
28	-	+	-	-	-	113	+	-	-	-	-
29	-	+	-	-	-	114	-	-	-	+	-
30	-	-	-	+	-	115	-	+	-	-	-
31	-	-	+	-	-	116	+	-	-	-	-
32	-	+	-	-	-	117	-	-	+	-	-
33	-	+	-	-	-	118	-	+	-	-	-
34	-	-	+	-	-	119	-	+	-	-	-
35	+	-	-	-	-	120	-	+	-	-	-
36	-	+	-	-	-	121	-	+	-	-	-
37	+	-	-	-	-	122	+	-	-	-	-
38	-	+	-	-	-	123	-	+	-	-	-
39	-	+	-	-	-	124	-	+	-	-	-
40	-	+	-	-	-	125	-	+	-	-	-
41	-	+	-	-	-	126	+	-	-	-	-
42	+	-	-	-	-	127	+	-	-	-	-
43	-	-	-	+	-	128	-	+	-	-	-
44	+	-	-	-	-	129	-	+	-	-	-
45	-	+	-	-	-	Noworodki (kolonizacja)					
46	-	+	-	-	-	130	-	+	-	-	-
47	-	+	-	-	-	131	-	+	-	-	-
48	-	-	+	-	-	132	+	-	-	-	-
49	+	-	-	-	-	133	-	+	-	-	-
50	-	-	+	-	-	134	-	+	-	-	-
51	-	-	+	-	-	135	-	+	-	-	-
52	-	-	+	-	-	136	-	+	-	-	-
53	-	-	+	-	-	137	+	-	-	-	-
54	-	+	-	-	-	138	+	-	-	-	-
55	-	-	+	-	-	139	+	-	-	-	-
56	-	+	-	-	-	140	+	-	-	-	-
57	-	-	+	-	-	141	-	-	+	-	-
58	-	-	+	-	-	142	-	+	-	-	-
59	-	+	-	-	-	143	-	-	+	-	-
60	-	-	+	-	-	144	-	+	-	-	-
61	-	+	-	-	-	145	-	-	+	-	-
62	-	+	-	-	-	146	-	-	-	+	-
63	+	-	-	-	-	147	-	-	+	-	-
64	+	-	-	-	-	148	+	-	-	-	-
65	+	-	-	-	-	149	+	-	-	-	-
66	-	-	+	-	-	150	+	-	-	-	-
67	-	-	+	-	-	151	+	-	-	-	-
68	-	+	-	-	-	152	+	-	-	-	-
69	-	-	+	-	-	153	-	+	-	-	-
70	+	-	-	-	-	154	+	-	-	-	-
71	+	-	-	-	-	155	-	+	-	-	-
72	-	-	+	-	-	156	-	+	-	-	-
73	+	-	-	-	-	157	-	+	-	-	-

Wyniki

74	-	-	+	-	-	158	-	+	-	-	-
75	-	+	-	-	-	159	-	+	-	-	-
76	+	-	-	-	-	Noworodki (zakażenia inwazyjne)					
77	-	+	-	-	-	160	-	-	-	+	-
78	-	-	+	-	-	161	-	+	-	-	-
79	-	+	-	-	-	162	-	+	-	-	-
80	+	-	-	-	-	163	-	-	+	-	-
81	-	+	-	-	-	164	+	-	-	-	-
82	-	+	-	-	-	165	-	-	+	-	-
83	+	-	-	-	-						
84	+	-	-	-	-						
85	-	+	-	-	-						

Rycina 17 przedstawia udział izolatów posiadających różne geny kodujące białka z rodziny Alp wśród szczepów izolowanych z różnych materiałów klinicznych. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w badanych grupach (Suplement, Obliczenie 4).



Rycina 17. Występowanie genów kodujących białka z rodziny Alp wśród badanych szczepów A) izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych, B) od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych, C) z kolonizacji od noworodków, D) od noworodków z zakażeń inwazyjnych.

5.6. Oznaczenie lekowrażliwości badanych szczepów

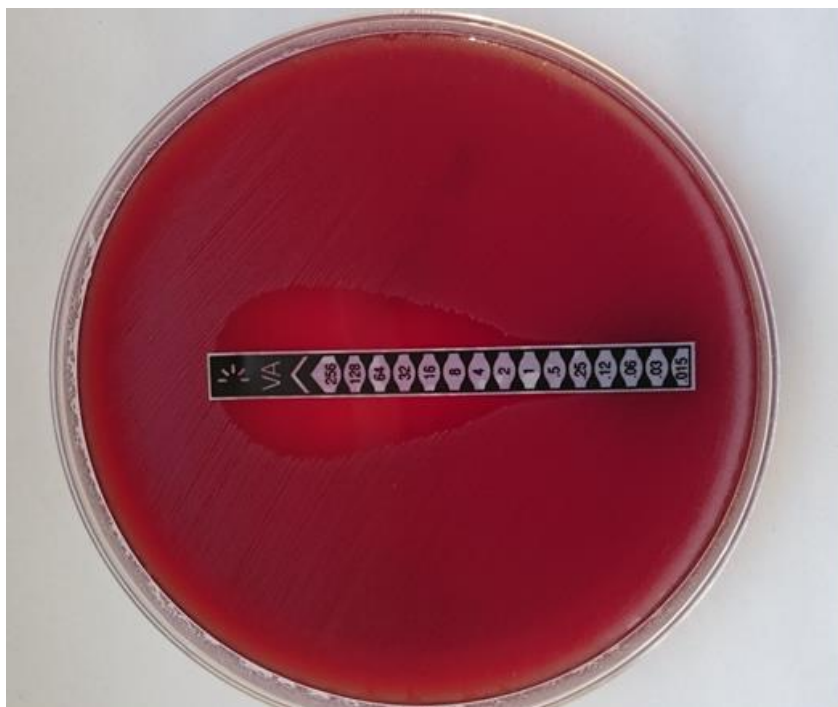
Wyniki oznaczenia lekowrażliwości metodą krążkowo-dyfuzyjną (przykładowe wyniki przedstawia Rycina 18) wraz z interpretacją przedstawione są w Tabeli 23 oraz w Tabeli 24 (lekowrażliwość dla szczepów izolowanych z moczu). Tabela 25 przedstawia wyniki oznaczenia lekowrażliwości na wankomycynę metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku dla szczepów izolowanych z krwi od noworodków (n=6) (przykładowe zdjęcie przedstawia Rycina 19). Profile lekowrażliwości dla badanych szczepów *S. agalactiae* przedstawiono na Rycinach 20 i 21.

Wszystkie szczepy *S. agalactiae* izolowane z materiałów klinicznych innych niż mocz (n=129) (Rycina 20) były wrażliwe na penicylinę i lewofloksacynę. Wrażliwość na tigecyklinę wykazywało 101 szczepów, natomiast 28 izolatów wykazywało średnią wrażliwość na ten antybiotyk. Wśród badanych szczepów 88 wykazywało wrażliwość na erytromycynę. Wrażliwość na klindamycynę zaobserwowano u 97 izolatów. Wszystkie szczepy izolowane z krwi od noworodków (n=6) wykazały wrażliwość na wankomycynę (Tabela 25).

Wśród szczepów izolowanych z moczu (n=36) wszystkie wykazywały wrażliwość na penicylinę i lewofloksacynę, natomiast tylko dwa szczepy były wrażliwe na tetracyklinę (Rycina 21).



Rycina 18. Oznaczanie lekowrażliwości badanych szczepów metodą krążkowo-dyfuzyjną na podłożu MH-F (fot. Kamińska, 2017).



Rycina 19. Oznaczanie lekowrażliwości badanych szczepów metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku (MIC) (fot. Kamińska, 2017).

Wyniki

Tabela 23. Wielkość strefy zahamowanego wzrostu, interpretacja oznaczania lekowrażliwości metodą krążkowo-dyfuzyjną oraz oznaczania mechanizmu oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B dla szczepów izolowanych z materiałów klinicznych innych niż mocz (n=129)

Nr szczepu	Penicylina (1U)		Tigecyklina (15 µg)		Lewofloksacyna (5 µg)		Erytromycyna (15 µg)		Klindamycyna (2 µg)		Mechanizm Oporności*
1	22	S	19	S	19	S	26	S	23	S	BRAK
2	22	S	16	I	19	S	6	R	6	R	MLS _B K
3	25	S	20	S	20	S	27	S	25	S	BRAK
4	21	S	18	I	19	S	25	S	22	S	BRAK
5	22	S	21	S	23	S	24	S	22	S	BRAK
6	23	S	18	I	20	S	25	S	22	S	BRAK
7	22	S	22	S	23	S	28	S	22	S	BRAK
8	23	S	19	S	20	S	27	S	24	S	BRAK
9	23	S	18	I	20	S	24	S	21	S	BRAK
10	24	S	18	I	20	S	6	R	6	R	MLS _B I
11	23	S	18	I	19	S	6	R	6	R	MLS _B K
12	21	S	19	S	20	S	25	S	22	S	BRAK
13	22	S	18	I	19	S	25	S	23	S	BRAK
14	23	S	20	S	21	S	28	S	24	S	BRAK
15	25	S	20	S	22	S	26	S	22	S	BRAK
16	23	S	18	I	19	S	6	R	6	R	MLS _B K
17	25	S	21	S	24	S	28	S	25	S	BRAK
18	23	S	20	S	20	S	26	S	25	S	BRAK
19	24	S	16	I	19	S	6	R	6	R	MLS _B K
20	25	S	21	S	24	S	24	S	22	S	BRAK
21	23	S	18	I	20	S	25	S	22	S	BRAK
22	22	S	19	S	20	S	25	S	22	S	BRAK
23	24	S	20	S	20	S	6	R	6	R	MLS _B K
24	23	S	18	I	21	S	25	S	22	S	BRAK
25	24	S	19	S	20	S	26	S	23	S	BRAK
26	24	S	19	S	20	S	26	S	22	S	BRAK
27	22	S	18	I	19	S	24	S	21	S	BRAK
28	22	S	19	S	19	S	25	S	21	S	BRAK
29	22	S	18	I	19	S	23	S	22	S	BRAK
30	26	S	19	S	20	S	27	S	24	S	BRAK
31	23	S	19	S	20	S	6	R	6	R	MLS _B K
32	21	S	19	S	20	S	25	S	22	S	BRAK
33	22	S	18	I	19	S	25	S	23	S	BRAK
34	23	S	18	I	20	S	6	R	6	R	MLS _B K
35	25	S	18	I	18	S	25	S	21	S	BRAK

Wyniki

36	23	S	18	I	20	S	23	S	21	S	BRAK
37	22	S	19	S	19	S	26	S	23	S	BRAK
38	23	S	24	S	24	S	6	R	6	R	MLS _B I
39	22	S	18	I	20	S	25	S	22	S	BRAK
40	21	S	19	S	21	S	25	S	22	S	BRAK
41	21	S	18	I	20	S	25	S	22	S	BRAK
42	22	S	19	S	21	S	25	S	23	S	BRAK
43	25	S	19	S	19	S	26	S	22	S	BRAK
44	23	S	24	S	22	S	30	S	25	S	BRAK
45	26	S	20	S	22	S	28	S	24	S	BRAK
46	23	S	19	S	20	S	26	S	23	S	BRAK
47	22	S	18	I	20	S	26	S	23	S	BRAK
48	22	S	18	I	20	S	6	R	6	R	MLS _B I
49	26	S	21	S	23	S	27	S	22	S	BRAK
50	30	S	21	S	24	S	6	R	6	R	MLS _B K
51	24	S	18	I	19	S	6	R	6	R	MLS _B K
52	22	S	18	I	20	S	26	S	23	S	BRAK
53	25	S	21	S	22	S	28	S	26	S	BRAK
54	23	S	18	I	19	S	25	S	21	S	BRAK
55	22	S	19	S	19	S	24	S	21	S	BRAK
56	18	S	20	S	22	S	26	S	23	S	BRAK
57	23	S	19	S	21	S	25	S	22	S	BRAK
58	22	S	18	I	20	S	25	S	22	S	BRAK
59	23	S	19	S	20	S	26	S	23	S	BRAK
60	24	S	19	S	21	S	6	R	6	R	MLS _B K
61	27	S	21	S	24	S	27	S	24	S	BRAK
62	25	S	20	S	21	S	28	S	19	S	BRAK
63	26	S	20	S	21	S	26	S	23	S	BRAK
64	26	S	21	S	21	S	10	R	23	S	FENOTYP M
65	26	S	22	S	24	S	25	S	24	S	BRAK
66	22	S	21	S	24	S	6	R	6	R	MLS _B I
67	28	S	22	S	24	S	29	S	24	S	BRAK
68	23	S	20	S	21	S	25	S	22	S	BRAK
69	25	S	21	S	22	S	25	S	22	S	BRAK
70	25	S	22	S	25	S	6	R	6	R	MLS _B K
71	27	S	22	S	24	S	27	S	24	S	BRAK
72	24	S	20	S	21	S	28	S	25	S	BRAK
73	23	S	20	S	20	S	25	S	23	S	BRAK
74	27	S	24	S	25	S	6	R	6	R	MLS _B I
75	28	S	21	S	22	S	6	R	6	R	MLS _B I
76	26	S	22	S	25	S	6	R	6	R	MLS _B K
77	25	S	21	S	22	S	20	S	23	S	BRAK
78	30	S	22	S	21	S	6	R	6	R	MLS _B K
79	25	S	20	S	22	S	25	S	17	S	BRAK

Wyniki

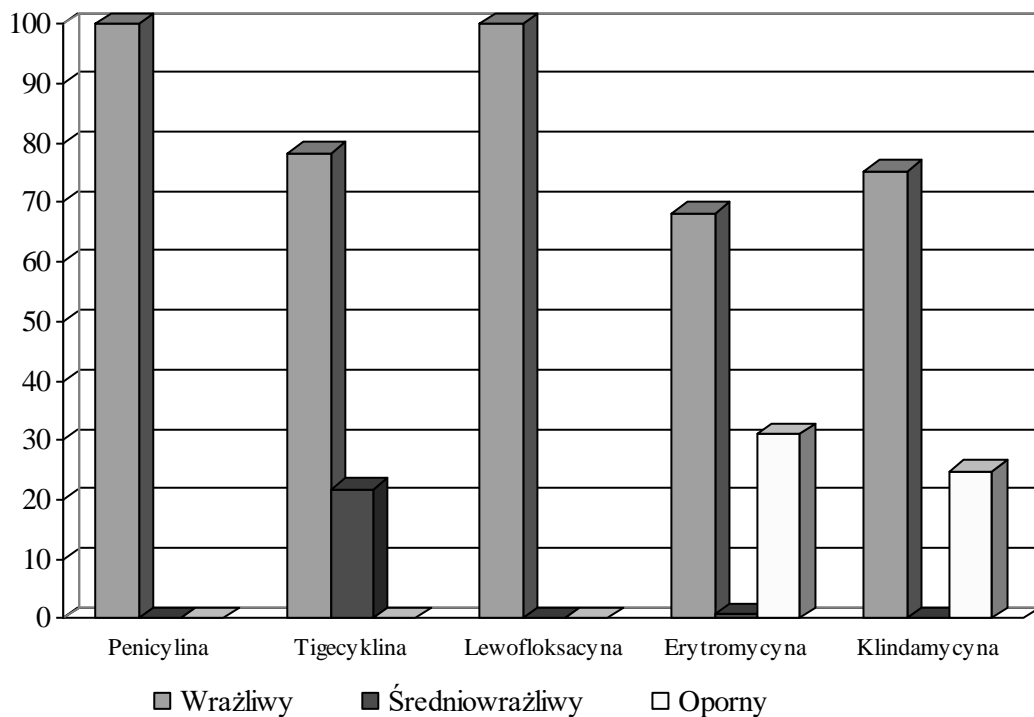
80	25	S	22	S	22	S	28	S	24	S	BRAK
81	27	S	21	S	23	S	28	S	25	S	BRAK
82	26	S	22	S	22	S	28	S	24	S	BRAK
83	28	S	20	S	24	S	28	S	25	S	BRAK
84	28	S	23	S	25	S	17	R	25	S	FENOTYP M
85	23	S	19	S	22	S	6	R	6	R	MLS _B K
122	27	S	22	S	21	S	28	S	23	S	BRAK
123	24	S	21	S	22	S	6	R	6	R	MLS _B K
124	26	S	21	S	22	S	6	R	6	R	MLS _B K
125	29	S	24	S	23	S	29	S	25	S	BRAK
126	26	S	27	S	24	S	16	R	26	S	FENOTYP M
127	25	S	21	S	23	S	6	R	6	R	MLS _B I
128	27	S	22	S	26	S	31	S	25	S	BRAK
129	25	S	22	S	26	S	26	S	24	S	BRAK
130	25	S	21	S	20	S	26	S	22	S	BRAK
131	25	S	22	S	23	S	6	R	6	R	MLS _B K
132	25	S	22	S	22	S	15	R	24	S	FENOTYP M
133	29	S	22	S	24	S	30	S	26	S	BRAK
134	25	S	25	S	24	S	28	S	24	S	BRAK
135	26	S	21	S	24	S	29	S	24	S	BRAK
136	24	S	20	S	21	S	25	S	22	S	BRAK
137	22	S	18	I	20	S	25	S	22	S	BRAK
138	25	S	21	S	23	S	25	S	24	S	BRAK
139	22	S	19	S	20	S	21	S	22	S	BRAK
140	26	S	22	S	21	S	22	S	25	S	BRAK
141	26	S	22	S	20	S	6	R	6	R	MLS _B K
142	25	S	21	S	20	S	24	S	23	S	BRAK
143	25	S	19	S	19	S	6	R	6	R	MLS _B I
144	25	S	25	S	25	S	28	S	25	S	BRAK
145	24	S	20	S	20	S	6	R	6	R	MLS _B K
146	26	S	22	S	26	S	21	S	19	S	BRAK
147	25	S	20	S	21	S	27	S	24	S	BRAK
148	27	S	23	S	25	S	17	R	27	S	FENOTYP M
149	24	S	22	S	25	S	17	R	26	S	FENOTYP M
150	25	S	22	S	24	S	21	S	25	S	BRAK
151	25	S	22	S	24	S	12	R	25	S	FENOTYP M
152	27	S	25	S	27	S	28	S	24	S	BRAK
153	24	S	21	S	23	S	16	R	20	S	FENOTYP M
154	25	S	22	S	21	S	6	R	6	R	MLS _B K
155	24	S	18	I	22	S	25	S	22	S	BRAK
156	25	S	21	S	23	S	27	S	24	S	BRAK
157	26	S	20	S	19	S	28	S	24	S	BRAK
158	23	S	20	S	21	S	24	S	21	S	BRAK
159	23	S	18	I	20	S	6	R	6	R	MLS _B K

Wyniki

160	25	S	24	S	23	S	29	S	23	S	BRAK
161	25	S	20	S	21	S	6	R	6	R	MLS _B K
162	25	S	22	S	24	S	28	S	26	S	BRAK
163	27	S	23	S	20	S	6	R	6	R	MLS _B K
164	25	S	22	S	23	S	17	R	25	S	FENOTYP M
165	26	S	19	S	23	S	6	R	6	R	MLS _B K

S – wrażliwy, R – oporny, I – średniowrażliwy

* interpretacja zgodnie ze stanowiskiem Zespołu ds. Oznaczania Lekowrażliwości, zgodnie z zaleceniami EUCAST w sprawie raportowania mechanizmu oporności MLS_B (oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B) u ziarenkowców Gram-dodatnich.



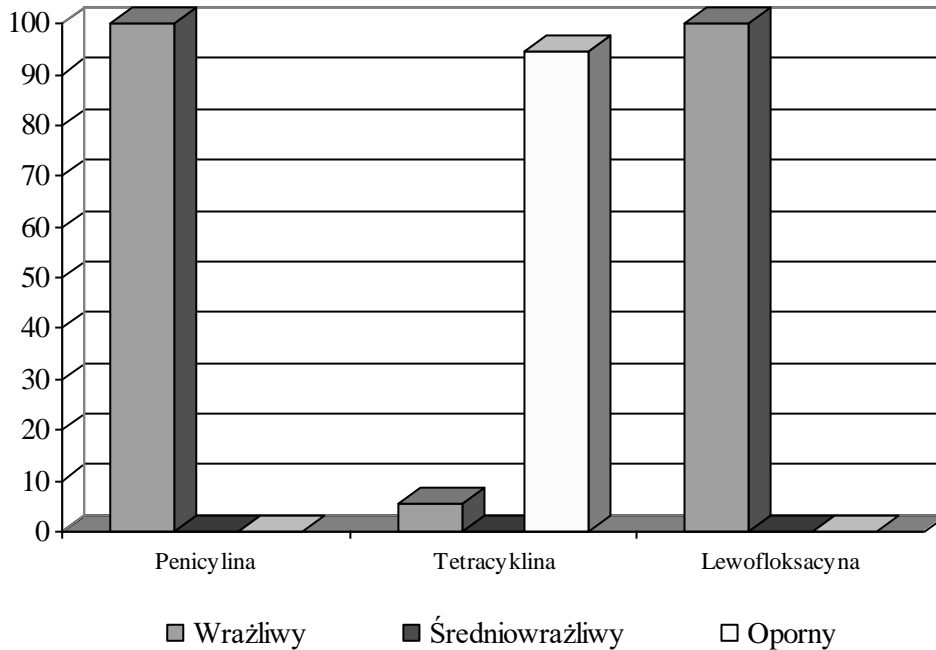
Rycina 20. Profil lekowrażliwości szczepów *S. agalactiae* (izolowanych z materiałów klinicznych innych niż mocz, zgodnie z rekomendacjami EUCAST [www.korld.edu.pl]).

Wyniki

Tabela 24. Wyniki i interpretacja oznaczania lekowrażliwości metodą krążkowo-dyfuzyjną dla szczepów izolowanych z moczu (n=36)

Nr szczepu	Penicylina (1U)		Tetracyklina (30 µg)		Lewofloksacyna (5 µg)	
86	25	S	14	R	26	S
87	27	S	19	R	24	S
88	28	S	17	R	25	S
89	26	S	13	R	19	S
90	27	S	16	R	23	S
91	25	S	13	R	23	S
92	25	S	11	R	23	S
93	31	S	17	R	22	S
94	25	S	15	R	24	S
95	26	S	25	S	23	S
96	23	S	13	R	20	S
97	27	S	17	R	20	S
98	23	S	17	R	21	S
99	25	S	15	R	22	S
100	24	S	13	R	21	S
101	28	S	12	R	24	S
102	28	S	13	R	21	S
103	26	S	26	S	22	S
104	25	S	11	R	21	S
105	24	S	12	R	21	S
106	26	S	14	R	24	S
107	27	S	13	R	24	S
108	26	S	14	R	22	S
109	24	S	14	R	25	S
110	26	S	12	R	23	S
111	26	S	13	R	24	S
112	26	S	14	R	23	S
113	25	S	17	R	22	S
114	25	S	15	R	24	S
115	29	S	16	R	23	S
116	26	S	17	R	24	S
117	26	S	16	R	23	S
118	26	S	17	R	23	S
119	26	S	13	R	21	S
120	27	S	16	R	22	S
121	25	S	17	R	23	S

S – wrażliwy, R – oporny,



Rycina 21. Profil lekowrażliwości szczepów *S. agalactiae* izolowanych z moczu, zgodnie z rekomendacjami EUCAST [www.korl.edu.pl].

Tabela 25. Oznaczanie wrażliwości na wankomycynę metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku dla szczepów izolowanych z krwi od noworodków (n=6)

Nr szczepu	Wartość MIC dla wankomycyny	Interpretacja
160	0,25	Wrażliwy
161	0,5	Wrażliwy
162	0,5	Wrażliwy
163	1,0	Wrażliwy
164	0,5	Wrażliwy
165	0,5	Wrażliwy

Analizując występowanie mechanizmów oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B wśród badanych szczepów (n=129) (dla szczepów izolowanych z moczu zgodnie z rekomendacjami nie oznaczamy mechanizmów oporności) stwierdzono występowanie fenotypu M u dziewięciu szczepów. Mechanizm oporności MLS_B typu konstytutywnego zidentyfikowano u 24 szczepów, natomiast MLS_B typu indukcyjnego u

ośmiu szczepów *S. agalactiae* (Tabela 23). Przykłady obserwowanych mechanizmów oporności zamieszczono poniżej (Ryciny 22, 23 i 24).



Rycina 22. Wykrywanie mechanizmu oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B – MLS_B indukcyjny (fot. Kamińska, 2017).



Rycina 23. Wykrywanie mechanizmu oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B – MLS_B konstytutywny (fot. Kamińska, 2017).



Rycina 24. Wykrywanie mechanizmu oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B – fenotyp M (fot. Kamińska, 2017).

5.7. Analizy korelacji uzyskanych wyników

5.7.1. Ocena częstości występowania serotypów I-VII w grupie silnych, umiarkowanych i słabych producentów biofilmu

W ramach korelacji uzyskanych wyników oceniono rozkład badanych serotypów w grupie silnych, umiarkowanych i słabych producentów biofilmu. We wszystkich trzech analizowanych grupach dominowały szczepy należące do serotypu III i V (Tabela 26). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w występowaniu badanych serotypów (Tabela 26).

Tabela 26. Rozkład poszczególnych serotypów wśród szczepów *S. agalactiae* produkujących biofilm w stopniu silnym, umiarkowanym i słabym

Stopień formowania biofilmu	Serotyp								χ^2 (Wartość p)
	Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII	
Silny (n=7)	1 (14,3)*	0 (0,0)	1 (14,3)	3 (42,9)	0 (0,0)	2 (28,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Umiarkowany (n=86)	12 (13,9)	9 (10,5)	10 (11,6)	28 (32,6)	1 (1,2)	24 (27,9)	2 (2,3)	0 (0,0)	8,807 (0,843)
Słaby (n=72)	17 (23,6)	3 (4,2)	8 (11,1)	23 (31,9)	3 (4,2)	16 (22,2)	1 (1,4)	1 (1,4)	
Razem	30	12	19	54	4	42	3	1	

*W nawiasach przedstawiono wartości udziału procentowego, odpowiednio dla silnych, umiarkowanych i słabych producentów biofilmu.

5.7.2. Porównanie obecności genów kodujących różne typy fimbrii wśród szczepów GBS reprezentujących różne serotypy

Przeanalizowano występowanie genów kodujących różne typy fimbrii wśród szczepów reprezentujących poszczególne serotypy (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII) (Tabela 27).

Zaobserwowano statystycznie istotne różnice (Tabela 27). Geny kodujące fimbrie typu Pl-1 razem z Pl-2a najczęściej występowały u szczepów serotypu VI, II i V ($p=2,55e-14$), geny kodujące fimbrie Pl-2a (występujące pojedynczo) najczęściej obserwowano u serotypu Ia ($p=1,34e-10$), geny kodujące fimbrie Pl-1 razem z Pl-2b najczęściej rozpoznano u szczepów reprezentujących serotyp VII, IV i III ($p<2,2e-16$).

Tabela 27. Obecność genów kodujących fimbrie u szczepów reprezentujących różne serotypy

Serotyp	Liczba izolatów z danym typem fimbrii							
	PI-1	χ^2	PI-1	χ^2	PI-2a	χ^2	PI-2b	χ^2
	i PI-2a	(Wartość p)	i PI-2b	(Wartość p)		(Wartość p)		(Wartość p)
Ia (n=30)	2 (6,7)*		0 (0,0)		28 (93,3)		0 (0,0)	
Ib (n=12)	9 (75,0)		1 (8,3)		1 (8,3)		1 (8,3)	
II (n=19)	16 (84,2)		1 (5,3)		0 (0,0)		2 (10,5)	
III (n=54)	22 (40,7)		27 (50,0)		4 (7,4)		1 (1,8)	
IV (n=4)	1 (25,0)	75,864 (2,55e-14)	3 (75,0)	92,714 (<2,2e-16)	0 (0,0)	48,947 (1,34e-10)	0 (0,0)	0,5 (0,779)
V (n=42)	35 (83,3)		2 (4,8)		5 (11,9)		0 (0,0)	
VI (n=3)	3 (100,0)		0 (0,0)		0 (0,0)		0 (0,0)	
VII (n=1)	0 (0,0)		1 (100,0)		0 (0,0)		0 (0,0)	
Razem	88		35		38		4	

*Wartości udziału procentowego przedstawione w nawiasach dotyczą poszczególnych serotypów I-VII.

5.7.3. Porównanie obecności genów kodujących różne typy fimbrii wśród szczepów GBS będących silnymi, umiarkowanymi i słabymi producentami biofilmu

W ramach korelacji uzyskanych wyników porównano obecność genów kodujących poszczególne rodzaje fimbrii wśród szczepów różniących się zdolnością do tworzenia biofilmu (Tabela 28). W grupie silnych producentów biofilmu wszystkie badane izolaty posiadały fimbrie Pl-2a [występujące razem z Pl-1 (n=6) lub pojedynczo (n=1)]. Również wśród umiarkowanych producentów biofilmu ponad połowa izolatów posiadała fimbrie Pl-1 występujące razem z Pl-2a (n=49), a w dalszej kolejności fimbrie Pl-2a występujące pojedynczo (n=20). W grupie słabych producentów biofilmu najczęściej stwierdzano obecność genów kodujących fimbrie Pl-1 razem z Pl-2a (n=33) oraz Pl-1 razem z Pl-2b (n=19), a następnie występujące pojedynczo Pl-2a i Pl-2b. Stwierdzone różnice nie były statystycznie istotne (Tabela 28).

Tabela 28. Obecność genów kodujących różne typy fimbrii u szczepów *S. agalactiae* produkujących biofilm w stopniu silnym, umiarkowanym i słabym

Stopień formowania biofilmu	Liczba izolatów z danym typem fimbrii				χ^2 (Wartość p)
	Pl-1 i Pl-2a	Pl-1 i Pl-2b	Pl-2a	Pl-2b	
Silny (n=7)	6 (85,7)*	0 (0,0)	1 (14,3)	0 (0,0)	
Umiarkowany (n=86)	49 (57,0)	16 (18,6)	20 (23,2)	1 (1,2)	6,901 (0,330)
Słaby (n=72)	33 (45,8)	19 (26,4)	17 (23,6)	3 (4,2)	
Razem	88	35	38	4	

* W nawiasach przedstawiono wartości udziału procentowego, odpowiednio dla silnych, umiarkowanych i słabych producentów biofilmu.

5.7.4. Porównanie obecności genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp wśród szczepów GBS reprezentujących różne serotypy

Analizę występowania genów kodujących badane białka z rodziny Alp wśród szczepów reprezentujących poszczególne serotypy przedstawia Tabela 29. Zaobserwowano istotne statystycznie różnice. Wśród 30 szczepów reprezentujących serotyp Ia, 26 posiadało gen *epsilon*, a cztery gen *rib*. U szczepów należących do serotypu Ib cztery posiadały gen *rib*, trzy gen *epsilon*, kolejne trzy geny *alp2/3*, pozostałe dwa izolaty posiadały gen *bca*. U większości szczepów należących do serotypów II i III rozpoznano gen *rib* [odpowiednio (n=9) i (n=40)]. Analizując występowanie omawianych genów u szczepów należących do serotypu V stwierdzano najczęściej obecność genów *alp2* lub *alp3* (n=29) i *rib* (n=12).

Tabela 29. Występowanie genów kodujących białka z rodziny Alp wśród szczepów o różnych serotypach

Serotyp	<i>epsilon</i>	χ^2 (Wartość p)	<i>rib</i>	χ^2 (Wartość p)	<i>alp2/3</i>	χ^2 (Wartość p)
Ia (n=30)	26 (86,7)*		4 (13,3)		0 (0,0)	
Ib (n=12)	3 (25,0)		4 (33,3)		3 (25,0)	
II (n=19)	2 (10,5)		9 (47,4)		2 (10,5)	
III (n=54)	2 (3,7)	100,86 ($< 2,2e-16$)	40 (74,1)	38,029 ($2,992e-06$)	12 (22,2)	53,426 ($3,055e-09$)
IV (n=4)	3 (75,0)		1 (25,0)		0 (0,0)	
V (n=42)	1 (2,4)		12 (28,6)		29 (69,0)	
VI (n=3)	0 (0,0)		2 (66,7)		1 (33,3)	
VII (n=1)	0 (0,0)		0 (0,0)		1 (100,0)	
Serotyp	<i>bca</i>	χ^2 (Wartość p)	<i>alp4**</i>			
Ia (n=30)	0 (0,0)		0 (0,0)			
Ib (n=12)	2 (16,7)		0 (0,0)			
II (n=19)	6 (31,6)		0 (0,0)			
III (n=54)	0 (0,0)	39,888 ($1,323e-06$)	0 (0,0)			
IV (n=4)	0 (0,0)		0 (0,0)			
V (n=42)	0 (0,0)		0 (0,0)			
VI (n=3)	0 (0,0)		0 (0,0)			
VII (n=1)	0 (0,0)		0 (0,0)			

*Wartości udziału procentowego przedstawione w nawiasach dotyczą poszczególnych serotypów I-VII.

**Ze względu na brak szczepów, które posiadałyby gen *alp4*, nie wykonano analiz dla tego genu.

5.7.5. Ocena obecności genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp wśród szczepów GBS będących silnymi, słabymi i umiarkowanymi producentami biofilmu

Porównanie obecności genów kodujących białka powierzchniowe wśród szczepów różniących się zdolnością do tworzenia struktury biofilmu przedstawia Tabela 30. We wszystkich analizowanych grupach dominowały izolaty z genem *rib*. Obserwowane różnice nie były statystycznie istotne (Tabela 30).

Tabela 30. Obecność genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp u szczepów *S. agalactiae* produkujących biofilm w stopniu silnym, słabym i umiarkowanym

Stopień formowania biofilmu	<i>epsilon</i>	χ^2 (Wartość p)	<i>rib</i>	χ^2 (Wartość p)	<i>alp2/3</i>	χ^2 (Wartość p)	<i>bca</i>	χ^2 (Wartość p)	<i>alp4</i> * *
Silny (n=7)	0 (0,0)*		5 (71,4)		2 (28,6)		0 (0,0)		0 (0,0)
Umiark. (n=86)	15 (17,4)	5,987 (0,0501)	36 (41,9)	2,318 (0,314)	30 (34,9)	3,047 (0,218)	5 (5,8)	0,603 (0,740)	0 (0,0)
Słaby (n=72)	22 (30,6)		31 (43,0)		16 (22,2)		3 (4,2)		0 (0,0)
Razem	37		72		48		8		0

* W nawiasach przedstawiono wartości udziału procentowego, odpowiednio dla silnych, umiarkowanych i słabych producentów biofilmu.

**Ze względu na brak szczepów, które posiadałyby gen *alp4*, nie wykonano analiz dla tego genu.

5.7.6. Ocena częstości występowania oporności na erytromycynę wśród izolatów należących do różnych serotypów

Analizując udział poszczególnych serotypów wśród szczepów opornych na erytromycynę zaobserwowano, że prawie połowa tych szczepów (n=20) należała do serotypu V, w dalszej kolejności do serotypów Ia, III i II (Tabela 31). Obserwowane różnice były statystycznie istotne (Tabela 31).

Tabela 31. Udział poszczególnych serotypów wśród szczepów opornych na erytromycynę

Serotyp	Szczepy oporne na erytromycynę (%)*	Wartość p**
Ia (n=30)	10 (33,3)	6.42e-05
Ib (n=12)	1 (8,3)	
II (n=19)	4 (21,0)	
III (n=54)	6 (11,1)	
IV (n=4)	0 (0,0)	
V (n=42)	20 (47,6)	
VI (n=3)	0 (0,0)	
VII (n=1)	0 (0,0)	

*Wartości udziału procentowego przedstawione w nawiasach dotyczą poszczególnych serotypów I-VII.

**Ze względu na małą liczebność analizowanych grup zastosowano test Fishera.

6. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Pomimo wykonywanych badań przesiewowych w kierunku *S. agalactiae* oraz wprowadzenia profilaktyki okołoporodowej, nadal notuje się przypadki zakażeń śmiertelnych u noworodków. Zakażenia powodowane przez *S. agalactiae* stanowią również narastający problem u pacjentów powyżej 60 r.ż., szczególnie u osób, z współtowarzyszącą chorobą podstawową i z obniżoną odpornością [Edwards, 2005; Verani, 2010].

S. agalactiae stanowi składnik mikrobioty pochwy kobiet ciężarnych. Podczas porodu bakterie kolonizują nowego gospodarza - noworodka z niedoborem/-ami odporności. U noworodka GBS może być organizmem komensalnym lub może przekształcić się w inwazyjny patogen powodujący poważne zakażenia.

S. agalactiae posiada wiele różnych czynników wirulencji (w tym silną toksynę hemolityczną) i białek powierzchniowych, jak również zdolność do mimikry molekularnej, które utrudniają odpowiedź immunologiczną gospodarza. Podobnie, jak u wielu innych mikroorganizmów, również w patogenezie zakażeń powodowanych przez *S. agalactiae*, zdolność do formowania struktury biofilmu może odgrywać ważną rolę [Kaur, 2009; Rinaudo, 2010; Ho, 2013; D'Urzo, 2014].

W niniejszym rozdziale przedyskutowane zostaną wyniki badań własnych na tle doniesień literaturowych, obejmujące ocenę zdolności badanych szczepów do wytwarzania biofilmu, rozkład serotypów *S. agalactiae*, ocenę obecności genów kodujących fimbrie i białka powierzchniowe z rodziny Alp oraz oznaczenia lekowrażliwości, jak również korelacje zachodzące pomiędzy nimi.

Tworzenie biofilmu przez szczepy GBS wydaje się wspierać kolonizację dróg rodnych kobiet, zapewniając ochronę przed trudnymi czynnikami środowiskowymi i mechanizmami obronnymi gospodarza. Na powstawanie biofilmu w warunkach *in vitro* wpływają różne czynniki środowiskowe, w tym rodzaj stosowanego podłoża, warunki pH, temperatura, osmolarność [Ho, 2013; D'Urzo, 2014; Rosini, 2015]. Jednakże badania nad wymienionymi czynnikami środowiskowymi i genetycznymi regulującymi tworzenie biofilmu przez *S. agalactiae* podejmowane są w nielicznych pracach. Ponadto porównując wyniki prac na ten temat napotyka się na trudności wynikające z różnic metodologicznych i przyjętych kryteriów interpretacji wyników [Kaur, 2009; Rinaudo, 2010; Borges, 2012; Ho, 2013; Parker, 2016].

Ho i współautorzy zbadali zdolność do tworzenia biofilmu przez szczepy GBS pochodzące z kolonizacji od kobiet ciężarnych [Ho, 2013]. Ocenili oni zdolność do tworzenia biofilmu u 80 badanych szczepów, klasyfikując je odpowiednio do grupy bardzo silnych (51%), silnych (28%) i umiarkowanych producentów biofilmu (18%) oraz szczepów nie wytwarzających biofilmu (4%). Jendak powyższe wyniki trudno jest porównywać z wynikami uzyskanymi przez innych autorów ze względu na różnice w przyjętych kryteriach analizy wyników [Ho, 2013].

Parker i wsp. w swoich badaniach kwalifikując badane szczepy GBS do dwóch grup – silnych i słabych producentów biofilmu odnotowali, że 43,0% spośród badanych 242 szczepów izolowanych od ludzi wytwarzało biofilm w stopniu silnym, natomiast 57,0% w stopniu słabym. Ponadto autorzy zaobserwowali, że większy odsetek (45,9%) szczepów pochodzących z kolonizacji od kobiet ciężarnych w porównaniu do szczepów pochodzących z zakażeń inwazyjnych od noworodków (32,5%) był silnymi producentami biofilmu [Parker, 2016]. Podobne obserwacje wskazujące na większą zdolność do produkcji biofilmu wśród szczepów pochodzących z kolonizacji (76,5%) w porównaniu do szczepów pochodzących z zakażeń (34,6%) prezentują w swojej pracy Kaur i wsp. [Kaur, 2009].

Zdolność szczepów GBS do tworzenia biofilmu powierdzają również wyniki uzyskane w niniejszej pracy. Stwierdzono, że ponad połowa badanych szczepów *S. agalactiae* wytwarzała biofilm w stopniu umiarkowanym, a około 4% w stopniu silnym. Ponadto zaobserwowano różnice w zdolności do silnego formowania biofilmu wśród szczepów izolowanych z zakażeń inwazyjnych od noworodków (brak w tej grupie szczepów silnie formujących biofilm) oraz wśród szczepów pochodzących z kolonizacji zarówno od kobiet ciężarnych, jak i od noworodków. Jednakże różnice te nie były statystycznie istotne.

W dalszej części dyskusji przeanalizowane zostaną zależności pomiędzy zdolnością do wytwarzania biofilmu, a poszczególnymi serotypami GBS, obecnością genów kodujących różne typy fimbrii i genów kodujących wybrane białka powierzchniowe z rodziny Alp.

Polisacharydy otoczkowe są jednym z najważniejszych czynników zjadliwości GBS. Występowanie poszczególnych serotypów jest różne, w zależności od regionu geograficznego świata i przynależności etnicznej, zmienia się także dla danego regionu w czasie [Lachenauer, 1999; Amin, 2002; Ippolito, 2010; Florino, 2010; Gudjónsdóttir, 2015; Shabayek i Spellerberg, 2018]. Tak więc, poznanie częstości występowania

poszczególnych serotypów GBS dla danej populacji jest istotne ze względów epidemiologicznych, a także dla rozwoju prac nad skonstruowaniem wieloważnej szczepionki przeciwko GBS.

Niewiele jest doniesień dotyczących występowania poszczególnych serotypów GBS w Polsce [Brzychczy-Włoch, 2009; Wolny i Gołda-Matuszak, 2010]. Brzychczy-Włoch i wsp. przeanalizowali występowanie serotypów I-VIII wśród 353 szczepów izolowanych od kobiet ciężarnych z województwa małopolskiego [Brzychczy-Włoch, 2009]. Wśród badanych szczepów dominowały izolaty o serotypie III (35%), następnie Ia (20%), V (17%), II (15%), Ib (8%) oraz IV (5%). Cytowani autorzy, nie stwierdzili w badanej grupie szczepów należących do serotypów VI, VII i VIII [Brzychczy-Włoch, 2009]. Wolny i Gołda-Matuszak w swoich badaniach dokonały oceny występowania serotypów Ia, Ib, II, III, IV, V wśród 380 szczepów izolowanych z dróg rodnych od kobiet w wieku rozrodczym z terenu Krakowa. Dominującymi serotypami były: III (50%), Ia (18%) i V (14%), autorki odnotowały także występowanie serotypów: IV (4%), Ib (3%) i II (3%) [Wolny i Gołda-Matuszak, 2010]. Przedstawione powyżej wyniki badań prowadzonych w Polsce są zbieżne z wynikami badań przeprowadzonych w Czechach, gdzie dominowały serotypy: III (33,2%), Ia (22%) i V (13,9%) [Motlova, 2004] oraz we Włoszech, gdzie udział wyżej wymienionych serotypów wynosił: III (32,9%), V (26,1%) i Ia (20,5%) [Savoia, 2008].

Obecnie brak jest informacji na temat częstości występowania w naszym kraju poszczególnych serotypów GBS wśród szczepów izolowanych z zakażeń od osób dorosłych oraz od noworodków (zarówno z kolonizacji, jak i z zakażeń inwazyjnych). Dostępne nieliczne na ten temat dane pochodzą z innych krajów europejskich: Szwecji, Anglii i Walii, oraz Francji [Gudjónsdóttir, 2015; Weisner, 2004; Salloum, 2011]. Gudjónsdóttir i wsp. ocenili udział serotypów wśród izolatów pochodzących z zakażeń inwazyjnych od noworodków i niemowląt oraz od osób dorosłych na terenie Szwecji. Dominującym serotypem wśród izolatów wyosobnionych od noworodków i niemowląt był serotyp III (48%), w dalszej kolejności występowały serotypy Ia (18%) i V (16%). Natomiast wśród izolatów od osób dorosłych dominowały serotypy V (39%), III (20%) i Ib (14%) [Gudjónsdóttir, 2015].

Weisner i współautorzy ocenili występowanie poszczególnych serotypów u szczepów izolowanych z zakażeń inwazyjnych noworodków na terenie Anglii i Walii. Wśród badanych izolatów dominował serotyp III (48%), Ia (27%) oraz V (10%) [Weisner, 2004]. Autorzy zaobserwowali różnicę w udziale poszczególnych serotypów wśród

izolatów pochodzących od pacjentów z EOD, u których serotyp III stanowił 38%, Ia 32% i V 13% oraz z LOD, gdzie serotyp III stanowił 67% [Weisner, 2004].

Salloum i wsp. określili w swoich badaniach przynależność do serotypów 142 szczepów *S. agalactiae* izolowanych z zakażeń inwazyjnych od osób dorosłych (n=75) i noworodków (n=67) z terenu Francji [Salloum, 2011]. Wśród szczepów izolowanych od osób dorosłych dominowały szczepy reprezentujące serotyp V (31%), a w dalszej kolejności serotypy Ia (23%), III (19%) i Ib (19%). Natomiast szczepy odpowiedzialne za zakażenia u noworodków należały głównie do serotypu III (79%) i Ia (12%) [Salloum, 2011].

Stwierdzony w niniejszej pracy rozkład serotypów GBS jest spójny z wynikami pochodzącymi z terenu naszego kraju oraz z innych populacji europejskich. Ponadto rozpoznano wcześniej nieidentyfikowane w naszym kraju szczepy należące do serotypów VI (trzy szczepy) i VII (jeden szczep). W przedstawionej pracy, wśród szczepów *S. agalactiae* izolowanych od kobiet ciężarnych dominowały szczepy reprezentujące serotyp III, V i Ia, a w dalszej kolejności II, Ib oraz IV. Ponadto w niniejszej pracy oceniono rozkład poszczególnych serotypów wśród szczepów izolowanych od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych (głównie z moczu). W tej grupie badanej dominowały serotypy V (31,8%) i III (27,3%), a w dalszej kolejności serotyp Ia (13,6%) i II (13,6%). Rozpoznano jeden izolat należący do serotypu IV i jeden reprezentujący serotyp VII. Wśród szczepów izolowanych z kolonizacji od noworodków dominowały serotypy III (33,3%), Ia (26,7%) i V (23,3%). Szczepy izolowane z zakażeń inwazyjnych od noworodków reprezentowały serotypy V (dwa izolaty), II (dwa izolaty), III (jeden izolat) i Ia (jeden izolat).

Analizując zdolność do tworzenia biofilmu przez szczepy reprezentujące różne serotypy zaobserwowano, że więcej niż połowa szczepów reprezentujących serotypy Ib, II, III, V i VI tworzyła biofilm w stopniu umiarkowanym, stanowiły one odpowiednio 75,0%, 52,6%, 51,8%, 57,1% oraz 66,7%. Spośród siedmiu izolatów wykazujących silną zdolność do tworzenia biofilmu trzy należały do serotypu III, dwa do serotypu V oraz po jednym do serotypów Ia i II, jednakże uzyskane wyniki nie charakteryzują się istotnością statystyczną. Jiang i wsp. badając 87 szczepów GBS, zaobserwowali, że jedynie 13,8% z nich było zdolnych do tworzenia biofilmu [Jiang, 2016]. Nie zaobserwowali zależności pomiędzy zdolnością szczepów do tworzenia biofilmu a serotypem i lekoopornością [Jiang, 2016].

Fimbrie *S. agalactiae* oraz inne białka powierzchniowe promują przyleganie do składników macierzy pozakomórkowej, takich jak kolagen, fibrynogen, fibronektyna i laminina, dzięki czemu odgrywają istotną rolę w kolonizacji powierzchni błony śluzowej

[Franken, 2001; Schubert, 2002; Hull, 2008; Sheen, 2011; Banerjee, 2011]. *S. agalactiae* posiada trzy typy fimbrii (PI-1, PI-2a i PI-2b), każdy szczep wytwarza równocześnie jeden lub dwa rodzaje fimbrii [Rinaudo, 2010; Martins, 2013; Springman, 2014; Lu, 2015].

Martins i wsp. ocenili obecność różnych typów fimbrii wśród 898 szczepów GBS pochodzących z kolonizacji od kobiet ciężarnych, z zakażeń nieinwazyjnych od osób dorosłych oraz z zakażeń inwazyjnych od noworodków i osób dorosłych z terenu Hiszpanii [Martins, 2013]. W badanej grupie dominowały szczepy posiadające fimbrie PI-1 razem z PI-2a (49%), następnie PI-2a (30%), PI-1 razem z PI-2b (21%) oraz PI-2b (0,6%). Badane szczepy należące do serotypu Ia najczęściej posiadały fimbrie PI-2a (92,5%), natomiast fimbrie typu PI-1 razem z PI-2a najczęściej identyfikowane były wśród szczepów należących do serotypów Ib, II, IV i V (odpowiednio 94,4%, 92,8%, 64,7%, 82,6%) [Martins, 2013].

Niewielkie różnice, w stosunku do cytowanych powyżej badań uzyskali Lu i wsp. oceniając częstość występowania różnych typów fimbrii u 160 szczepów GBS izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych w Chinach [Lu, 2015]. U badanych szczepów najczęściej identyfikowali fimbrie typu PI-2a (43,8%) oraz fimbrie PI-1 razem z PI-2a (41,9%). U szczepów serotypu Ia dominowały fimbrie PI-2a, u szczepów należących do serotypów Ib, III i V autorzy identyfikowali najczęściej fimbrie PI-1 w połączeniu z PI-2a [Lu, 2015].

Springman i wsp. porównali występowanie poszczególnych typów fimbrii wśród szczepów izolowanych od ludzi (od kobiet ciężarnych z kolonizacji i z zakażeń inwazyjnych od noworodków) i bydła [Springman, 2014]. Zaobserwowali istotne różnice: większość szczepów izolowanych od bydła posiadała jedynie fimbrie PI-2b (86%), podczas gdy w grupie szczepów pochodzących od ludzi, żaden nie posiadał fimbrii PI-2b występujących samodzielnie. Szczepy bydlęce w większości pozbawione były PI-1, w przeciwieństwie do ludzkich izolatów, które powszechnie kodują fimbrie PI-1 w połączeniu z jednym z wariantów PI-2 [Springman, 2014].

Analizując występowanie różnych typów fimbrii wśród szczepów GBS w niniejszej pracy zaobserwowano, że wśród badanych szczepów dominowały izolaty posiadające równocześnie dwa rodzaje fimbrii, typu PI-1 i PI-2a. W dalszej kolejności rozpoznawano fimbrie PI-2a występujące pojedynczo, PI-1 w połączeniu z PI-2b oraz PI-2b występujące samodzielnie. Analizując uzyskane wyniki można stwierdzić, że szczepy należące do serotypu Ia najczęściej posiadały fimbrie typu PI-2a, u szczepów należących do serotypów Ib, II, V i VI najczęściej występowały fimbrie PI-1 równocześnie z PI-2a, natomiast wśród

szczepów serotypu III połowa posiadała fimbrie Pl-1 w połączeniu z Pl-2b, a ok. 41% fimbrie Pl-1 w połączeniu z Pl-2a. Obserwowane różnice są istotne statystycznie, a także zgodne z cytowanymi powyżej wynikami otrzymanymi przez innych autorów.

Ponadto, w niniejszej pracy porównano występowanie poszczególnych typów fimbrii wśród szczepów GBS izolowanych z różnych materiałów klinicznych. W każdej z czterech porównywanych grup dominowały izolaty posiadające fimbrie typu Pl-1 razem z Pl-2a. Występowały one u 55,3% szczepów izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych, 59,1% szczepów pochodzących od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych, 40,0% szczepów izolowanych z kolonizacji od noworodków oraz 50,0% szczepów pochodzących z zakażeń inwazyjnych od noworodków. Ze względu na brak doniesień literaturowych w tym aspekcie uzyskane wyniki należy uznać za nowe.

W przeprowadzonych badaniach własnych zaobserwowano, że fimbrie typu Pl-2a występujące razem z Pl-1 (85,7%) lub pojedynczo (14,3%) występowały u wszystkich szczepów wytwarzających biofilm w stopniu silnym. Ponadto, 57,0% szczepów wytwarzających biofilm w stopniu umiarkowanym posiadało fimbrie Pl-1 razem z Pl-2a, a 23,3% fimbrie Pl-2a występujące samodzielnie. Obserwowane różnice nie były statystycznie istotne. Wyniki te znajdują potwierdzenie w dostępnych danych literaturowych. Rinaudo i wsp. w badaniu z wykorzystaniem mutantów insercyjnych i delecyjnych wykazali, że fimbrie typu 2a (a nie typu 1 i 2b) warunkują wystąpienie fenotypu tworzącego biofilm. Obserwowali również, że dość duża liczba szczepów, mimo, że nie posiadała fimbrii 2a była zdolna do tworzenia biofilmu. Prawdopodobnie u tych szczepów inne znane lub nieznanne jeszcze czynniki, które spełniają podobne funkcje (tj. właściwości adhezji) kompensują brak fimbrii [Rinaudo, 2010].

Białka powierzchniowe z rodziny Alp są istotnymi czynnikami wirulencji szczepów GBS [Gherardi, 2007; Persson, 2008a]. W dostępnym piśmiennictwie znaleziono informacje na temat częstości występowania genów kodujących białka z rodziny Alp wśród szczepów GBS izolowanych z różnych materiałów klinicznych [Gherardi, 2007; Persson, 2007; Brzychczy-Włoch, 2011].

Gherardi i wsp. wykrywali obecność genów kodujące białka powierzchniowe z rodziny Alp u 91 szczepów GBS izolowanych z zakażeń inwazyjnych (n=31), zakażeń nieinwazyjnych (n=36) oraz z kolonizacji od kobiet ciężarnych (n=24) [Gherardi, 2007]. Wśród badanych izolatów dominowały szczepy z genem *rib* (33%), w dalszej kolejności *alpha(bca)* (23%), *alp3* (19%), *alp1* (18%) oraz *alp2* (8%) [Gherardi, 2007].

Również Brzychczy-Włoch i wsp. przeanalizowali w swojej pracy występowanie omawianych genów. Badanie przeprowadzili na 169 szczepach GBS pochodzących z kolonizacji od polskich kobiet ciężarnych. Wśród badanych izolatów najczęściej występowały geny *epsilon* (27%), *rib* (21%) oraz *alp2* (21%), w dalszej kolejności *bca* (17%) i *alp3* (14%). Nie stwierdzono natomiast szczepów z genem *alp4* [Brzychczy-Włoch, 2011].

W niniejszej pracy, wśród badanych szczepów dominowały te, u których stwierdzono geny *rib*, *alp2* lub *alp3* oraz *epsilon*. Gen *bca* występował u około 5% izolatów, natomiast w badanej grupie nie stwierdzono obecności genu *alp4*. Dodatkowo, w niniejszej pracy po raz pierwszy przeanalizowano występowanie ww. genów u szczepów pochodzących z różnych materiałów klinicznych. We wszystkich porównywanych grupach dominowały izolaty z genem *rib*. Wśród szczepów pochodzących z kolonizacji od kobiet ciężarnych badane geny rozpoznawano w następującej kolejności: najczęściej gen *rib*, następnie geny *alp2* lub *alp3*, *epsilon* oraz *bca*. W grupie szczepów pochodzących z kolonizacji od noworodków rozpoznawano omawiane geny w kolejności: najczęściej *rib*, *epsilon*, *alp2* lub *alp3* oraz *bca*. Wśród szczepów pochodzących z zakażeń nieinwazyjnych najczęściej wykrywano geny *rib*, *alp2* lub *alp3*, *epsilon* oraz *bca*. Spośród sześciu szczepów izolowanych z zakażeń inwazyjnych od noworodków dwa posiadały gen *rib*, kolejne dwa geny *alp2* lub *alp3*, jeden izolat posiadał gen *epsilon* i jeden gen *bca*.

Analizując obecność genów kodujących białka z rodziny Alp wśród badanych szczepów *S. agalactiae* zaobserwowano, że istnieje statystycznie istotna zależność pomiędzy obecnością określonych genów, a poszczególnymi serotypami GBS. W niniejszej pracy stwierdzono występowanie genu *rib* u 72 izolatów GBS, najczęściej reprezentujących serotyp III (55,5%), w dalszej kolejności serotypy V (16,7%), II (12,5%), Ia (5,6%), Ib (5,6%), VI (2,8%) i IV (1,4%). Obecność genu *epsilon* zaobserwowano u 37 izolatów, wśród których dominowały szczepy należące do serotypu Ia, a następnie Ib, IV, II, III oraz V. Występowanie genów *alp2* lub *alp3* było najsilniej skorelowane z serotypami V i III. Gen *bca* oznaczono u ośmiu izolatów, sześć z nich należało do serotypu II, a dwa do serotypu Ib.

Podobnych obserwacji dokonali inni autorzy [Creti, 2004; Persson, 2007; Persson, 2008a]. Creti i wsp. obserwowali występowanie genu *rib* najczęściej u szczepów z serotypem III, genu *bca* wśród izolatów należących do serotypów Ia, Ib i II, natomiast genu *alp3* u serotypu V i VIII [Creti, 2004]. Również Persson i współautorzy w swoich badaniach zauważyli występowanie najczęściej genu: *rib* wśród szczepów serotypu III,

epsilon u serotypu Ia, *bca* u szczepów reprezentujących serotypy Ib i II oraz *alp3* u szczepów należących do serotypu V [Persson, 2007; Persson, 2008a].

W niniejszej pracy zaobserwowano, że spośród siedmiu szczepów wytwarzających biofilm w stopniu silnym u pięciu występuje gen *rib*, a u dwóch geny *alp2* lub *alp3*. U szczepów wytwarzających biofilm w stopniu umiarkowanym najczęściej obserwowano gen *rib* oraz *alp2* lub *alp3*, w dalszej kolejności geny *epsilon* i *bca*. Również wśród szczepów wytwarzających biofilm w stopniu słabym, większość posiadała gen *rib*. Obserwowane różnice nie były statystycznie istotne. Brak jest danych z piśmiennictwa, z którymi można porównać uzyskane wyniki.

W okołoporodowej profilaktyce antybiotykowej, a także w leczeniu zakażeń o etiologii GBS największe znaczenie mają antybiotyki β -laktamowe oraz makrolidy i linkozamidy. W ostatnim czasie pojawiają się jednak doniesienia o szczepach *S. agalactiae* wykazujących obniżoną wrażliwość na penicylinę, za którą odpowiada mutacja genu *pbp2x* [Kimura, 2008; Dahesh, 2008]. Ponadto, od kilku lat obserwuje się w wielu krajach narastającą oporność na makrolidy wśród paciorkowców beta-hemolizujących, co stanowi istotny problem terapeutyczny u chorych uczulonych na β -laktamy [Mikołajczyk, 2007; Capanna, 2013; Matani, 2016]. W związku z tym, pomimo powszechnej wrażliwości na antybiotyki β -laktamowe wśród szczepów GBS, z uwagą należy śledzić tendencje w ich lekowrażliwości.

Przeprowadzona w ramach niniejszej pracy ocena lekowrażliwości szczepów GBS wykazała, że wszystkie szczepy badane były wrażliwe na penicylinę i lewofloksacynę. Również wszystkie szczepy izolowane z zakażeń inwazyjnych od noworodków, dla których oznaczano wartość MIC wankomycyny były wrażliwe na ten glikopeptyd. Ponadto wśród szczepów izolowanych z materiałów innych niż mocz 78,3% wykazywało wrażliwość, a 21,7% średnią wrażliwość na tigeicyklinę. Uzyskane wyniki są zbliżone z danymi publikowanymi w różnych krajach europejskich [Mikołajczyk, 2007; Gherardi, 2007; Persson, 2008b; Matani, 2016]. Wśród szczepów izolowanych z moczu, aż 94,4% było opornych na tetracyklinę. Zaobserwowany wysoki odsetek szczepów opornych na tetracyklinę zgodny jest z dostępnymi danymi literaturowymi [Mikołajczyk, 2007; Gherardi, 2007; Capanna, 2013, Dutra, 2014; Wang, 2015b].

Ponieważ coraz częściej raportowana jest oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B, charakterystyka szczepów opornych jest istotna z epidemiologicznego punktu widzenia. Zgodnie z ostatnimi doniesieniami literaturowymi procent szczepów opornych na erytromycynę i klindamycynę w różnych krajach europejskich jest

zróznicowany i wynosi odpowiednio 32,2% i 43,7% we Włoszech [Matani, 2016], 30,0% i 28,0% w Szwajcarii [Capanna, 2013], 14,5% i 14,0% w Szwecji [Fröhlicher, 2014]. Również poza Europą obserwuje się niepokojącą tendencję do narastania oporności na te grupy antybiotyków [Dogan, 2005; Phares, 2008; Wang, 2015a; Wang, 2015b]. Stosunkowo niskie odsetki szczepów opornych obserwowane są w krajach Ameryki Południowej takich jak Brazylia (4,1% szczepów opornych na erytromycynę i 3,0% opornych na klindamycynę) [Dutra, 2014] oraz Chile (odpowiednio 9,5% i 13,7%) [Abarzúa, 2014]. Odmienne wrażliwość na omawiane grupy antybiotyków wygląda w Chinach, gdzie odnotowuje się 78,6% szczepów opornych na erytromycynę i 64,3% opornych na klindamycynę wśród izolatów pochodzących z kolonizacji [Wang, 2015a], natomiast dla izolatów z zakażeń od noworodków odpowiednio 92,5% i 87,5% szczepów [Wang, 2015b].

Brzychcy-Włoch i wsp. badali oporność na makrolidy wśród 169 izolatów GBS pochodzących z kolonizacji od kobiet ciężarnych. Odnotowali oporność na erytromycynę wynoszącą 16% natomiast na klindamycynę 10% [Brzychcy-Włoch, 2010]. Mikołajczyk i wsp. w swojej pracy, w której analizą objęli 342 izolaty *S. agalactiae* pochodzące z różnych materiałów klinicznych obserwowali oporność na erytromycynę u 23,9% szczepów oraz oporność na klindamycynę u 20,0% szczepów badanych [Mikołajczyk, 2007].

W przedstawionej pracy oporność na erytromycynę wśród szczepów izolowanych z materiałów innych niż mocz wynosiła 31,8%, natomiast oporność na klindamycynę 24,0%. W porównaniu do danych publikowanych w naszym kraju kilka lat wcześniej obserwujemy wzrost odsetka szczepów opornych na badane grupy antybiotyków [Brzychcy-Włoch, 2010; Mikołajczyk, 2007].

W niniejszej pracy u szczepów opornych na makrolidy zidentyfikowano trzy mechanizmy oporności. U większości z nich rozpoznano mechanizm MLS_B konstytutywny (58,5%), mechanizm MLS_B indukcyjny stwierdzono u 19,5%, a fenotyp M u 21,9% szczepów opornych na makrolidy. Podobnie, jak w przedstawionej pracy mechanizm MLS_B konstytutywny był również najczęściej stwierdzanym mechanizmem oporności na makrolidy przez innych autorów w Polsce [Mikołajczyk, 2007; Brzychcy-Włoch, 2010], w Niemczech [Schoening, 2005], i we Francji [De Mouy, 2001].

Poddając dalszej analizie badane szczepy odporne na makrolidy, możemy zaobserwować, że prawie połowa z nich (48,8%) należała do serotypu V, 24,4% do serotypu Ia, a w dalszej kolejności do serotypów III (14,6%), II (9,7%) oraz Ib (2,4%).

Uzyskane wyniki cechowały się istotnością statystyczną. Również, w badaniach prowadzonych przez innych autorów wśród szczepów opornych na erytromycynę obserwowano przewagę izolatów należących do serotypu V [Uh, 2005; Gherardi, 2007; Brzychcy-Włoch, 2010].

Zdolność bakterii do wytwarzania biofilmu może mieć istotny wpływ na skuteczność leczenia antybiotykami. Bakterie, które tworzą biofilm, mogą charakteryzować się nawet tysiąckrotnie niższą wrażliwością na działanie niektórych substancji aktywnych w porównaniu ze szczepami rosnącymi w postaci planktonu [Gilbert i Moore, 2005]. Ponadto, wykazano, że niektóre antybiotyki, na przykład tetracykliny lub erytromycyna, mogą stymulować tworzenie biofilmu. Melchior i wsp. po podaniu tych antybiotyków zaobserwowali u *Staphylococcus epidermidis*, wzrost ekspresji genu odpowiedzialnego za tworzenie się biofilmu (*ica*) [Melchior, 2006].

Badania przesiewowe u matki i antybiotykoprofilaktyka podczas porodu to obecnie stosowane środki zapobiegawcze przeciwko zakażeniom powodowanym przez GBS u noworodków. Jednakże tak wczesna ekspozycja na antybiotyki o szerokim spektrum działania zmienia florę jelitową niemowląt i może powodować konsekwencje zdrowotne w późniejszym okresie życia.

W ramach niniejszej pracy przeanalizowano zależności pomiędzy obecnością wybranych czynników związanych z adhezją a zdolnością szczepów *S. agalactiae* do tworzenia biofilmu. Zgodnie z dostępnym piśmiennictwem, w Polsce nie badano do tej pory zdolność do tworzenia biofilmu przez szczepy GBS izolowane z materiałów klinicznych.

Uzyskane wyniki poszerzają naszą wiedzę na temat czynników wirulencji, które odgrywają rolę w przyleganiu do powierzchni komórek gospodarza oraz tworzeniu biofilmu. Ponadto identyfikacja białek wspomagających adhezję do komórek i tworzenie się biofilmu przez szczepy GBS może posłużyć do lepszego zrozumienia mechanizmów tworzenia biofilmu przez szczepy *S. agalactiae* i przyczynić się do rozwoju nowych metod terapeutycznych przeciwko tym drobnoustrojom. Informacje uzyskane w ramach niniejszej pracy mogą być wykorzystane w badaniach nad eradykacją GBS z dróg rodnych oraz z przewodu pokarmowego kobiet ciężarnych, zapewniając tym samym ochronę dziecka przed zakażeniem.

7. WNIOSKI

1. Ponieważ wszystkie szczepy *S. agalactiae* wytwarzały *in vitro* biofilm, różniąc się stopniem jego formowania, zaobserwowana zdolność może wpływać na przebieg kolonizacji i zakażenia, a także na leczenie infekcji GBS.
2. Stwierdzony w niniejszej pracy rozkład serotypów GBS jest zgodny z innymi wynikami uzyskanymi dla populacji europejskich.
3. Opracowany protokół identyfikacji serotypów GBS może być przydatny w rozpoznawaniu najczęstszych serotypów GBS.
4. Brak statystycznie istotnych zależności pomiędzy badanymi czynnikami zjadliwości, a zdolnością *S. agalactiae* do formowania struktury biofilmu wskazuje, że jest to proces złożony, uwarunkowany różnymi czynnikami.
5. U wszystkich szczepów wytwarzających biofilm w stopniu silnym oraz u większości szczepów formujących biofilm w stopniu umiarkowanym stwierdzono obecność genów kodujących fimbrie typu PI-2a występujących razem z PI-1 lub pojedynczo, co może wskazywać na ich istotną rolę w procesie powstawania biofilmu.
6. Zaobserwowano wysoki odsetek szczepów opornych na erytromycynę i klindamycynę, co stanowi istotny problem terapeutyczny u chorych uczulonych na β -laktamy. W związku z powyższym należy z uwagą śledzić tendencje w lekowrażliwości paciorkowców grupy B.

8. SPIS TABEL

- Tabela 1. Podział paciorkowców na grupy serologiczne [Szewczyk E, 2013]
- Tabela 2. Podział paciorkowców na grupy filogenetyczne [Szewczyk, 2013]
- Tabela 3. Wybrane czynniki wirulencji *S. agalactiae* oraz ich rola w patogenezie zakażeń, zestawienie opracowane na podstawie Landwehr-Kenzel i Henneke [Landwehr-Kenzel i Henneke, 2014]
- Tabela 4. Szczepy wzorcowe wykorzystane w badaniach
- Tabela 5. Badane szczepy kliniczne *S. agalactiae*.
- Tabela 6. Pochodzenie badanych szczepów klinicznych *S. agalactiae*
- Tabela 7. Warunki poszczególnych etapów reakcji PCR
- Tabela 8. Przyjęte kryteria oceny stopnia formowania biofilmu [Borges, 2012]
- Tabela 9. Charakterystyka starterów do reakcji PCR zastosowanych do serotypowania badanych szczepów *S. agalactiae*
- Tabela 10. Warunki reakcji PCR w gradiencie temperatur oraz dla pojedynczych serotypów
- Tabela 11. Warunki reakcji multipleks PCR
- Tabela 12. Sekwencje zastosowanych starterów oraz dane sekwencji referencyjnych dla genów kodujących fimbrie
- Tabela 13. Warunki reakcji PCR
- Tabela 14. Sekwencje specyficznych starterów dla genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp [Creti, 2004]
- Tabela 15. Warunki reakcji multiplex PCR zgodnie z Creti i wsp. [Creti, 2004]
- Tabela 16. Wyniki absorpcji przy 590 nm oraz ocena zdolności badanych szczepów do formowania biofilmu
- Tabela 17. Procentowy udział szczepów wykazujących różną zdolność do formowania biofilmu
- Tabela 18. Zgodność uzyskanych wyników sekwencjonowania badanych fragmentów genów z sekwencjami referencyjnymi z wykorzystaniem oprogramowania BLAST [w %; [www.http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)]
- Tabela 19. Wyniki serotypowania badanych szczepów GBS izolowanych z materiałów klinicznych

- Tabela 20. Częstość zidentyfikowanych serotypów (I-VII) wśród badanych szczepów
- Tabela 21. Występowanie różnych typów fimbrii wśród badanych szczepów *S. agalactiae*
- Tabela 22. Występowanie genów kodujących białka z rodziny Alp
- Tabela 23. Wielkość strefy zahamowanego wzrostu, interpretacja oznaczania lekowrażliwości metodą krążkowo-dyfuzyjną oraz oznaczania mechanizmu oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B dla szczepów izolowanych z materiałów klinicznych innych niż mocz (n=129)
- Tabela 24. Wyniki i interpretacja oznaczania lekowrażliwości metodą krążkowo-dyfuzyjną dla szczepów izolowanych z moczu (n=36)
- Tabela 25. Oznaczanie wrażliwości na wankomycynę metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku dla szczepów izolowanych z krwi od noworodków (n=6)
- Tabela 26. Rozkład poszczególnych serotypów wśród szczepów *S. agalactiae* produkujących biofilm w stopniu silnym, umiarkowanym i słabym
- Tabela 27. Obecność genów kodujących fimbrie u szczepów reprezentujących różne serotypy
- Tabela 28. Obecność genów kodujących różne typy fimbrii u szczepów *S. agalactiae* produkujących biofilm w stopniu silnym, umiarkowanym i słabym
- Tabela 29. Występowanie genów kodujących białka z rodziny Alp wśród szczepów o różnych serotypach
- Tabela 30. Obecność genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp u szczepów *S. agalactiae* produkujących biofilm w stopniu silnym, słabym i umiarkowanym
- Tabela 31. Udział poszczególnych serotypów wśród szczepów opornych na erytromycynę

9. SPIS RYCIN

- Rycina 1. Budowa polisacharydów otoczkowych GBS (opracowane na podstawie Lin i wsp. [Lin, 2018]).
- Rycina 2. Schemat dwuskładnikowego systemu regulacyjnego u bakterii (opracowany na podstawie Gotoh i wsp. [Gotoh, 2010]).
- Rycina 3. Wzrost *S. agalactiae* na podłożu Columbia Agar z 5% krwią baranią (fot. Kamińska, 2017).
- Rycina 4. Lateksowy test aglutynacyjny, A – wynik dodatni testu, potwierdzający przynależność do grupy B paciorkowców, B – wynik ujemny (fot. Kamińska, 2016).
- Rycina 5. Ocena zdolności badanych szczepów do wytwarzania biofilmu metodą spektrofotometryczną – płytką titracyjną po rozpuszczeniu zaabsorbowanego fioletu krystalicznego, przygotowana do odczytu (fot. Kamińska, 2016).
- Rycina 6. Wynik elektroforezy produktów amplifikacji genu *cAMP* (wielkość produktu 155 pz): ścieżki 1-10 – badane próby, (+) kontrola dodatnia, (-) kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 50 bp).
- Rycina 7. Ocena stopnia formowania biofilmu dla szczepów *S. agalactiae*: A) izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych, B) od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych, C) z kolonizacji od noworodków, D) od noworodków z zakażeń inwazyjnych.
- Rycina 8. Przykładowy wynik sekwencjonowania: A) Fragment chromatogramu analizowanej sekwencji genu dla serotypu III. B) Porównanie sekwencji referencyjnej z wynikami sekwencjonowania dla fragmentu DNA szczepu o serotypie III (szczep wzorcowy *S. agalactiae* ATCC 12403 oraz szczep kliniczny nr 27). Stwierdzono występowanie jednego wariantu sekwencji DNA u szczepu klinicznego w odniesieniu do sekwencji referencyjnej (substytucja w pozycji 7672 A>G).

- Rycina 9. Wynik elektroforezy produktów amplifikacji genów w reakcji multipleks PCR [serotyp Ia (521 pz), Ib (770 pz), III (187 pz) V (247 pz)]: ścieżki 1-8 – badane próby, (+) kontrola dodatnia, (-) kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 100 bp).
- Rycina 10. Przykładowe wyniki elektroforezy produktów amplifikacji genów w pojedynczych reakcjach PCR A. serotyp II (188 pz), ścieżki 1-4 – badane próby, (+) – kontrola dodatnia, (-) – kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 50 bp); B. serotyp IV (314 pz), ścieżki 1-8 – badane próby, (+) – kontrola dodatnia, (-) – kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 100 bp).
- Rycina 11. Częstość występowania poszczególnych serotypów izolowanych z A) kolonizacji od kobiet ciężarnych, B) od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych, C) z kolonizacji od noworodków, D) od noworodków z zakażeń inwazyjnych.
- Rycina 12. Wynik elektroforezy produktów amplifikacji dla fragmentu genu kodującego fimbrie PI-1 (298 pz) ścieżki 1-7 – badane próby, (+) – kontrola dodatnia, (-) – kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 50 bp).
- Rycina 13. Wynik elektroforezy produktów amplifikacji dla fragmentu genu kodującego fimbrie PI-2a (575 pz) ścieżki 1-13 – badane próby, (+) – kontrola dodatnia, (-) – kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 50 bp).
- Rycina 14. Wynik elektroforezy produktów amplifikacji dla fragmentu genu kodującego fimbrie PI-2b (314 pz) ścieżki 1-10 – badane próby, (+) – kontrola dodatnia, (-) – kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 50 bp).
- Rycina 15. Występowanie różnych typów fimbrii wśród badanych szczepów: A) izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych, B) od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych, C) z kolonizacji od noworodków, D) od noworodków z zakażeń inwazyjnych.
- Rycina 16. Wynik elektroforezy produktów amplifikacji genów kodujących białka z rodziny Alp w reakcji multipleks PCR [*epsilon* (200 pz), *rib* (295 pz), *alp2/3* (334 pz) *bca* (398 pz), *alp4* (110 pz)] ścieżki 1-34 – badane próby,

(+) – kontrola dodatnia, (-) – kontrola ujemna, M – wzorzec wielkości DNA (GeneRuler DNA Ladder 100 bp).

- Rycina 17. Występowanie genów kodujących białka z rodziny Alp wśród badanych szczepów A) izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych, B) od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych, C) z kolonizacji od noworodków, D) od noworodków z zakażeń inwazyjnych.
- Rycina 18. Oznaczanie lekowrażliwości badanych szczepów metodą krążkowo-dyfuzyjną na podłożu MH-F (fot. Kamińska, 2017).
- Rycina 19. Oznaczanie lekowrażliwości badanych szczepów metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku (MIC) (fot. Kamińska, 2017).
- Rycina 20. Profil lekowrażliwości szczepów *S. agalactiae* (izolowanych z materiałów klinicznych innych niż mocz, zgodnie z rekomendacjami EUCAST [www.korld.edu.pl]).
- Rycina 21. Profil lekowrażliwości szczepów *S. agalactiae* izolowanych z moczu, zgodnie z rekomendacjami EUCAST [www.korld.edu.pl]).
- Rycina 22. Wykrywanie mechanizmu oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B – MLS_B indukcyjny (fot. Kamińska, 2017).
- Rycina 23. Wykrywanie mechanizmu oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B – MLS_B konstytutywny (fot. Kamińska, 2017).
- Rycina 24. Wykrywanie mechanizmu oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B – fenotyp M (fot. Kamińska, 2017).

10. SUPLEMENT

Pozostałe wyniki analiz statystycznych

Obliczenie 1.

Porównanie częstości występowania silnych (F), słabych (S) i umiarkowanych (U) producentów biofilmu wśród szczepów GBS izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych, od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych, z kolonizacji od noworodków oraz z zakażeń inwazyjnych od noworodków

	F	S	U	χ^2	Wartość p
Kolonizacja - kobiety ciężarne	2	35	48	4.8061	0.5689
Kolonizacja - noworodki	2	13	16		
Zakażenia inwazyjne - noworodki	0	3	3		
Zakażenia nieinwazyjne - osoby dorosłe	4	21	19		

Obliczenie 2.

Rozkład badanych serotypów wśród szczepów GBS izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych, od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych, z kolonizacji od noworodków oraz z zakażeń inwazyjnych od noworodków

	Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII	χ^2	Wartość p
Kolonizacja - kobiety ciężarne	15	7	9	31	1	19	3	0	17.379	0.6879
Kolonizacja - noworodki	8	1	2	10	2	7	0	0		
Zakażenia inwazyjne - noworodki	1	0	2	1	0	2	0	0		
Zakażenia nieinwazyjne - osoby dorosłe	6	4	6	12	1	14	0	1		

Obliczenie 3.

Porównanie obecności genów kodujących różne typy fimbrii (PI-1, PI-2a, PI-2b) wśród szczepów GBS izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych, od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych, z kolonizacji od noworodków oraz z zakażeń inwazyjnych od noworodków

Suplement

	PI-1 (-)	PI-1 (+)	χ^2	Wartość p
Kolonizacja - kobiety ciężarne	20	65	1.5162	0.6785
Kolonizacja - noworodki	10	20		
Zakażenia inwazyjne - noworodki	2	4		
Zakażenia nieinwazyjne - osoby dorosłe	10	34		
	PI-2a (-)	PI-2a (+)	χ^2	Wartość p
Kolonizacja - kobiety ciężarne	19	66	1.31	0.7268
Kolonizacja - noworodki	9	21		
Zakażenia inwazyjne - noworodki	2	4		
Zakażenia nieinwazyjne - osoby dorosłe	9	35		
	PI-2b (-)	PI-2b (+)	χ^2	Wartość p
Kolonizacja - kobiety ciężarne	66	19	1.31	0.7268
Kolonizacja - noworodki	21	9		
Zakażenia inwazyjne - noworodki	4	2		
Zakażenia nieinwazyjne - osoby dorosłe	35	9		

Obliczenie 4.

Porównanie obecności genów kodujących białka powierzchniowe wśród szczepów GBS izolowanych z kolonizacji od kobiet ciężarnych, od osób dorosłych z zakażeń nieinwazyjnych, z kolonizacji od noworodków oraz z zakażeń inwazyjnych od noworodków. Ze względu na brak szczepów, które posiadałyby gen *alp4*, nie wykonano analiz dla tego genu

	<i>epsilon</i> (-)	<i>epsilon</i> (+)	χ^2	Wartość p	<i>rib</i> (-)	<i>rib</i> (+)	χ^2	Wartość p
Kolonizacja - kobiety ciężarne	67	18	4.7623	0.1901	48	37	0.37506	0.9453
Kolonizacja - noworodki	19	11			16	14		
Zakażenia inwazyjne -noworodki	5	1			4	2		
Zakażenia nieinwazyjne - osoby dorosłe	37	7			25	19		
	<i>alp2/3</i> (-)	<i>alp2/3</i> (+)	χ^2	Wartość p	<i>bca</i> (-)	<i>bca</i> (+)	χ^2	Wartość p
Kolonizacja - kobiety ciężarne	58	27	4.4913	0.2131	82	3	2.6564	0.4477
Kolonizacja - noworodki	26	4			29	1		
Zakażenia inwazyjne -noworodki	4	2			5	1		
Zakażenia nieinwazyjne - osoby dorosłe	29	15			41	3		

11. STRESZCZENIE

Obecnie poszukuje się nowych czynników chorobotwórczości *S. agalactiae*, zaangażowanych w adhezję oraz tworzenie biofilmu. Uważa się, że przyleganie bakterii do komórek gospodarza jest kluczowe w procesie dalszej kolonizacji i/lub inwazji GBS.

Ponieważ w dostępnym piśmiennictwie istnieje niewiele doniesień dotyczących charakterystyki czynników zjadliwości *S. agalactiae* związanych z adhezją i tworzeniem biofilmu, w niniejszej pracy postanowiono ocenić: zdolność szczepów *S. agalactiae* do formowania struktury biofilmu; częstość występowania wśród badanych szczepów poszczególnych serotypów GBS oraz wybranych czynników wirulencji, a także lekowrażliwość szczepów GBS. Ponadto dokonano analizy korelacji uzyskanych wyników.

Materiał do badań stanowiło 165 szczepów klinicznych *S. agalactiae*. Badane szczepy izolowano od kobiet ciężarnych, noworodków oraz osób dorosłych z zakażeń innych niż okołoporodowe. Identyfikacji badanych szczepów dokonano przy pomocy lateksowego testu aglutynacyjnego oraz z zastosowaniem technik PCR.

W ramach niniejszej pracy zbadano zdolność szczepów *S. agalactiae* do formowania biofilmu metodą spektrofotometryczną. Wszystkie badane szczepy wykazały *in vitro* zdolność do tworzenia biofilmu, jednakże różniły się stopniem jego formowania. Ponad połowa badanych szczepów wytwarzała biofilm w stopniu umiarkowanym, a około 4% w stopniu silnym.

Oceniono rozkład serotypów od I do VII wśród badanych szczepów z zastosowaniem technik PCR. Badane szczepy bakteryjne najczęściej reprezentowały serotyp III (32,73%), V (25,45%) oraz serotyp Ia (18,18%). Rozpoznano wcześniej nieidentyfikowane w naszym kraju szczepy należące do serotypów VI (trzy szczepy) i VII (jeden szczep).

Badania wykazały, że wśród badanych szczepów dominowały izolaty posiadające równocześnie dwa rodzaje fimbrii, typu Pl-1 i Pl-2a. W dalszej kolejności rozpoznano fimbrie Pl-2a występujące pojedynczo, Pl-1 w połączeniu z Pl-2b oraz Pl-2b występujące samodzielnie.

Analizy występowania genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp wykazały, że wśród badanych szczepów dominowały te, u których stwierdzono geny *rib*,

w dalszej kolejności *alp2* lub *alp3* oraz *epsilon*. Gen *bca* występował u około 5% izolatów, natomiast w badanej grupie nie stwierdzono obecności genu *alp4*.

Wyniki badania lekowrażliwości szczepów *S. agalactiae* wskazują, iż oporność na erytromycynę wśród badanych izolatów wynosiła 31,8%, natomiast oporność na klindamycynę 24,0%. U szczepów opornych na makrolidy rozpoznano trzy mechanizmy oporności: mechanizm MLS_B konstytutywny (58,5%), mechanizm MLS_B indukcyjny (19,5%) oraz fenotyp M (21,9%).

Wyniki badań wskazują, iż szczepy *S. agalactiae* posiadają *in vitro* zdolność do tworzenia biofilmu, różniąc się stopniem jego formowania. Stwierdzony w niniejszej pracy rozkład serotypów GBS jest spójny z wynikami odnoszącymi się do innych populacji europejskich. Zaobserwowano statystycznie istotną zależność pomiędzy szczepami reprezentującymi różne serotypy a obecnością genów kodujących różne typy fimbrii oraz genów kodujących poszczególne białka powierzchniowe z rodziny Alp. Zauważono również zależność pomiędzy serotypem, a opornością na erytromycynę. Jednakże, brak statystycznie istotnych zależności pomiędzy badanymi czynnikami zjadliwości, a zdolnością *S. agalactiae* do formowania struktury biofilmu wskazuje, że jest to proces złożony warunkowany różnymi czynnikami. Narastająca oporność na erytromycynę i klindamycynę wśród szczepów *S. agalactiae*, stanowi problem terapeutyczny u chorych uczulonych na β -laktamy, zatem z uwagą należy śledzić tendencje w lekowrażliwości paciorkowców grupy B.

W obliczu pojawiających się szczepów *S. agalactiae* o zmniejszonej wrażliwości na penicylinę oraz narastającej oporności na klindamycynę i erytromycynę, w najbliższym czasie może być konieczne opracowanie nowych strategii profilaktyki zakażeń GBS. Przedstawione wyniki badań mogą być wykorzystane w badaniach nad eradykacją GBS z dróg rodnych oraz wykorzystane w opracowaniu nowych procedur profilaktycznych.

12. SUMMARY

Currently, new *S. agalactiae* virulence factors, involved in adhesion and biofilm formation, are being searched for. It is believed that adherence of bacteria to host cells is crucial in the further colonization and/or invasion of GBS.

Because in the available literature there are only a few reports on the characteristics of *S. agalactiae* virulence factors related to adhesion and biofilm formation, the present study will assess: the ability of *S. agalactiae* strains to form the biofilm structure; frequency of occurrence of individual GBS serotypes among the tested strains and selected virulence factors as well as susceptibility of GBS strains. In addition, the correlation of the obtained results was analyzed.

The study material consisted of 165 *S. agalactiae* clinical strains. The studied strains were isolated from pregnant women, newborns and adults with non-perinatal infections. Identification of the studied strains was performed using a latex agglutination test and PCR techniques.

As part of this study, the ability of *S. agalactiae* strains to form biofilm by spectrophotometric method was examined. All strains tested *in vitro* demonstrated the ability to form biofilms, however, they differed in the degree of its formation. Over half of the tested strains produced biofilms to a moderate degree, and about 4% to a strong degree.

The distribution of serotypes from I through to VII was assessed among the tested strains using PCR techniques. The tested bacterial strains most frequently represented serotype III (32.73%), V (25.45%) and serotype Ia (18.18%). Strains - previously unidentified in our country - belonging to serotypes VI (three strains) and VII (one strain) were recognized.

Studies have shown that isolates with two types of fimbriae, type Pl-1 and Pl-2a, dominated among the tested strains. Subsequently, Pl-2a fimbriae that occurred individually, Pl-1 in combination with Pl-2b and Pl-2b occurring alone were recognized.

Analyses of the occurrence of genes coding surface proteins from the Alp family showed that strains in which *rib* genes, *alp2* or *alp3* and *epsilon* genes were found dominated among the studied strains. *Bca* gene occurred in approx. 5% of isolates, while in the studied group the presence of *alp4* gene was not observed.

The results of the susceptibility testing of *S. agalactiae* strains indicate that the resistance to erythromycin among the tested isolates was 31.8%, while the resistance to clindamycin was 24.0%. Three resistance mechanisms were identified in the macrolide-resistant strains: the MLS_B constitutive mechanism (58.5%), the inducible MLS_B mechanism (19.5%) and the M phenotype (21.9%).

The study results indicate that *S. agalactiae* strains *in vitro* have the ability to form biofilms, differing in the degree of its formation. The distribution of GBS serotypes found in this study is consistent with results relating to other European populations. A statistically significant relationship was observed between strains representing different serotypes and the presence of genes encoding various types of fimbriae and genes encoding individual surface proteins of the Alp family. A relationship between serotypes and resistance to erythromycin was also noticed. However, the lack of statistically significant relationships between the studied virulence factors and the ability of *S. agalactiae* to form the biofilm structure indicates that it is a complex process conditioned by various factors. The increasing resistance to erythromycin and clindamycin among *S. agalactiae* strains constitutes a therapeutic problem in patients allergic to β -lactams, therefore attention should be paid to the tendency of susceptibility of group B streptococci.

In the face of emerging *S. agalactiae* strains with reduced sensitivity to penicillin and increasing resistance to clindamycin and erythromycin, it may be necessary in the near future to develop new strategies for the prevention of GBS infections. The presented study results can be used in studies on eradication of GBS from the genital tract and in the development of new preventive procedures.

13. PIŚMIENICTWO

Aagaard K., Riehle K., Ma J., Segata N., Mistretta T.A., Coarfa C., Raza S., Rosenbaum S., Van den Veyver I., Milosavljevic A., Gevers D., Huttenhower C., Petrosino J., Versalovic J. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One*. 2012, 7, e36466.10.1371/journal.pone.0036466.

Abarzúa F., Argomedo C., Meissner A., Díaz T., Garrido P., Fariña S., Chahin C. Prevalence of anal-vaginal colonization of *Streptococcus agalactiae* in third trimester of pregnancy and susceptibility to macrolides and lincosamides, in pregnant women controlled at Clínica Alemana Temuco, Southern Chile. *Rev. Chil. Infectol.* 2014, 31, 305-8.

Abee T., Kovacs A.T., Kuipers O. P, van der Veen S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011, 22, 172-179.

Akoh C.C., Pressman E.K., Cooper E., Queenan R.A., Pillittere J., O'Brien K.O. Prevalence and risk factors for infections in a pregnant adolescent population. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 2017, 30, 71–5.

Alhazmi A., Hurteau D., Tyrrell, G. J. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in Alberta, Canada, from 2003 to 2013. *J. Clin. Microbiol.* 2016, 54, 1774–81.

Allardice J.G., Baskett T.F., Seshia M.M., Bosman N., Malazdrewicz R. Perinatal group B streptococcal colonization and infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1982, 142, 617-20.

Altöparlak U., Kadanali A., Kadanali S. Genital flora in pregnancy and its association with group B streptococcal colonization. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2004, 87, 245–6.

Amin A., Abdulrazzaq Y. M., Uduman S. Group B streptococcal serotype distribution of isolates from colonized pregnant women at the time of delivery in United Arab Emirates. *J. Infect.* 2002, 45, 42–46.

Baker C. J., Rench M.A., Edwards M.S., Carpenter R.J., Hays B.M., Kasper D.L. Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B Streptococcus. N. Eng. J. Med. 1988, 319, 1180-5.

Banerjee A., Kim B.J., Carmona E.M., Cutting A.S., Gurney M.A., Carlos C., Feuer R., Prasadarao N.V., Doran K.S. Bacterial Pili exploit integrin machinery to promote immune activation and efficient blood-brain barrier penetration. Nat. Commun. 2011, 2:462.10.1038/ncomms1474.

Barcaite C.J., Bartusevicius A., Tameliene R., Kliucinskas M., Maleckiene L., Nadisauskiene R. Prevalence of maternal group B streptococcal colonization in European countries. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2008, 87, 260-271.

Baron M.J., Filman D.J., Prophete G.A., Hogle J.M., Madoff L.C. Identification of a glycosaminoglycan binding region of the alpha C protein that mediates entry of group B streptococci into host cells. J. Biol. Chem. 2007, 282, 10526-36.

Barton L.L., Feigin R.D., Lins R. Group B beta hemolytic streptococcal meningitis in infants. J. Pediatr. 1973, 82, 719-23.

Beier D., Gross R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. Curr. Opin. Microbiol. 2006, 9, 143-52.

Bigos M., Łysakowska M., Wasiela M. Zakażenie okołoporodowe o etiologii *Streptococcus agalactiae*. Post. Mikrobiol. 2012, 51, 4, 299-308.

Bisharat N., Crook D.W., Leigh J., Harding R.M., Ward P.N., Coffey T.J., Maiden M.C., Peto T., Jones N. Hyperinvasive neonatal group B *Streptococcus* has arisen from a bovine ancestor. J. Clin. Microbiol. 2004, 42, 2161-7.

Blancas D., Santin M., Olmo M., Alcaide F., Carratala J., Gudiol F. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults: incidence, clinical characteristics, and outcome. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2004, 23, 168-73.

Bolduc G.R., Madoff L.C. The Group B Streptococcal α C protein binds α 1 β 1-integrin through a novel KTD motif that promotes internalization of GBS within human epithelial cells. *Microbiol.* 2007, 153, 4039-49.

Borges S., Silva L., Teixeira P. Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2012, 101, 677-82.

Boyer K.M., Gotoff S.P. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. *N. Eng. J. Med.* 1986, 314, 1665-9.

Brigtsen A.K., Jacobsen A.F., Dedi L., Melby K.K., Fugelseth D., Whitelaw A. Maternal colonization with group B *Streptococcus* is associated with an increased rate of infants transferred to the neonatal intensive care unit. *Neonatology*, 2015, 108, 157–63.

Brzychczy-Włoch M., Strus M., Pawlik D., Machlarz H., Gosiewski T., Drzewiecki A., Rytlewski K., Lauterbach R., Heczko P.B. Narastanie stopnia kolonizacji kobiet w ciąży i noworodków przez *Streptococcus agalactiae* na obszarze Polski południowo-wschodniej. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2008, 60, 5-12.

Brzychczy-Włoch M., Gosiewski T., Bodaszewska M., Pabian W., Bulanda M., Heczko P.B. Rozkład serotypów paciorkowców grupy B, izolowanych z przypadków nosicielstwa, oznaczonych metodą multipleks PCR. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2009, 61, 293 - 9.

Brzychczy-Włoch M., Gosiewski T., Bogdaszewska M., Pabian W., Bulanda M., Kochan P., Struś M., Heczko P.B. Genetic characterization and diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates with macrolide resistance. 2010. *J. Med. Microbiol.* 59, 780-6.

Brzychczy-Włoch M., Gosiewski T., Bodaszewska M., Talaga K., Natkaniec J., Adamski P., Heczko P.B. Występowanie genów kodujących białka z rodziny Alp u *Streptococcus agalactiae*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2011, 63, 5-14.

Brzychczy-Włoch M., Pabian W., Majewska E., Zuk M.G., Kielbik J., Gosiewski T., Bulanda M.G. Dynamics of colonization with group B streptococci in relation to normal flora in women during subsequent trimesters of pregnancy. *New Microbiol.* 2014, 37, 307–19.

Buscetta M., Papasergi S., Firon A., Pietrocola G., Biondo C., Mancuso G., Midiri A., Romeo L., Teti G., Speziale P., Trieu-Cuot P., Beninati C. FbsC, a Novel Fibrinogen-binding Protein, Promotes *Streptococcus agalactiae* -Host Cell Interactions. *J. Biol. Chem.* 2014, 289, 21003-15.

Capan-Melser M., Mombo Ngoma G., Akerey-Diop D., Basra A., Wurbel H., Groger M., Mackanga J.R., Zoleko-Manego R., Schipulle U., Schwing J., Lötsch F., Rehman K., Matsiegui P.B., Agnandji S.T., Adegnika A.A., B elard S., Gonz alez R., Kremsner P.G., Menendez C., Ramharter M. Evaluation of intermittent preventive treatment of malaria against group B *Streptococcus* colonization in pregnant women: a nested analysis of a randomized controlled clinical trial of sulfadoxine/pyrimethamine versus mefloquine. *J. Antimicrob. Chemother.* 2015, 70, 1898–902.

Capanna F., Stephane P., Emonet S.P., Cherkaoui A., Orion O., Schrenzel J., de Tajada B.M. Antibiotic resistance patterns among group B *Streptococcus* isolates: implications for antibiotic prophylaxis for early-onset neonatal sepsis. *Swiss. Med. Wkly.* 2013, 143:w13778.

Chaisilwattana P., Monif G.R. In vitro ability of the group B streptococci to inhibit Gram-positive and Gram-variable constituents of the bacterial flora of the female genital tract. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 1995, 3, 91–7.

Chattopadhyay D., Carey A.J., Caliot E., Webb R.I., Layton J.R., Wang Y., Bohnsack J.F., Adderson E.E., Ulett G.C. Phylogenetic lineage and pilus protein Spb1/SAN1518 affect opsonin-independent phagocytosis and intracellular survival of Group B *Streptococcus*. *Microbes Infect.* 2011, 13, 369–82.

Creti R., Fabretti F., Orefici G., Von Hunolstein C. Multiplex PCR assay for direct identification of group B streptococcal alpha-like protein genes. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 1326-29.

Dahesh S., Hensler M.E., Van Sorge N.M., Gertz R.E. Jr., Schrag S., Nizet V., Beall B.W. Point mutation in the group B streptococcal *pbp2x* gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52, 2915–8.

De Gregorio P.R., Juarez Tomas M.S., Leccese Terraf M.C., Nader-Macias M.E. Preventive effect of *Lactobacillus reuteri* CRL1324 on Group B *Streptococcus* vaginal colonization in an experimental mouse model. *J. Appl. Microbiol.* 2015, 118, 1034–47.

De Gregorio P.R., Juarez Tomas M.S., Nader-Macias M.E. Immunomodulation of *Lactobacillus reuteri* CRL1324 on group B *Streptococcus* vaginal colonization in a murine experimental model. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2016, 75, 23–35.

De Mouy D., Cavallo J.D., Leclercq R., Fabre R., the Aforcopi-bio Network. Antibiotic susceptibility and mechanisms of erythromycin resistance in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae*: French multicenter study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 2400-2.

Dogan B., Schukken Y.H, Santisteban C., Boor K.J. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 5899–906.

Doran K.S., Liu G.Y., Bizet V. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neurophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *J. Clin. Incest.* 2003, 112, 736-44.

D'Urzo N., Martinelli M., Pezzicoli A., De Cesare V., Pinto V., Margarit I., Telford J.L., Maione D., Members of the DEVANI Study Group. Acidic pH strongly enhances in vitro biofilm formation by a subset of hypervirulent ST-17 *Streptococcus agalactiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014, 80, 2176-85.

Dutra V.G., Alves V.M., Olendzki A.N., Dias C.A., de Bastos A.F., Santos G.O., de Amorin E.L., Sousa M.Â., Santos R., Ribeiro P.C., Fontes C.F., Andrey M., Magalhães K., Araujo A.A., Paffadore L.F., Marconi C., Murta E.F., Fernandes P.C., Raddi M.S., Marinho P.S., Bornia R.B., Palmeiro J.K., Dalla-Costa L.M., Pinto T.C., Botelho A.C., Teixeira L.M., Fracalanza S.E. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. BMC Infect. Dis. 2014, 14, 323.

Edwards M.S, Baker C.J. Group B streptococcal infection in elderly adults. Clin. Infect. Dis. 2005, 41, 839-47.

Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST). Tabele interpretacji wartości granicznych minimalnych stężeń hamujących (MIC) oraz wielkości stref zahamowania wzrostu. Wersja 6.0, obowiązująca od 1 stycznia 2016 roku. www.korl.edu.pl

Florindo C., Damiao V., Silvestre I., Farinha C., Rodrigues F., Nogueira F., Martins-Pereira F., Castro R., Borrego M.J., Santos-Sanches I., Group for the Prevention of Neonatal GBS Infection. Epidemiological surveillance of colonising group B *Streptococcus* epidemiology in the Lisbon and Tagus Valley regions, Portugal (2005 to 2012): emergence of a new epidemic type IV/clonal complex 17 clone. Euro. Surveill. 2014, 19:20825.

Florindo C., Viegas S., Paulino A., Rodrigues E., Gomes J.P., Borrego M.J. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility profiles in *Streptococcus agalactiae* colonizing strains: association of erythromycin resistance with subtype III-1 genetic clone family. Clin. Microbio. Infect. 2010, 16, 1458-63.

Franciosi R.A., Knostman J.D., Zimmerman R.A. Group B streptococcal neonatal and infant infections. J. Pediatr. 1979, 82, 707-18.

Franken C., Haase G., Brandt C., Weber-Heynemann J., Martin S., Lammler C., Podbielski A., Lütticken R., Spellerberg B. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. Mol. Microbiol. 2001, 41, 925–35.

Fröhlicher S., Reichen-Fahrni G., Müller M., Surbek D., Droz S., Spellerberg B., Sendi P. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of group B streptococci in pregnant women: results from a Swiss tertiary centre. *Swiss Med. Wkly.* 2014, 20, 144, w13935.

Fry R.M. Fatal infections by hemolytic streptococcus group B. *Lancet* 1938; 1, 199-201.

Gherardi G., Imperi M., Baldassarri L., Pataracchia M., Alfarone G., Recchia S., Orefici G., Dicuonzo G., Creti R. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 2909-16.

Gilbert P., Moore L.E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* 2005, 99, 703-15.

Gniadkowski M., Żabicka D, Hryniewicz W. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów, Narodowy Instytut Leków, Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej.

Gotoh Y., Eguchi Y., Watanabe T., Okamoto S., Doi A., Utsumi R. Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010, 13:232-9.

Gudjónsdóttir M.J., Hentz E., Berg S., Backhaus E., Elfvin A., Kawash S., Trollfors B. Serotypes of group B streptococci in western Sweden and comparison with serotypes in two previous studies starting from 1988. *BMC Infect. Dis.* 2015, 15, 507.

Heath P.T., Balfour G.F., Tighe H., Verlander N.Q., Lamagni T.L., Efstratiou A., HPA GBS Working Group. Group B streptococcal disease in infants: a case control study. *Arch. Dis. Child.* 2009, 94, 674-80.

Heczko P.B., Niemiec T., Lauterbach R., Przondo-Mordarska H., Struś M., Drzewiecki A., Brzychczy-Włoch M. Zalecenia dotyczące wykrywania nosicielstwa paciorkowców grupy B (GBS) u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom u noworodków spowodowanym przez ten drobnoustrój. *Zakażenia.* 2008, 2.

Hensler M.E., Liu G.Y., Sobczak S., Benirschke K., Bizet V., Heldt G.P. Virulence role of group B *Streptococcus* beta-hemolysin/cytolysin in a neonatal rabbit model of early-onset pulmonary infection. *J. Infect. Dis.* 2005, 191, 1287-91.

Ho Y.R., Li C.M., Yu C.H., Lin Y.J., Wu C.M., Harn I.C., Tang M.J., Chen Y.T., Shen F.C., Lu C.Y., Tsai T.C., Wu J.J. The enhancement of biofilm formation in Group B streptococcal isolates at vaginal pH. *Med. Microbiol. Immunol.* 2013, 202, 105-15.

Huang P.Y., Lee M.H., Yang C.C., Leu H.S. Group B streptococcal bacteremia in non-pregnant adults. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2006, 39, 237-41.

Hull J.R., Tamura G.S., Castner D.G. Interactions of the streptococcal C5a peptidase with human fibronectin. *Acta Biomater.* 2008, 4, 504–13.

Ippolito D.L., James W.A., Tinnemore D., Huang R.R., Dehart M.J., Williams J., Wingerd M.A., Demons S.T. Group B streptococcus serotype prevalence in reproductive-age women at a tertiary care military medical center relative to global serotype distribution. *BMC Infect. Dis.* 2010, 10, 336.

Jabłoński L. Podstawy mikrobiologii lekarskiej, PZWL, Warszawa 1979, 205-23.

Jiang H., Chen M., Li T, Liu H., Gong Y., Li M. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* causing community and hospital acquired infections in Shanghai, China. *Front. Microbiol.* 2016, 30;7:1308.

Jiang S., Cieslewicz M.J., Kasper D.L., Wessels M.R. Regulation of virulence by a two-component system in group B Streptococcus. *J. Bacteriol.* 2005, 187, 1105-13.

Jiang S., Park S. E., Yadav P., Paoletti L. C., Wessels M. R. Regulation and function of pilus island 1 in group B streptococcus. *J. Bacteriol.* 2012, 194, 2479–90.

Jiang S., Wessels M.R. BsaB, a novel adherence factor of group B Streptococcus. *Infect. Immun.* 2014, 82, 1007-16.

Juda M., Dadas E., Malm E. Rola dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w chorobotwórczości i lekooporności bakterii. *Post. Mikrobiol.* 2007, 46, 237-48.

Kaczorek E., Małaczewska J., Wójcik R., Siwicki A.K. Biofilm production and other virulence factors in *Streptococcus* spp. isolated from clinical cases of bovine mastitis in Poland. *BMC Veterinary Research.* 2017, 13, 398.

Kamińska D., Gajecka M. Is the role of human female reproductive tract microbiota underestimated? *Benef Microbes.* 2017, 8, 327-43.

Kasahara K., Baltus A.J., Lee S.H., Edelstein M.A., Edelstein P.H. Prevalence of non-penicillin-susceptible group B *Streptococcus* in Philadelphia and specificity of penicillin resistance screening methods. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48, 1468-69.

Kaur H., Kumar .P, Ray P., Kaur J., Chakraborti A. Biofilm formation in clinical isolates of group B streptococci from north India. *Microb. Pathog.* 2009, 46, 321-7.

Khan M.A., Faiz A., Ashshi A.M. Maternal colonization of group B *Streptococcus*: prevalence, associated factors and antimicrobial resistance. *Ann. Saudi Med.* 2015, 35, 423–7.

Khodaei F., Najafi M., Hasani A., Kalantar E., Sharifi E., Amini A., Aghazadeh M. Pilus-encoding islets in *S. agalactiae* and its association with antibacterial resistance and serotype distribution. *Microb. Pathog.* 2018, 116, 189-194.

Khosa S., Lagedroste M., Smits S.H. Protein defense systems against the lantibiotic nisin: function of the immunity protein NisI and the resistance protein NSR. *Front. Microbiol.* 2016, 7:504.10.3389/fmicb.2016.00504.

Kimura K., Suzuki S., Wachino J.I., Kurokawa H., Yamane .K, Shibata N., Nagano N., Kato H., Shibayama K., Arakawa Y. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52, 2890-7.

Kimura K., Matsubara K., Yamamoto G., Shibayama K., Arakawa Y. Active screening of group B Streptococci with reduced penicillin susceptibility and altered serotype distribution isolated from pregnant women in Kobe, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013, 66, 158-60.

Koenig J.M., Keenan W.J. Group B Streptococcus and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr. Clin. North. Am.* 2009, 56, 689-700.

Köhler M., Köhler W. Zentralblatt für Bakteriologie – 100 years ago: Streptococcal mastitis of cows – long-lasting dilemmas in diagnosis and nomenclature. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004, 294, 1-6.

Kong F., Ma L., Gilbert G.L. Simultaneous detection and serotype identification of *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization. *J. Med. Microbiol.* 2005, 54, 1133-8.

Konto-Ghiorghi Y., Mairey E., Mallet A., Dumenil G., Caliot E., Trieu-Cuot P., Dramsi S. Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog.* 2009, 5:e1000422. 10.1371/journal.ppat.1000422.

Kotarski J., Heczko P.B., Lauterbach R., Niemiec T., Leszczyńska-Gorzela B. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące wykrywania nosicielstwa paciorkowców grupy B (GBS) u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom u noworodków. *Ginekol. Pol.* 2008, 79, 221-3.

Kowalska B., Niemiec K., Drejewicz H. Częstość występowania kolonizacji paciorkowcami β hemolizującymi grupy B kobiet ciężarnych i noworodków – określona na podstawie badań przeprowadzonych u pacjentek Polikliniki i Kliniki Położnictwa i Ginekologii Instytutu Matki i Dziecka – badania pilotażowe. *Gin. Pol.* 2003, 74, 10.

Lachenauer C.S., Kasper D.L., Shimada J., Ichiman Y., Ohtsuka H., Kaku M., Paoletti L.C., Ferrieri P., Madoff L.C. Serotypes VI and VIII predominate among Group B Streptococci isolated from Japanese women. *J. Infect. Diseases* 1999; 179, 1030-3.

Lamagni T. L., Keshishian C., Efstratiou A., Guy R., Henderson K. L., Broughton K., Sheridan E. Emerging trends in the epidemiology of invasive group B streptococcal disease in England and Wales, 1991-2010. *Clin. Infect. Dis.* 2013, 57, 682–688.

Lancefield R.C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 1933, 57, 571–95.

Lancefield R.C., Hare R. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. *J. Exp. Med.* 1935; 61, 335-49.

Landwehr-Kenzel S., Henneke P. Interaction of *Streptococcus agalactiae* and cellular innate immunity in colonization and disease. *Front. Immunol.* 2014, 29, 519.

Lauer P., Rinaudo C.D., Soriani M., Margarit I., Maione D., Rosini R., Taddei A.R., Mora M., Rappuoli R., Grandi G., Telford J.L. Genome analysis reveals pili in group B *Streptococcus*. *Science*. 2005, 309.

Lazzarin M., Mu R., Fabbri M., Ghezzi C., Rinaudo C.D., Doran K.S., Margarit I. Contribution of pilus type 2b to invasive disease caused by a *Streptococcus agalactiae* ST-17 strain. *BMC Microbiol.* 2017, 17:148.

Le Doare K., Heath P.T. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine* 2013, 31, 7-12.

Leclair C.M., Hart A.E., Goetsch M.F., Carpentier H., Jensen J.T. Group B streptococcus: prevalence in non-obstetric population. *J. Low Genit. Tract Dis.* 2010, 14, 162-6.

Lembo A., Gurney M.A., Burnside K., Banerjee A., de los Reyes M., Connelly J.E., Lin W.J., Jewell K.A., Vo A., Renken C.W., Doran K.S., Rajagopal L. Regulation of CovR expression in group B *Streptococcus* impacts blood-brain barrier penetration. *Mol. Microbiol.* 2010, 77, 431-43.

Lin S.M., Zhi Y., Ahn K.B., Lim S., Seo H.S. Status of group B streptococcal vaccine development. *Clin Exp Vaccine Res.* 2018, 7, 76–81.

Lu B., Wang D., Zhou H., Zhu F., Li D., Zhang S., Shi Y., Cui Y., Huang .L, Wu H. Distribution of pilus islan and alpha-like protein genes of group B Streptococcus colonized in pregnant women in Beijing, China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015, 34, 1173-9.

Łysakowska M., Bigos M., Wasiela M. Budowa, regulacja i znaczenie czynników wirulencji szczepów *Streptococcus agalactiae*. *Post. Mikrobiol.* 2013, 52, 41-52.

Madrid L., Seale A.C., Kohli-Lynch M., Edmond K.M., Lawn J.E., Heath P.T., Madhi S.A., Baker C.J., Bartlett L., Cutland C., Gravett M.G., Ip M., Le Doare K., Rubens C.E., Saha S.K., Sobanjo-Ter Meulen A., Vekemans J., Schrag S., Infant GBS Disease Investigator Group. Infant group B streptococcal disease incidence and serotypes worldwide: systemic review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.* 2017, 65, 160-72.

Maisey H.C., Hensler M., Nizet V., Doran K.S. Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J. Bacteriol.* 2007, 189, 1464–7.

Manning S.D., Springman A.C., Million A.D., Milton N.R., McNamara S.E., Somsel P.A., Bartlett P., Davies H.D. Association of group B Streptococcus colonization and bovine exposure: a prospective cross-sectional cohort study. *PLoS ONE* 2010, 5(1): e8795, doi:10.1371/journal.pone.0008795.

Margarit I., Rinaudo C.D., Galeotti C.L., Maione D., Ghezzi C., Buttazzoni E., Rosini R., Runci Y., Mora M., Buccato S., Pagani M., Tresoldi E., Berardi A., Creti R., Baker C.J., Telford J.L., Grandi G. Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the group B Streptococcus paradigm. *J. Infect. Dis.* 2009, 199, 108-15.

Marques M.B., Kasper D.L., Pangburn M.K., Wessels M.R. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect. Immun.* 1992, 60, 3986-93.

Martins E.R., Andreu A., Melo-Cristino J., Ramirez M. Distribution of pilus islands in *Streptococcus agalactiae* that cause human infections: insights into evolution and implication for vaccine development. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013, 20, 313-6.

Mascher T., Helmann J.D., Uden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006, 70, 910–38.

Matani C., Trezzi M., Matteini A., Messeri D., Catalani C. *Streptococcus agalactiae*: prevalence of antimicrobial resistance in vaginal and rectal swabs in Italian pregnant women. *Infez. Med.* 2016, 24, 217-21.

Matsubara K., Katayama K., Baba K., Nigami H., Harigaya H., Sugiyama M. Seroepidemiologic studies of serotype VIII group B *Streptococcus* in Japan. *J. Infect. Dis.* 2002, 186, 855-8.

Melchior M.B., Vaarkamp H., Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet. J.* 2006, 171, 398–407.

Melin P. Neonatal group streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011, 17, 1294-1303.

Mikołajczyk D.(obecnie Kamińska), Budzyńska A., Kaczmarek A., Gospodarek E. Częstość występowania i lekooporność paciorkowców beta-hemolizujących izolowanych z materiału klinicznego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2007, 4, 301-6.

Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001, 55, 165-99.

Moczko J.A., Bręborowicz G.H., Tadeusiewicz R. *Statystyka w badaniach medycznych.* Warszawa 1998.

Motlova J., Strakova L., Urbaskova P. Sak P., Sever T. Vaginal & rectal carriage of *Streptococcus agalactiae* in the Czech Republic: incidence, serotypes distribution & susceptibility to antibiotics. *Indian J. Med. Res.* 2004, 119, 84-7.

Nowak A., Tyski S. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne ziarenkowców Gram-dodatnich i ich rola w tworzeniu biofilmu. *Post. Mikrobiol.* 2012, 51, 265-76.

Nuriel-Ohayon M., Neuman H., Koren O. Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 1031.

Ortiz L., Ruiz F., Pascual L., Barberis L. Effect of two probiotic strains of *Lactobacillus* on in vitro adherence of *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, and *Staphylococcus aureus* to vaginal epithelial cells. *Curr. Microbiol.* 2014, 68, 679–84.

Papasergi S., Brega S., Mistou M-Y., Firon A., Oxaran V., Dover R., Teti G., Shai Y., Trieu-Cuot P., Dramsi S. The GBS PI-2a pilus is required for virulence in mice neonates. *PLoS One.* 2011, 6(4).

Parker R.E., Laut C., Gaddy J.A., Zadoks R.N., Davies H.D., Manning S.D. Association between genotypic diversity and biofilm production in group B *Streptococcus*. *BMC Microbiol.* 2016, 16: 86.10.1186/s12866-016-0704-9.

Patras K.A., Wang N-Y., Fletcher E.M., Cavaco C.K., Jimenez A., Garg M., Fierer J., Sheen T.R., Rajagopal L., Doran K.S. Group B *Streptococcus* CovR regulation modulates host immune signaling pathways to promote vaginal colonization. *Cell Microbiol.* 2013, 15, 1154-67.

Patras K.A., Nizet V. Group B Streptococcal Maternal Colonization and Neonatal Disease: Molecular Mechanisms and Preventative Approaches. *Front. Pediatr.* 2018, 6, 27.

Persson E., Berg S., Trollfors B., Larsson P., Ek E., Backhaus E., Claesson B.E., Jonsson L., Rådberg G., Ripa T., Johansson S. Serotypes and clinical manifestations of invasive group B streptococcal infections in western Sweden 1998-2001. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007, 10, 791-6.

Persson E., Berg S., Bevanger L., Bergh K., Valsö-Lyng R., Trollfors B. Characterization of invasive group B streptococci based on investigation of surface proteins and genes encoding surface proteins. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008a; 14, 66-73.

Persson E., Berg S., Bergseng H., Bergh K., Valsö-Lyng R., Trollfors B. Antimicrobial susceptibility of invasive group B streptococcal isolates from south-west Sweden 1988–2001. *Scand. J. Infect. Dis.* 2008b, 40, 308–13.

Petrova M.I., Lievens E., Malik S., Imholz N., Lebeer S. *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Front. Physiol.* 2015, 6:81.

Pezzicoli A., Santi I., Lauer P., Rosini R., Rinaudo D., Grandi G., Telford J.L., Soriani M. Pilus backbone contributes to group B *Streptococcus* paracellular translocation through epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 2008, 198, 890–8.

Phares C.R., Lynfield R., Farley M.M., Mohle-Boetani J., Harrison L.H., Petit S., Craig A.S., Schaner W., Schrag S.J. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005. *JAMA.* 2008, 299, 2056–65.

Poyart C., Tazi A., Reglier-Poupet H., Billoet A., Tavares N., Raymond J. Multiplex PCR Assay for Rapid and Accurate Capsular Typing of Group B Streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 1985-8.

Rajagopal L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiol.* 2009, 4, 201-21.

Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.S., McCulle S.L., Karlebach S., Gorle R., Russell J., Tacket C.O., Brotman R.M., Davis C.C., Ault K., Peralta L., Forney L.J. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2011, 108, 4680–7.

Rekomendacje CDC. Prevention of perinatal group B streptococcal disease – Revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR* 2010, 59: RR-10.

Rick A.M., Aguilar A., Cortes R., Gordillo R., Melgar M., Samayoa-Reyes G., Frank D.N., Asturias E.J. Group B streptococci colonization in pregnant Guatemalan women: prevalence, risk factors, and vaginal microbiome. *Open Forum Infect. Dis.* 2017, 4(1):ofx020.10.1093/ofid/ofx020.

Rinaudo C.D., Rosini R., Galeotti C.L., Berti F., Necchi F., Reguzzi V., Ghezzi C., Telford J.L., Grandi G., Maione D. Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B streptococcus. *PLoS One* 2010, 5:e19216.

Ronnqvist P.D., Forsgren-Brusk U.B., Grahn-Hakansson E.E. Lactobacilli in the female genital tract in relation to other genital microbes and vaginal pH. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2006, 85, 726–35.

Rosini R., Rinaudo C.D., Soriani M., Lauer P., Mora M., Maione D., Taddei A., Santi I., Ghezzi C., Brettoni C., Buccato S., Margarit I., Grandi G., Telford J.L. Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. *Mol. Microbiol.* 2006, 61, 126-41.

Rosini R., Margarit I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2015, 5, 6.10.3389/fcimb.2015.00006.

Russell N.J., Seale A.C., O'Sullivan C., Le Doare K., Heath P.T., Lawn J.E., Bartlett L., Cutland C., Gravett M., Ip M., Madhi S.A., Rubens C.E., Saha S.K., Schrag S., Sobanjo-Ter Meulen A., Vekemans J., Baker C.J. Risk of Early-Onset Neonatal Group B Streptococcal Disease With Maternal Colonization Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.* 2017, 6, 152-159.

Sadowy E., Matynia B., Hryniewicz W. Population structure, virulence factors and resistance determinants of invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* in Poland. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010, 65, 1907-14.

Salloum M., van der Mee-Marquet N., Valentin-Domelier A.S., Quentin R. Diversity of prophage DNA regions of *Streptococcus agalactiae* clonal lineages from adults and neonates with invasive infectious disease. PLoS One. 2011, 6(5): e20256.

Santi I., Scarselli M., Mariani M., Pezzicoli A., Massignani V., Taddei A., Grandi G., Telford J.L., Soriani M. BibA: a novel immunogenic bacterial adhesion contributing to group B Streptococcus survival in human blood. Mol. Microbiol. 2007, 63, 754-67.

Savoia D., Gottimer C., Crocilla C., Zucca M. *Streptococcus agalactiae* in pregnant women: Phenotypic and genotypic characteristic. J. Infec. 2008, 56, 120-5.

Schoening T.E., Wagner J., Arvand M. Prevalence of erythromycin and clindamycin resistance among *Streptococcus agalactiae* isolates in Germany. Clin. Microbiol. Infect. 2005, 11, 579-82.

Schubert A., Zakikhany K., Schreiner M., Frank R., Spellerberg B., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J. A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. Mol. Microbiol. 2002, 46, 557–69.

Schuchat A., Wenger J.D. Epidemiology of group B streptococcal disease: risk factors, prevention strategies, and vaccine development. Epidemiol. Rev. 1994, 16, 374-402.

Seo H.S., Minasov G., Seepersaud R., Doran K.S., Dubrovskaya I., Shuvalova L., Anderson W.F., Iverson T.M., Sullam P.M. Characterization of fibrinogen binding by glycoproteins Srr1 and Srr2 of *Streptococcus agalactiae*. J. Biol. Chem. 2013, 288, 35982-96.

Shabayek S., Abdalla S., Abouzeid A.M. Serotype and surface protein gene distribution of colonizing group B streptococcus in women in Egypt. Epidemiol. Infect. 2014, 142, 208–210.

Shabayek S., Bauer R., Mauerer S., Mizaikoff B., Spellerberg B. A streptococcal NRAMP homologue is crucial for the survival of *Streptococcus agalactiae* under low pH conditions. Mol. Microbiol. 2016, 100, 589–606.

Shabayek S., Spellerberg B. Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. *Front. Microbiol.* 2018, 14, 9:437.

Sheen T.R., Jimenez A., Wang N.Y., Banerjee A., van Sorge N.M., Doran K.S. Serine-Rich Repeat Proteins and Pili Promote *Streptococcus agalactiae* Colonization of the Vaginal Tract. *J. Bacteriol.* 2011, 193, 6834–42.

Skoff T.H., Farley M.M., Petit S., Craig A.S., Schaffner W., Gershman K., Harrison L.H., Lynfield R., Schrag S.J. Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *CID*, 2009, 49, 85-92.

Slotved H.C., Kong F., Lambertsen .L, Sauer S., Gilbert G.L. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 2929-36.

Soriani M., Santi I., Taddei A., Rappuoli R., Grandi G., Telford J.L. Group B Streptococcus crosses human epithelial cells by a paracellular route. *J. Infect. Dis.* 2006, 193, 241-50.

Spellerberg B., Rozdzinski E., Martin S., Weber-Heynemann J., Schnitzler N., Lütticken R., Podbielski A. Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesion family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect. Immun.* 1999, 67, 871-8.

Springman A.C., Lacher D.W., Waymire E.A., Wengert S.L., Singh P., Zadoks R.N., Davies H.D., Manning S.D. Pilus distribution among lineages of group B Streptococcus: an evolutionary and clinical perspective. *BMC Microbiol.* 2014, 19, 14:159.

Stalhammar-Carlemalm M., Stenberg L., Lindahl G. Protein rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *J. Exp. Med.* 1993, 177, 1593-603.

Stanisz A. Przystępny kurs statystyki w oparciu o program Statistica PL na przykładach z medycyny. Tom I. Statystyki podstawowe. Kraków 2001.

Stapleton R.D., Kahn J.M., Evans L.E., Critchlow C.W., Gardella C.M. Risk factors for group B streptococcal genitourinary tract colonization in pregnant women. *Obstet. Gynecol.* 2005, 106, 1246-52.

Stevens D.L., Kaplan E.L. Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis. Oxford University Press 2000, 1-15.

Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 2000, 69, 183-215.

Szewczyk E.M. (red.). Diagnostyka bakteriologiczna. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013.

Szwabowicz K., Panasiuk A. Nosicielstwo paciorkowca grupy B u kobiet ciężarnych – standardy postępowania. *Przegl. Epidemiol.* 2012, 66, 33-38.

Teatero S., Athey T.B., Van Caesele P., Horsman G., Alexander D.C., Melano R.G., Li A., Flores A.R., Shelburne S.A., McGeer A., Demczuk W., Martin I., Fittipaldi N. Emergence of serotype IV group B *Streptococcus* adult invasive disease in Manitoba and Saskatchewan, Canada, is driven by clonal sequence type 459 strains. *J. Clin. Microbiol.* 2015, 53, 2919–26.

Tenenbaum T., Spellerberg B., Adam R., Vogel M., Kim K.S., Schroten H. *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. *Microbes. Infect.* 2007, 9, 714-20.

Uh Y., Kim H.Y., Jang I.H., Hwang G.Y., Yoon K.J. Correlation of serotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus agalactiae*. *Yonsei Med. J.* 2005, 46, 480-3.

Verani J., Mc Gee L., Schrag S.J. Prevention of perinatal Group B Streptococcal disease revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm. Rep.* 2010, 19, 59(RR-10), 1-36.

Wang N.Y., Patras K.A., Seo H.S. Cavaco C.K., Rösler B., Neely M.N., Sullam P.M., Doran K.S. Group B Streptococcal Serine-rich Repeat Proteins Promote Interaction with Fibrinogen and Vaginal Colonization. *J. Infect. Dis.* 2014, 210(6), 982-91.

Wang P., Tong J., Ma X., Song F.L., Fan L., Guo C.M., Shi W., Yu S.J., Yao K.H., Yang Y.H. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multilocus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* isolates circulating in Beijing, China. *PLoS One.* 2015a, 10, 3, e0120035.

Wang P., Ma Z., Tong J., Zhao R., Shi W., Yu S., Yao K., Zheng Y., Yang Y. Serotype distribution, antimicrobial resistance, and molecular characterization of invasive group B Streptococcus isolates recovered from Chinese neonates. *Int. J. Infect. Dis.* 2015b, 37, 115-8.

Weisner A.M., Johnson A.P., Lamagni T.L., Arnold E., Warner M., Heath P.T., Efstratiou A. Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 38, 1203-8.

Wolny K., Gołda – Matuszak E. *Streptococcus agalactiae* (GBS) – charakterystyka szczepów izolowanych z dróg rodnych kobiet w okresie rozrodczym. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2010, 62, 141-51.

Wu P., Feldman A.S., Rosas-Salazar C., James K., Escobar G., Gebretsadik T., Li S.X., Carroll K.N., Walsh E., Mitchel E., Das S., Kumar R., Yu C., Dupont W.D., Hartert T.V. Relative importance and additive effects of maternal and infant risk factors on childhood asthma. *PLoS One* 2016 11(3):e0151705.10.1371/journal.pone.0151705.

Zaleznik D.F., Rench M.A., Hillier S., Krohn M.A., Platt R., Lee T., Flores A.E., Ferrieri P., Baker C.J. Invasive disease due to group B streptococcus in pregnant women and neonates from diverse population groups. *Clin. Infect. Dis.* 1999, 30, 276-81.

Zarate G., Nader-Macias M.E. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 2006, 43, 174–80.

Żabicka D., Hryniewicz W. Zakażenia inwazyjne wywołane przez *Streptococcus agalactiae*. Med. Zak. 2008, 15, 526-30.

Żabicka D., Izdebski R., Hryniewicz W. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. Oznaczanie wrażliwości ziarenkowców Gram-dodatnich z rodzaju *Streptococcus* spp. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów, Narodowy Instytut Leków, Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej www.korld.edu.pl

[www.http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

[www.https://cran.r-project.org/](https://cran.r-project.org/)

www.korld.edu.pl