

Monika Brzychczy-Włoch<sup>1</sup>, Tomasz Gosiewski<sup>1</sup>, Dorota Pawlik<sup>2</sup>, Anna Szumala-Kąkol<sup>3</sup>, Alfred Samed<sup>4</sup>,  
Piotr B. Heczko<sup>1</sup>

## WYSTĘPOWANIE HIPERWIRULENTNEGO KLONU ST-17 *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* U KOBIET CIĘŻARNYCH ORAZ NOWORODKÓW

### OCCURRENCE OF THE HYPERVIRULENT ST-17 CLONE OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* IN PREGNANT WOMEN AND NEWBORNS

<sup>1</sup> Zakład Bakteriologii, Epidemiologii Drobnoustrojów i Parazytologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, Kraków, Polska

<sup>2</sup> Katedra Ginekologii i Położnictwa, Klinika Neonatologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, Kraków, Polska

<sup>3</sup> Pracownia Mikrobiologiczna, Centralnego Laboratorium Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego, Poznań, Polska

<sup>4</sup> Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego, Gdańsk, Polska

#### STRESZCZENIE

**CEL.** Hiperwirulentny klon ST-17 *S. agalactiae* (ang. *Group B Streptococcus*, GBS) o ogólnoświatowym zasięgu występowania, zidentyfikowany dzięki metodzie MLST (ang. *multilocus sequence typing*), uznawany jest obecnie za najważniejszy typ sekwencyjny, odpowiedzialny za wywoływanie inwazyjnych zakażeń u noworodków. Celem pracy było określenie częstości występowania klonu ST-17 w grupie kobiet ciężarnych oraz u noworodków za pomocą metody PCR w odniesieniu do referencyjnej metody MLST.

**METODY.** Badaniami objęto 169 szczepów GBS wyizolowanych od ciężarnych będących nosicielkami paciorkowców grupy B oraz 42 szczepy pochodzące od noworodków zdrowych, skolonizowanych *S. agalactiae*, jak i z rozpoznanym klinicznie zakażeniem GBS. Badane izolaty pochodziły z kolekcji własnej Katedry Mikrobiologii UJ CM. Zostały zgromadzone w latach 2006-2010 w ramach realizowanych projektów badawczych. Oznaczenie typu sekwencyjnego ST-17 przeprowadzono za pomocą metody PCR z odpowiednio dobranymi starterami ST17S i ST17AS specyficznymi dla fragmentu *gbs2018* stanowiącego wariant genu determinującego klon ST-17. Wyniki dodatnie potwierdzono metodą MLST, poprzez sekwencjonowanie siedmiu genów housekeeping. Analiza pokrewieństwa genetycznego izolatów o typie sekwencyjnym ST-17 została wykonana metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE).

**WYNIKI.** W grupie kobiet ciężarnych będących bezobjawowymi nosicielkami *S. agalactiae* stwierdzono występowanie klonu ST-17 u 2,4% pacjentek. W grupie noworodków klon ST-17 został oznaczony jedynie u dzieci z objawami klinicznymi zakażenia stanowiąc 18,2%. Natomiast nie występował u zdrowych noworodków skolonizowanych GBS. Wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy występowaniem klonu ST-17, a noworodkami z rozpoznanym klinicznie zakażeniem GBS, w porównaniu do grupy noworodków zdrowych skolonizowanych *S. agalactiae* (poziom istotności  $p=0,0398$ ) oraz do grupy kobiet ciężarnych będących nosicielkami paciorkowców grupy B ( $p<0,00001$ ). Zastosowanie metody PFGE umożliwiło zróżnicowanie szczepów reprezentujących klon ST-17 i pozwoliło wyodrębnić dwa różne typy PFGE (przy założeniu podobieństwa rzędu 60%).

**WNIOSKI.** Uzyskane wyniki potwierdzają występowanie wysoce zjadliwego klonu ST-17 w Polsce i wskazują na konieczność regularnego monitorowania kobiet ciężarnych i noworodków w tym kierunku.

**SŁOWA KLUCZOWE:** hiperwirulentny klon ST-17, paciorkowce grupy B, kobiety ciężarne, noworodki, MLST

#### ABSTRACT

**OBJECTIVES.** The ST-17 clone of *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus, GBS) identified by Multi Locus Sequence Typing (MLST) is recognized as a hypervirulent international clone mainly associated with

invasive neonatal infections. There is no data on the occurrence of the ST-17 clone of GBS in pregnant women and newborns in Poland.

**METHODS.** 169 strains of GBS, isolated from pregnant women's carriage, and 42 from newborns with invasive infection or asymptomatic carriage, which were derived from the collection of the Chair of Microbiology Jagiellonian University Medical College, collected between 2006-2010, were genetically characterized. The PCR with specific primers ST17S and ST17AS was adopted to characterize the *gbs2018* gene variant specific to ST-17 clone. All positive results in direction of ST-17 were confirmed by MLST. The genetic relatedness of the ST-17 clone was determined by PFGE.

**RESULTS.** The hypervirulent ST-17 clone was detected in 2.4% of women with GBS asymptomatic carriage, whereas it was detected in 18.2% newborns with invasive infection. No ST-17 was isolated from healthy neonates. Statistically significant correlation between the presence of ST-17 and neonatal GBS infection was showed, in comparison to healthy neonates colonized by GBS ( $p=0.0398$ ) and to GBS-positive pregnant women ( $p<0.00001$ ). The ST-17 strains belonged to 2 clearly distinguishable PFGE type, but were closely related to one another at a level of 60% similarity.

**CONCLUSIONS.** The results emphasize the necessity of a regular study of the ST-17 GBS clone occurrence among pregnant women and newborns in Poland.

**KEY WORDS:** *hypervirulent ST-17 clone, group B streptococcus, pregnant women, newborns, MLST*

## WSTĘP

*Streptococcus agalactiae* (ang. *Grup B Streptococcus* - GBS), pomimo wprowadzenia w USA i wielu krajach europejskich odpowiedniej profilaktyki, nadal jest główną przyczyną zakażeń i śmierci noworodków w krajach rozwiniętych (1, 2, 3). U noworodków paciorkowce grupy B odpowiadają głównie za tzw. zakażenia wczesne (ang. *Early Onset Diseases* - EOD), które rozwijają się w pierwszych siedmiu dobach życia dziecka oraz zakażenia o późnym początku (ang. *Late Onset Diseases* - LOD), występujące pomiędzy 7 a 90 dniem życia. Zakażenia noworodków o etiologii GBS przebiegają najczęściej pod postacią zakażenia krwi (sepsy) i zapalenia płuc (80% przypadków) oraz zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (10%), prowadząc niekiedy do śmierci dziecka (4%) (4). Najważniejszym czynnikiem predysponującym noworodki do nabycia zakażenia jest obecność GBS w maczynych drogach rodnych lub w przewodzie pokarmowym, skąd dochodzi do transmisji bakterii na dziecko. Nosicielstwo *S. agalactiae* u ciężarnych sięga 30-40%, zaś procent skolonizowanych noworodków matek GBS-dodatnich szacuje się na 50%-70%, przy czym częstość zakażeń wynosi 1-2% (1, 2, 3).

W obrębie gatunku *S. agalactiae* dotychczas opisanych zostało dziesięć serotypów (Ia, Ib, II – IX) wyróżnionych na podstawie różnic w budowie polisacharydów powierzchniowych (ang. *capsular polysaccharide* – CPS) (5, 6). W Europie i w USA dominują serotypy Ia, III i V (7, 8, 9, 10), w Polsce reprezentują one około 80% wszystkich serotypów (11). Wśród nich, serotyp III uważany jest za szczególnie istotny z klinicznego punktu widzenia, gdyż odpowiada on za znaczną część

EOD i większość LOD (9). Dzięki zastosowaniu metod molekularnych służących do typowania szczepów bakteryjnych, takich jak PFGE (ang. *pulsed-field gel electrophoresis*) czy MLST (ang. *multilocus sequence typing*), wykazano dużą zmienność genetyczną w obrębie serotypu III (7, 8, 12). Na podstawie genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp, stanowiące istotny czynnik wirulencji GBS, możliwe jest zróżnicowanie szczepów pod względem ich patogenności (7, 13, 14), przy czym za najbardziej patogenne uważane są izolaty serotypu III posiadające gen *rib* kodujący silnie immunogenne białko powierzchniowe Rib (15, 16).

Obecnie, na podstawie analizy wyników genotypowania przeprowadzonego metodą MLST, opisanych zostało pięć głównych kompleksów klonalnych (ang. *Clonal Complexes* - CCs) CC1, CC10, CC23, CC19 oraz CC17, obrazujących duże zróżnicowanie wśród szczepów GBS pochodzenia ludzkiego (17, 18). W ostatnich latach za najbardziej patogenne dla noworodków uznawany jest hiperwirulentny klon ST-17 o ogólnoświatowym zasięgu, zaliczany do kompleksu CC17. Typ sekwencyjny ST-17 reprezentowany jest przez szczepy serotypu III, które na swojej powierzchni mają białko Rib. Wykazano, że typ ST-17 najczęściej wywołuje u noworodków LOD, przebiegające pod postacią zapalenia opon mózgowo – rdzeniowych, charakteryzujących się dużą śmiertelnością (70%) oraz rzadziej sepsy (4, 8, 17, 18).

Poznanie częstości występowania wysoce zjadliwego klonu ST-17 w różnych populacjach i szerokościach geograficznych ma szczególne znaczenie w badaniach epidemiologicznych, a także w rozwoju prac nad skonstruowaniem szczepionki przeciwko zakażeniom GBS, nad którą obecnie trwają intensywne badania

(19). W piśmiennictwie światowym, znajdujemy wiele doniesień na temat częstości występowania klonu ST-17 w różnych populacjach (5, 7, 18). Niestety, brak jest polskich danych opisujących skalę tego zjawiska. Dlatego też, celem głównym pracy było określenie częstości występowania klonu ST-17 w grupie kobiet ciężarnych będących nosicielkami paciorkowców grupy B oraz u noworodków zdrowych skolonizowanych GBS i z zakażeniem o etiologii *S. agalactiae*, przeprowadzone za pomocą metody PCR w odniesieniu do referencyjnej metody MLST.

## MATERIAŁ I METODY

Badaniami w kierunku hiperwirulentnego klonu ST-17 objęto 169 szczepów GBS wyizolowanych z wymazów z pochwy lub odbytu od ciężarnych (Grupa I), 22 szczepy izolowane z krwi od noworodków z zakażeniem, w tym 20 przypadków sepsy i dwa przypadki zapalenia płuc (Grupa II) oraz 20 szczepów izolowanych z wymazów z ucha zewnętrznego lub jamy ustnej od zdrowych noworodków (Grupa III). Badane izolaty GBS pochodziły z kolekcji własnej Katedry Mikrobiologii UJ CM. Zostały zgromadzone w latach 2006-2010 w ramach dwóch projektów badawczych o numerach 3PO5E08425 (zgoda Komisji Bioetycznej UJ CM KBET/267/B/2002) oraz NN401042337 (zgoda Komisji Bioetycznej UJ CM KBET/143/B/2007). Wymazy z pochwy i odbytu, diagnozowane były w kierunku GBS za pomocą metody hodowli prowadzonej według rekomendacji CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) (2) oraz Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego (20). Próbkę krwi żyłnej pobierana była od noworodków do podłoża Peds Plus Bactec 9120 media (Becton Dickinson), a następnie diagnozowana z wykorzystaniem standardowych metod hodowli i identyfikacji. Wymazy od noworodków pobierane były na podłoże transportowe typu Amies transport medium (Eurotubo), a następnie poddawane rutynowej diagnostyce w kierunku *S. agalactiae*.

Genomowe DNA szczepów bakteryjnych izolowano przy użyciu kolumnkowego zestawu Genomic DNA Mini Kit zgodnie z zaleceniami producenta (DNA Gdańsk).

Określenie serotypu Ia, Ib, II-V przeprowadzono przy zastosowaniu metody multipleks PCR zgodnie z procedurą *Poyart* i inni (5). Wyniki uzyskane dla grupy kobiet będących nosicielkami GBS zostały przedstawione we wcześniejszej pracy (11).

Detekcja genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp została przeprowadzona metodą PCR zgodnie z procedurą *Creti* i inni (14) oraz *Gherardi* i inni (7). Wyniki uzyskane dla grupy kobiet będących nosicielkami GBS zostały przedstawione we wcześniejszej pracy (13).

Oznaczenie typu ST-17 przeprowadzono za pomocą metody PCR z odpowiednio dobranymi starterami ST17S i ST17AS (Genomed) specyficznymi dla fragmentu *gbs2018* według procedury opisanej przez *Lamy* i inni (21). Detekcję fragmentu *gbs2018* stanowiącego wariant genu determinującego klon ST-17 określano na podstawie obecności produktu amplifikacji o wielkości 210 pz.

W celu przeprowadzenia metody MLST amplifikacji poddano siedem genów housekeeping dla *S. agalactiae*, których lista została ustalona przez *Jones* i inni (18), natomiast zmodyfikowane startery oraz procedura pochodziły z pracy *Manning* i inni (8) (tab. I).

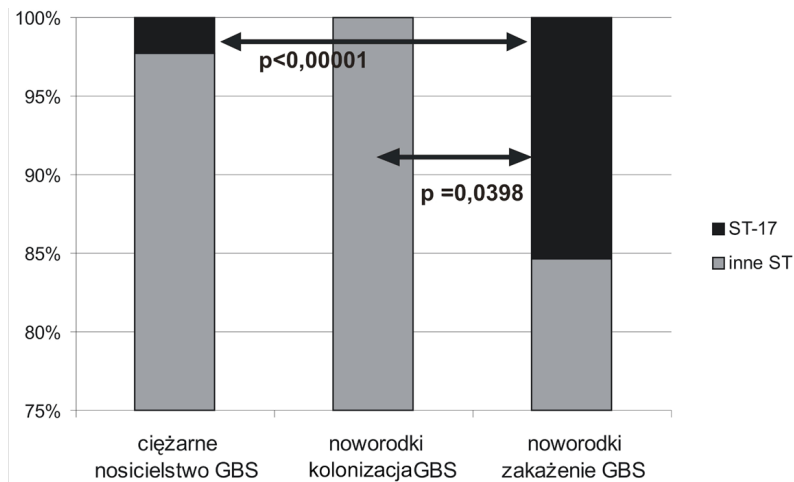
Tabela. I. Sekwencje specyficznych starterów komplementarnych dla siedmiu genów housekeeping *S. agalactiae* wykorzystywane w metodzie MLST według *Jones* i inni (18) oraz *Manning* i inni (8)

Table I. Sequences of specific primers complementary to the seven housekeeping genes of *S. agalactiae* using in MLST method according to *Jones* at al. (18) and *Manning* at al. (8)

Startery	Sekwencje 5' - 3'	Oczekiwane wielkości produktu PCR (pz)
adhP-F110	TGTGCCATACTGATTACACG	584
adhP-R693	ACAACCGCCTGTCTTTTCT	
atr-F8	AGCCAATTATTTCAATACAAGGAC	598
atr-R605	AAACCCATTTTCATGAGTGACAATA	
glcK-F25	GACCTCGGAGGAACGACCATTA	587
glcK-R611	TGTTCTGCGAGTTGACGTGCTACT	
glnA-F170	CTATTGAGGGCTTTGTTGATATCA	610
glnA-R779	AAAGCATTGTCCCTTCATTATCA	
pheS-F10	CAAAAACAATTAGAAGAGTTGAAAA	600
pheS-R609	ACGGAAAACAGGTCCAGGAG	
sdhA-F39	TAGCCAACATAAGGGTAACATAGC	602
sdhA-R640	CTGCAACAGGGTCACAGATAAG	
tkt-F427	AAACCAGGCTTTGATTTAGT	652
tkt-R1078	GTTGGCTTGAAACACGACT	

Produkty PCR poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu w 2% agarozie (Prona) przy 5V/cm (BioRad) w obecności 0,25 µg bromku etydyny (Sigma). Wyniki rozdziału analizowano przy pomocy programu Quantity One (BioRad) oraz aparatu GelDoc2000 (BioRad).

Sekwencjonowanie produktów amplifikacji wykonała firma zewnętrzna (Genomed). Uzyskane sekwencje poddawano analizie ustalając ich sekwencje konsensus przy pomocy programu ChromasPro 1.5 (Digital River). Następnie, na ich podstawie ustalano, który typ sekwencyjny (ang. *Sequence Type*, ST) reprezentują



Ryc 1. Występowanie klonu ST-17 *S. agalactiae* w badanych grupach pacjentów oraz wykazanie statystycznie znamiennej zależności pomiędzy obecnością ST-17 u noworodków z rozpoznaniem zakażeniem GBS w porównaniu do grupy noworodków zdrowych ( $p=0,0398$ ) oraz do grupy kobiet ciężarnych ( $p<0,00001$ )

Fig. 1. The occurrence of the ST-17 clone of *S. agalactiae* in the two groups of patients and demonstrate a statistically significant relationship between the presence of the ST-17 clone in newborns diagnosed with GBS infection compare to healthy newborns ( $p=0.0398$ ) and the group of pregnant women ( $p<0.00001$ )

badane izolaty GBS wykorzystując bazę danych <http://pubmlst.org/sagalactiae>.

Szczepy reprezentujące klon ST-17 ( $n=8$ ) poddano typowaniu molekularnemu przy użyciu metody elektroforezy pulsacyjnej (PFGE) zgodnie z wcześniej opisaną metodyką (12). Jako szczep referencyjny użyto wzorzec *S. agalactiae* serotyp III o numerze 12403 (ATCC). Genomowe DNA było trawione za pomocą enzymu restrykcyjnego *Sma*I (MBI Fermentas). Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono na aparacie CHEF-DR III (Bio-Rad), zaś analiza restrykcyjna wykonana była przy użyciu oprogramowania GelCompar II (Applied Maths) z zastosowaniem metody grupowania UPGMA oraz współczynnika Jaccard. Uzyskane profile genetyczne interpretowano zgodnie z wytycznymi *van Belkum* i inni (22).

Zależność pomiędzy występowaniem klonu ST-17 w badanych grupach analizowano przy użyciu testu  $\chi^2$  (chi kwadrat) oraz testu  $G^2$  (ang. *likelihood ratio*). Wartość poziomu istotności ( $p$ ) uznawano za statystycznie istotną dla wartości  $p<0,05$ .

## WYNIKI

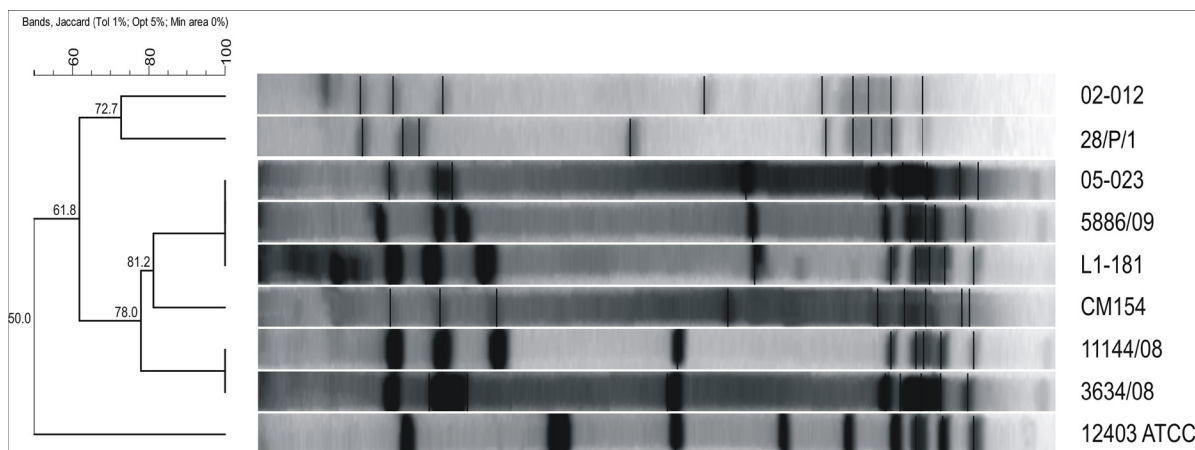
Badanie w kierunku typu sekwencyjnego ST-17 przeprowadzono w trzech etapach. W pierwszym etapie z badanej puli izolatów GBS wybrano wszystkie szczepy należące do serotypu III ( $n=78$ ), w tym 55 szczepów izolowanych od kobiet ciężarnych (Grupa I), 11 od noworodków z rozpoznaniem zakażeniem (Grupa II) oraz 12 od noworodków zdrowych, skolonizowanych GBS (Grupa III). W drugim etapie dla 78 izolatów GBS reprezentujących serotyp III, wykonano oznaczenie w kierunku typu ST-17 przy zastosowaniu metody PCR

z wykorzystaniem odpowiednio dobranych starterów ST17S i ST17AS specyficznych dla fragmentu *gbs2018* stanowiącego wariant genu determinującego klon ST-17. W trzecim etapie dziesięć izolatów GBS, dla których otrzymano dodatkowo wyniki w metodzie PCR, poddano genotypowaniu metodą MLST. Na podstawie uzyskanych wyników sekwencjonowania siedmiu genów housekeeping, potwierdzono przynależności do klonu ST-17 ośmiu z analizowanych izolatów (80%), natomiast w przypadku dwóch pozostałych szczepów, które dały pozytywny wynik w metodzie PCR, przeprowadzona analiza MLST wskazywała na ich przynależność do dwóch innych typów ST, tj. typ ST-286 oraz ST-358.

Oszacowano częstość występowania klonu ST-17 w populacji kobiet ciężarnych i noworodków. Ogółem na 169 kobiet ciężarnych będących nosicielkami *S. agalactiae* stwierdzono 4 przypadki występowania klonu ST-17, co stanowiło 2,4%. W badanej populacji noworodków oznaczono 4 izolaty reprezentujące typ sekwencyjny ST-17, przy czym występował on jedynie u dzieci z objawami klinicznymi zakażenia, stanowiąc w tej grupie 18,2%. Natomiast, wśród izolatów pochodzących od noworodków zdrowych skolonizowanych GBS nie wykazano obecności typu ST-17. Wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy występowaniem klonu ST-17, u noworodków z rozpoznaniem klinicznie zakażeniem GBS, w porównaniu do grupy noworodków zdrowych ( $p=0,0398$ ) oraz do grupy kobiet ciężarnych będących nosicielkami paciorkowców grupy B ( $p<0,00001$ ) (ryc. 1). Częstość występowania ST-17 w grupie noworodków z zakażeniem była ponad siedem razy większa niż w grupie kobiet ciężarnych skolonizowanych GBS.

Tabela II. Charakterystyka izolatów *S. agalactiae* reprezentujących hiperwirulentny klon ST-17  
 Table II. Characterization of *S. agalactiae* isolates representing hypervirulent clone of ST-17

Badana grupa	Numer izolatu GBS	Serotyp	Gen z rodziny Alp	allele							Typ ST	Typ PFGE
				<i>adhP</i>	<i>pheS</i>	<i>atr</i>	<i>glnA</i>	<i>sdh</i>	<i>glcK</i>	<i>tkt</i>		
Kobiety ciężarne -bez-objawowe nosicielstwo GBS	02-012	III	<i>rib</i>	2	1	1	2	1	1	1	ST-17	B
	05-023	III	<i>rib</i>	2	1	1	2	1	1	1	ST-17	A
	28-P-1	III	<i>rib</i>	2	1	1	2	1	1	1	ST-17	B
	CM154	III	<i>rib</i>	2	1	1	2	1	1	1	ST-17	A
Noworodki - zakażenie o etiologii GBS	5886/09	III	<i>rib</i>	2	1	1	2	1	1	1	ST-17	A
	3634/08	III	<i>rib</i>	2	1	1	2	1	1	1	ST-17	A
	11144/08	III	<i>rib</i>	2	1	1	2	1	1	1	ST-17	A
	L1-181	III	<i>rib</i>	2	1	1	2	1	1	1	ST-17	A



Ryc. 2. Analiza profili genetycznych izolatów GBS reprezentujących hiperwirulentny klon ST-17 uzyskanych w metodzie PFGE po trawieniu DNA enzymem restrykcyjnym *Sma*I

Fig. 2. Analysis of the genetic profiles of GBS isolates, representing the hypervirulent ST-17 clone, obtained in the method of PFGE after digestion of DNA with the restriction enzyme *Sma*I

Analiza profili restrykcyjnych wykazała zmienność genetyczną wśród izolatów reprezentujących klon ST-17. Przy założeniu punktu odcięcia na poziomie 60% uzyskano dwa główne typy PFGE, określone jako typ A i B, składające się odpowiednio z sześciu i dwóch izolatów. Natomiast unikatowe profile restrykcyjne wyznaczające subtypy PFGE określono dla podobieństwa rzędu 80%, otrzymując dla ośmiu badanych izolatów GBS pięć różnych subtypów (tab. II, ryc. 2).

## DYSKUSJA

Hiperwirulentny klon ST-17 o ogólnoświatowym zasięgu występowania jest obecnie uznawany za najważniejszy typ ST, zaliczany do kompleksu CC17, odpowiedzialny za wywoływanie inwazyjnych zakażeń u noworodków. Klon ten izolowany jest od noworodków zarówno z EOD, jak i przede wszystkim,

z większości przypadków LOD przebiegających pod postacią zakażenia opon mózgowo-rdzeniowych (>80%). Natomiast stosunkowo rzadko izolowany jest z zakażeń od osób dorosłych (12%). ST-17 jest typowym przykładem homogenego klonu epidemicznego zdolnego do bardzo szybkiego rozprzestrzenienia się w populacji ludzi, a szczególnie w populacji noworodków (4, 17).

Częstości występowania klonu ST-17 w USA jak i wybranych krajach europejskich została już opisana (5, 7, 8, 10, 23), brak jest natomiast polskich danych, obrazujących skalę tego zjawiska. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają występowanie klonu ST-17 w badanych grupach pacjentów, wykazując jego obecność zarówno wśród kobiet ciężarnych będących nosicielkami paciorkowców grupy B (2,4%), jak i u noworodków z rozpoznaniem klinicznie zakażeniem GBS (18,2%).

*Poyart* i inni (5) wykazali, że wysoce zjadliwy klon ST-17 jest ściśle związany z zakażeniami o późnym

początku. Przy czym, klon ten był izolowany od 45% noworodków z sepsą oraz 75% dzieci z zakażeniem opon mózgowo-rdzeniowych o wczesnym początku (EOD) oraz 75% przypadków sepsy i 86% zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych w przypadku zakażeń o późnym początku (LOD). Z kolei, *Strakova* i inni (23) oznaczyli występowanie ST-17 w 32% zakażeń krwi oraz w 85% zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych. Uzyskane przez nasz zespół wyniki potwierdzają opisywane przez innych autorów zależności pomiędzy obecnością klonu ST-17, a wystąpieniem zakażeń u noworodków.

Paciorkowce grupy B cechuje duża zmienność genetyczna. Zastosowanie w naszych badaniach metody PFGE umożliwiło zróżnicowanie szczepów reprezentujących klon ST-17. Przy założeniu podobieństwa na poziomie 60% uzyskano dwa różne typy PFGE utworzone przez szczepy należące do klonu ST-17. Podobne wyniki zostały opisane przez innych autorów (7, 10). *van der Mee-Marquet* i inni (10) wykazali w metodzie PFGE zmienność genetyczną szczepów reprezentujących klon ST-17, otrzymując dla sześciu badanych izolatów trzy różne profile genetyczne. Opisywana zmienność genetyczna paciorkowców grupy B wskazuje na ciągłą adaptację tego patogenu do zmiennych warunków środowiskowych. Dlatego też, należy mieć na uwadze, iż obecnie powszechnie występujący tak, w Europie, jak i w Ameryce klon ST-17 może w przyszłości zostać wyparty przez inny typ ST. Podobna sytuacja została odnotowana w latach 90-tych XX-ego wieku, kiedy to wysoce zjadliwy klon ST-1 najczęściej izolowany z zakażeń został zastąpiony przez klon ST-17 (8). Z tego względu, bardzo istotne są badania mające na celu monitorowanie częstości występowania poszczególnych klonów w różnych krajach i grupach pacjentów, w celu wykazania istniejących tendencji i zmian w czasie.

Ponad to, badania pacjentów GBS-dodatnich w kierunku wysoce zjadliwego klonu ST-17, umożliwiłoby oszacowanie ryzyka infekcji GBS u noworodków. Brak jest na razie wystarczającej liczby danych epidemiologicznych dotyczących częstości zakażeń z udziałem typu ST-17 w odniesieniu do skuteczności stosowanej profilaktyki okołoporodowej. Jednakże w przyszłości może okazać się, że obowiązujące zalecenia dotyczące profilaktyki zakażeń GBS u noworodków, powinny zostać zmodyfikowane dla tej grupy pacjentów. Wyniki szeroko zakrojonych badań nad skutecznością obecnie obowiązującej profilaktyki w odniesieniu do klonu ST-17, powinny pomóc odpowiedzieć na trzy zasadnicze pytania: (1) czy profilaktyka u kobiet ciężarnych skolonizowanych przez klon ST-17 wymaga modyfikacji, (2) czy noworodki bez objawów zakażenia skolonizowane ST-17 powinny otrzymywać profilaktycznie antybiotyki oraz (3) jak długo powinny być monitorowane dzieci ST-17 – dodatnie, z uwagi na możliwość wystąpienia LOD?

## PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. W badaniach potwierdzono występowanie klonu ST-17 w analizowanej populacji, wykazując jego obecność zarówno wśród kobiet ciężarnych będących nosicielkami paciorkowców grupy B (2,4%), jak i u noworodków z rozpoznaniem klinicznie zakażeniem GBS (18,2%).
2. Ponadto, wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy występowaniem klonu ST-17, a noworodkami z zakażeniem, w porównaniu do grupy noworodków zdrowych ( $p=0,0398$ ) oraz do grupy kobiet ciężarnych ( $p<0,00001$ ).
3. Zastosowanie metody PCR z wykorzystaniem odpowiednio dobranych starterów ST17S I ST17AS specyficznych dla fragmentu *gbs2018* daje możliwość szybkiej diagnostyki hiperwirulentnego klonu ST-17. Jednakże z powodu możliwości uzyskania w metodzie PCR fałszywie dodatnich wyników, w celu ostatecznej ich weryfikacji wskazane jest zastosowanie referencyjnej metody MLST.
4. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność regularnego monitorowania częstości występowania klonu ST-17 wśród kobiet ciężarnych i noworodków w Polsce. Skłaniają również do opracowania szczegółowych zaleceń profilaktycznych dla ciężarnych i ich dzieci skolonizowanych przez ten wysoce zjadliwy klon.

Praca została sfinansowana w ramach projektu badawczego własnego numer N N401 042337 z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

## PIŚMIENNICTWO

1. Heath PT, Schuchat A. Perinatal group B streptococcal disease. *Clin Obstet Gynecol* 2007; 21: 411–24.
2. Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, i in. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR* 2002; 15: 1–22.
3. Verani J, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal Group B Streptococcal disease revised guidelines from CDC. *MMWR* 2010; 59, RR-10: 1–32.
4. Melin P. Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1294–303.
5. Poyart C, Tazi A, Réglie-Poupet H, i in. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1985–8.
6. Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, i in. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2929–36.
7. Gherardi G, Imperi M, Baldassarri L, i in. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins

- and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2909–16.
8. Manning SD, Lewis MA, Springman AC, i in. Genotypic diversity and serotype distribution of group B streptococcus isolated from women before and after delivery. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1829–37.
  9. Persson E, Berg S, Trollfors B, i in. Serotypes and clinical manifestations of invasive group B streptococcal infections in western Sweden 1998–2001. *Clin Microbiol Infect* 2007; 10: 791–96.
  10. van der Mee-Marquet N, Fourny L, Arnault L, i in. Molecular characterization of human-colonizing *Streptococcus agalactiae* strains isolated from throat, skin, anal margin, and genital body sites. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2906–11.
  11. Brzychczy-Włoch M, Gosiewski T, Bogdaszewska M, i in. Rozkład serotypów paciorkowców grupy B, izolowanych z przypadków nosicielstwa, oznaczonych metodą multipleks PCR. *Med Dośw Mikrobiol* 2009; 61: 293–99.
  12. Brzychczy-Włoch M, Gosiewski T, Bodaszewska M, i in. Genetic characterization and diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates with macrolide resistance. *J Med Microbiol* 2010; 59: 780–6.
  13. Brzychczy-Włoch M, Gosiewski T, Bodaszewska M, i in. Występowanie genów kodujących białka z rodziny Alp u *Streptococcus agalactiae*. *Med Dośw Mikrobiol* 2011; 63: 5–14.
  14. Creti R, Fabretti F, Orefici G, i in. Multiplex PCR assay for direct identification of group B streptococcal alpha-protein-like protein genes. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1326–9.
  15. Persson E, Berg S, Bevanger L, i in. Characterization of invasive group B streptococci based on investigation of surface proteins and genes encoding surface proteins. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 66–73.
  16. Stalhammar-Carlemalm M, Stenberg L, Lindhal 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.
  17. Tazi A, Bellais S, Tardieux I, i in. Group B Streptococcus surface proteins as major determinants for meningeal tropism. *Curr Opin Microbiol* 2012; 15: 44–9.
  18. Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, i in. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2530–6.
  19. Johri AK, Paoletti AC, Glaseri P, i in. Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 932–42.
  20. Kotarski J, Heczko PB, Lauterbach R, i in. 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.
  21. Lamy MC, Dramsi S, Billoët A, i in. Rapid detection of the “highly virulent” group B Streptococcus ST-17 clone. *Microbes Infect* 2006; 8: 1714–22.
  22. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, i in. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 1–46.
  23. Straková L, Musílek M, Motlová J. Multilocus sequence types in Czech neonatal GBS strains from 2004 to 2008. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2010; 59(1): 45–7.

Otrzymano: 22.05.2012 r.

Zaakceptowano do druku: 10.07.2012 r.

#### Adres do korespondencji:

Dr n. biol. Monika Brzychczy-Włoch

Zakład Bakteriologii, Epidemiologii Drobnoustrojów

i Parazytologii

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

ul. Czysza 18,

31-121 Kraków, Polska

Telefon: +4812 633 25 67; Fax: +4812 423 39 24

e-mail: mbrzych@cm-uj.krakow.pl