

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Душан Љ. Кекић

**Генотипске, фенотипске и редокс  
карактеристике сојева групе Б  
стрептокока изолованих у Србији**

Докторска дисертација

Београд, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Dušan Lj. Kekić

**Genotypic, phenotypic and redox  
characteristics of group B streptococci  
isolated in Serbia**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2021.

Ментор:

**Проф. др Лазар Ранин**, редовни професор, Медицински факултет, Универзитет у Београду

Коментор:

**Проф. др Кристина Гопчевић**, редовни професор, Медицински факултет, Универзитет у Београду

Комисија:

1. **Проф. др Наташа Вучковић Опавски**, редовни професор, Медицински факултет, Универзитет у Београду, научна област: медицинска микробиологија
2. **Ван. проф. др Лидија Израел Живковић**, ванредни професор, Медицински факултет, Универзитет у Београду, научна област: медицинска и клиничка биохемија
3. **Ван. проф. др Александра Шмитран**, ванредни професор, Медицински факултет, Универзитет у Бањој Луци, научна област: медицинска микробиологија

Датум одбране докторске дисертације: \_\_\_\_\_

## *Изјаве захвалности*

Својим драгим и уваженим менторима, проф. др Лазару Ранину и проф. др Кристини Гопчевић, најискреније се захваљујем на драгоцену помоћу, указаном поверењу и саветима приликом израде докторске дисертације, као и на вишегодишњем пријатељству и непрекидној подршци у раду и животу.

Великодушно се захваљујем члановима Комисије, проф. др Наташи Вучковић Опавски проф. др Лидији Израел Живковић и проф. др Александри Шмитран на корисним саветима приликом уобличавања коначног облика ове дисертације и на дугогодишњу помоћу у раду и усавршавању.

Посебну захвалност истичем доц. др Ини Гајић на вишегодишњем пријатељству, свесрдној помоћу и сарадњи од почетка експерименталног рада до финалног уобличења ове дисертације.

Пријатељу, куму и колеги, кл. ас. др Браниславу Ровчанину дугујем велику захвалност на помоћу током експерименталне и аналитичке фазе истраживања, као и на деценијској сарадњи у многобројним истраживачким областима.

Велику захвалност, помоћ и подршку у различитим деловима експерименталне фазе дугујем др Марини Николић, научном сараднику на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, ас. др Горану Вукотићу, научном сараднику Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, као и др Милану Којићу, научном саветнику Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство.

Такође се захваљујем свим колегама микробиолозима који су учествовали у прикупљању и слању бактеријских сојева неопходних за ово истраживање.

За увођење у свет биолошке науке и подршку научном путу, највећу могућу захвалност дугујем својим првим менторима, покојној проф. Љиљани Поповић-Митровић и проф. Љубици Веселиновић, чувеним професорима биологије Гимназије „Свети Сава“.

Свакако највећу и неизмерну захвалност исказујем својој породици и пријатељима, који су ми на све начине помагали у свим животним аспектима.

*Посвећено Владимиру и Наталији*

# ГЕНОТИПСКЕ, ФЕНОТИПСКЕ И РЕДОКС КАРАКТЕРИСТИКЕ СОЈЕВА ГРУПЕ Б СТРЕПТОКОКА ИЗОЛОВАНИХ У СРБИЈИ

## САЖЕТАК

**Увод:** Група Б стрептокока (ГБС) је један од најчешћих узрочника неонаталног морбидитета и морталитета широм света, значајан узрочник инвазивних инфекција пацијента старије животне доби и имунокомпромитованих, али и асимптоматски колонизатор урогениталног и гастроинтестиналног тракта код 10 до 30% здравих људи и трудница.

**Циљ:** Циљ студије је да се испитају фенотипови и генотипови резистенције на антибиотике инвазивних и неинвазивних изолата ГБС, одреде капсуларни типови, утврди повезаност капсуларних типова са фенотиповима и генотиповима резистенције на макролиде и тетрациклин и испита редокс статус изолата ГБС.

**Материјал и методе:** Тест осетљивости на антибиотике је извршен диск-дифузионом методом антибиограма и тестом дифузије антибиотика у градијенту концентрације по EUCAST стандардима. Испитивање генетичке основе резистенције, капсуларна типизација и детекција хипервирулентног клона III/ST17 су обављене PCR методом, а испитивање клоналне повезаности, PFGE профилисањем. Параметри редокс статуса су квантитативно одређени у бактеријским лизатима употребом одговарајућих спектрофотометријских метода.

**Резултати:** Процењена учесталост колонизације трудница је износила 15,6%, а инциденција инвазивних неонаталних инфекција 0,18/1000 живорођене деце. Заступљености резистенције на еритромицин (26,7%), клиндамицин (22,1%) и тетрациклин (85,2%) су имали тренд пораста. Доминантан фенотип резистенције на макролиде је био cMLS (60,8%), посредован *ermB* геном. Већину CPS типова (51,8%) су чинили типови V и III, од којих је тип III био доминантан међу инвазивним сојевима (51,3%), а тип V међу неинвазивним (26,3%). Хипервирулентни клон III/ST17 је био заступљенији међу инвазивним сојевима (35%) са трендом пораста. Резултати редокс статуса указују на већи антиоксидативни капацитет неинвазивних сојева, повећану оксидацију сојева резистентних на макролиде и смањену ензимску заштиту сојева III/ST17.

**Закључак:** Високе стопе резистентних сојева и клона III/ST17 са значајним трендовима пораста указују на неопходност континуираног праћења и спровођења мера за спречавање даљег раста. Редокс параметри нам дају додатан увид у патогенезу различитих клиничких облика сојева ГБС.

**Кључне речи:** група Б стрептокока, *Streptococcus agalactiae*, колонизација трудница, рана неонатална болест, касна неонатална болест, резистенција на макролидне антибиотике, резистенција на тетрациклин, капсуларни типови, редокс статус, биомаркери.

Научна област: Медицина

Ужа научна област: Молекуларна медицина

УДК бр.: \_\_\_\_\_

# GENOTYPIC, PHENOTYPIC AND REDOX CHARACTERISTICS OF GROUP B STREPTOCOCCI ISOLATED IN SERBIA

## ABSTRACT

*Introduction:* Group B streptococcus (GBS) is one of the most common causes of neonatal morbidity and mortality worldwide, a significant cause of invasive infections in elderly and immunocompromised patients, and also an asymptomatic colonizer of the urogenital and gastrointestinal tract in 10 to 30% of healthy people and pregnant women.

*Aim:* The study aims to examine phenotypes and genotypes of antibiotic resistance of invasive and noninvasive GBS isolates, determine capsular types, determine the association of capsular types with phenotypes and genotypes of resistance to macrolides and tetracycline and examine the redox status of GBS isolates.

*Material and methods:* The antibiotic susceptibility testing was performed by the disk diffusion method and antimicrobial gradient method according to EUCAST standards. Determination of resistance genetic basis, capsular typing, and detection of hypervirulent clone III/ST17 were performed by PCR method and clonal association testing by PFGE profiling. Redox status parameters were quantified in bacterial lysates using appropriate spectrophotometric methods.

*Results:* The estimated frequency of colonization of pregnant women was 15.6%, and the incidence of invasive neonatal infections was 0.18/1000 live births. The prevalence of erythromycin resistance (26.7%), clindamycin (22.1%), and tetracycline (85.2%) had an increasing trend. The dominant macrolide resistance phenotype was cMLS (60.8%), mediated by the *ermB* gene. The majority of CPS types (51.8%) were V and III, of which type III was dominant among invasive strains (51.3%) and type V among non-invasive (26.3%). Hypervirulent clone III/ST17 was more prevalent among invasive strains (35%) with an increasing trend. The redox status results indicate the higher antioxidant capacity of noninvasive strains, increased oxidation of macrolide-resistant strains, and decreased enzyme protection of III/ST17 strains.

*Conclusion:* High rates of resistant strains and clone III/ST17 with significant growth trends indicate the need for continuous monitoring and implementation of measures to prevent further growth. Redox parameters give us additional insight into the pathogenesis of different clinical forms of GBS strains.

**Keywords:** group B streptococci, *Streptococcus agalactiae*, colonization of pregnant women, early neonatal disease, late neonatal disease, resistance to macrolide antibiotics, resistance to tetracycline, capsular types, redox status, biomarkers.

Scientific field: Medicine

Specific scientific field: Molecular medicine

UDK No.: \_\_\_\_\_

## САДРЖАЈ

1.	УВОД .....	1
1.1	Историјат .....	2
1.2	Класификација.....	2
1.2.1	Таксономска класификација .....	2
1.2.2	Подела стрептокока на основу типа хемоллизе .....	4
1.2.3	Подела $\beta$ хемолитичних стрептокока према групно специфичном антигену.....	4
1.2.4	Подела стрептокока на основу 16s rRNK секвенцирања .....	4
1.3	Морфолошке, културалне и биохемијске карактеристике ГБС .....	5
1.4	Типизација ГБС.....	8
1.4.1	Капсуларна типизација – CPS .....	8
1.4.2	Детекција површинских протеина .....	9
1.4.3	Pulsed-field gel electrophoresis – PFGE.....	9
1.4.4	Multi-locus sequence typing – MLST.....	10
1.4.5	Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD .....	11
1.4.6	Multi-locus variant-repeat assay – MLVA .....	11
1.5	Фактори вируленције.....	12
1.5.1	Капсула.....	12
1.5.2	Протеини богати серинским поновцима ( <i>Srr</i> ) .....	13
1.5.3	Фибриноген везујући протеини ( <i>Fbs</i> ) .....	14
1.5.4	Ламинин везујући протеин ( <i>Lmb</i> ) .....	14
1.5.5	Стрептококни фибронектин везујући протеин ( <i>SfbA</i> ) .....	14
1.5.6	Плазминоген везујући протеин ( <i>PbsP</i> ) .....	15
1.5.7	Пили .....	15
1.5.8	Имуногени бактеријски адхезин ( <i>BibA</i> ) .....	16
1.5.9	Хипервирулентни ГБС адхезин ( <i>HvgA</i> ) .....	16
1.5.10	Ц5а пептидаза .....	16
1.5.11	Хијалуронидаза ( <i>HylB</i> ) .....	17
1.5.12	Циклични di-AMP и <i>CdnP</i> .....	17
1.5.13	Д-аланилација липотеихоинске киселине.....	18
1.5.14	Метионин.....	18

1.5.15	<i>Хемолитички пигмент</i> .....	18
1.5.16	<i>САМР фактор</i> .....	19
1.5.17	<i>Супероксид дизмутаза</i> .....	20
1.5.18	<i>Биофилм</i> .....	20
1.5.19	<i>Регулација генске експресије фактора вируленције</i> .....	21
1.6	<i>Обољења која изазива ГБС</i> .....	21
1.6.1	<i>Асимптоматска колонизација и инфекције трудница</i> .....	21
1.6.2	<i>Неонаталне болести</i> .....	22
1.6.3	<i>Болести одраслих и нетрудних пацијената</i> .....	23
1.7	<i>Превенција, развој вакцине и терапија</i> .....	23
1.8	<i>Резистенција на антибиотици</i> .....	25
1.8.1	<i>β-лактамски антибиотици</i> .....	25
1.8.2	<i>Макролиди, линкозамиди и стрептограмини (MLS група)</i> .....	27
1.8.3	<i>Тетрациклини</i> .....	29
1.8.4	<i>Флуорохинолони</i> .....	30
1.8.5	<i>Аминогликозиди и гликопептиди</i> .....	31
1.8.6	<i>Хлорамфеникол</i> .....	31
1.9	<i>Оксидативни стрес и редокс односи</i> .....	33
1.9.1	<i>Основе редокс процеса</i> .....	33
1.9.2	<i>Настанак слободних радикала код бактерија</i> .....	33
1.9.3	<i>Оксидативни стрес и ефекти РОС</i> .....	34
1.9.4	<i>Антиоксидативни заштитни механизми</i> .....	35
2.	<i>ЦИЉЕВИ</i> .....	38
3.	<i>МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</i> .....	39
3.1	<i>Бактеријски сојеви и скрининг трудница</i> .....	39
3.2	<i>Идентификација и конзервација сојева</i> .....	40
3.3	<i>Фенотипско испитивање осетљивости на антибиотици</i> .....	40
3.3.1	<i>Диск дифузиони метод антибиограма</i> .....	40
3.3.2	<i>Одређивање минималне инхибиторне концентрације антибиотика</i> .....	41
3.3.3	<i>Одређивање фенотипова резистенције на MLS групу антибиотика</i> .....	41
3.4	<i>Детекција гена резистенције на макролиде и тетрациклин ГБС</i> .....	42
3.4.1	<i>Изолација ДНК</i> .....	43



3.4.2	Квантификација ДНК .....	43
3.4.3	Детекција гена резистенције на макролиде и тетрациклин ГБС.....	43
3.4.4	Електрофореза у агарозном гелу.....	43
3.4.5	Визуализација PCR производа .....	44
3.5	Методe молекуларне типизације .....	45
3.5.1	Капсуларна типизација и детекција хипервирулентног клона .....	45
3.5.2	PFGE .....	47
3.5.3	Визуализација PFGE и обрада профила.....	49
3.6	Одређивање параметара редокс статуса .....	49
3.6.1	Припрема лизата за спектрофотометријска мерења .....	49
3.6.2	Одређивање концентрације протеина.....	49
3.6.3	Одређивање тоталног оксидативног статуса .....	50
3.6.4	Одређивање тоталног антиоксидативног статуса .....	50
3.6.5	Одређивање индекса оксидативног стреса .....	50
3.6.6	Одређивање садржаја завршних производа оксидације протеина.....	51
3.6.7	Одређивање концентрације малондиалдехида.....	51
3.6.8	Одређивање активности супероксид дисмутазе .....	51
3.6.9	Одређивање укупног садржаја тиола.....	52
3.7	Статистичка анализа.....	52
3.8	Етичко одобрење.....	53
4.	РЕЗУЛТАТИ.....	54
4.1	Бактеријски сојеви и скрининг трудница .....	54
4.1.1	Узорци и пацијенти.....	54
4.1.2	Ректовагинална колонизација трудница .....	54
4.1.3	Инвазивне и неинвазивне инфекције изазване ГБС .....	54
4.2	Осетљивост ГБС на антибиотике .....	56
4.2.1	Минималне инхибиторне концентрације пеницилина .....	56
4.2.2	Резистенција ГБС на MLS групу и тетрациклин ГБС и генетичке детерминанте ..	56
4.2.3	Трендови резистенције на макролиде и тетрациклин ГБС .....	58
4.3	Капсуларна типизација и детекција хипервирулентног клона.....	61
4.4	PFGE.....	70
4.5	Биохемијски параметри оксидативног и антиоксидативног статуса .....	73

4.5.1	<i>Анализа биохемијских параметара у функцији инвазивности сојева ГБС.....</i>	73
4.5.2	<i>Анализа биохемијских параметара у функцији изолата ГБС различитих група пацијената.....</i>	74
4.5.3	<i>Анализа биохемијских параметара у функцији старости пацијената.....</i>	76
4.5.4	<i>Анализа биохемијских параметара у функцији резистенције на макролиде и тетрациклин.....</i>	78
4.5.5	<i>Анализа биохемијских параметара у функцији капсуларних типова и хипервирулентног клона ST17.....</i>	79
5.	ДИСКУСИЈА.....	83
6.	ЗАКЉУЧЦИ.....	101
7.	ЛИТЕРАТУРА.....	102

## 1. УВОД

Постојање микроорганизама се претпостављало вековима пре њиховог стварног открића. Прве забележене претпоставке се помињу у учењима Mahavira већ у 6. веку пре нове ере у Индији. У својим учењима, тврдио је да постоје невидљива сићушна бића која живе у земљи, води, ваздуху и ватри. Римљанин Marcus Terentius Varro у својим записима даје упозорења да се не сме лоцирати домаћинство у близини мочвара „јер се ту узгајају одређена ситна бића која се очима не виде, која плутају у ваздуху и улазе у тело кроз уста и нос и тиме изазивају озбиљне болести“. У златно доба исламске цивилизације персијски научници су дали претпоставке постојање микроорганизама, попут Ibn Sina у својој књизи „The Canon of Medicine“, где се описује шуга и начин преноса куге. Girolamo Fracastoro 1546. године предлаже теорију да се епидемијске болести преносе ентитетима директним или индиректним контактом или путем вектора. Robert Hooke 1665. године први пут види гљивичне елементе увеличавајућим стаклима. За оца микробиологије се сматра Antonie van Leeuwenhoek који 1676. године уводи своје једноставне микроскопе којима даје увид у свет микроорганизама, називајући их „animalcules“ и даје описе облика бактеријских ћелија. И поред сазнања о постојању микроорганизама, тек у 19. веку, Louis Pasteur 1858. године побија дотадашњу теорију о спонтаној генерацији и утврђује да микроорганизми изазивају инфективне болести. Уследило је „златно доба“ микробиологије током ког су откривени бројни микроорганизми, методе за њихово испитивање, утврђивани главни патогенетски механизми најзначајнијих изазивача инфективних обољења. Ferdinand Cohn уводи таксономску класификацију бактерија, а Robert Koch 1884. године даје своје значајне постулате као темељ патогенезе инфективних болести који се до данас користе. Такође, уводи методологију и изолацију чисте бактеријске културе и открива бацил туберкулозе. Уводе се и методе превенције инфективних болести, од епидемиолошких мера које је применио John Snow у прекиду трансмисије колере, метода пастеризације, тиндализације и стерилизације, принципа асепсе и антисепсе до и данас најмоћније методе вакцинације коју у савремену медицину уводи Edward Jenner. Открићем антитоксина за тетанус и дифтерију крајем 19. века, уводе се и прве вакцине у бактериологији, а убрзо са почетком 20. века и могућност атенуације микроорганизама у циљу прављења вакцине за туберкулозу. Почине и откриће првих антибактеријских лекова. Ehrlich и Hato 1910. године уводе салварзан за лечење сифилиса, а Alexander Fleming 1929. године открива пеницилин и отпочиње антибиотску еру. Данашња модерна микробиологија се бави истраживањима микроорганизама кроз бројна научна поља: молекуларно-генетичка, биохемијска, епидемиолошка, имунолошка, клиничка, итд.

У овој тези ће се дати микробиолошки и молекуларно-епидемиолошки опис групе Б стрептокока у Србији у петогодишњем периоду и кроз базично микробиолошко-биохемијско истраживање редокс карактеристика ове бактеријске врсте, дати додатно разјашњење одређених патогенетских механизма. С тога ће се у уводном делу представити преглед тренутних сазнања и карактеристика групе Б стрептокока које су од интереса за наведено истраживање, а неопходни су у контексту анализе и коментарисања резултата, као и доношења закључака.

## 1.1 Историјат

Група Б стрептокока (ГБС) се први пут спомиње 1887. године, када је утврђено да изазива маститис говеда (1). Lancefield и Hare су 1935. године идентификовали *Streptococcus agalactiae* из вагиналних брисева породиља (2). У неколико наредних година, забележена су три постпартална смртна случаја посредована инфекцијом ГБС код жена у Лондону. Сви претходни случајеви су приписивани групи А стрептокока (3). Током 1970-тих, долази до пораста броја регистрованих случајева неонаталних инфекција узрокованих ГБС. До 1970. године није забележен ни један случај неонаталног менингитиса посредован ГБС, док је у периоду од 1970. до 1974. године регистровано сваке године 7 до 14 случајева (4). Инциденција неонаталних обољења ГБС се кретала од 1,3 до 2,9 на 1000 живорођене деце, чиме је ГБС постао главни узрочник неонаталног морбидитета и морталитета, уз *E.coli* са нешто мањом инциденцијом (1). Осамдесетих година 20. века, међу развијеним и земљама у развоју, ГБС постаје водећи узрочник неонаталне сепсе и менингитиса. У истом периоду, почињу и клиничка испитивања ефикасности интрапарталне антибиотске профилаксе у циљу смањењу ризика од вертикалног преноса ГБС током порођаја, као и развој скрининг програма код трудница. Упркос увођењу препорука за скрининг и антибиотску профилаксу, као и смањењу инциденције појединих клиничких облика неонаталних болести, ГБС остаје и даље најзначајнији неонатални патоген уз *E. coli* и *L. monocitogenes* (5).

## 1.2 Класификација

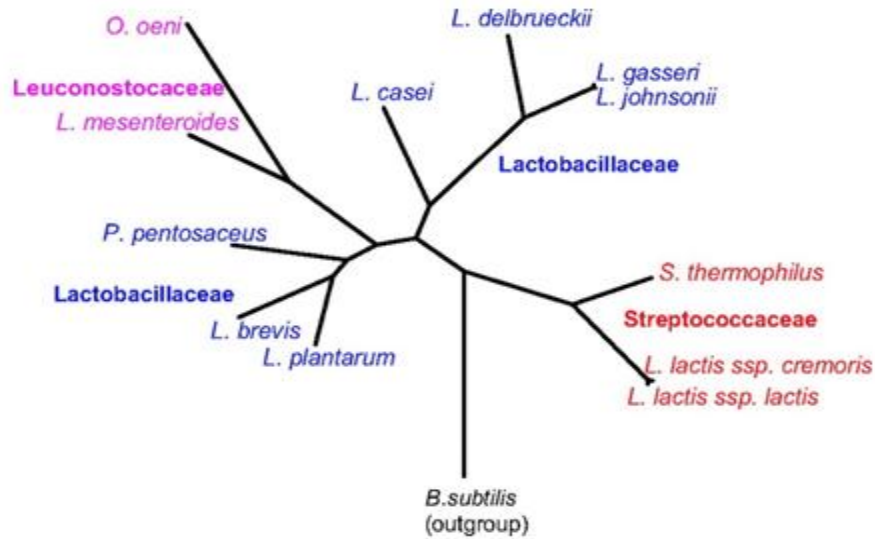
### 1.2.1 Таксономска класификација

Домен	Bacteria
Царство	Firmicutes
Класа	Bacilli
Ред	Lactobacillales
Фамилија	Streptococcaceae
Род	<i>Streptococcus</i>
Врста	<i>Streptococcus agalactiae</i>

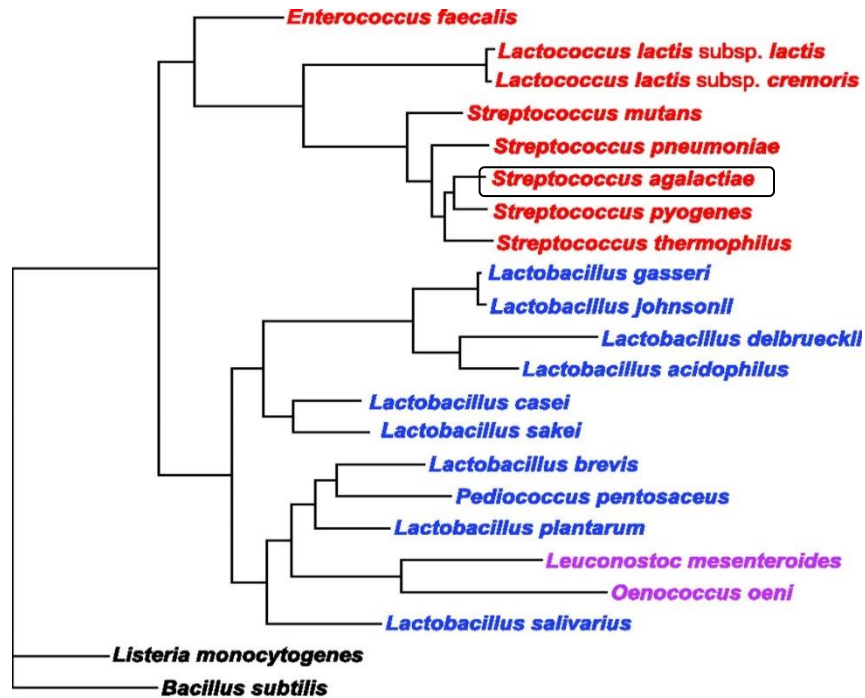
Слика 1. - Таксономска класификација *Streptococcus agalactiae* –групе Б стрептокока

Група Б стрептокока припада фамилији Streptococcaceae и функционално је класификована у хомоферментативне млечно киселинске бактерије, јер производе млечну киселину као једини или главни производ ферментације (Слика 1). Као и већина осталих млечно киселинских бактерија, припадају царству Firmicutes, реда Lactobacillales (Слика 2). У овом разноврсном реду, налазе се бројни пре свега индустријски битни родови *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* и

*Lactobacillus* (6). Фамилија Streptococcaceae (Слика 3) укључује род *Enterococcus*, који је део гастроинтестиналне микробиоте, *Lactococcus*, који се користи у индустрији прераде млека и млечних производа и *Streptococcus* (7).



Слика 2 - Филогенија реда Lactobacillales, конструисана на основу поређења рибозомалних протеина. Врсте су обојене према фамилији: Lactobacillaceae, плаве; Leuconostocaceae, љубичасте; Streptococcaceae, црвене. Род *Streptococcus* представљен је врстом *Streptococcus thermophilus* и родом *Lactococcus* са подврстом врсте *Lactococcus lactis subspecies cremoris* на различитој грани фамилије Streptococcaceae. (преузето од Makarova, Slesarev и сар. 2006.)



Слика 3 – Позиција *Streptococcus agalactiae* односно групе Б стрептокока у оквиру реда Lactobacillales. Филогенетско стабло реда Lactobacillales конструисано на основу поређења 4 субјединице ДНК зависне РНК полимеразе. Фамилија Streptococcaceae је приказана црвено, а позиција *Streptococcus agalactiae* је уоквирена. (преузето и модификовано од Makarova и Koonin 2007.)

### **1.2.2 Подела стрептокока на основу типа хемоллизе**

Schottmuller је увођењем коришћења крвног агара у медицинску микробиологију извршио прву класификацију стрептокока (8). Он је на основу типа хемоллизе на крвном агару поделио стрептококе у две категорије (алфа и бета), док је Brown (9). (са гама) допунио класификацију на три категорије :

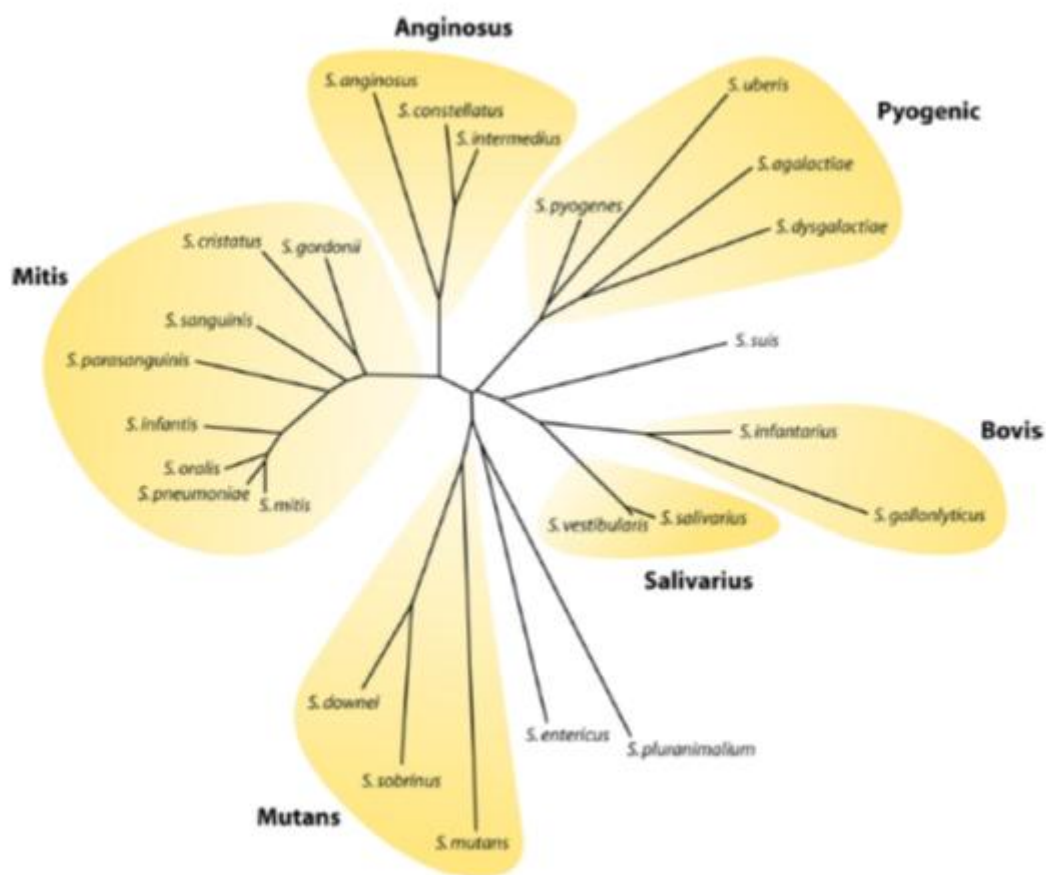
1. алфа ( $\alpha$ ) хемолитичне стрептококе, које непотпуно разграђују хемоглобин до биливердина и на крвном агару стварају зелену зону хемоллизе око колонија,
2. бета ( $\beta$ ) хемолитичне стрептококе, које потпуно разграђују хемоглобин до билирубина, стварајући прозрано-жуту зону хемоллизе око колонија и
3. гама ( $\gamma$ ) хемолитичне стрептококе или нехемолитичне стрептококе.

### **1.2.3 Подела $\beta$ хемолитичних стрептокока према групно специфичном антигену**

Rebecca Lancefield је 1928. године идентификовала групно специфичан угљенохидратни антиген, који улази у састав ћелијског зида бета хемолитичких стрептокока (БХС) (10). На основу грађе групно специфичног антигена, Ц полисахарида који се састоји из N-ацетилглюкозамина везаног за полимер рамнозе, Lancefield је БХС поделила на групе, означене латиничним словима абецеде - А, В, С, Е, G и F. Изузетак су групе D и N стрептокока где нема Ц полисахарида, већ је теихоинска киселина групно специфични антиген, односно липотеихоинска киселина (код групе H) (11). До данас је дефинисано више од 20 група БХС, обележених латиничним словима абецеде од А до V.

### **1.2.4 Подела стрептокока на основу 16s rRNA секвенцирања**

На основу секвенцирања 16s rRNA, стрептококе су подељене у 6 група - Mitis, Anginosus, Pyogenes, Bovis, Salivarius и Mutans (Слика 4) (12). *Streptococcus agalactiae* се сврстава у пиогену групу заједно са *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae* и *Streptococcus uberis*.



Слика 4 - Подела стрептокока на основу 16s rRNK секвенцирања (преузето од Nobbs и сар. 2009.)

### 1.3 Морфолошке, културалне и биохемијске карактеристике ГБС

Стрептококе групе Б су Грам позитивне коке, распоређене у краћим или дужим ланцима или у паровима, што је последица паралелних деобних равни под правим углом и закасног раздвајања бактеријских ћелија након деобе. Факултативно су анаеробне, ферментативне, каталаза негативне, непокретне и аспорогене, пречника од 0,5 до 1 $\mu$ m. За култивисање захтевају обогаћене хранљиве подлоге (нпр. крвни агар). Формирају округле, заравњене, сивкасто-беле колоније са присутном  $\beta$  хемолизом око колоније на крвном агару. Присуство  $\alpha$  хемолитичних сојева је изузетно ретко, док је 1-2% изолата ГБС анхемолитично (13). Такође, забележено је и присуство хиперпигментованих и хиперхемолитичних изолата са наранџасто-црвенкастим колонијама што је последица хиперекспресије  $\beta$  хемолизина/цитоллизина, значајног фактора вируленције (14). Ћелије ГБС су окружене капсулом која се састоји од полисахарида или егзополисахарида који окружују и штите бактерију спречавањем таложења комплекса и опсонизације. Капсуларни полисахарид је ковалентно везан за пептидогликан ћелијског зида, стварајући тако мукоидни слој капсуле који покрива површину бактеријске ћелије. Ћелијски зид ГБС

састоји се од типичног пептидогликана, заједно са разним угљенохидратним структурама попут теихоинске киселине и бројним површинским протеинима. Пептидогликан присутан у ћелијском зиду ГБС је састава Lys–Ala1–3(Ser), а полисахаридни антиген групе Б је грађен од рамнозе, N-ацетилглукозамина и галактозе. Претпоставља се да овај антиген није фактор вируленције, нити је важан за стимулацију имунског система, међутим корисно је средство за идентификацију ГБС у клиничкој лабораторији. Ћелијска мембрана има двоструки слој липида и протеина који помаже у транспорту различитих молекула у и из ћелија кроз различите транспортне канале или системе (15). Биохемијске карактеристике ГБС су приказане у Табелама 1-3.

**Табела 1 - Биохемијске карактеристике групе Б стрептокока**

Ред.бр.	Биохемијске карактеристике	<i>Streptococcus agalactiae</i>
1	Капсула	Инкапсулирана - полисахаридна
2	Облик	Коке
3	Каталаза	Негативне (-)
4	Оксидаза	Позитивне (+)
5	Цитрат	Негативне (-)
6	Метил црвена	Негативне (-)
7	Voges–Proskauer (VP) тест	Позитиван (+)
8	ОФ (оксидативно-ферментативни)	Факултативни анаероби
9	Коагулаза	Негативне (-)
10	ДН аза	Негативне (-)
11	Clumping фактор	Негативне (-)
12	Производња гаса	Негативне (-)
13	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Негативне (-)
14	Хемолиза	примарно β (изузетно α и анхемолитичне)
15	Покретљивост	Непокретна
16	Редукција нитрата	Негативно (-)
17	Хидролиза желатина	Негативно (-)
18	Производње пигмента	Варијаблна
19	Тест жучних соли - ескулина	Негативно (-)
20	САМР тест	Позитиван (+)
21	РУР тест	Негативан (-)
22	Осетљивост на бацитрацин	Резистентан
23	Lancefield група	Група Б



**Табела 2 - Ферментационе карактеристике групе Б стрептокока**

Ред.бр.	Супстрат	<i>Streptococcus agalactiae</i>
1	Глукоза	Позитивна (+)
2	Фруктоза	Позитивна (+)
3	Галактоза	Позитивна (+)
4	Лактоза	Позитивна (+)
5	Малтоза	Позитивна (+)
6	Манитол	Негативан (-)
7	Маноза	Негативна (-)
8	Рафиноза	Негативна (-)
9	Рибоза	Позитивна (+)
10	Сахароза	Позитивна (+)
11	Скроб	Позитиван (+)
12	Трехалоза	Позитивна (+)
13	Ксилоза	Негативан (-)
14	Салицин	Позитиван (+)
15	Глицерол	Позитиван (+)
16	Дулцитол/Галактилол	Негативан (-)
17	Целобиоза	Позитивна (+)
18	Рамноза	Негативан (-)
19	Арабиноза	Негативан (-)
20	Инулин	Негативан (-)
21	Сорбитол	Позитиван (+)
22	Пируват	Негативан (-)
23	Гликоген	Негативан (-)

**Табела 3 - Ензимске реакције групе Б стрептокока**

Ред.бр.	Ензим	<i>Streptococcus agalactiae</i>
1	Каталаза	Негативна (-)
2	Супероксид дизмутаза	Позитивна (+)
3	Коагулаза	Негативна (-)
4	Алкална фосфатаза	Позитивна (+)
6	Хијалуронидаза	Позитивна (+)
7	$\beta$ -Д-галактозидаза	Негативна (-)
8	Аргинин дехидролаза	Негативна (-)
9	Неураминидаза	Позитивна (+)
10	Уреаза	Негативна (-)

\*ГБС може да хидролизује аргинин, али не може да хидролизује ескулин и желатин.

Толерише 6,5% концентрацију NaCl, али не толерише веће концентрације од тога.

## 1.4 Типизација ГБС

Типизација бактерија представља скуп различитих метода којим се врши карактеризација сојева унутар једне бактеријске врсте. Типизацијом бактерија се могу одредити извор инфекције, путеви преношења, дистрибуција специфичних клонова одређених карактеристика, што има велики епидемиолошки значај. Резултати студија које се баве праћењем дистрибуције и промена учесталости појединих типова у популацији су од великог значаја у креирању различитих протокола, мера превенције и истраживањима везаним за прављење вакцина. Да би метода типизације била успешна, идентификовани типови бактерија би требало да буду стабилни, техника би требало да има довољну моћ дискриминације, да буде једноставна, репродуцибилна, а метод стандардизован великим бројем поновљених тестирања. Класичне методе типизације које се базирају на фенотипским особинама (детекција фенотипова), биохемијским особинама (детекција биотипова), профилима резистенције (детекција резистотипова) и другим, све више се замењују методама молекуларне биологије, односно методама генотипизације. Описано је неколико метода за генотипизацију и карактеризацију ГБС у научне, епидемиолошке и дијагностичке сврхе. Овим методама припадају: капсуларна типизација, на бази разликовања капсуларног полисахарида (capsular polysaccharide - CPS); детектовање површинских протеина; гел електрофореза у пулсном пољу (енг. Pulsed-field gel electrophoresis - PFGE); типизација секвенцирањем више локуса (енг. Multi-locus sequence typing - MLST); типизација умножавањем насумичних поновака ДНК (енг. Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD) и типизација базирана на понављајућим секвенцама умножених реакцијом ланчаног умножавања (енг. Repetitive-sequence-based Polymerase Chain Reaction - rep-PCR); типизација варијабилних поновака на више локуса (Multi-locus variant-repeat assay - MLVA); и у новије време, коришћење кластеровања регулаторних међупросторних кратких палиндромских поновака (clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR) као алтернативни вид добијања секвенчног типа (енг. sequence type - ST) уместо коришћења MLST (16). Све наведене методе имају своје предности и недостатке и сви дају различите врсте података који се могу користити у контексту молекуларно - епидемиолошких надзора.

### 1.4.1 Капсуларна типизација – CPS

Капсуларни полисахарид ГБС који гради капсулу бактеријске ћелије је главни фактор вируленције ове бактеријске врсте и користи се у лабораторијским условима за типизацију, односно одређивање серотипа. До данас је идентификовано укупно десет CPS типова, означених са Ia, Ib и од II до IX. Одређивање типова се може вршити помоћу латекс аглутинације или молекуларне типизације коришћењем мултиплекс PCR методе (17). Као један од првих дискриминишућих фактора међу ГБС изолатима, CPS типови се у литератури најчешће спомињу када се говори о груписању изолата у покушају да се разуме преваленција и колонизација трудница и нетрудница као и инвазивних, поготову неонаталних болести. Типизација пружа драгоцене информације које омогућавају класификацију у групе, и праћење заступљености одређених типова у глобалној преваленцији. Најчешћи глобално заступљени CPS типови су: Ia, Ib, II, III и V, који се

јављају доминантно у свим популацијама пацијената. Са друге стране, CPS типови VI - IX спадају у ређе типове са регионалним варијацијама у јављању и детекцији (18).

#### **1.4.2 Детекција површинских протеина**

Осим капсуларних полисахарида, на површини ћелија ГБС присутни су и површински протеини. Они су такође имуногени, односно протективна антитела на њих се такође синтетишу. Фамилија  $\alpha$ -like протеина (Alp) је међу најбоље описаним и испитаним површинским протеинима, а такође представљају и битне факторе вируленције. У ову фамилију се сврставају и  $\alpha$ -Ц протеин, Rib, Alp2, Alp3, Alp4 и  $\epsilon$  (Alp1), које кодирају њихови гени (*bca*, *rib*, *alp2*, *alp3*, *alp4* и *epsilon/alp1*) (19). Детектовање експримираних површинских протеина у сврху типизације се може вршити серолошким и молекуларним методама (PCR или секвенцирањем). Први идентификовани површински протеински антиген је био Ц антиген, детектован код бројних сојева, осим код CPS типа III (20). Иако су Alp протеини детектовани код већине ГБС сојева, постоје и они код којих нису детектовани. Такви сојеви представљају око 1% изолата и повезани су са случајевима бактеријемije и сепсе (21). Повезаност капсуларних типова и експресије Alp протеина указује на њихову корелацију са CPS типовима Ia, Ib и II, ретко код V и непостојање код типа III. Са друге стране, код већине изолата CPS типа III је експримиран Rib протеин, делом код типа II и ретко типа V. Протеин Alp3 се уочава код CPS типова V и VIII, а Alp2 ретко код Ia, III и V (19).

#### **1.4.3 Pulsed-field gel electrophoresis – PFGE**

Гел електрофореза у пулсном пољу је моћна молекуларна метода за разликовање изолата са већом дискриминацијом од капсуларне типизације за процену генетске сродности. Бактеријска нуклеинска киселина се исеца са једним или више рестрикционих ензима (у случају ГБС то је често SmaI) да би се добио профил фрагмената (пулсотип) на агарозном гелу, након чега се профили упоређују ради сличности и групишу у складу с тим (22). Међутим, ГБС као генетички варијабилан организам, карактерише се бројним пулсотиповима када се типизира овом методом, што се манифестује појавом више пулсотипова у оквиру једног капсуларног типа (23). Истовремено, слични пулсотипови се групишу тако да дају исти капсуларни тип, што указује на добру предиктивну вредност капсуларног типа. Такође, показало се да овом типизацијом могу да се подтипизирају хипервирулентни клонови, утврди повезаност или удаљеност одређених изолата (24). Ипак, кључни недостатак ове методе је немогућност тачног поређења пулсотипова из различитих студија на основу гел профила. И поред ове мане, метода има значајно место у испитивању локалне повезаности сојева, скринингу молекуларних механизма преноса и повезаности изолата сличних особина, као и молекуларне епидемиологије ГБС.

#### 1.4.4 Multi-locus sequence typing – MLST

MLST је метода генотипизације, која се базира на умножавању и секвенцирању седам високо конзервираних, тзв. *house-keeping* гена, који се налазе у сваком бактеријском геному и кодирају синтезу ензима од виталног значаја за бактеријску ћелију (25). Методу за MLST типизацију, развили су Jones и сарадници користећи секвенцирање седам дефинисаних *house-keeping* гена (*adhP*, *atr*, *glcK*, *glnA*, *pheS*, *sdhA* и *tkl*) (26). Очитане секвенце се пореде *in silico* са референтном базом података (<https://pubmlst.org/sagalactiae/>), које броји скоро десет хиљада секвенцираних ГБС изолата, а развили су је Jolley и сарадници 2004. године (27). Алелне варијације ових гена омогућавају одређивање различитих секвенцираних типова (ST), којих тренутно у бази има 1651. Ови ST се затим могу груписати у такозване клонске комплексе (енг. clonal complex - CC), који се разликују највише у једном алелу од другог члана кластера. Главна предност ове методе је у томе што су резултати униформисани и лако поредиви међу различитим лабораторијама, без потребе за поређењем слика гелова као код PFGE методе. База података MLST-а је драгоцен ресурс који омогућава дељење и поређење различитих података; јавно доступне информације изолата ГБС укључују низ података, као што су земља порекла, капсуларни тип, резистенција и тип узорка. Повезаност ST и CPS типова показује да међу неким постоји јака кореација (ST17 и CPS тип III, ST12 и CPS тип Ib), док је код других врло мала (CPS тип V је заступљен у свим ST осим у ST17) (28). У различитим студијама уочена су варијабилна присуства одређених CPS типова унутар неких ST, као код ST1, доминантност CPS типа III унутар ST17 и ST19, као и CPS Ia унутар ST23 (29,30). Унутар клонских комплекса, хомогеност CPS типова је евидентна у CC17, кога представљају CPS тип III, осим малог дела који није специфициран. Слично томе, унутар CC19, ST182 представља само CPS тип III, међутим други ST у овом CC показују варијације, посебно ST28 који је претежно представљен CPS типом II. При закључивању филогенетских односа добијених овом методом ипак треба бити опрезан због могућности да различити сегменти генома ГБС еволуирају независно, што се кроз PFGE методу јасно и види (31). MLST можда није најбољи метод за опис еволуционих односа, али за епидемиолошке сврхе и праћење клоналне дистрибуције широм света је сасвим задовољавајући.

Један од алтернативних начина детекције ST осим MLST типизације је коришћење CRISPR методе. Кластеровани регулаторни међупросторни кратки палиндромски поновци - CRISPR и њихови повезани протеини Cas (енг. CRISPR-associated proteins), недавно су детектовани код већине археа и бактерија (32). Представљају вид адаптивног имунитета за заштиту прокариота од страних генетичких елемената, као што су бактериофаги и мобилни генетички елементи (транспозони и плазмиди) (33). Генетски аранжман који овај систем ствара резултира поларизованом оријентацијом генома, која омогућава праћење инвазије генетичких елемената током времена (34). Код ГБС су идентификована два CRISPR- Cas система, који укључују систем типа II-A (убиквитарни и функционални) и систем типа I-C (редак и често непотпуни), који су повезани са CRISPR-1 и CRISPR-2 локусима (35,36). Убиквитарна природа CRISPR-1 локуса чини га згодним молекуларним маркером за праћење промена у геному ГБС. Посебну особину овог локуса одликује висока конзервираност репетитивних поновака, између којих се уводе претходно споменути страни генетички елементи, помоћу којих се и могу пратити промене које се

дешавају у геному. Показана је и врло добра корелација између генетичке организације CRISPR-1 локуса и типова секвенци ST, на основу које може да се изведе конкретан ST без комплетне примене MLST типизације (35).

#### **1.4.5 *Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD***

RAPD типизација се заснива на употреби једног пара прајмера, који су неспецифични и комплементарни са понављајућим секвенцама у геному ГБС, што им омогућава амплификацију више различитих продуката PCR методом. У RAPD типизацији се користе прајмери који имају високу дискриминативну моћ и који показују репродуцибилност у умножавању сегмената ДНК. У реакцији ланчаног умножавања прајмер се насумично везује за комплементарне сегменте ДНК. Сходно томе, код различитих сојева, долази до умножавања различитог броја фрагмената, различите величине. Након електрофоретског раздвајања добијају се одређени RAPD профили, који се међусобно могу поредити. RAPD типизација је економична и веома дискриминативна. Велика предност ове методе је релативно кратко време поступка и једноставна методологија што га чини погодним алатом за процену сродности клонова у клиничким условима праћења епидемије. Са друге стране, поређење резултата добијених у различитим лабораторијама је проблематично, јер је метода врло осетљива на температурне и друге промене услова амплификације, што између осталог утиче и на репродуцибилност. Резултати студије изолата ГБС резистентних на макролиде сугеришу да је PFGE прецизније средство за анализу молекуларне епидемиологије од RAPD методе (37).

#### **1.4.6 *Multi-locus variant-repeat assay – MLVA***

Бројне бактеријске врсте се типизирају путем детекције различитог броја тандемских поновака (енг. variable numbers of tandem repeats - VNTR), тј. понављајућих секвенци у ДНК који се налазе на различитим локацијама у бактеријском геному (38). Као што и име методе каже, број локуса односно локација поновака је варијабилна па ће се број поновака разликовати од соја до соја и тиме генерисати различите профиле. Ово профилисање је означено као MLVA типизација, и треба нагласити да има сличан принцип као и MLST типизација. Разлика је у томе што MLVA метода уместо *house-keeping* гена користи VNTR локусе (39). У објављеним студијама које су се бавиле поређењем метода типизације са MLVA, аутори су утврдили да CPS типизација, типизација површинским протеинима и MLST, углавном дају сличне профиле који одговарају MLVA профилима (39,40). Ипак, и ова метода значајну ману - тешко је упоредити профиле између студија. Не постоји униформност извештавања типова нити база података у којој се јединствено похрањују подаци. База података у ове сврхе је направљена ([www.mlva.net](http://www.mlva.net)), али не укључује ГБС.

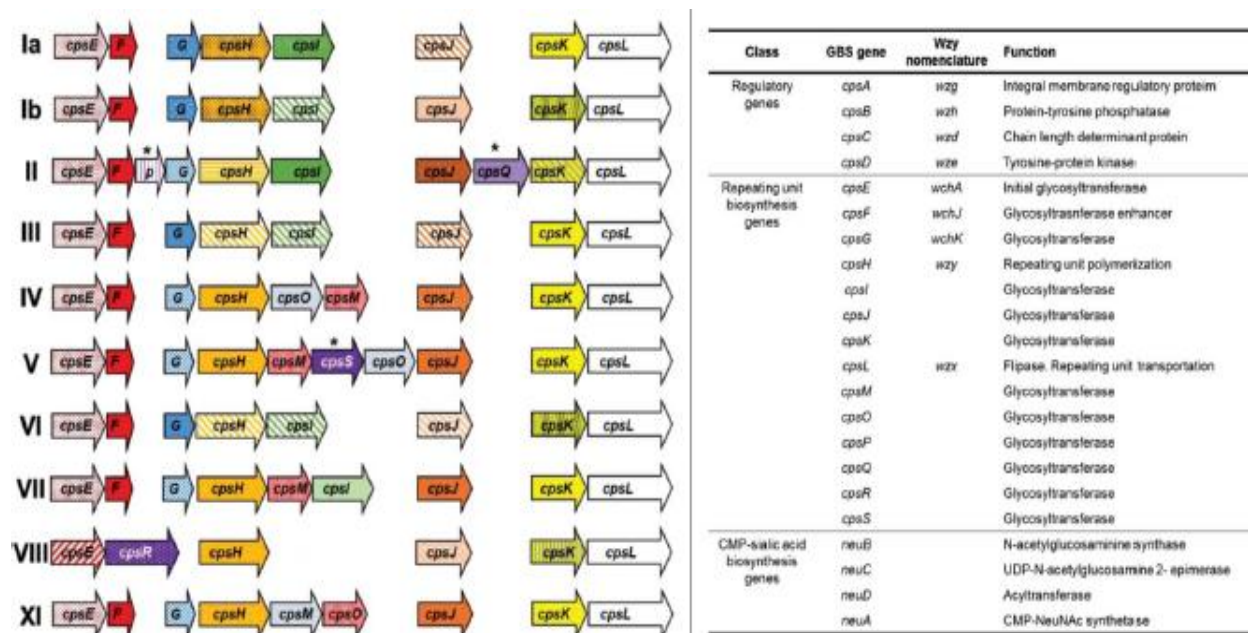
## 1.5 Фактори вируленције

ГБС обично асимптоматски колонизује урогенитални и гастроинтестинални тракт здравих људи, али има способност да у одговарајућим условима пређе у друге нише у којима ће испољити свој патогени потенцијал. Те способности се огледају кроз успешну бактеријску колонизацију и способност продирања кроз физичке баријере домаћина. То захтева одговарајућу контролу генске експресије, регулацију површинских структурних и секреторних фактора вируленције. Доминантну улогу имају фактори који учествују у интеракцијама са ћелијама домаћина, укључујући адхеренцију за површине епитела домаћина, инвазију епителних и ендотелних баријера и ометање механизма урођеног имунитета (41).

### 1.5.1 Капсула

Капсула ГБС је означена као главни фактор вируленције. Већина сојева ГБС изолована из хуманих узорака је инкапсулирана и припада једном од 10 капсуларних типова (Ia, Ib, II-IX). Капсуларни полисахариди су грађени од понављајућих јединица четири елемента: глукозе, галактозе, N-ацетилглукозамина и сијалинске киселине. Изузетци су CPS типови VI и VIII, који немају N-ацетилглукозамин, а тип VIII додатно има и резидуе рамнозе (42). Синтеза капсуле је кодирана кластером гена која се састоји из централне групе гена за кодирање тип-специфичних гликозил-трансфераза и полимераза, високо конзервираних у свим типовима. Усходно од овог, налази се регион који кодира ензиме синтезе и активације сијалинске киселине, док су нисходно гени одговорни за експорт полисахарида капсуле (43). Капсуларни оперони се састоје од 4 *neu* гена, конзервирана у свим типовима (*neuA*, *neuB*, *neuC* и *neuD*), 6 *cps* гена конзервирана у свим типовима (*cpsA*, *cpsB*, *cpsC*, *cpsD*, *cpsE* и *cpsL*) и додатних 6 гена који одређују специфичан тип (*cpsF*, *cpsG*, *cpsH*, *cpsI*, *cpsJ*, *cpsK*, *cpsM*). Генски кластери капсуларних типова су структурно и генетички слични (44,43). Увидом у кластере биосинтезе капсуле може се закључити да постоји могућност хоризонталног генског трансфера (интра- или интерспецијес рекомбинацијама), што доприноси диверзитету CPS гена (Слика 5). Такође, описане су и промене у капсуларним локусима под утицајем селективног притиска имунитета домаћина, што води варијацији капсуларног типа, али и доказује потребу постојања у патогеном потенцијалу бактерије (44,45). Показано је да изолати ГБС који немају капсулу су атенуирани у моделима системских инфекција (46). Сијалинска киселина, нонозни мономер, налази се на терминалним гликанима многих хуманих ћелија. Код ГБС се налази у оквиру CPS, доводећи до смањења ефикасности урођеног имунитета механизмом молекулске мимикрије. Такође, спречава таложење С3b компоненте комплемента на површину ГБС и опсонифагоцитозу (47). Исто тако, везује се за инхибиторне Siglecs (енг. Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins) лектине домаћина, смањујући активацију неутрофила и инфламацију плаценталне мембране, смањује проинфламаторне сигналне путеве и подстиче бактеријску дисеминацију. Експериментални *in vitro* и *in vivo* модели показују да смањење експресије CPS повећава способност инвазије епителних и ендотелних ћелија. Такође, показано је да се некапсуларни хиперхемолитични сојеви ГБС лакше дисеминују на периферију организма

домаћина и прелазе хематоенцефалну баријеру (48,49,50). Ово упућује на закључак да промене у експресији капсуле посредоване транскрипционим регулаторима, у различитим фазама инфекције, доводе до повећања вируленције ГБС.



Слика 5 - Генетичка организација cps локуса код ГБС ( преузето од J.Y. Song и сар. 2018.)

### 1.5.2 Протеини богати серинским поновцима (Srr)

Srr протеини (енг. Serine-rich repeat proteins) су високо гликозилирани (гликопептиди), везани за површину ћелије, богати серинским наставцима адхезивног карактера за фибриноген (слично фибронектин везујућим протеинима). Кодирани су опероном који има преваходно секреторне системе (51,52). Дефинисана су два облика Srr гликопротеина (1 и 2). Већина сојева ГБС експримира Srr1 који има адхезивна својства за фибронектин вагиналних и цервикалних ћелија и повезан је са перзистентном вагиналном колонизацијом. Srr2 са друге стране има јачи адхезивни афинитет за фибриноген од Srr1 и може адхерисати и за имобилисани плазмин и плазминоген, што Srr1 не може (53,54). Капсуларни типови Ia, Ib, II, V и поједини сојеви типа III, експримирају Srr1, док већина типова III експримира Srr2, што може објаснити компетитивну предност хипервирулентног клона III/ST 17 за адхеренцију у вагиналној ниши, као и адхеренцију за епителне и ендотелне ћелије у инвазивним обољењима. Хомологија између Srr2 и Srr1 је мања од 20%, а такође је показано да ГБС сојеви који експримирају Srr2 имају значајно већу вирулентност у моделу инфекција неонаталне сепсе (1000 пута веће вредности LD<sub>90</sub> – леталне дозе) у поређењу са сојевима који експримирају Srr1 (55).

### 1.5.3 Фибриноген везујући протеини (Fbs)

Примарни фибриноген везујући протеини код ГБС су Fbs протеини (енг. fibrinogen-binding proteins) A, B и C (такође познат и као BsaB). FbsA и FbsC имају централну улогу у адхеренцији за хумане епителне ћелије, односно улогу у колонизацији вагиналне слузнице. Осим адхезивне улоге, FbsC такође учествује и у формирању биофилма као и инвазивним процесима (56). У студијама инвазивних болести, показано је да делецијом гена за FbsC долази до смањења способности ГБС сојева да се вежу и инвадирају хумане ендотелне ћелије мозга *in vitro*. До истог смањења могућности колонизације ЦНС-а се дошло и у мишјем моделу системске инфекције (57). За површински FbsA је показано да делецијом сојеви бивају осетљивији на фагоцитозу у поређењу са сојевима код којих није извршена делеција (58). FbsB је секреторни протеин који делује као фактор инвазивности повећавајући способност ћелија ГБС да инвадирају хумане епителне ћелије (59).

### 1.5.4 Ламинин везујући протеин (Lmb)

Lmb протеин (енг. laminin binding protein), кодиран од стране истоименог *lmb* гена, одговоран је за везивање за ламинин, једну од најбитнијих компоненти екстрацелуларног матрикса и базалне мембране већине ткива и органа. Присутност овог гена код готово свих сојева ГБС, говори о његовом значају за процес адхеренције и колонизације али исто тако и за процес инвазије ћелија домаћина (60). У прилог томе говори и рад у коме је доказано да делеција *lmb* гена резултира смањењем способности инвадирања хуманих можданих микроваскуларних ендотелијалних ћелија, као и смањењу неуротропизма (61). Приликом везивања за ламинин, Lmb користи такозвани „Zn-везујући цеп“ који одржава одговарајућу конформацију за реакцију са ламинином (62,63). Овај цеп такође има улогу и у преузимању цинка из околине за потребе раста и размножавања ГБС (64).

### 1.5.5 Стрептококни фибронектин везујући протеин (SfbA)

SfbA протеин (енг. Streptococcal fibronectin binding protein) је високо конзервиран у популацији ГБС сојева и учествује у детерминацији тропизма ка гастроинтестиналном и вагиналном тракту, као и централном нервном систему (ЦНС). Такође је показана и његова улога у процесу инвазије вагиналних и цервикалних епителних ћелија, микроваскуларних ендотелних ћелија можданог ткива, као и астроцита (65,66). Пример је мишји модел хематогене дисеминације ГБС менингитиса, који показује да су сојеви без SfbA имали мању способност колонизације можданог ткива, односно преласка хематоенцефалне баријере (65). Регулација експресије је и даље неистражена, док је откривен одговор организма на овај фактор вируленције. Наиме, маст ћелије у одговору на присуство инфекције ГБС продукују протеазни ензим химазу, која разлаже фибронектин и тиме смањује бактеријску адхеренцију и дисеминацију (67).



### 1.5.6 Плазминоген везујући протеин (PbsP)

PbsP протеин (енг. plasminogen-binding surface protein) је површински адхезивни протеин ћелијског зида ГБС који се везује за плазминоген екстрацелуларног матрикса. Овај такође високо конзервирани протеин међу ГБС сојевима има различит степен експресије у зависности од средине у којој се налази (68). Тако је откривено да је експресија значајно већа код изолата са вагиналне слузнице у поређењу са сојевима гајеним у *in vitro* условима течних хранљивих медијума. Слична разлика је откривена у способности колонизације вагиналне слузнице између сојева који су дефицијентни за PbsP протеин и оних који нису (69). Учествује такође и у адхеренцији за ендотелне ћелије хематоенцефалне баријере (68). Поред наведеног, PbsP протеин има способност везивања за хумани витронектин, гликопротеин широко распрострањен у екстрацелуларном матриксу и серуму, што доприноси дисеминацији, адхеренцији и инвазији епителних ћелија (70). Због свих наведених особина (површинске локализације, конзервираниости, израженој *in vivo* експресији и улоге у колонизацији и инвазији), PbsP протеин је препознат као потенцијално добар циљни молекул за развој протеинске вакцине.

### 1.5.7 Пили

Пили представљају протеинске структуре на површини бактеријске ћелије, чврсто усидрене за њен ћелијски зид. Грађени су од три субјединице: главног носећег протеина (PilB) и два помоћна, од чега је један локализован на дисталном крају (PilA, енг. pilus-associated adhesin) и други везан за базу пила (PilC). Бројна истраживања, углавном методологијом циљаних мутација компоненти, су показала да PilA и C имају улогу у адхеренцији и колонизацији регија, док PilB доприноси вируленцији ГБС сојева (71,72). У прилог томе су радови који показују повезаност PilA са адхеренцијом за цервикални и вагинални епител у моделу вагиналне колонизације, затим за хумане пулмонарне епителне ћелије и микроваскуларне ендотелне ћелије мозга, а у мишјем моделу системске инфекције, дисеминацију у централни нервни систем (72,73). Са друге стране, доказано је да PilB има улогу у формирању биофилма, учествује у трансцитози кроз цервикалне епителне ћелије. На тај начин доприноси отпорности ГБС на фагоцитозу, и доводи до резистенције на антимикуробне пептиде које синтетише организам домаћина (74,75). У моделима системске инфекције, код сојева који немају PilB, утврђен је смањен морталитет и убрзана елиминација бактерија из система (75). Пили су кодирани на два ткз. пилусна острва (PI, енг. pilus islands -1 и -2), од којих PI-2 постоји у две подваријанте (-a и -b). PI-2a се јавља код већине ГБС сојева свих капсуларних типова, док је PI-2b углавном резервисан за хипервирулентне клонове CC17. Сви сојеви носе бар једну варијанту PI или комбинацију два PI, која учествују у одређивању капацитета колонизације или инвазије за дати сој (76).

### 1.5.8 Имуногени бактеријски адхезин (VibA)

Имуногени бактеријски адхезин ГБС (енг. GBS immunogenic bacterial adhesin - VibA) је још један високо конзервирани, мултифункционални површински протеин, чврсто везан за ћелијски зид. VibA има улогу у колонизацији мукозних регија и продору у епителијалне ћелије. Највећи афинитет овај површински протеин показује ка цервикалним, плућним и интестиналним епителним ћелијама. Поред тога, овај протеин повећава вероватноћу преживљавања ГБС у крви током бактеријемije. Механизам интраваскуларног преживљавања је заснован на инхибицији активације класичног пута активације комплемента (везивањем Ц4 компоненте комплемента) и блокирањем дејства неутрофила (77,78). Описане су четири варијанте VibA (1-4), од којих је варијанта 4 која се јавља само код ST17 сојева јако слична варијантама детектованим код говеђих сојева (79). Регулација његове генске експресије је везана и за рН средину: појачана је у неутралној (крв) у односу на киселу средину (генитални тракт), што објашњава улогу VibA протеина у трансформацији ГБС из форме мирног колонизатора у инвазивну патогену форму.

### 1.5.9 Хипервирулентни ГБС адхезин (HvgA)

Недавно откривени хипервирулентни ГБС адхезин (енг. hypervirulent GBS adhesin) је специфично детектован код хипервирулентних клонова ST17, а такође је регистрована заступљеност у високом проценту код сојева изолованих од новорођенчади са обликом касне неонаталне инфекције са менингитисом (80). Као и код VibA, терминални 5' и 3' региони HvgA су такође високо конзервирани, што директно утиче на њихову функционалну експресију, док су им интернални региони нешто различитији. Иако лиганд за HvgA није утврђен још увек, његова улога у адхеренцији за интестиналне и хориоидне епителне и микроваскуларно ендотелне ћелије хемато-енцефалне баријере је доказана. Такође је доказана његова одговорност за интестинални и менингеални тропизам, колонизацију наведених регија, као и транслокација интестиналне и хемато-енцефалне баријере *in vivo* на мишјим моделима. Разлика је показана и у односу на култивацију сојева *in vivo* и *in vitro*, где је експресија HvgA адхезина већа у *in vivo* средини. Приказана је и различита клиничка форма болести у зависности од старости и развијености домаћина у *in vivo* мишјим моделима. Наиме, већина животиња из групе старости 2-3 недеље имали су летални исход након гастроинтестиналне инокулације ГБС, на супрот животињама старијима од 4 недеље које нису имале леталан исход (80).

### 1.5.10 Ц5а пептидаза

Стрептококна Ц5а пептидаза Б, је површински адхезин/инвазин са протеазном активношћу коју експримирају сви сојеви ГБС. Прво је описан као фактор избегавања имунског одговора, цепањем хумане Ц5а компоненте комплемента која је одговорна за хемотаксију неутрофила (81,82). Код других анималних модела инфекције није уочена наведена пептидазна активност, па се тако у мишјим моделима хемотаксија неутрофила од стране Ц5а одвија без проблема (81). Такође, откривена је и улога у адхеренцији за

фибронектин и инвазији хуманих епителних ћелија, независно од пептидазне активности (83,84). Везивање за фибронектин је специфично за несолубилну форму коју образује више молекула правећи конформациону детерминанту за везивање, док солубилни фибронектин не везује (85).

### ***1.5.11 Хијалуронидаза (HylB)***

Хијалуронидаза ГБС је ендогликозидаза која исеца ланце гликозаминогликана на дисахариде, првенствено код хијалуронске киселине (ХК) (86). Улога у инвазивном потенцијалу ГБС је одавно доказана детектовањем повећане експресије HylB код изолата неонатуса са инвазивним болестима. Хијалурони су битна градивна компонента бројних ткива, посебно у већој концентрацији у плаценти, амнионској течности и плућном паренхиму, где овај ензим има значајну улогу у ширењу инфективног агенса (87). Код хипервирулентних клонова, данас препознатих као ST17, показана је јача експресија HylB у односу на сојеве који ређе изазивају инвазивне болести неонатуса (86). Такође је уочено да сојеви који немају потентни хемолитички пигментни токсин, своју вируленцију надокнађују хиперекспресијом HylB (88). Додатно, откривена је недавно и битна улога у анти-инфламаторном процесу. Наиме, већ је поменуто да је ХК присутна структурна компонента у свим ткивима и одговорна за стабилност екстрацелуларног матрикса, али и за имунски надзор. По оштећењу ткива, долази до деградације ХК од стране реактивних кисеоничних радикала - ROS (енг. reactive oxygen species) који се том приликом продукују. Ти фрагменти ХК преузимају улогу молекуларних образаца оштећења – DAMPs (енг. damage-associated molecular patterns) које препознају рецептори тих образаца, као што су TLRs (енг. Toll-like receptors) на имунским ћелијама урођеног имунитета који покрећу про-инфламаторни процес. Димери које HylB ствара од ХК инхибирају поједине битне рецепторе, као што су TLR2 и -4, блокирајући инфламаторне сигналне путеве које би уобичајени фрагменти ХК и остали молекуларни обрасци препознавања патогена – PAMPs (енг. pathogen-associated molecular patterns) активирали и покренули. Овај процес се сматра битним у супресији локалног имунског одговора на присуство ГБС у вагиналној регији, доприносећи процесу њене колонизације (89). Такође, и у мишјем моделу трудноће је имао кључну улогу у асцедентној инфекцији утеруса, смањењем инфламације целе регије и далеко веће учесталости спонтаних побачаја (90). Као и многе друге факторе вируленције, ГБС и овај врло пажљиво експримира у зависности да ли је у улози колонизатора или је покренуо процес инвазије ткива домаћина.

### ***1.5.12 Циклични di-AMP и CdnP***

ГБС синтетише сигнални молекул циклични di-AMP (енг. c-di-adenosine monophosphate), који има кључну улогу у одржању осмотске хомеостазе бактеријске ћелије. Регулација и одржање ове равнотеже је јако битна за преживљавање у различитим нишама у којима се може налазити, од киселе вагиналне слузнице до алкалне средине у крви (91). Ипак присуство сигналног молекула детектују унутарћелијски рецептори за препознавање сопствених образаца, као што су c-GAS (енг. cyclic guanosine

monophosphate-adenosine monophosphate - cyclic GMP–AMP) и STING (енг. cyclic GMP–AMP receptor stimulator of interferon genes), који покрећу продукцију интерферона типа 1 (нпр. интерферона бета - IFN-β), последичну хемотаксију неутрофила и уклањање патогена. ГБС такође продукује и ектонуклеазу, везану за ћелијски зид - CdnP, која врши деградацију екстрацелуларног цикличног di-AMP. У мишћем моделу системске инфекције ГБС инактивираним сојевима за CdnP, дошло је до повећања активације IFN-β и бржег санирања бактеријемije (92). Регулацијом експресије цикличног di-AMP и CdnP, ГБС доводи до смањења алармираћа c-GAS и STING рецептора, а тиме доводи до одржања стабилне осмотске хомеостазе.

### **1.5.13 Д-аланилација липотеихоинске киселине**

Липотеихоинска киселина (ЛТА) је саставни део ћелијског зида већине Грам позитивних бактерија као фосфатни полимер који у свом саставу садржи гликозилне и Д-аланинске естре. Овај макромолекул ћелијског зида има улогу у везивању за лиганде и одржању површинског напона бактеријске ћелије, а модулација Д-аланина у саставу ЛТА има битне ефекте на ову улогу. Д-аланилацијом ЛТА се смањује укупан негативни површински напон бактеријске ћелије што доводи до повећања резистенције на антимикробна катјонска једињења (93). Насупрот томе, сојеви којима је регулација Д-аланилације ЛТА инактивисана или им је инактивисан Д-аланин-Д-аланил носач лигаза која обавља цео процес, далеко су осетљивији на дејство катјонског механизма одбране домаћина, као и на способност леукоцита да испоље цитоцидно дејство (94). Регулација модулирања ЛТА је делимично одређена и регулисана аутодетекцијом састава ћелијског зида и површинског напона саме бактеријске ћелије, али и присуства антимикробних пептида у окружењу, као што је код групе А стрептокока (ГАС) (95).

### **1.5.14 Метионин**

Група Б стрептокока нема способност *de novo* синтезе метионина, те ову есенцијалну аминокиселину неопходну за раст мора да преузима из околине. Преузимање се одвија посредством метионин транспортног регулатора (MtaR). Сој ГБС код кога је инактивисан ген за MtaR је имао значајно смањење вируленције. Користећи експериментални модел неонаталне сепсе пацова за поређење дивљег соја ГБС и соја са инактивисаним геном за MtaR, утврђено је да је LD<sub>50</sub> мутираног соја 1000 пута већа од вредност LD<sub>50</sub> код дивљег соја. Поред тога, код мутираног соја са инактивисаним геном за MtaR, утврђен је и поремећај регулације других синтетичких путева, као на пример за метаболизам аргинина, серин протеазе и FbsB (96).

### **1.5.15 Хемолитички пигмент**

Хемолитичка активност ГБС је посредована дејством хемолитичког пигмента орнитин рамнолипида. Ген за синтезу овог пигмента је на *cil* оперону. Означен је као *cilE*

ген и познато је да кодира синтезу N-ацетил трансферазе која је неопходна за синтезисање пигмента (97). У свом саставу хемолитички пигмент садржи рамнополиен са 12 двоструких веза који истовремено има улогу потентног цитотоксина и антиоксиданса. Регулација активности овог гена је комплексна и у директној је зависности од услова средине, односно фактора који делују у одговарајућој животној ниши. Тако на пример, колонизација вагиналне слузнице у моделу на мишу је била значајно отежана сојевима ГБС са инактивисаним *cilE* геном, који су били брзо и ефикасно елиминисани дејством неутрофила (98). Са друге стране и сојеви који су имали хиперекспресију су такође били елиминисани неутрофилном инфилтрацијом и дегранулацијом маст ћелија услед значајне инфламације коју је изазвала хиперекспресија цитотоксина (99). Осим улоге у модулацији колонизације вагиналне регије, пигмент омогућава и дисеминацију у друге нише организма, као и инвазију и оштећења ткива. Нехемолитични сојеви ГБС, који су ретки, у *in vivo* моделима су показали немогућност дисеминације и оштећења фетуса, што указује на значајну улогу хемолитичног пигмента, тј. цитотоксичног својства за пенетрацију плацентарне баријере (100). Са друге стране, хиперхемолитични сојеви су изоловани код трудница са превременим порођајима, као и код одраслих особа са инвазивним ГБС инфекцијама, што указује да поједини сојеви конститутивно хиперекспримирају пигмент и користе га за развој обољења (101). Код неонатуса, посебно превремено рођених, уочена је значајна осетљивост на токсичне ефекте хемолитичног пигмента. Они који развију рану неонаталну болест аспирацијом вагиналног садржаја или амнионске течности у којој је присутан ГБС, развијају и колонизацију плућног паренхима истим ГБС сојем. Јача експресија пигмента, корелира са већом цитотоксичношћу ћелија паренхима, алвеоларних епителних и капиларних епителних ћелија (102). Показано је да сојеви са инактивацијом *cilE* гена имају смањену способност адхеренције, инвазије и иницијације инфламације плућног епитела (66). Продором кроз алвеоларни епител и активацијом других фактора вируленције, адхезина и инвазина, долази до дисеминације ГБС где доласком до хематоенцефалне баријере, хемолитички пигмент поново има улогу у њеној пенетрацији, инфламацији и оштећењу микроваскуларних ендотелних ћелија и изазивању тежих облика менингитиса (103).

### 1.5.16 CAMP фактор

CAMP фактор (енг. Christie, Atkins и Munch-Petersen - CAMP factor) добио је име по скраћеници имена научника који су га открили. У питању је секреторни екстрацелуларни протеин, кодиран *cfb* геном који је значајан фактор вируленције. CAMP фактор својом литичком активношћу доводи до стварања пора на осетљивим мембранама циљних ћелија. Због показаних способности везивања за Fc фрагмент иминоглобулина, слично као протеину А ГАС, означен је као протеин Б (104). Откривена су и његова везујућа својства за гликозилфосфатидилинитол везујуће протеине на циљним ћелијама, што указује да је адхеренција неопходан механизам за испољавање токсичног ефекта, који је описан и код других бактеријских врста са сличним токсинима. Код CAMP фактор дефицијентних сојева, није уочено смањење вируленције у поређењу са дивљим сојевима који продукују CAMP фактор. То доказује да CAMP фактор нема есенцијалну улогу у патогенези болести. Осим тога, утврђено је да код инвазивних инфекција, хемолитички пигмент компензује недостатак ефекта CAMP фактора као и *vice versa* (105). Тако на пример када

је дејство хемолитичког пигмента инактивисано плућним сурфактантом долази до експресије САМР фактора који надокнађује неактивност хемолитичког пигмента. Насупрот томе, код неонатуса код којег још није успостављена синтеза сурфактанта, хемолитички пигмент има доминантну улогу у патогенези. Овакав модел регулације генске експресије је карактеристичан за ГБС и означен је као двокомпонентни регулаторни систем (106).

У интеракцији са сфингомијелиназом *S. aureus-a*, САМР фактор индукује специфичну зону хемоллизе на крвном агару. Од открића 1944. године, овај облик појачања хемоллизе се користи као дијагностички идентификациони тест за ГБС у медицинској микробиологији (107).

### **1.5.17 Супероксид дизмутаза**

Поред већ поменутих фактора вируленције који имају заштитну улогу од ROS, ГБС поседује и  $Mn^{2+}$  зависну супероксид дизмутазу (СодА) која пружа заштиту, како од слободних, тако и имунски посредованих ROS. Овај ензим врши конверзију супероксидних анјона ( $O_2^-$ ) у кисеоник ( $O_2$ ) и водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), које даље метаболишу каталаза или пероксидаза. Ови ензими заједнички штите бактерије од оксидативног стреса током патогенезе инфекције. Као што је већ раније наведено, ГБС не поседује каталазу. Значај СодА код ГБС је приказана кроз експериментални модел миша, код кога су сојеви ГБС са инактивисаним геном за СодА били значајно осетљивији на дејство макрофага и имали смањено време преживљавања у крви и можданом ткиву од сојева којима је СодА нормално функционисао (108).

### **1.5.18 Биофилм**

Једна од битних одлика ГБС је способност колонизације и перзистенције у различитим нишама домаћина. Ова особина се испољава као резултат дејства бројних наведених фактора вируленције, међу којима је и способност адхеренције за различите типове ћелија и ткива. Ово представља добру базу за агрегацију бактеријских ћелија у већу сесилну организацију као што је биофилм, који представља значајан фактор вируленције у изазивању перзистентних и хроничних инфекција. Биофилм чине чврсто везане ћелијске јединице, слепљене екстрацелуларним матриксом полисахаридне структуре. Кључну улогу у формирању биофилма код ГБС, имају капсула и пили типа -2а (109). Поред тога, и фактори спољне средине имају значајну улогу у формирању биофилма. Утврђено је да хумана плазма доприноси ефикаснијем формирању биофилма на васкуларним катетерима, као и кисели рН (4.5) у вагиналном тракту који поспешује колонизацију и стварања биофилма ГБС сојева (109,110). Такође, показано је и да су одређени ST бољи продуктори биофилма, као што је ST17 (111).

### **1.5.19 Регулација генске експресије фактора вируленције**

Примарно место асимптоматске колонизације и перзистенције ГБС је ректовагинална регија жена у репродуктивном животном добу. Већину фактора вируленције које ГБС користи у процесу колонизације, као што су адхеренција и уравнотежен однос са локалним елементима имунског система домаћина, истовремено користи и за потенцијалну дисеминацију и изазивање обољења одраслих или новорођенчади. Неки сојеви поседују додатне факторе вируленције који им омогућавају веће могућности у дисеминацији, инвазији и оштећењу ткива. Као што је већ истакнуто, ГБС често своје факторе вируленције фино подешава у њиховој експресији у зависности од услова средине, за шта највише користи сигналне трансдукујуће системе, пре свега двокомпонентне регулаторне системе. Они се састоје од мембранског сензора хистидин киназе и одговарајућег регулатора који има ДНК везујуће/регулаторне способности. По препознавању екстерног сигнала на Н-терминалном крају, Ц-терминални трансмитерски домен хистидин киназе фосфорилише одговарајући регулатор на конзервираном региону активног места аспартатне резидуе, вршећи конформационе промене које доводе до везивања за циљно место на ДНК. Анализом генома ГБС, до сада је откривено између 17 и 21 двокомпонентних система, а за само 7 (CovR/S, DltR/S, RgfA/C, CiaR/H, FspR/S, LrdR/S и SaeR/S) је описан прецизан механизам деловања (112). Најбоље испитан двокомпонентни регулаторни систем код ГБС је CovR/S који је високо конзервиран. Познат је и као „кључни регулатор“ јер утиче на регулацију најбитнијих фактора вируленције. До сада је утврђено да регулише експресију преко 100 гена (113). Осим двокомпонентних система, ГБС поседује и једнокомпонентне транскрипционе регулаторе, као што су MtaR, RovS и RogB. Њих активирају мали молекули у цитоплазми или недовољно проучени екстерни средински сигнали. Додатно, ГБС поседује и одређене еукариотима сличне сигналне системе типа серин/треонин киназа које се преклапају и допуњују са одређеним двокомпонентним системима (114).

## **1.6 Обољења која изазива ГБС**

*Streptococcus agalactiae* је дуго био познат као изазивач маститиса крва и доводио до трајног престанка лактације. Као такав је детаљно описан и класификован у групу Б  $\beta$ -хемолитичних стрептокока. Тек 1938. године се спомиње као потенцијални изазивач хуманих обољења. Наиме, публикована су три случаја постпорођајних инвазивних обољења неонатуса са фаталним исходом (3). Веза између инвазивних обољења новорођенчади и нешто ређе одраслих особа, доказана је шездесетих година двадесетог века.

### **1.6.1 Асимптоматска колонизација и инфекције трудница**

Као што је претходно наведено, ГБС може представљати део асимптоматске колонизације ректогениталне регије жена у репродуктивном периоду. Преваљенција колонизације варира географски и креће се од 5% до 30% (115). Процењена средња

вредност колонизације трудница је 18%, од чега 98% изолата припада CPS типовима I-V (18). Колонизација трудница може бити интермитентна, а процењено је да од 17% до 28% оних код којих је колонизација уочена на почетку првог триместра ће имати колонизацију током целе трудноће и на порођају (116). Са друге стране, одсуство колонизације на почетку трудноће не значи да се она неће десити током другог или трећег триместра. Процена је да труднице колонизоване ГБС имају 1,21 већи ризик од превременог порођаја и компликација, док код оних којима је откривена ГБС бактериурија, ризик 1,98 пута већи (117). Што се самих трудница тиче, трудноћа јесте кључни фактор ризика за развој инвазивне ГБС инфекције жена које су дуго више заступљене као случајеви у односу на жене исте животне доби које нису трудне. Већина случајева се дешава пред крај трудноће односно током порођаја, иако нису ретки ни пост порођајни случајеви, где такође постоји повећани ризик са и без очигледних детектованих предиспонирајућих фактора (118). Глобална процена инциденце системских инвазивних болести узрокованих ГБС код трудница је 0,38 случаја на 1000 трудноћа, са стопом смртних случајева од 0,2%. За наведене случајеве у преко 50% су одговорни сојеви CPS типа Ia и III, док остатак углавном сачињавају типови V, Ib и IV (118). Наравно, у случајевима јављања инвазивне ГБС инфекције током трудноће, повећане су и шансе превременог и компликованог порођаја, као и сепсе неонатуса.

### 1.6.2 Неонаталне болести

*Streptococcus agalactiae* је препознат као водећи узрочник неонаталних бактеријских инфекција са високим стопама морталитета. Инвазивне неонаталне болести узроковане ГБС су подељене на рану неонаталну болест (енг. early onset disease - EOD), која се јавља у првих седам дана од рођења и касну неонаталну болест (енг. late onset disease - LOD) која се може јавити од седмог до 90-тог дана живота. Процењена инциденција неонаталних ГБС болести је 0,49 на 1000 живорођене деце, највећа у Африци (1,21) а најнижа у Азији (0,30). Инциденција EOD случајева износи 0,41, док је за LOD случајеве 0,26 (119). Међу сојевима који изазивају неонаталне болести, доминира CPS тип III који представља 61,5% свих изолата, док заједно са CPS типовима Ia, Ib, II и V покрива 97% свих изолата (119). Код случајева LOD, CPS тип III апсолутно доминира (>75%), док је код EOD такође највише процентуално заступљен, али уз CPS типове Ia, Ib и V (120). Фактори ризика за EOD представљају вагинално-ректална колонизација ГБС, бактериурија, дуготрајан и компликован порођај, прерана и пролонгирана руптура плодоваих овојака, нижа телесна тежина на рођењу, превремени порођај, интрапартална фебрилност и системска ГБС болест мајке (118). За разлику од EOD, код случајева LOD није јасно утврђена повезаност са одређеним факторима ризика, осим што се помињу превремени порођај и чешћа учесталост код новорођенчади црне расе (121). Трансмисија код EOD је вертикална, са мајке на новорођенче и може бити посредована: асцедентном инфекцијом из урогениталног тракта мајке; током вагиналног порођаја проласком кроз порођајни канал или током порођаја превременом руптуром плодоваих овојака и доласка у контакт са садржајем околине. Знаци болести се могу уочити одмах по рођењу или најчешће у року од 24 часа. Типичне клиничке манифестације су бактеријемја са последичном сепсом и пнеумонија, док су менингитис, инфекције зглобова, костију и меких ткива знатно ређе (119,122). Код LOD случајева, путеви трансмисије и фактори



ризика нису јасно установљени. Претпостављају се могућност вертикалне трансмисије са касним развојем клиничке слике, као и већег броја студија које указују на хоризонталне правце трансмисије како у болничким тако и ванболничким условима. Клиничка слика код LOD чешће се манифестује менингитисом, а затим бактеријемјом са сепсом, инфекцијом уринарног тракта, костију и зглобова, пнеумонијом и инфекцијама меких ткива (121). Стопа смртности неонаталних болести је висока и креће се од 5% до 10% код EOD и од 2% до 6% код LOD случајева (120).

### ***1.6.3 Болести одраслих и нетрудних пацијената***

Болести одраслих изазване ГБС, не рачунајући труднице, јављају се спорадично али су у порасту. У прилог томе говори студија обављена у 10 држава САД којом је утврђено да је 1990. године било 3,6 случајева на 100 000 становника обољења изазваних ГБС код одраслих особа (не рачунајући труднице), а непуних 20 година касније - 2007. године тај број је порастао на 7,3 случаја на 100 000 становника. Код већине пацијената су забележени коморбидитети у виду срчаних, неуролошких, бубрежних болести, обољења јетре, али и фактора ризика као што су: конзумирање алкохола, пушења, гојазност, и имунодефицијентна стања. Већи морбидитет је присутан у групи оболелих од дијабетеса, посебно код пацијената са оштећењима или инфекцијама коже и меких ткива (123,124). У старијој популацији особа преко 65 година, уочена је значајано већа инциденција инвазивних болести изазваних ГБС у поређењу са популацијом средње животне доби. Насупрот вредности учесталости за општу популацију од 7,3 случаја на 100 000 становника, код особа старијих од 65 година, студијом у САД је утврђена учесталост од 25 случајева на 100 000 одраслих. При томе је такође утврђено да је преко 40% свих инвазивних облика болести регистровано у популацији преко 65 година и то са значајно већом стопом морталитета (1,8 – 4,73 смртних исхода на 100 000 становника) у поређењу са вредностима утврђеним за општу популацију одраслих особа (0,54 смртних исхода на 100 000 становника)(125). Међу изолатима ГБС одраслих особа, било да се ради о колонизацији или манифестним болестима, доминира CPS тип V. Од клиничких манифестација инфекција ГБС код одраслих особа, највећи проценат чине: бактеријемја и последично сепса, уринарне и кожно / мекоткивне инфекције, као и пнеумонија (126).

## **1.7 Превенција, развој вакцине и терапија**

Мере превенције обољења новорођенчади ГБС уведене су 1973. године као одговор на повећање инциденције и висок степен смртности. Стратегија превенције је до данас више пута модификована и ревидирана (127). Интрапартална антибиотска профилакса (ИАП) за превенцију ГБС неонаталних обољења, довела је до редукције случајева EOD рођених од стране колонизованих мајки за 86% до 89% (128). У земљама које немају националне препоруке за ИАП, око 1,1% новорођенчади које роде колонизоване мајке, развију EOD, док је у земљама где се овакве препоруке и водичи спроводе, тај проценат је смањен на 0,03% (129). Препоруке ИАП се базирају на администрацији прве линије лечења, пеницилина или ампицилина најмање 4 сата пре порођаја. Као алтернатива код

пацијенткиња са алергијом на пеницилин, а без тежих манифестација у виду ангиоедема, анафилаксе, респираторног дистреса или уртикарије, могућа је примена цефазолина. Међутим, код пацијенткиња са анафилактичном манифестацијом преосетљивости на пеницилин, примењује се алтернативно клиндамицин интрапартално, уз неопходну претходну потврду антибиограма о осетљивости соја. У супротном се примењује ванкомицин (128). По тренутно важећим националним препорукама држава које примењују ИАП, примена се врши или на основу скрининга на присуство ГБС или на основу процене ризика за развој болести. Пример је Велика Британија, где су националне препоруке везане за процену ризика за примену ИАП, док САД, Канада, Аустралија, Нови Зеланд итд. примењују метод универзалног скрининга на присуство ГБС код трудница. Први водичи за скрининг и употребу ИАП су издати у Канади 1994. године, а нешто касније у САД 1996. године. Према последњој ревизији водича Америчког центра за контролу и превенцију болести из 2010. године, скрининг је базиран на изолацији ГБС из ректо-вагиналних брисева трудница и врши се између 36. и 38. гестационе недеље. ИАП се препоручује свим трудницама са позитивним резултатима на скрининг, као и оним трудницама које су током трудноће имале бактериурију са ГБС, или су имале претходне случајеве инфекција ГБС током трудноће или неонаталне болести посредоване ГБС (128). Ипак, и поред свих ревизија и побољшања техника детекције и профилактичких режима, инциденца ЕОД је постигла минимални плато и задњих година се одржава на истим вредностима учесталости (128). Са друге стране, скрининг и ИАП нису довели до смањења код LOD, те се учесталост ових случајева одржава стабилним у популацији. Шта више, готово 60 до 80% LOD случајева се јавља код неонатуса чије су мајке претходно на скринингу биле ГБС негативне. Управо недовољно познавање путева преноса је проблематично. Потенцијални узроци могу бити реколонизација вагиналне слузнице или *de novo* колонизација интрахоспитално, путем дојења или различитим другим хоризонталним путевима болничке и ванболничке колонизације (120,130).

Дуго очекивана алтернатива ИАП је развој ГБС вакцине за труднице. Иницијалне пробе полисахаридних некоњугованих ГБС вакцина нису пружале задовољавајући протективни имунски одговор. Користећи искуство стечено на производњи и примени других капсуларних вакцина (на пример пнеумококне вакцине), и код ГБС се прешло на тестирање и развој коњугованих полисахаридних вакцина, коришћењем тетанусног токсоида уз додатке одређених површинских протеинских адхезивних високо конзервираних антигена (131). *In silico* модел из 2015. године са предикцијом броја ГБС неонаталних случајева широм света и применом потенцијалне вакцине која би имала ефикасност од 80% и обухватом од 90% трудница, извршила би превенцију 107 000 случајева неонаталних смрти и мртворођености (132). Тренутно испитиване тровалентне коњуговане полисахаридне вакцине (CPS типови Ia, Ib и III) су показале добру толеранцију и значајно бољи протективни ниво заштите како мајки, тако и неонатуса. Тренутно две велике компаније развијају своје вакцине. Први GlaxoSmithKline (GSK) је спровео фазе 1 и 2 испитивања за тровалентну коњуговану полисахаридну CPS-CRM197 ГБС вакцину (CPS типови Ia, Ib и III), а обавља клиничка испитивања за пентавалентну вакцину (додатак још CPS типови II и V) (133). Компанија Pfizer је недавно објавила резултате о напретку испитивања њихове хексавалентне вакцине (CPS типови Ia, Ib, II, III, IV и V) у погледу безбедности и имуногености у фазама 1 и 2 (134). Од чисто протеинских вакцина заснованих на адхезивним молекулима ГБС, само је GBS-NN вакцина

произвођача MinervaX Inc. прошла прву фазу испитивања где је регистрована добра продукција антитела (135).

Осетљивост ГБС према пеницилину и осталим  $\beta$ -лактамским антибиотцима је и даље апсолутна. У Јапану су регистровани изолати ГБС са смањеном осетљивошћу на пеницилин *in vitro*. Механизам ове појаве почива на смањеној експресије пеницилин везујућег протеина 2х (енг. Penicillin-Binding-Protein - РВР 2Х) (136)(137). Пеницилин Г је свакако лек избора за лечење инвазивних болести, а као алтернативе код алергија на  $\beta$ -лактамске антибиотике су еритромицин, клиндамицин, флуорохинолони и ванкомицин. Ипак, са порастом учесталости изолације сојева ГБС резистентних на алтернативне антибиотике (првенствено еритромицин и клиндамицин, а ређе на флуорохинолоне), неопходно је претходно тестирање осетљивости *in vitro* на конкретан антибиотик пре примене истог (138,139). Проблем избора алтернативног антибиотика додато се компликује недавном регистрацијом првих изолата ГБС резистентних на ванкомицин (140).

Код инвазивних инфекција одраслих, прва линија терапије је наравно пеницилин Г, чији терапијски режим се подешава у складу са клиничком манифестацијом. Десетодневна терапија препоручује у лечењу: бактеријемиије, пнеумоније, пијелонефритиса, кожных и мекоткивних инфекција. Продужена терапија (минимум 14 дана) препоручена је за менингитис, остеомијелитис, ендокрадитис и вентрикулитис (барем 4 недеље). Синергистичка терапија са гентамицином је препоручена у иницијалном режиму 2 недеље код ендокрадитиса. Алтернатива пеницилину је ампицилин у режиму 2г/дневно (141).

Код неонаталних инвазивних болести, емпиријска терапија спроводи се комбинацијом ампицилина са аминогликозидом (гентамицин или амикацин). По добијању резултата антибиограма, може се остати у истом режиму (25мг/кг/доза/12сати ампицилина + 2.5мг/кг/доза/12сати гентамицина), или прећи на пеницилин Г (300 000 и.ј./кг и.в.) 7 до 14 дана. Код менингитиса и компликованих стања, може се продужити терапија по потреби, а код септичног артритиса, остеомијелитиса и ендокрадитиса препоручује се терапија и до 3 - 4 недеље (142).

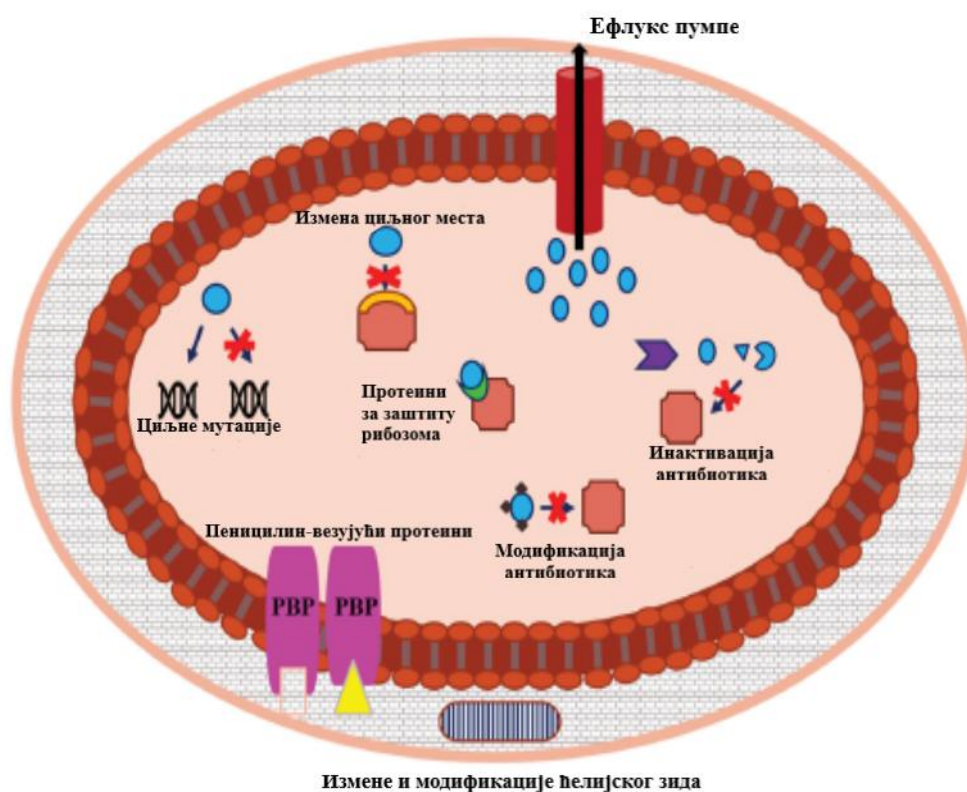
## 1.8 Резистенција на антибиотике

### 1.8.1 $\beta$ -лактамски антибиотици

$\beta$ -лактамски антибиотици (БЛА) су сложена група антибактеријских агенаса који у структурној формули садрже  $\beta$ -лактамски прстен. Могу се поделити на пеницилине, цефалоспорине, карбапенеме и монобактаме. Механизам деловања  $\beta$ -лактамских антибиотика је инхибиција синтезе пептидогликана. Ефекат се остварује везивањем  $\beta$ -лактамског прстена за ензиме синтезе пептидогликана. Сви биолошки активни молекули, који учествују у процесу синтезе пептидогликана налазе се на спољашњој страни цитоплазматске мембране бактерија и означени су као пеницилин-везујући протеини (енг. penicillin binding proteins – РВРs). Њихов број варира код различитих врста бактерија, а

могу да варирају и у погледу афинитета за везивање појединих БЛА. Инаktivација активности РВР доводи до заустављања синтезе пептидогликана и дестабилизације ћелијског зида. При томе се и даље одвија синтеза прекурсора пептидогликана који се нагомилавају, што на крају има за последицу активирање хидролаза и аутолизина. Активирани аутолизини доводе до оштећења пептидогликанског сакулуса и последичну смрт бактеријске ћелије (143).

Бактерије се супротстављају дејству БЛА применом три до сада описана механизма за резистенцију: ометање преноса БЛА кроз омотаче бактеријске ћелије и приступ РВР; смањен афинитет РВР за везивање појединих БЛА; и ензимска инаktivација БЛА цепањем  $\beta$ -лактамског прстена ( $\beta$ -лактамазе)(Слика 6).



Слика 6 - Механизми резистенције на антибиотике код ГБС (прилагођено из Hayes и сар. 2020.)

Као што је већ наведено, до сада нису изоловани сојеви ГБС резистентни на пеницилин и остале БЛА. Међутим, описани су сојеви са смањеном осетљивошћу на пеницилин. До смањења осетљивости на пеницилин долази као последица мутација на генима који кодирају синтезу појединачних РВР. Мутације у регионима за РВР су први корак ка потенцијалној резистенцији коју имамо прилике да видимо код рецимо *Streptococcus pneumoniae* (144,145). Мутације су до сада забележене у свим кључним

генима за PBP (PBP1a, -2a, -2b и -2x), од којих су најчешће супституције на PBP2x транспептидази (V405A и/или Q557E). Обзиром да се налазе близу високо конзервираног региона активног места ензима, сматра се да доводе до тренутне редукције осетљивости на пеницилин. Такође се претпоставља да би акумулацијом мутација у неком тренутку могло доћи до комплетне резистенције на пеницилин (146).

Први изолати ГБС са смањеном осетљивошћу на пеницилин, описани су 2008. године у САД. У наредном периоду, сличне појаве су уочене и у Канади, Јужној Кореји и Јапану (147,148,149). Опрез изазива податак да је у Јапану током 7 година уочен пораст учесталости изолације сојева ГБС са смањеном осетљивошћу на пеницилин са 2,3% 2005-2006. на 14,7% 2012-2013. године. Овај податак има још већу значајност ако се има у виду да је код 70% оваквих сојева регистрована истовремена резистенција на макролиде и флуорохинолоне (137).

### 1.8.2 Макролиди, линкозамиди и стрептограмини (MLS група)

Ова група антибиотика је хемијски врло разнолика, али блиска по механизму дејства. Лекови из ове групе се примарно користе за лечење болести изазваних Грам позитивним бактеријама (родови *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp. и *Enterococcus* spp.), али су такође ефикасни и у терапији болести које изазивају *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp. и *Chlamidia* spp (150).

Макролиди су грађени од 14- (еритромицин), 15- (азитромицин) или 16- чланог (спирамицин) лактонског прстена за који су везани неутралне или аминок шећерне групе. Макролиди свој антибактеријски ефекат остварују везивањем за 23S rRNK 50S субјединице бактеријског рибозома, блокирајући наставак синтезе протеина (150).

Линкозамиди немају лактонски прстен, већ се састоје од пиролидинског прстена и шећера пиранозе који су амидно везани. Линкомицин је природни производ који синтетише *Streptomyces lincolnensis*. Клиндамицин је дериват линкомицина који се добија супституцијом 7R хидроксилне група атомом хлора. До данас је синтетски или полусинтетски конструисано неколико стотина препарата, али су значајну примену остварили само линкомицин и клиндамицин. Иако хемијски различити од макролида, линкозамиди се везују непосредно уз везно место за макролиде, што објашњава зашто им је резистенција често укрштена. Клиндамицин се везује за А место рибозома и онемогућава позиционирање аминоксил-тRNK (151).

Стрептограмини су група цикличних пептидних антибиотика које производе врсте из рода *Streptomyces*, и претежно се сматрају резервним антибиотцима. Састоје се од две групе (А и Б) које појединачно имају бактериостатско дејство, а у случају комбинације испољавају бактериоцидно дејство (152).

Резистенција на макролиде је врло брзо детектована, свега 4 године по увођењу у клиничку праксу и данас је широко распрострањена (153). До сада су описана 3 бактеријска механизма избегавања дејства MLS групе антибиотика: 1. ефлукс пумпе; 2.

модификација циљног места на рибозомима и 3. ензимска инактивација антибиотика (Слика 5). Ефлукс пумпе и ензимска инактивација су специфични за одређени антибиотик и резултирају експресијом резистенције на поједине антибиотике MLS групе. Насупрот томе, механизам модификације циљног места рибозома, због преклапања зоне циљног места целе MLS групе, често резултира укрштеном резистенцијом. Фенотипски се оваква резистенција такође описује као MLS фенотип, који може бити конститутивна (сMLS) и индуцибилна (iMLS). Резистенција на 14 и 15-очлане макролидне антибиотике, фенотипски се означава као М фенотип, а резистенција само на линкозамиде L фенотипом. Експресија корезистенције на линкозамиде, стрептограмин А и одређене плеуромутилине се означава као LSA односно LSAP фенотип (154).

Најчешћи механизам резистенције на макролиде је метилација циљног места на рибозомима, посредована метилтрансферазом, коју кодирају бројни *erm* гени (енг. erythromycin ribosome methylation) (Табела 4). Метилазе додају једну или више метил групе на аденинске резидуе везног места (23S rRNK 50S субјединице бактеријског рибозома), чиме доводе до укрштене MLS резистенције. Експресија овог облика резистенције може бити антибиотик зависна односно индуцибилна, или антибиотик независна односно конститутивна (150,153). До сада је описано преко 40 варијанти *erm* гена. Код ГБС је најзаступљенији *ermB*, а нешто ређе су заступљени *ermA* и *ermTR* (155). Већина *erm* гена је индуцибилна и њихова транскрипција се одвија у присуству 14- и 15-очланих макролида. Код ГБС је најчешће заступљен MLS фенотип, при чему резистенцију на еритромицин индукује клиндамицин (156). Овај фенотип се детектује тестом са два антибиограм диска (еритромицин и клиндамицин) постављена на растојању од 10-12 mm. Позитиван резултат детекције iMLS фенотипа, означава зона инхибиције у облику латиничног слова „D“ око диска клиндамицина (157).

Ефлукс пумпе су активни мембрански транспортери различитих материја па и антибиотика, који своју функцију обављају или путем електрохемијског градијента или користећи енергију АТП (аденозин-3-фосфата). Постоје две класе ефлукс пумпи које могу узроковати резистенцију на антибиотике: 1. суперфамилија транспортера АТП-везујућих касета, АБЦ (енг. АТР-binding cassette - ABC) и 2. суперфамилија главних извршитеља, МФС (енг. major facilitator superfamily - MFS) (150).

Макролидне ефлукс пумпе (Меф) код ГБС кодирају одговарајући гени *mefA* и *mefE*, који припадају МФС фамилији. Овај транспортни систем за своје покретање користи секундарне активне транспортере. Ефлукс покреће протонски проток, а резистенција се јавља као последица избацивања 14- и 15-очланих макролида. Овакав ефлукс модел се експримира као М фенотип (150). АБЦ суперфамилија се може поделити у 8 подфамилија, које се обележавају великим латиничним словима А-Н. Већина подфамилија АБЦ суперфамилије може да избаци антибиотике у екстрацелуларни простор. За АБЦ Ф подфамилију, коју кодирају *mre* и *lsa* гени, доказано је да могу имати алтернативну улогу у настанку резистенције, тако што се вежу у близини циљног места на рибозому и „изгурају“ молекул антибиотика, чиме се стварају услови за несметан наставак синтезе пептидног ланца (158,159). Овакав вид резистенције ГБС на макролиде, линкозамиде и стрептограмин А и Б остварује се експресијом *lsaC* и *lsaE* гена (158). Еритромицин осетљиви сојеви ГБС, који су резистентни на клиндамицин и истовремено резистентни на

стрептограмин А су први пут откривени на Новом Зеланду 2004. године и означени као LSA фенотип (160). Нешто касније је утврђено да ови сојеви имају укрштену резистенцију на плеуроумутилине, па је и ознака фенотипа промењена у LSAP. Амерички CDC је ретроспективном анализом сојева утврдио преваленцу овог фенотипа од 0,31%, од којих је 75% носило *lsaC* ген. Са друге стране, *lsa E* ген је детектован код 18% сојева L фенотипа, увек у комбинацији са другим генима резистенције, и да се његова локализација налази на плазмиду (161).

Ензимска модификација антибиотика ове групе доводи до смањења афинитета везивања циљно место на 50S субјединици рибозома. Грам позитивних бактерија најчешће се детектује активност фосфотрансферазе и естеразе. Међутим, код ГБС доминантну улогу има нуклеотидилтрансфераза, коју кодирају је *lnu* гени. Експресијом *lnuB* гена код ГБС, долази до продукције нуклеотидитрансферзе која врши аденилацију хидроксил групе на позицији 3 линкомицина и клиндамицина, инактивишући их (162). Изоловање оваквих сојева ГБС, описана је у различитим деловима света, и претпоставља се да у комбинацији *lnuB* са *lsaC* и *E* генима, долази до формирања LSAP фенотипа (161).

Проценти изолације сојева ГБС резистентних на MLS групу антибиотика расте у целом свету. Објављене вредности су разнолике и варирају од 1% у Гани, преко просечних 22,5% вредности у Ирској, до изузетно високих 74% резистентних сојева ГБС на еритромицин у Кини (163,164,165). Слична ситуација је и по питању клиндамицина, где објављени проценти варирају од 1,8% у Аргентини, преко просечних 21,3% у Ирској, до 65,6% на Тајвану (166,165,167).

### 1.8.3 Тетрациклини

Тетрациклини свој бактериостатски ефекат обављају везивањем за 30S субјединицу рибозома, блокирајући елонгацију полипептидног ланца (168). Резистенција на тетрациклине је кодирана *tet* генима, који се налазе на мобилним генетским елементима. До данас је откривено преко 70 различитих *tet* гена. Механизми резистенције могу бити: 1. активност ефлукс пумпи, 2. синтеза рибозом-заштитних протеина, 3. ензимска инактивација и 4. активирање још увек недовољно разјашњеног механизма кодираног *tetU* геном. Међу врстама рода *Streptococcus* детектоване су ефлукс пумпе кодиране генима: *tetK*, *L*, *40*, *AB46*, као и гени који кодирају заштитне протеине рибозома: *tetM*, *O*, *Q*, *S*, *T*, *W* и *32*. За ГБС су карактеристични ефлуксни *tetK* и *L* гени, као и рибозом-заштитни гени *tetM* и *O* (169). Ефлуксне пумпе за тетрациклине припадају МФС фамилији мембранских протеина који евакуацију тетрациклина обављају путем измене протона за тетрациклин-катјон комплекс (170). Гени за ефлукс пумпе *tetK* и *L* су превасходно локализовани на трансмисибилним (коњугативним) плазмидима, који имају могућност интеграције у хромозом или веће плазмиде (169).

Рибозом-заштитни протеини TetM и O су најчешћи медијатори резистенције на тетрациклине код ГБС. Они врше ослобађање (избацивање) молекула тетрациклина са рибозомског А везног места, омогућавајући тако следећој аминоксил-tRNK да се веже и да се се веже за позицију А и настави елонгацију пептидног ланца (171). Иако се

тетрациклони не користе у терапији ГБС, надзор над њима се врши због праћења њихових преносних генетских елемената који често са собом носе и генске елементе резистенције на MLS групу и хлорамфеникол (169). Повезаност *ermB* гена са *tetM* геном (примарно доминантним носиоцем генске основе резистенције хуманих сојева), или са *tet O* геном (ређим у хуманој популацији а чешћим у животињској) указује на хоризонтални генски трансфер основа резистенције међу ГБС сојевима (172). Ова повезаност се огледа кроз заједнички пренос гена резистенције путем мобилних транспозона и брзу епидемијску пропацију резистентних сојева. Због прекомерне и неодговарајуће употребе тетрациклина који доводи до селекције резистентних генотипова ГБС, стопа резистенције на тетрациклин је свуда у свету веома висока (>80%) (173).

#### 1.8.4 Флуорохинолони

Ова група антибиотика широког спектра дејства се примарно користи у лечењу респираторних и урогениталних инфекција. Прву генерацију чине норфлоксацин и ципрофлоксацин, другу L-изомер офлоксацина, левофлоксацин, док трећу генерацију представљају моксифлоксацин и гатифлоксацин (174). Антибактеријски ефекат испољавају ометајући ензимске процесе репликације и транскрипције бактеријске ДНК, везујући се за топоизомерезу тип II, ДНК гиразу и топоизомеразу IV, што доводи до инхибиције њихове улоге у процесу контроле суперувртања и одмотавања ДНК. Поремећај овог процеса доводи до оштећења ланца ДНК и на крају до смрти бактеријске ћелије. ДНК гиразу чине две субјединице GyrA и GyrB, а топоизомеразу IV хомологне субјединице ParC и ParE (175).

Резистенција на флуорохинолоне се јавља у виду ефлукса антибиотика или акумулације мутација на генским локусима који кодирају субјединице гиразе и топоизомерезе. Акумулиране мутације доводе до успостављања детерминишућег региона хинолонске резистенције (енг. quinolone resistance determining regions - QRDRs). Код ГБС мутације се обично јављају у генима *gyrA* (најчешће супституција Ser-81-Leu) и *parC* (најчешће супституција Ser-79-Phe), што за последицу има смањење афинитета флуорохинолона за циљно место (176). Наведене мутације и механизми се јављају код већине сојева код којих је детектована резистенција на флуорохинолоне, док је ефлукс до сад описан само у једном случају, где се резистенција фенотипски јављала само на норфлоксацин (177). Први детектовани изолати резистентни на ову групу антибиотика, описани су у Јапану 2003. године. Имали су мутације на генским локусима *gyrA* и *parC* и врло брзо су се пропагирани достигавши 43,6% од укупног броја изолованих сојева у Јапану (178,179). Први документовани случајеви у Европи објављени су у Француској 2008. године. Имали су мутацију на *parC* гену, нису се нарочито брзо ширили, задржавши проценат резистентних изолата на 1,5% са укрштеном резистенцијом на макролиде (180).



### 1.8.5 Аминогликозиди и гликопептиди

Иако нису лекови првог избора, аминогликозиди (гентамицин) и гликопептиди (ванкомицин) се према протоколима примењују у лечењу инвазивних клиничких ентитета изазваних ГБС. Гентамицин се даје у синергистичком режиму са пеницилином или ампицилином у емпиријској терапији EOD, ендокардитиса или инфекцији зглобова (181). Међутим, оправданост употребе гентамицина је под знаком питања, јер осим емпиријских запажања појединих клиничара, синергистички ефекат није доказан у *in vitro time-kill* тестовима. Имајући у виду нефротоксичност гентамицина, све је ређа примена поменутих протокола у лечењу инвазивних ГБС обољења (182). Ванкомицин се такође примењује само као последња терапијска опција инвазивних обољења и ИАП-а (181).

Гентамицин је бактерицидни антибиотик, који везивањем за А место 16S rRNA на 30S субјединици рибозома прекида синтезу протеина (183). Ванкомицин учествује у инхибицији синтезе пептидогликана Грам позитивних бактерија, тако што блокира терминалне аминокиселине пептидног ланца и онемогућава транспептидацију, а секундарно и трансгликозилацију везујући се за и шећерне резидуе (184).

ГБС као и остале Грам позитивне бактерије имају урођену резистенцију ниског нивоа на гентамицин, због отежаног пролаза релативно великог молекула гентамицина кроз структуре ћелијског зида. Поред тога, детектована је и резистенција високог нивоа узрокована синтезом бифункционалног инактивирајућег ензима б'-ацетилтрансфераза-2'-фосфотрансферазе (AAC-6'-APH-2'), који је кодиран *aacA-aphD* геном (185). Први забележени случај резистенције ГБС на гентамицин високог нивоа, објављен је у Француској 1987. године. Међутим, заступљеност ГБС сојева резистентних на гентамицин високог нивоа задржала се до данас на 0,3% (186).

Резистенција на ванкомицин је посредована синтезом пептидогликанских прекурсора са измењеним резидуама, односно циљним местима за ванкомицин. Ове измене врше неколико различитих ензима, од којих код ГБС највећи значај има ензим који мења терминалну секвенцу кратких пептида из D-Ala-D-Ala у D-Ala-D-Ser. Ген који кодира синтезу овог ензима код ГБС означен је као *vanG* ген. То је први документовани инсерциони елемент који носи овакву генску основу резистенције роду *Streptococcus* (187).

### 1.8.6 Хлорамфеникол

Механизам дејства хлорамфеникола је инхибиција синтезе протеина, специфичним блокирањем 50S субјединице бактеријског рибозома. Резистенција на овај антибиотик је посредована активношћу ензима хлорамфеникол ацетилтрансферазе, коју кодира *cat* ген. Дејством хлорамфеникол ацетилтрансферазе долази до супституције -ОН групе у молекулу хлорамфеникола ацетил резидуом. Тако промењен молекул хлорамфеникола има мањи афинитет везивања за циљно место на 50S субјединици рибозома, што доводи до смањења осетљивости бактеријских ћелија на овај антибиотик. Код хлорамфеникол

Табела 4 - Механизми резистенције на антибиотике код ГБС

Механизам		Ензими	Модификације
Класа антибиотика	Механизам	Ензими	Модификације
MLS група	Ефлуке пумпе	<i>ermB</i>	Модификације
	Метилазе	<i>ermA</i> <i>ermTR</i>	Модификације
Тетрациклини	АБЦ транспортери	<i>IsaC</i> <i>IsaE</i>	Модификације
	Метилација	<i>mefA/E</i>	Модификације
Флуорохинолони	Тетрациклини	<i>tetK</i> <i>tetL</i>	Модификације
	Флуорохинолони	<i>tetM</i> <i>tetO</i>	Модификације
β - лактами	Флуорохинолони	У регионима гена за топоизомеразе, ДНК гиразу и топоизомеразу IV	Модификације
	β - лактами	У регионима гена за РВР, посебно РВР2х	Модификације
Аминогликозиди	АБЦ транспортери	<i>IsaC</i> <i>IsaE</i>	Модификације
	Метилација	<i>mecA</i>	Модификације
Гликопептиди	АБЦ транспортери	<i>IsaC</i> <i>IsaE</i>	Модификације
	Метилација	<i>mecA</i>	Модификације
Хлорамфеникол	АБЦ транспортери	<i>IsaC</i> <i>IsaE</i>	Модификације
	Метилација	<i>mecA</i>	Модификације

резистентних ГБС сојева детектовано је присуство *cat* гена на хромозому (интеграција одговарајућег транспозона) или на плазмиду (188).

## 1.9 Оксидативни стрес и редокс односи

### 1.9.1 Основе редокс процеса

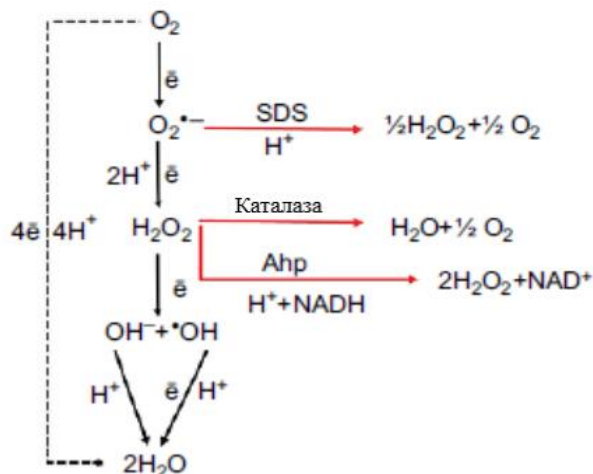
Аеробни организми користе молекуларни кисеоник за своје животне процесе, као што су респирација или оксидација хранљивих материја у циљу обезбеђивање енергије за биолошке процесе. При томе, природно настају кисеонични међупродукти, као што су супероксидни анјон радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) и високо реактивни хидроксил радикал ( $HO^{\cdot}$ ), који могу снажно реаговати са другим молекулима унутар ћелије. Хемијски процеси у којима један молекул предаје свој електрон другом молекулу назива се оксидација. Супротно томе, када неки молекул прима електрон од другог молекула, такав процес називамо редукијом молекула. Током трансфера електрона, односно процеса оксидације и редукије молекула, може доћи да настанка нестабилних молекула који могу даље дестабилизovati: мембранске липиде, различите биолошки активне протеине или молекуле ДНК. Молекули који имају тенденцију да додају своје неспарене електроне другим молекулима са циљем његове трансформације се називају прооксидантима, тј. слободним радикалима. Са друге стране, ради регулације оваквих природних процеса, постоје молекули који имају способност преузимања ових неспарених електрона од оксиданата и тиме да заштите трансформацију биолошки важних молекула и потенцијалног оштећења ћелије. Такви заштитни молекули се називају антиоксидансима, а биолошка равнотежа између прооксиданаса и антиоксиданаса означава се као редокс равнотежа (189,190).

### 1.9.2 Настанак слободних радикала код бактерија

Слободни радикали, односно пуним именом реактивни кисеонични радикали - РОС (енг. reactive oxygen species) су молекули са једним или више неспарених електрона, као што су: супероксидни радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), пероксидни радикал ( $ROO^{\cdot}$ ), хидроксилни радикал ( $HO^{\cdot}$ ), водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), алкоксилни радикал ( $RO^{\cdot}$ ), азот оксидни радикал ( $NO^{\cdot}$ ) и синглетни кисеоник ( $^1O_2^{\cdot}$ ) (191). Продукција РОС се заснива на природним механизмима респирације и оксидације током метаболизма бактеријске ћелије, тј. ендогено. Такође, РОС могу настати и екзогено излагањем физичким средствима, као што су јонизовано зрачење, ултравиолетно (УВ) зрачење и исушивање или бројним хемијским средствима (нпр. митомицин Ц). У зависности од локализације продукције и концентрације, РОС могу имати физиолошке или патолошке улоге по ћелију (192).

Аеробни микроорганизми користе неполарни молекул кисеоника ( $O_2$ ) у својим биохемијским процесима. Он брзо и лако дифундује путем воде кроз биолошке мембране и када се нађе у бактеријској ћелији учествује у процесу оксидативне фосфорилације и

продукцији аденозин-3-фосфата (193). Процес ослобађања и везивања енергије се заснива на редукцији  $O_2$  у молекуле воде, током чега настају супероксидни радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ), водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) и високо реактивни хидроксилни радикал ( $HO^{\bullet}$ ) (Слика 7). Трансфером енергије  $O_2$  настаје синглетни кисеоник ( $^1O_2^*$ ) (194). Хидроксилни радикал претежно настаје током Фентонове реакције ( $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}$ ) оксидације  $H_2O_2$  у присуству јона гвожђа ( $Fe^{2+}$ ). Реакција је зависна од Хабер-Вајсове реакције редукције јона гвожђа ( $Fe^{3+}$ ) супероксидним радикалом и настанком  $Fe^{2+}$ . Супероксидни радикал може да реагује са слободним  $Fe^{3+}$  или дестабилише/отпусти Фентон  $Fe^{2+}$  редукцијом са гвожђе-сумпорним ензимима (195).



Слика 7 - Настанак РОС и њихова редукција

### 1.9.3 Оксидативни стрес и ефекти РОС

Реактивни кисеонични радикали се физиолошки стварају као секундарни метаболити биолошких процеса, негде и циљно стварају, али у контролисаним условима у односу на антиоксидантне молекуле. Ћелија као високоорганизовани биолошки систем, настоји да одржи равнотежу између прооксиданаса и антиоксиданаса, тј. редокс равнотежу. Оног момента када дође до преваге у корист РОС, било због повећане продукције и/или смањења антоксиданаса, долази до оксидативног стреса (196). Осим већ наведених физичких и хемијских егзогених индуктора оксидативног стреса, у одбрани организма од бактерија, значајну улогу има и способност фагоцита да продукцију  $NADPH$  оксидазе и мијелопероксидазе (190). Такође, оксидативни стрес настаје и у склопу антибактеријског дејства појединих антибиотика, као што су: флуорохинолони,  $\beta$ -лактами и аминокликозиди, и то тако што својим дејством покрећу продукцију хидроксилног радикала кроз Фентонову реакцију (197,198). У прилог томе говори и смањен антибактеријски ефекат споменутих антибиотика при анаеробним условима, који се значајно повећава увођењем  $O_2$  или неког другог рецептора електрона (199). Конструисане наночестице своје ефекте такође експримирају индуковањем оксидативног стреса ћелија стварањем РОС на цитоплазматској мембрани (200). Интересантно је запажање да поједине бактерије саме по себи продукују РОС. Наиме поједини сојеви ГАС и *Streptococcus pneumoniae* продукују  $H_2O_2$  дејством лактат оксидазе и  $NADH$  пероксидазе.

Иако смисао продукције ових ензима није до краја разјашњен, претпоставља се да је то у циљу борбе са другим бактеријама за заузимање места у микросредини и за успостављање услова за сопствено размножавање и остварење инфекције (201,202).

Антибактеријски ефекат РОС на тиолне групе протеина, липиде мембрана и ДНК је директно зависан од дозе (203). Главно дејство  $H_2O_2$  на ДНК је модификација молекула пуринских и пиримидинских база, као и деструкција молекула дезоксирибозе. РОС доводи и до деструкције слободних нуклеотида, али и нуклеотида везаних у дволанчани хеликс ДНК. Додатно, ДНК могу оштетити и продукти липидне пероксидације коју такође индукују РОС (204). Високо реактивни  $HO^\bullet$  покреће липидну пероксидацију и оксидацију полинезасићених мембранских фосфолипида доводећи до озбиљних оштећења цитоплазматске мембране (205). Разлика у степену оштећења прокариотске и еукариотске цитоплазматске мембране јавља се као последица одсуства полинезасићених фосфолипида у цитоплазматској мембрани већине бактерија (206). Пероксидација липида се описује у склопу антибактеријског дејства неутрофила после фагоцитозе (207). Код прокариота се претпоставља да је супероксидни радикал главни медијатор пероксидације мембранских липида (208). Утицај РОС на структуру цитоплазматске мембране бактерија огледа се у деактивацији мембранских рецептора и протеина, као и у оштећењу функције ефлукса пумпи (206,209). Инактивација протеина настаје као последица: оксидације сулфхидрилних веза, редукцијом дисулфидних веза, оксидацијом метала и последичним конформационим променама аминокиселинских резидуа, интеракцијом са алдехидима, променом простетичне групе или метала, укрштеним би-протеинским везама или цепањем пептидне везе унутар пептидног ланца (190). Различите оксидативне промене се могу уочити код цистеина, метионина, тирозина, фенилаланина и триптофана. Карбонилација протеина је још један од механизма иреверзибилног оштећења протеина са губитком њихове функције. При томе они формирају велике протеинске агрегате који су резистентни на протеазомалну деградацију (210).

#### ***1.9.4 Антиоксидативни заштитни механизми***

Стратегија одбране бактерија од егзогеног и ендогеног деловања РОС заснована је на три механизма: 1) деловање у правцу смањења или потпуног престанка синтезе РОС, 2) неутрализације РОС дејством антиоксиданата и 3) механизам репарације оштећења изазваних деловањем РОС (193).

Антиоксидативни механизми бактерија почивају на дејству неензимских и ензимских антиоксидативних молекула који заједнички штите виталне молекуле и одржавају редокс равнотежу. Због тога се сврставају међу факторе вируленције бактерија. Они омогућавају бактеријама преживљавање у различитим биолошким нишама штитећи их од дејства имунског система домаћина који директним или индиректним утицајем подстиче интрацелуларну продукцију РОС. Елементарно гвожђе је један од најзначајнијих фактора у биохемијским процесима бактерија као што су: транспорт, складиштење и активација  $O_2$ , редукција рибонуклеотида, активација пероксида, транспорт електрона, итд. Отуда бактерије имају снажне механизме за фиксацију гвожђа, коришћењем мембранских рецептора и транспортера, али и цитоплазматским протеинима

бактериоферитину и феритину. Оба ова цитоплазматска протеина бактеријске ћелије имају ферооксидазну способност (190). Бактерије располажу бројним неензимским антиоксидансима. Поред већ споменутих, значајну улогу у успостављању редокс равнотеже имају: NADPH и NADH, хемолитични пигмент, глутатион (ГСХ), аскорбинска киселина (витамин Ц) и  $\alpha$ -токоферол (витамин Е) (190). У успостављању оксидативне равнотеже ГБС значајно место заузимају хемолитички пигмент и ГСХ. Познато је да су каротеноидни пигменти снажни антиоксиданси. Тако и пигмент ГБС штити ћелију од штетног дејства:  $H_2O_2$ , хипохлорида, супероксида и синглетног кисеоника, који заједно представљају медијаторе оксидативног праска које фагоцити користе за убијање бактерија (106). ГСХ је убиквитарни антиоксидант присутан код великог броја једноћелијских и вишећелијских биолошких система. Утврђено је да се код ГСХ у ћелијама ГБС налази у готово десет пута већој концентрацији него код других организама, што упућује на његову битну улогу у антиоксидативном заштитном механизму. Група Б стрептокока може сама да производи ГСХ путем путем бифункционалног ензима глутатион синтетазе коју кодира ген *gshAB* али и да преузима ГСХ из спољне средине. Већина других стрептокока може само да користи екстрацелиларни ГСХ прихватањем из спољне средине. Поређења ради, хумане ћелије продукују ГСХ посредством два ензима које кодирају три гена. Додатно, комплетан биосинтетски систем, кинетика и структура ензима се врло разликују у односу на хуману. То значи да би инхибитори стрептококне продукције ГСХ могли да буду врло корисни лекови са високим степеном селективности (211).

Бактерије такође поседују и ензимске антиоксиданте, коа што су: супероксид дизмутаза (СОД), каталаза, NADH оксидаза, алкил хидропероксид редуктаза и глутатион редуктаза. СОД врши конверзију супероксидног аниона у молекулски кисеоник и водоник пероксид, кога иначе даље метаболишу каталазе и/или пероксидазе (212). То су металоензими који се у односу на метални кофактор деле у три групе:  $Cu^{+2}/Zn^{+2}$ -SOD (СодЦ),  $Mn^{+2}$ -SOD (СодА) и  $Fe^{+2}$ -SOD (СодБ). Бактерије могу поседовати сва три типа, периплазматску СодЦ и цитоплазматску СодА и Б (213). Иако неке врсте рода *Streptococcus* могу имати више типова СОД, ГБС поседује само СодА, коју кодира истоимени ген. СодА представља главни ензимски механизам оксидативне заштите ГБС, обзиром да ова бактеријска врста не поседује каталазу. Осим заштите од оксидативног стреса, СодА омогућава преживљавање ГБС у фагоцитним ћелијама, као и дуготрајни опстанак у циркулацији током бактеријемие и сепсе у мишићем моделу (214).

Осим СОД, и Mn транспортери су битни како за одржање хомеостазе ћелије и функционисање СОД у условима ниског рН и оксидативног стреса. Показано је да је генска експресија *sodA* и *mntH* индукована дејством снижене вредности рН и оксидативног стреса. Активност СОД код ГБС је у директној зависности од концентарције  $Mn^{+2}$  у цитоплазми који обезбеђују транспортери (215). Иста експериментална запажања и односи су добијени и код сојева ГАС (216).

Бактерије продукују и две NADH оксидазе: 1. оксидазу која редукује  $O_2$  у  $H_2O_2$  и која је кодирана *nox1* геном, и 2. оксидазу која редукује  $O_2$  до воде без формирања реактивних интермедијера, коју кодира *nox2* ген (217). Код ГБС је доказано присуство и активност само *Nox2* NADH оксидазе, која има важну улогу у расту и размножавању ГБС у аеробним условима, као и у одговору на оксидативни стрес (218).

Алкил хидроксипероксидаза (AhpC) врши превођење пероксида у воду и алкохол. Поред ГБС, варијанте овог ензима поседују и ГАС и *Streptococcus mutans*, али не и *Streptococcus pneumoniae* (194). Иако је код ГАС доказано да се AhpC синтетише у условима снижене рН вредности и оксидативног стреса, код ГБС нису разјашњени услови синтезе овог ензима и његова улога у оксидативном стресу.

Тиол пероксидаза (Trx) припада фамилији пероксиредоксин антиоксидативних ензима који преузимају електроне из редукционог система тиоредоксин/тиоредоксин редуктазе (219). Геномске анализе су доказале да у одговору на оксидативни стрес код ГБС долази до индукције експресије *trx* гена, али детаљи овог механизма нису још увек разјашњени (220).

## **2. ЦИЉЕВИ**

- 2.1** Proceniti учесталост ректовагинална колонизације трудница сојевима ГБС
- 2.2** Proceniti учесталост раних и касних инвазивних инфекција одојчади изазваних сојевима ГБС
- 2.3** Испитати фенотипове и генотипове резистенције инвазивних и неинвазивних изолата ГБС на макролиде и тетрациклине, као и њихову осетљивост на друге класе антибиотика
- 2.4** Одредити капсуларне типове инвазивних и неинвазивних изолата ГБС
- 2.5** Утврдити повезаност различитих капсуларних типова инвазивних и неинвазивних изолата ГБС са фенотиповима и генотиповима резистенције на макролиде и тетрациклине
- 2.6** Испитати редокс статус инвазивних и неинвазивних изолата ГБС



### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1 Бактеријски сојеви и скрининг трудница

Студија је обухватила изолате групе Б стрептокока који су прикупљени у периоду од јануара 2015. до јануара 2020. године на територије Републике Србије и послати у Националну референтну лабораторију (НРЛ) за стрептокок. У студију су укључени: 1. сви инвазивни сојеви ГБС који су изоловани у наведеном периоду; 2. сви сојеви ГБС изоловани од трудница које су методом случајног узорка биле укључене у студију; 3. сви сојеви ГБС изоловани од пацијената са урогениталним инфекцијама, одабрани методом случајног узорка. Изолати су прикупљани из 14 микробиолошких лабораторија, од којих је седам регионалних завода за јавно здравље (Институт за јавно здравље Србије “др Милан Јовановић Батут“ и заводи у Чачку, Крагујевцу, Краљеву, Крушевцу, Сомбору и Војводине), две опште болнице (Ужице и Суботица), три гинеколошко-акушерске клинике у Београду (Клиника за гинекологију и акушерство, Клиничког центра Србије; Гинеколошко-акушерска клиника „Народни Фронт“; Клиника за гинекологију и акушерство, Клиничко-болнички центар „др Драгиша Мишовић“) и две терцијарне педијатријске клинике (Институт за здравствену заштиту мајке и детета Србије “Др Вукан Чупић“; Универзитетска дечја клиника Тиршова). Примарна изолација и идентификација инвазивних и неинвазивних ГБС сојева, извршена је током рутинског рада у дијагностичким микробиолошким лабораторијама. Сојеви су заједно са одговарајућим клиничким подацима слати у НРЛ за стрептокок на даљу анализу. Инвазивни сојеви су дефинисани као изолати из примарно стерилних регија (као што је крв, цереброспинална течност - ликвор и синовијална течност), док су неинвазивни сојеви прикупљени у оквиру скрининга асимптоматских трудница на колонизацију ГБС, као и изолата одраслих пацијената са урогениталним инфекцијама, а које нису трудне. Инвазивни сојеви су подељени на основу релевантних клиничких и демографских података медицинске документације на: 1. изолате неонатуса са раном неонаталном болести (ЕОД), 2. изолате неонатуса са касном неонаталном болести (ЛОД) и 3. изолате одраслих особа (>18 година). Процена инциденције инвазивних неонаталних инфекција рађена је на основу укупног броја пријављених случајева у посматраном периоду и званичних података о броју живорођених на одговарајућем подручју Републике Србије од 2015. до 2020. године, добијених из Извештаја Републичког завода за статистику (221).

Скрининг трудница на ректовагиналну колонизацију ГБС вршен је у гинеколошко-акушерским клиникама и регионалним болницама са гинеколошким одељењима. У ту сврху, узорковани су ректовагинални брисеви (flocked-swab, Soran, Италија) у периоду између 36. и 38. недеље трудноће. Брисеви су стављани у селективни Todd-Hewitt бујон са додатком колистина (10mg/L) и налидиксинском киселином (15mg/L) (Lim бујон, Veston Dickinson, САД) и инкубирани преко ноћи на 35°C. Lim бујон је коришћен ради селективног обогаћења подлога које омогућава лакшу култивацију ГБС, посебно из гениталних узорака. Добијена суспензија је засејавана на хромогену подлогу, chromID Strepto B (bioMérieux, Француска) под аеробним условима на 35°C током 24 часа, ради

изолације и идентификације ГБС. Позитивни узорци на ГБС су слати у НРЛ за стрептокок ради коначне идентификације, као и фенотипске и генотипске карактеризације.

## 3.2 Идентификација и конзервација сојева

Прелиминарна идентификација сојева је вршена у регионалним лабораторијама, а потврда у НРЛ за стрептокок. Поступак идентификације је био заснован на испитивању: морфолошких карактеристика бактерија (Грам позитивне коке, распоређене у ланцима), културелних особина (присуство бета хемоллизе на крвном агару), резистенције на бацитрацин (0,04U, BioRad, САД), позитивног САМР теста и позитивне реакције латекс аглутинације са групно специфичним Б антисерумом (SlidexStrepto B, bioMérieux, Француска).

Молекуларна потврда идентификације ГБС вршена је PCR реакцијом доказивања присуства специјес специфичног регулаторног *dltR* гена (79). Прајмери коришћени у ову сврху се налазе у Табели 7.

ГБС изолати су субкултивисани на Колумбија (Columbia) крвном агару (ККА) са додатком 5% овчије крви (bioMérieux, Француска) и инкубирани 18 до 24 часа, на температури од 36°C, у аеробним условима. Чиста култура одговарајућег изолата ГБС је конзервирана замрзавањем у медијуму од обраног млека (Skim milk, HiMedia, Индија) за чување бактеријских култура на -80°C (Heraeus Herafreeze HFU 586 Basic, Thermo Scientific, Немачка).

## 3.3 Фенотипско испитивање осетљивости на антибиотике

### 3.3.1 Диск дифузиони метод антибиограма

За испитивање осетљивости сојева групе Б стрептокока на антибиотике, коришћен је диск дифузиони метод антибиограма на основу препорука EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) 2020 (157). Коришћени су дискови пеницилина (10U), еритромицина (15µg), клиндамицина (2µg), тетрациклина (30µg), ванкомицина (5µg), хлорамфеникола (30µg), гентамицина високе дозе (500µg) и норфлоксацина (10µg) (BioRad, САД).

Колоније са свежје бактеријске културе одговарајућег соја ГБС на ККА, суспендоване се у физиолошком раствору (ФР). Густина инокулума је била еквивалентна турбидитету од 0,5 McFarland (McF). Суспензија је, помоћу стерилног бриса, засејавана на Милер Хинтон (Mueller Hinton) крвни агар (МХКА) са 5% дефибринисане коњске крви и 20mg/L β-NAD (β-никотинамид аденин динуклеотид) (bioMérieux, Француска). Након nanoшења дискова импрегнираних антибиотиком, извршена је инкубација у трајању од 18±2 сата, на температури од 35±1°C, у инкубатору са 5% CO<sub>2</sub> (4002628 CO<sub>2</sub> Incubator, Selecta, Шпанија). Пречници зона инхибиције раста су читавани у милиметрима, а категорије осетљивости су интерпретиране у складу са препорукама EUCAST стандарда (157). Категорије осетљивости испитиваних изолата на антибиотике су интерпретиране

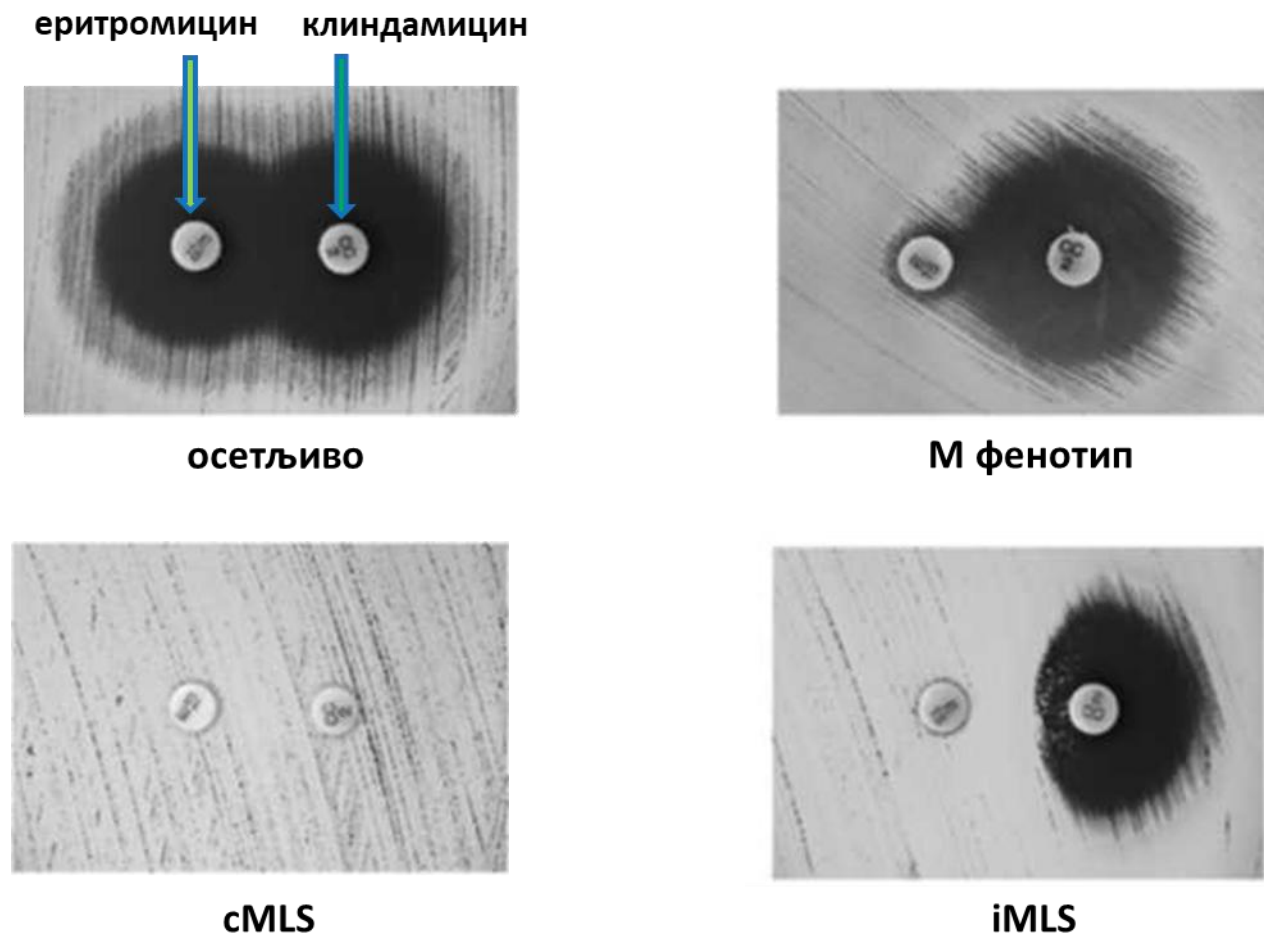
као С (осетљив; енг. susceptible), И (осетљив при већој концентрацији антибиотик; енг. susceptible, increased exposure) и Р (резистентан; енг. resistant) према EUCAST 2020 стандарду. За контролу процеса тестирања осетљивости на антибиотике, по EUCAST 2020 стандарду је коришћен *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 контролни сој (157).

### 3.3.2 Одређивање минималне инхибиторне концентрације антибиотика

Минималне инхибиторне концентрације (МИК) пеницилина, еритромицина и клиндамицина су одређиване тестом дифузије антибиотика у градијенту концентрације, односно коришћењем Е-тест трака (bioMérieux, Француска). Као и код припреме за диск дифузиону методу антибиограма, са свежје 18-часовне културе је припремана бактеријска суспензија одговарајућег ГБС соја у ФР, густине од 0,5 McF. Суспензија је брисом засејавана на МХКА са 5% дефибринисане коњске крви и 20mg/L  $\beta$ -NAD ( $\beta$ -никотинамид аденин динуклеотид) (bioMérieux, Француска). Након нашошења трачица импрегнираних антибиотиком у градијенту концентрације, извршена је инкубација у трајању од 18±2 сата, на температури од 35±1°C, у инкубатору са 5% CO<sub>2</sub> (4002628 CO<sub>2</sub> Incubator, Selecta, Шпанија). Вредности минималне инхибиторне концентрације антибиотика су читаване и резултати интерпретирани према препорукама EUCAST 2020 стандарда (157).

### 3.3.3 Одређивање фенотипова резистенције на MLS групу антибиотика

Фенотипови резистенције на макролиде су одређени у складу са EUCAST 2020 стандардом (157). На МХКА засејана је бактеријска суспензија у ФР одговарајућег соја ГБС, припремљена са свежје 18-часовне културе, густине од 0,5 McF. Након тога су нанети дискови са еритромицином (15 $\mu$ g) и клиндамицином (2 $\mu$ g) на растојању од 12-16 mm (од ивице до ивице диска) (BioRad, САД). Извршена је инкубација у трајању од 18±2 сата, на температури од 35±1°C, у инкубатору са 5% CO<sub>2</sub> (4002628 CO<sub>2</sub> Incubator, Selecta, Шпанија), након чега је одређиван фенотип резистенције на макролиде (Слика 7). Сојеви ГБС који су дефинисани као М фенотип резистенције на макролиде, односно резистентни на 14- и 15-члане макролиде, имали су пречник зоне инхибиције раста око еритромицина до 18 mm, док је зона око клиндамицина била преко 17 mm. За дефинисање конститутивног фенотипа MLS (cMLS) резистенције на макролиде, око дискова еритромицина и клиндамицина није било зона инхибиције раста. Код сојева са индуцибилном резистенцијом на клиндамицин (iMLS), потребно је постојање резистенције на еритромицин и смањене осетљивости на клиндамицин у присуству индуктора (макролида), односно индукција резистенције (феномен „D“ зоне између еритромицина и клиндамицина - Слика 8 - iMLS).



Слика 8 - Фенотипови резистенције на макролиде: сој ГБС осетљив на еритромицин и клиндамицин, М фенотип, конститутивни MLS (cMLS) фенотип, индуцибилни MLS (iMLS) фенотип са карактеристичном „D“ зоном око диска клиндамицина

### 3.4 Детекција гена резистенције на макролиде и тетрациклин ГБС

Сви сојеви ГБС су тестирани на присуство гена који кодирају резистенцију на тетрациклин, док су сојеви који су фенотипски резистентни на макролиде тестирани на гене који кодирају резистенцију на макролиде. Гени који одређују резистенцију на ове антибиотике су испитани применом мултиплекс PCR реакција, а присуство умножених продуката је детектовано методом хоризонталне електрофорезе у агарозном гелу и визуализовано УВ трансилуминатором. Резултати су сликани и сачувани системом за фотодокументацију

### 3.4.1 *Изолација ДНК*

Изолација ДНК вршена је термичком методом екстракције у TRIS-EDTA-SDS пуферу за лизу. Три до пет бактеријских колонија чисте културе ГБС после 18-часовног инкубирања је суспендовано у 200µl пуфера за лизу. Суспензија је прво инкубирана на собној температури 20 минута, а затим 5 минута на 90°C у термоблоку (Eppendorf, Немачка). Суспензија се затим центрифугира 5 минута на 6000 rpm (Hettich, Немачка), из које се супернатант пребацује у нову пластичну микротубицу и додаје 500µl апсолутног етанола уз инвертовање пар пута. Смеша се поново центрифугира 5 минута на 13000 rpm и супернатант се одстрањује, а натант (бактеријска ДНК) се након сушења ресуспендује елуционим пуфером. Изолована ДНК је била одмах употребљена или је чувана у фрижидеру на температури +4°C у периоду до 7 дана или у замрзивачу на -20°C у дужем временском периоду.

### 3.4.2 *Квантификација ДНК*

Мерење приноса ДНК је обављено коришћењем спектрофотометра (Biophotometer 8,5 Light Center Height, Eppendorf, Немачка). Концентрација изоловане ДНК је израчунавана на основу абсорпције светлости одређене таласне дужине (260nm) према Lambert Beer- овом закону.

### 3.4.3 *Детекција гена резистенције на макролиде и тетрациклин ГБС*

За потребе PCR реакција, коришћене су стерилне пластичне микротубице запремине 0,2ml (Eppendorf, Немачка). Гени који детерминишу резистенцију на макролиде (*mefA*, *ermA* и *ermB*), као и они који кодирају резистенцију на тетрациклине (*tetO*, *tetM*, *tetK*, и *tetL*) су претходно описани (Табела 5) као и методологија за њихову детекцију (222). За потребе детектовања резистенције на макролиде и тетрациклине, припремане су две реакционе смеше финалне запремине по 25µl, које су чинили по 12µl Taq PCR MasterMix (Qiagen, Немачка), по 1µl раствора 20mM одговарајућих прајмера за макролиде, односно тетрациклине (Invitrogen, САД), 5µl бактеријске ДНК и ad 25µl дејонизоване PCR воде (Qiagen, Немачка). Позитивне контроле су чинили узорци код којих је претходно истом методом доказано присуство једног или комбинације гена. Као негативна контрола уместо бактеријске ДНК, коришћена је дестилована PCR вода. Услови за мултиплекс PCR реакције за макролиде и тетрациклине је дата у Табели 6.

### 3.4.4 *Електрофореза у агарозном гелу*

Детектовање присуства амплификата PCR реакција обављано је електрофоретским раздвајање PCR продуката, на основу њихове величине и наелектрисања у 1,5% агарозном гелу. Смеша ТАЕ пуфера (40mM TRIS, 20mM сирћетне киселине, 1mM EDTA, pH=7,6) и

агарозе је кувана до тачке кључања ради хомогенизације. У течну агарозу је након делимичног хлађења додат 0,01% раствор етидијум бромида, интеркалирајуће боје, ради визуализације продукта. Агароза је затим разливана у калуп за гел, у који је претходно учвршћен пластични чешаљ, који служи за формирање бунарчића. Након стезања гела, чешаљ је извађен, а цео систем је уношен у кадицу за електрофорезу у коју је сипан ТАЕ пуфер до граничне линије. Бунарчићи су испуњени мешавином 8 µl PCR продукта и 2 µl пуфера за пуњење концентрације 5X (енгл. loading buffer), односно раствора бромфенол плавог (Fermentas, САД). Поред испитиваних PCR продуката на гел је наносен и ДНК стандард (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas, САД), односно смеша ДНК фрагмената познатих величина (енгл. ladder) у запремини од 5µl. Електрофореза је обављана при напону струје од 100V и јачини од 300mA у трајању од 60мин.

**Табела 5: Прајмери коришћени у молекуларним анализама ГБС сојева**

прајмер	секвенца 5'→3'	продукт (bp)	референца
<i>резистенција на макролиде</i>			
<i>mefA</i> Fw	CAA TAT GGG CAG GGC AAG	317 bp	222
<i>mefA</i> Rw	AAG CTG TTC CAA TGC TAC GG		
<i>ermA</i> Fw	CCC GAA AAA TAC GCA AAA TTT CAT	590 bp	
<i>ermA</i> Rw	CCC TGT TTA CCC ATT TAT AAA CG		
<i>ermB</i> Fw	TGG TAT TCC AAA TGC GTA ATG	745 bp	
<i>ermB</i> Rw	CTG TGG TAT GGC GGG TAA GT		
<i>резистенција на тетрациклине</i>			
<i>tetM</i> Fw	GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG	406 bp	222
<i>tetM</i> Rw	CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC		
<i>tetO</i> Fw	AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC	515 bp	
<i>tetO</i> Rw	TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA		
<i>tetL</i> Fw	TGG TGG AAT GAT AGC CCA TT	229 bp	
<i>tetL</i> Rw	CAG GAA TGA CAG CAC GCT AA		
<i>tetK</i> Fw	GTA GGA TCT GCT GCA TTC CC	155 bp	
<i>tetK</i> Rw	CAC TAT TAC CTA TTG TCG C		

### 3.4.5 Визуализација PCR продуката

Детекција PCR продуката је обављана просветљавањем гелова коришћењем УВ трансилуминатора (Kodak Gel logic 200 imaging system, САД). Појава траке одговарајућег броја базних парова указивала је на постојање датог гена у испитиваном узорку, а изостанак траке на његово одсуство. Систем за фотодокументацију (Kodak, 1D 3.6, САД) је коришћен за сликање гелова и складиштење добијених фотографија.

**Табела 6: Параметри извођења PCR метода коришћених за испитивање резистенције сојева ГБС**

*резистенција на макролиде*

Фаза	Т (°C)	Време (мин.)
1. Иницијална денатурација	94	5
2. Денатурација	94	1
3. Везивање прајмера	57	1,5
4. Екстензија	72	1,5
5. Финална екстензија	72	3
Број циклуса (од 2. до 4. фазе)	30	

*резистенција на тетрациклин*

Фаза	Т (°C)	Време (мин.)
1. Иницијална денатурација	93	3
2. Денатурација	93	1
3. Везивање прајмера	62	1
4. Екстензија	65	4
5. Финална екстензија	65	3
Број циклуса (од 2. до 4. фазе)	30	

### 3.5 Методе молекуларне типизације

#### 3.5.1 Капсуларна типизација и детекција хипервирулентног клона

У реакцији капсуларне типизације, коришћен је протокол молекуларне капсуларне типизације по Royart и сарадницима (223). Две реакционе смеше запремине по 25µl су чинили 12µl Taq PCR MasterMix (Qiagen, Немачка), по 1µl раствора одговарајућих прајмера (Invitrogen, САД) (Табела 7) концентрације 10mM (Ia, II, IV, V, VI, VII, VIII), 20mM (II) и 30mM (III), 5µl бактеријске ДНК и ad 25µl дејонизоване PCR воде (Qiagen, Немачка). У реакционим смешама као негативне контроле, уместо бактеријске ДНК, коришћена је дестилована PCR вода. Позитивне контроле су представљали узорци сојева претходно успешно доказане типизације PCR методом. Микротубе са реакционим смешама су стављане у термоблок PCR апарата (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Немачка), а услови под којима су се одвијале мултиплекс реакције ланчаног умножавања представљени су у Табели 8.

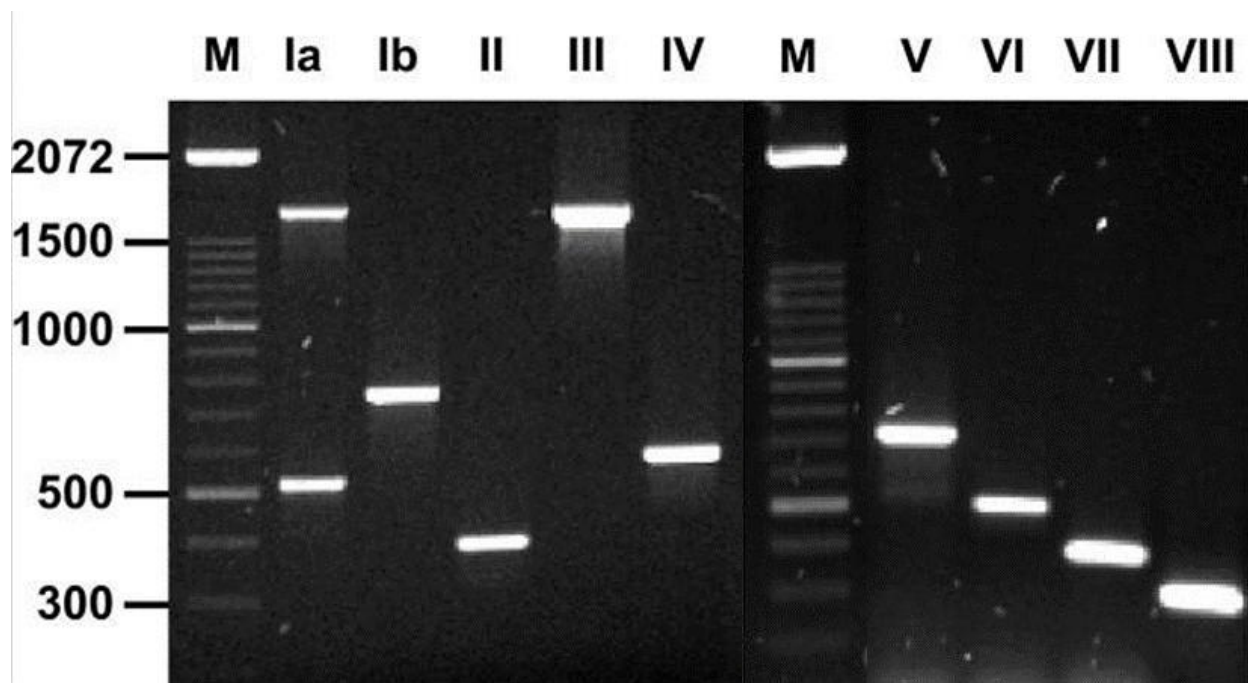
Одређивање присуства хипервирулентног клона ST17, вршено је PCR методом по Lamu и сарадницима, откривањем присуства *hvgA* гена који кодира истоимени адхезин (79). Услови за ову PCR реакцију су дати у Табели 7, а прајмери у Табели 8.

**Табела 7: Прајмери коришћени у молекуларним анализама ГБС сојева**

прајмер	секвенца 5'→3'	продукт (bp)	референца
<b>молекуларна потврда врсте</b>			
<i>dltR</i> Fw	TTG ACA GGT CTC TAT GAT TTA GTC	232bp	79
<i>dltR</i> Rw	GTC TGG TTC TCA GCC TAA TTC		
<b>капсуларна типизација микс I</b>			
<i>Ia</i> Fw	GGTCAGACTGGATTAATGGTATGC	1826 bp + 521 bp	223
<i>Ia</i> Rw	GTAGAAATAGCCTATATACGTTGAATGC		
<i>Ib</i> Fw	TAAACGAGAATGGAATATCACAAACC	770 bp	
<i>Ib</i> Rw	GAATTAACCTCAATCCCTAAACAATATCG		
<i>II</i> Fw	GCTTCAGTAAGTATTGTAAGACGATAG	397 bp	
<i>II</i> Rw	TTCTCTAGGAAATCAAATAATTCTATAGGG		
<i>III</i> Fw	TCC GAT CTA CAA CAG ACT CAT CC	1826 bp	
<i>III</i> Rw	AGT AAC CGT CCA TAC ATT CTA TAA GC		
<b>капсуларна типизација микс II</b>			
<i>IV</i> Fw	GGTGGTAATCCTAAGAGTGAACCTGT	578 bp	223
<i>IV</i> Rw	CCTCCCAATTCGTCCATAATGGT		
<i>V</i> Fw	GAGGCCAATCAGTTGCACGTAA	701 bp	
<i>V</i> Rw	AACCTTCTCCTTCACACTAATCCT		
<i>VI</i> Fw	GGACTTGAGATGGCAGAAGGTGAA	487 bp	
<i>VI</i> Rw	CTGTCCGACTATCCTGATGAATCTC		
<i>VII</i> Fw	CCTGGAGAGAACAATGTCCAGAT	371 bp	
<i>VII</i> Rw	GCTGGTCGTGATTTCTACACA		
<i>VIII</i> Fw	AGGTCAACCACTATATAGCGA	282 bp	
<i>VIII</i> Rw	TCTTCAAATTCGCTGACTT		
<b>детекција хипервирулентног клона ST17</b>			
<i>hvgA</i> Fw	ATA CAA ATT CTG CTG ACT ACC G	210 bp	79
<i>hvgA</i> Rw	TTA AAT CCT TCC TGA CCA TTC C		

Након свих PCR реакција, вршена је детекција присуства амплификата, односно добијених PCR продуката путем гел електрофорезе. На Слици 9 је приказан пример репрезентативног електрофореграма капсуларне типизације сојева ГБС по Royart и сарадницима (223).





Слика 9 - Електрофореграм 2% агарозног гела; мултиплекс PCR метода по Royart и сар. капсуларне типизације сојева ГБС: Микс 1: *cps Ia* – 1826bp + 521bp, *cps Ib* – 770bp, *cps II* – 397bp, *cps III* – 1826bp, *cps IV* – 578bp; Микс 2: *cps V* – 701bp, *cps VI* – 487bp, *cps VII* – 371bp, *cps VIII* – 282bp. М – ДНК стандард (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)

### 3.5.2 PFGE

Испитивање клоналних профила сојева ГБС и њихове повезаности, извршено је помоћу PFGE профилисања (224)(225). Са чисте 18-часовне културе, једна колонија одговарајућег соја ГБС инокулисана је у 5 ml ВНИ (енг. Brain heart infusion) бујона (bioMérieux, Француска) ради добијања ћелија у раној логаритамској фази раста које су исталожене центрифугирањем 1 минут на 13000 обртаја (Hettich, Немачка). Ћелије ГБС су испране са ЕЕТ пуфером ( $100\text{mmol L}^{-1}$  EDTA,  $10\text{mmol L}^{-1}$  EGTA,  $10\text{mmol L}^{-1}$  Tris-HCl, pH=8.0) и ресуспендоване у истом пуферу. Суспензија је загрејана до  $37^{\circ}\text{C}$  и мешана у једнаком волумену са такође загрејаном 2% SeaPlaque-GTG агарозом, након чега је мешавина калуљена у блокове на  $+4^{\circ}\text{C}$ . Формирани калупи су инкубирани преко ноћи у раствору ЕЕТ пуфера, 1% SDS (енг. Sodium dodecyl sulfate) и протеиназе К ( $0,5\text{ mg/ml}$ ) на  $50^{\circ}\text{C}$ . Калупи су након тога третирани два пута у  $0,1\text{ mmol L}^{-1}$  раствору PMSF (енг. phenylmethylsulfonyl fluoride) и додатним испирањем два пута у дестилованој води у трајању по 30 минута на хоризонталном шејкеру (MaxQ SHKA2506, Thermo Scientific, Немачка) на собној температури. Блокови су сечени и еквилибрисани с одговарајућим пуфером за рестрикциони ензим који ће се користити. Рестрикција је вршена са раствором одговарајућег рестрикционог ензима (*Sma*I 20U/100nl пуфера) 3 сата на  $30^{\circ}\text{C}$ . Реакција је заустављена стоп раствором ( 40% сахароза,  $10\text{ mmol L}^{-1}$  EDTA, 0,01% бромфенол плаво,

pH=8.0). Исечени калупи су нанешени на 1,2% агарозни гел и подвргнути пулној електрофорези (2015 Pulsafor, LKB instruments, Врома, Шведска) у трајању од 15 сати, на 300V на температури од 9°C, са променом пулсних термина са 8 на 19 сек.

**Табела 8: Параметри извођења PCR метода коришћених за карактеризацију сојева ГБС**

*молекуларна потврда врсте*

Фаза	T (°C)	Време (мин.)
1. Иницијална денатурација	95	10
2. Денатурација	95	1
3. Везивање прајмера	56	1
4. Екстензија	72	1,5
5. Финална екстензија	72	10
Број циклуса (од 2. до 4. фазе)	40	

*капсуларна типизација*

Фаза	T (°C)	Време
1. Иницијална денатурација	94	5 мин.
2. Денатурација	94	45 сек.
3. Везивање прајмера	58	45 сек.
4. Екстензија	72	2 мин.
5. Финална екстензија	72	5 мин.
Број циклуса (од 2. до 4. фазе)	35	

*детекција хипервирулентног клона ST17*

Фаза	T (°C)	Време (мин.)
1. Иницијална денатурација	95	10
2. Денатурација	95	0,5
3. Везивање прајмера	53	0,5
4. Екстензија	72	1
5. Финална екстензија	72	10
Број циклуса (од 2. до 4. фазе)	40	

Гел је финално бојен 0,01% раствором етидијум бромидом, а за одређивање величине молекуларних профила, коришћени су маркери Ламбда фагне конкатемере (Lambda PFG Ladder, New England Biolabs, САД) са фрагментима познатих величина (енгл. ladder).

### **3.5.3 Визуализација PFGE и обрада профила**

Детекција PFGE профила је обављана просветљавањем гелова коришћењем УВ трансилуминатора (Kodak Gel logic 200 imaging system, САД). Систем за фотодокументацију (Kodak, 1D 3.6, САД) је коришћен за сликање гелова и складиштење добијених фотографија. Добијени профили су анализирани коришћењем софтвера BioNumerics software v7.6 (Applied Maths, Белгија). За упоређивање PFGE профила примењен је Dice коефицијент сличности, помоћу кога је конструисан и дендрограм сличности применом методе груписања непондерисаних парова са аритметичким просеком (UPGMA) са коефицијентом толеранције од 1,5%. Изолати чија је сличности била изнад 80% сматрани су уско повезаним, односно удруженим у један PFGE кластер. Кластери су садржали најмање по три изолата ГБС, док су групе од два изолата сличних профила удруживани у мале PFGE групе.

## **3.6 Одређивање параметара редокс статуса**

За потребе одређивања параметара редокс статуса сојева ГБС, припремани су бактеријски лизати сојева из којих су спектрофотометријским методама мерени конкретни параметри.

### **3.6.1 Припрема лизата за спектрофотометријска мерења**

Са чисте 18-часовне културе одговарајућег соја ГБС на ККА, стерилном езом је узимана једна колонија ГБС и инокулисана у 3 ml ВНИ бујона и инкубирани 18 часова на  $35\pm 1^\circ\text{C}$ , у инкубатору са 5%  $\text{CO}_2$  (4002628  $\text{CO}_2$  Incubator, Selecta, Шпанија). Након инкубације, бујони су центрифугирани 5 минута на 5000 обртаја (Hettich, Немачка), након чега је супернатант пипетиран. Бактеријске ћелије у натанту су три пута испиране у фосфатном пуферу (pH=7) и финално ресуспендоване у истом пуферу у волумену од 1,5 ml. Лизирање ћелија је обављено сонификацијом ултразвучном иглом (Hielscher, Немачка) на леду у трајању од 2 минута (са режимом од по 30 сек. сонификације и 15 сек. паузе). Добијени лизати су аликвотирани и чувани на  $-80^\circ\text{C}$  до коришћења за анализе (226).

### **3.6.2 Одређивање концентрације протеина**

Мерење концентрација протеина у узорцима бактеријских лизата сојева ГБС, изведено је спектрофотометријском методом по Брадфорду (227). Спектрофотометријско читавање (Pharmacia 4050 UltroSpec II UV-Vis spectrophotometer, LKB, Шведска) апсорбанце узорака је вршено у видљивом делу спектра на таласној дужини  $\lambda=595\text{ nm}$ . Стандардна права је конструисана на основу читавања апсорбанци стандарда познатих концентрација протеина. Концентрације протеина у узорцима бактеријских лизата сојева

ГБС су добијене линеарном регресијом на основу стандардне праве и изражене као милиграми протеина по милилитру бактеријског лизата [mg/ml].

### **3.6.3 Одређивање тоталног оксидативног статуса**

Мерење тоталног оксидативног статуса (ТОС) бактеријских лизата сојева ГБС, вршено је коришћењем спектрофотометријске методе по Ерелу (228). Метода се заснива на оксидацији феро јона ( $\text{Fe}^{2+}$ ) у фери јон ( $\text{Fe}^{3+}$ ) у присуству различитих оксиданата у киселој средини и мерења концентрације  $\text{Fe}^{3+}$  јона бојеним индикатором ксиленол-оранжом. Реакциона смеша се састојала од 10 $\mu\text{l}$  узорка бактеријског лизата, 166 $\mu\text{l}$  реагенса 1 (кисели раствор ксиленол-оранжа у сумпорној киселини, концентрације 25 mmol/l, уз додатак глицерола и натријум хлорида) и 8 $\mu\text{l}$  реагенса 2 (кисели раствор Морове соли ( $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ ) у сумпорној киселини, концентрације 25 mmol/l, уз додатак орто-дианизидина). Смеша је инкубирана 10 минута на 37°C, а апсорбанца очитана на  $\lambda=560$  nm. За стандардизацију методе коришћен је водени раствор водоник пероксида у концентрацијама 0-100  $\mu\text{mol/l}$ . Добијени резултати су изражени у јединицама  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  еквивалената по милиграму протеина бактеријског лизата одговарајућег соја ГБС [ $\mu\text{mol/H}_2\text{O}_2$  еквивалената/mg протеина].

### **3.6.4 Одређивање тоталног антиоксидативног статуса**

Мерење тоталног антиоксидативног статуса (ТАС) бактеријских лизата сојева ГБС, вршено је коришћењем спектрофотометријске методе по Ерелу (229). Метода се заснива на способности антиоксиданата у узорку да инхибирају формирање АБТС $\cdot^+$  радикал катјона који настаје оксидацијом АБТС (2,2'-азино-ди-(3-етилбенз-тиазолин-сулфонат)) у киселој средини. Реакциона смеша се састојала од 10 $\mu\text{l}$  узорка бактеријског лизата, 150 $\mu\text{l}$  реагенса 1 (ацетатни пуфер концентрације 40 mmol/l, рН=5,8) и 15 $\mu\text{l}$  реагенса 2 (раствор АБТС у ацетатном пуферу концентрације 30 mmol/l, рН=3,6, уз додатак  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Смеша је инкубирана 10 минута на 37°C, а апсорбанца очитана на  $\lambda=660$  nm. За стандардизацију методе коришћен је водени раствор Тролокса у концентрацијама 0-100  $\mu\text{mol/l}$ . Добијени резултати су изражени у јединицама  $\mu\text{mol}$  Тролокс еквивалената по милиграму протеина бактеријског лизата соја ГБС [ $\mu\text{mol/Тролокс}$  еквивалената/mg протеина].

### **3.6.5 Одређивање индекса оксидативног стреса**

Одређивање индекса оксидативног стреса (ИОС) је вршено израчунавањем количника вредности тоталног оксидативног статуса и вредности тоталног антиоксидативног статуса за сваки узорак бактеријског лизата, а изражен је као бездимензионална вредност.

### **3.6.6 Одређивање садржаја завршних производа оксидације протеина**

Мерење садржаја завршних производа оксидације протеина (АОПП) у узорцима бактеријских лизата сојева ГБС, изведено је UV-спектрофотометријском методом по Витко-Сарсату (230). Метода се заснива на мерењу пораста апсорбанце приликом реакције калијум јодида и завршних производа оксидације протеина дитиروزинске природе у киселој средини. Реакциона смеша се састојала од 15 $\mu$ l узорка бактеријског лизата, 185 $\mu$ l фосфатног пуфера ( $c=20$  mmol/l, pH=7,4), 20 $\mu$ l сирћетне киселине концентрације 0,5 mol/l и 10 $\mu$ l воденог раствора калијум јодида концентрације 1,16 mol/l. Смеша је инкубирана 10 минута на 37°C, а апсорбанца очитана на  $\lambda=340$  nm. За стандардизацију методе коришћен је водени раствор хлорамина-Т у концентрацијама 0-100  $\mu$ mol/l. Добијени резултати су изражени у јединицама  $\mu$ mol хлорамин-Т еквивалената по милиграму протеина узорка бактеријског лизата соја ГБС [ $\mu$ mol/ хлорамин-Т еквивалената/mg протеина].

### **3.6.7 Одређивање концентрације малондиалдехида**

За мерење укупне концентрације малондиалдехида, коришћена је спектрофотометријска ТБАРС метода (231). Узорцима бактеријских лизата сојева ГБС је прво додат 10% водени раствор натријум додецил сулфата у запреминском односу 1:1, а потом бојени реагенс, који је садржао тиобарбитурну киселину ( $c=7$  mmol/l) растворену у 20% воденом раствору сирћетне киселине, а којој је потом додата једнака запремина воденог раствора натријум хидроксида ( $c=1$  mol/l). Смеша је инкубирана 30 минута у термоблоку на 100°C, а по истеку инкубационог периода, реакција је заустављена пребацивањем узорка на лед. Након 10 минута инкубације на леду, узорци су центрифугирани на 4000 обртаја у минути током 5 минута, како би се преципитирао талог денатурираних протеина. Бистри супернатант је пребачен у епрувете, а потом је апсорбанца очитана на  $\lambda=532$  nm. Концентрација малондиалдехида у узорцима бактеријских изолата добијена је коришћењем Ламбер-Беровог закона, као количник апсорбанце и моларног екстинкционог коефицијента хромогеног производа ( $\epsilon=1,56 \times 10^5$  mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) и изражена у јединицама  $\mu$ mol малондиалдехида по милиграму протеина бактеријског лизата соја ГБС [ $\mu$ mol/mg протеина].

### **3.6.8 Одређивање активности супероксид дисмутазе**

Мерење активности супероксид дисмутазе (СОД) у узорцима бактеријских изолата сојева ГБС је одређена спектрофотометријском методом по Сану и Зигману (232). Метода се заснива на инхибицији аутооксидације адреналина у адренохром у базној средини. Реакциона смеша се састојала од 10 $\mu$ l узорка бактеријског лизата, 15 $\mu$ l реагенса [100 $\mu$ l адреналина (0,18 g/l у 0,1 mol/l HCl) и 275 $\mu$ l Tris-HCl пуфера (0,05 mol/l, pH=10,2)]. Промена апсорбанце на  $\lambda=340$  nm је праћена током 10 минута реакције, а активност ензима је изражена као јединица ензимске активности по милиграму протеина бактеријског лизата соја ГБС [U/mg протеина].

### 3.6.9 Одређивање укупног садржаја тиола

Мерење укупног садржаја тиола у узорцима бактеријских лизата сојева ГБС, одређено је спектрофотометријском методом по Елману (233). Принцип методе се заснива на интеракцији између тиола и ДТНБ (5,5'-дитиобис-(2-нитробензојева киселина)), при чему настаје колорни анјон који показује максималну апсорпцију светлости на  $\lambda=412$  nm. Реакциона смеша се састојала од 30 $\mu$ l узорка бактеријског лизата, 10 $\mu$ l раствора ДТНБ концентрације 0,01 mol/l у 0,2 mol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 150 $\mu$ l 0,002 mol/l EDTA раствореног у Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (c=0,2 mol/l). Метода је калибрисана са градијентним раствором ацетил цистеина у распону концентрације 0-100  $\mu$ mol/l, а добијени резултати су изражени као микромоларна концентрација тиола по милиграму протеина бактеријског лизата соја ГБС [ $\mu$ mol/mg протеина].

## 3.7 Статистичка анализа

За примарно сакупљање и организовање података и прављење табела коришћен је софтверски пакет Microsoft Excel, верзија 2016 (Microsoft, САД). У обради података и статистичким анализама података, коришћен је софтверски пакет SPSS, верзија 20.0 за Windows оперативни систем (SPSS Inc, IBM, САД).

У статистичкој обради нумеричких резултата, коришћене су методе дескриптивне статистике, при чему су израчунаване учесталости фенотипова и генотипова. Тестови  $\chi^2$  и Фишер коришћени су за процену могућих повезаности и разлика између микробиолошких карактеристика. Поред тога, коришћен је тест линеарних трендова (Cochran-Armitage - CA) за праћење промена у временским оквирима. За процену разноликости испитиваних изолата коришћен је Симпсонов индекс диверзитета (SID) са 95% интервалом поверења (95% CI) (234). За израчунавање нивоа подударност између метода типизације бактеријских сојева у микробиологији коришћен је Wallace коефицијент (Wc) (235). Анализе у ове сврхе су рађене бесплатним и слободно доступним online програмом Comparing Partitions који се налази на адреси [www.comparingpartitions.info](http://www.comparingpartitions.info).

Потенцијал за изазивање инвазивног облика болести код појединачних CPS типова је израчунат на основу инвазивних односа квота (odds ratio - OR) (236). Вредности OR преко 1 указују на постојање веће вероватноће да одређени CPS тип изазива инвазивну болест, вредности OR испод 1 указују на смањену вероватноћу, а вредност која је износи 1 указује на једнаку могућност изазивања инвазивне болести и опоравка.

За нумеричка обележја коришћене су класичне методе дескриптивне статистике: у зависности од нормалности расподеле, од мера централне тенденције коришћена је аритметичка средина или медијана, а од мера варијабилитета стандардна грешка или интерквartilни опсег. Хомогеност варијабли извршена је тестирањем нормалности расподеле по Колмогоров-Смирнов тесту, а у зависности од добијених резултата у даљој анализи су коришћене параметарске или непараметарске методе инференцијалне статистике. Испитивање значајности разлике вредности студијских параметара између сојева извршено је коришћењем параметарских или непараметарских статистичких

тестова (Студентов т-тест за невезан и везан узорак, Ман Витнијев тест, Вилкоксонев тест суме рангова).

У свим примењеним статистичким аналитичким методама прихваћени ниво значајности био је  $p < 0,05$ .

Подаци о српском становништву и броју живорођених у истраживаном периоду (2015–2020), добијени су од Завода за статистику Републике Србије (221).

### **3.8 Етичко одобрење**

Истраживање и израда докторске тезе је одобрена од стране Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Београду (под бројем 1550 / II-10). Све методе су изведене у складу са релевантним прописима Републике Србије и научном методологијом претходно објављеном у референтним часописима.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1 Бактеријски сојеви и скрининг трудница

#### 4.1.1 Узорци и пацијенти

У току трајања студије од јануара 2015. године до јануара 2020. године, прикупљен је и обрађен 1071 изолат ГБС, од чега 80 инвазивних изолата и 991 неинвазивних. Приказ дистрибуције изолата по пореклу узорка, инвазивности и клиничкој манифестацији се налази у Табели 9.

#### 4.1.2 Ректовагинална колонизација трудница

Од 5621 труднице која је подвргнута скринингу у току трајања студије, код 877 је детектована ректовагинална колонизација. На основу броја изолованих сојева (Табела 9), утврђена је укупна стопа асимптоматске колонизације трудница износила 15,6% (95% CI 15,5–15,7). У посматраном петогодишњем периоду студије, процењена учесталост колонизације трудница се кретала од 12% до 17%, без статистичке значајности.

#### 4.1.3 Инвазивне и неинвазивне инфекције изазване ГБС

Међу инвазивним изолатима ГБС, већину (60 од 80; 75,0%) прикупљених изолата представљају узорци новорођенчади са раном или касном неонаталном болести. Процењена инциденција инвазивне болести одојчади је у посматраном периоду износила 0,18 на 1.000 живорођене деце (95% CI 0,1–0,2 на 1000) у току периода студије. У оквиру појединачних случајева ране (EOD бр.= 41) и касне неонаталне болести (LOD бр. = 19), процењен инциденција за EOD износи 0,12 на 1.000 (95% CI 0,1–0,2), односно 0,05 на 1000 (95% CI 0,0–0,1) живорођене деце за LOD случајеве. Током периода студије, регистровано је благо смањење преваленције инвазивних инфекција ГБС код новорођенчади, али без статистичке значајности (са 0,3 на 0,1 случај на 1.000 живорођених;  $p = 0.351$ ).

Преостали инвазивни случајеви инфекције ГБС (20 изолата, 25% инвазивних узорака) је припадало одраслим особама. Старост одраслих пацијената са инвазивним инфекцијама ГБС се кретала од 42 до 77 година, а просек је износио  $59,6 \pm 11,2$  година. У погледу пола, више је било заступљено пацијената мушког пола (12; 60%) у односу на пацијенткиње женског пола (8; 40%).

Међу узорцима пацијената са инвазивним инфекцијама ГБС, хемокултура је била најчешћи узорак (68; 85%). Од добијених узорака ликвора, већина (5; 62,5%) су узорковани пацијентима са LOD, као и оба узорка синовијалне течности (100%).



Табела 9 – Дистрибуција узорака изолата ГБС инвазивних и неинвазивних по групама пацијената

Пацијенти	Инвазивни ГБС изолати (80)		Неинвазивни ГБС изолати (991)		Σ	
	ЕОД	ЛОД	Деча	Одрасли		Труднице са асимптомагском колонизацијом
Тип узорка	бр. (%)	бр. (%)	бр. (%)	бр. (%)	бр. (%)	бр. (%)
Крв	37 (90,2)	12 (63,2)	19 (95)		68 (6,3)	
Ликвор	2 (4,9)	5 (26,3)	1 (5)		8 (0,8)	
Плеурални пунктат	2 (4,9)				2 (0,2)	
Синовијална течност		2 (10,5)			2 (0,2)	
Ректовагинални брис				877 (100)	877 (81,9)	
Урогенитални узорци	Генитални брис				94 (82,5)	114 (10,6)
	Урин				20 (17,5)	
Σ	41 (100)	19 (100)	20 (100)	877 (100)	114 (100)	1071 (100)

Дистрибуција узорака унутар група пацијената представљена је у Табели 9. Најчешћа дијагностикована клиничка манифестација била је сепса како код пацијената са EOD (80,5%) и LOD (58%), тако и код одраслих са инвазивним ГБС болестима (90%).

Код 114 одраслих пацијената са неинвазивним ГБС болестима, гениталне инфекције су биле чешће (94; 82,5%) у односу на инфекције уринарног тракта (20; 17,5%), као што је приказано у Табели 9.

## 4.2 Осетљивост ГБС на антибиотике

Сви изолати ГБС били су осетљиви на пеницилин, ванкомицин, норфлоксацин и хлорамфеникол. Резистенција на високе дозе гентамицина није откривена међу тестираним изолатима.

### 4.2.1 Минималне инхибиторне концентрације пеницилина

Ранг МИК вредности за пеницилин испитиваним сојевима ГБС се кретао од 0,006  $\mu\text{g/ml}$  до 0,094  $\mu\text{g/ml}$ , што указује да су сви изолати категорисани као осетљиви. Најчешћа (mode) вредност МИК пеницилина је износила 0,016  $\mu\text{g/ml}$ , док је вредност МИК<sub>50</sub> износила 0,023  $\mu\text{g/ml}$ , а вредност МИК<sub>90</sub> је износила 0,064  $\mu\text{g/ml}$ . Вредности МИК пеницилина за појединачне групе пацијената су дате у Табели 10.

**Табела 10 - Вредности МИК пеницилина**

Пацијенти	Вредности МИК ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	Ранг	МИК <sub>50</sub>	МИК <sub>90</sub>
EOD	0,012 - 0,120	0,06	0,064
LOD	0,06 - 0,064	0,06	0,064
Одрасли инвазивни	0,012 - 0,094	0,032	0,064
Труднице са асимптоматском колонизацијом	0,08 - 0,094	0,023	0,047
Одрасли без трудница –урогениталне инфекције	0,016 - 0,064	0,032	0,047

### 4.2.2 Резистенција ГБС на MLS групу и тетрациклин ГБС и генетичке детерминанте

Укупна резистенција свих тестираних сојева ГБС на антибиотике MLS групе је износила 26,7% за еритромицин и 22,1% за клиндамицин, док је 85,2% сојева ГБС било резистентно на тетрациклин. Најчешћи фенотип резистенције на макролиде код сојева

Табела 11 - Дистрибуција резистенције на еритромицин, клиндамицин и тетрациклин са фенотиповима резистенције на макролиде код инвазивних и неинвазивних сојева ГБС (1071)

Пацијенти	Инвазивни ГБС изолати (80): бр. (%)			Неинвазивни ГБС изолати (991): бр. (%)		
	ЕОД	ЛОД	Одрасли	Труднице са асимптоматском колонизацијом	Одрасли без трудница – урогениталне инфекције	Σ
Еритромицин	12 (29,3)	6 (31,6)	5 (25)	23 (28,8)	233 (26,6)	263 (26,5)
Фенотип	сMLS	4 (66,7)	3 (60)	14 (60,9)	145 (62,2)	160 (60,8)
	иMLS	3 (25)	1 (16,7)	/	4 (14,4)	12 (40)
	М	2 (16,7)	1 (16,7)	2 (40)	41 (17,6)	3 (10)
Клиндамицин	10 (24,4)	5 (26,3)	3 (15)	18 (22,5)	192 (21,9)	219 (22,1)
Тетрациклин	36 (87,8)	13 (68,4)	16 (80)	65 (81,3)	754 (86)	848 (85,6)
Σ	41 (100)	19 (100)	20 (100)	80 (100)	877 (100)	991 (100)

ГБС резистентних на макролиде, био је сMLS (174; 60,8%), затим iMLS (63; 22%) и М фенотип (49; 17,1%). Резистенција појединачних група пацијената на MLS групу и тетрациклин са фенотиповима резистенције на макролиде, приказани су у Табели 11.

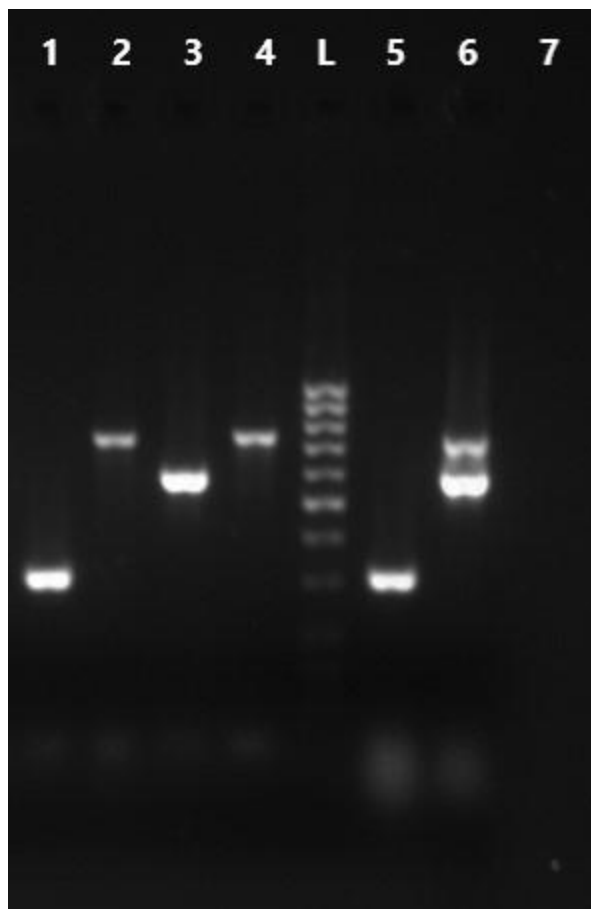
Сојевима ГБС код којих је одређен М фенотип резистенције на макролиде, имали су умерене вредности МИК резистенције на еритромицин које су износиле 2 µg/ml за МИК<sub>50</sub> и 8 µg/ml за МИК<sub>90</sub>. Са друге стране, вредности МИК осетљивости на клиндамицин се одликовала кроз МИК<sub>50</sub> и МИК<sub>90</sub> који су износили 0,094 µg/ml. Изолати са индуцибилним МЛС фенотипом резистенције су имали високе вредности МИК<sub>50</sub> и МИК<sub>90</sub> за еритромицин (256 µg/ml), док су вредности и МИК<sub>50</sub> и МИК<sub>90</sub> за клиндамицин износили 0,25µg/ml. Највеће вредности МИК<sub>50</sub> и МИК<sub>90</sub> еритромицина и клиндамицина су детектоване код сојева ГБС са сMLS фенотипом резистенције на макролиде, који су били једнаки и износили су ≥256 µg/ml.

Резултати молекуларне детекције генетичких детерминанти резистенције ГБС на макролиде су приказани на Слици 10. Код сојева који су исказивали М фенотип резистенције на макролиде, генетску основу је представљао *mefA* ген. Код сојева ГБС који су имали сMLS и iMLS фенотип резистенције на макролиде, експресија резистенције је била повезана са присуством *ermB* гена, односно *ermA* гена. Код седам сојева са сMLS фенотипом детектовано је истовремено присуство и *ermB* и *mefA* гена. Приказ детектованих гена резистенције је приказано у Табели 16.

Код свих изолата ГБС резистентних на макролиде, утврђена је истовремена резистенција (корезистенција) на тетрациклин. Пример резултата молекуларне детекције генетичких детерминанти резистенције ГБС на тетрациклин посредована *tet* генима, приказан је на Слици 11. Најчешће детектован ген резистенције на тетрациклине је био *tetM* (726; 79,5%), затим *tetO* (186; 20,4%) и *tetL* (1; 0,1%). Удруженост гена резистенције на тетрациклине је забележена код *tetM* и *tetO* гена (48; 5,2%), као и код *tetM* и *tetL* гена (1; 0,1%). Код два изолата ГБС осетљива на тетрациклин пронађена је тиха форма *tetM* гена.

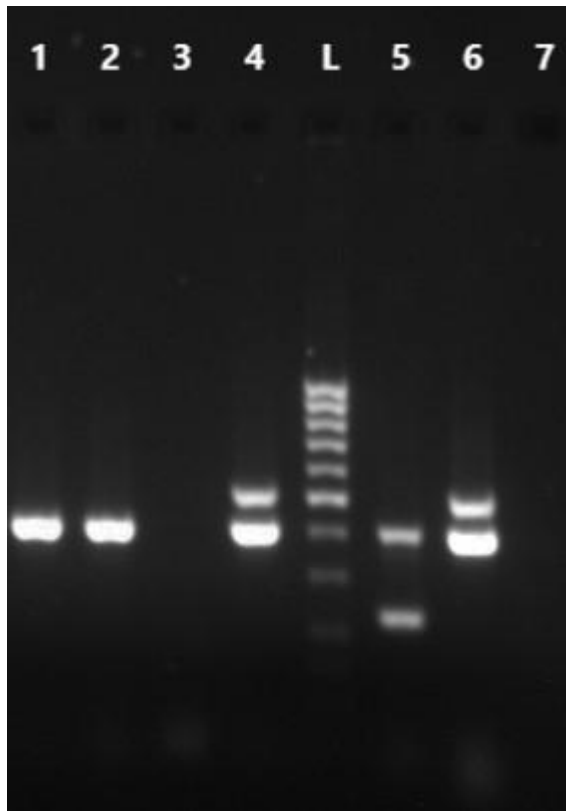
#### 4.2.3 Трендови резистенције на макролиде и тетрациклине ГБС

Током периода трајања студије, регистроване су значајне промене стопа резистенције сојева ГБС на еритромицин, клиндамицин и тетрациклин. У периоду од 2015. до 2020. године, регистрован је тренд повећања стопе резистенције ГБС на еритромицин са 19,7% на 29,2% ( $p$  (СА) = 0,0033) , док је учесталост резистенције на клиндамицин порасла са 17,3% на 24,1% ( $p$  (СА) = 0,0278). Такође, забележено је и повећање укупне стопе резистенције ГБС на тетрациклин, са 82% на 90,9% ( $p$  (СА) = 0,0111). Вредности промене тренда резистенције су дате у Табели 12 и графички на Графикону 1.



Слика 10 - Электрофореграм 2% агарозног гела; мултиплекс PCR метода детекције гена резистенције на макролиде код сојева ГБС изолованих у Србији; *ermB* ген – 745bp, *ermA* ген – 590bp, *mefA* ген – 317bp.

- Позиција 1 – позитиван узорак (*mefA* ген)
- Позиција 2 – позитиван узорак (*ermB* ген)
- Позиција 3 – позитиван узорак (*ermA* ген)
- Позиција 4 – позитиван узорак (*ermB* ген)
- Позиција L – ДНК стандард (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)
- Позиција 5 – позитивна контрола (*mefA* ген – 317bp)
- Позиција 6 – позитивна контрола (*ermB* ген – 745bp + *ermA* ген – 590bp)
- Позиција 7 – негативна контрола



Слика 11 - Електрофореграм 2% агарозног гела; мултиплекс РСR метода детекције гена резистенције на тетрациклин код сојева ГБС изолованих у Србији; *tetO* ген – 515bp, *tetM* ген – 406bp, *tetL* ген – 229bp, *tetK* ген – 155bp (није детектован).

- Позиција 1 – позитиван узорак (*tetM* ген)
- Позиција 2 – позитиван узорак (*tetM* ген)
- Позиција 3 – негативан узорак
- Позиција 4 – позитиван узорак (*tetO* ген + *tetM* ген)
- Позиција L – ДНК стандард (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)
- Позиција 5 – позитивна контрола (*tetM* ген – 406bp + *tetL* ген – 229bp)
- Позиција 6 – позитивна контрола (*tetO* ген – 515bp + *tetM* ген – 406bp)
- Позиција 7 – негативна контрола

**Табела 12 – Вредности промене учесталости резистенције сојева ГБС (бр. (%)) на еритромицин, клиндамицин и тетрациклин од 2015. до 2020. године**

	2015-2016	2016-2017	2017-2018	2018-2019	2019-2020	p (CA)
Еритромицин	56 (19,7)	30 (24,4)	35 (34,0)	76 (29,6)	89 (29,2)	0,0033
Клиндамицин	49 (17,3)	26 (21,1)	29 (28,2)	59 (23,2)	74 (24,1)	0,0278
Тетрациклин	233 (82,0)	103 (83,7)	89 (86,4)	218 (82,6)	270 (90,9)	0,0111



Графикон 1- Промена трендова резистенције сојева ГБС на макролиде и тетрациклин у периоду од 2015. до 2020. године у Србији

### 4.3 Капсуларна типизација и детекција хипервирулентног клона

У овој студији је од 10 постојећих CPS типова, детектовано шест типова (CPS тип Ia, Ib и од II до V). Пример репрезентативног електрофореграма типизације капсуларних типова сојева ГБС применом мултиплек PCR методе је дато на Слици 12. Најчешћи детектовани CPS типови у целој студији су били тип V (26%) и III (25,8%), а затим и типови II (17,8%), Ia (13,9%), Ib (11%) и IV (5,5%). Дистрибуција CPS типова сојева ГБС по различитим групама пацијената, приказана је у Табели 13.

Међу инвазивним изолатима ГБС, најчешћи CPS тип је био тип III, који је чинио готово половину свих испитиваних сојева (51,3%), док је међу неинвазивним изолатима најчешћи био CPS тип V (26,3%). Регистрована је значајно већа заступљеност CPS типа III међу инвазивним (51,3%) изолатима ГБС у односу на неинвазивне (23,7%;  $p < 0,01$ ). Са друге стране, тип II је био значајно више заступљен међу неинвазивним изолатима (19%) ГБС у односу на инвазивне (3,8%;  $p < 0,01$ ). Капсуларни тип III био је најчешћи детектовани тип и међу неонаталним инвазивним ГБС изолатима (EOD + LOD) са 58,3%

**Табела 13 – Дистрибуција CPS типова и хипервирулентног клона III/ST17 међу инвазивним и неинвазивним изолатима ГБС (1071) у оквиру група пацијената**

CPS типови	Инвазивни ГБС изолати (80): бр. (%)			Неинвазивни ГБС изолати (991): бр. (%)		
	EOD	LOD	Одрасли	Труднице са асимптоматском колонизацијом	Одрасли без трудница – урогениталне инфекције	Σ
Ia	6 (14,6)	/	1 (5)	128 (14,6)	14 (12,3)	142 (14,3)
Ib	4 (9,8)	1 (5,3)	2 (10)	96 (10,9)	15 (13,2)	111 (11,2)
II	3 (7,3)	/	/	175 (20)	13 (11,4)	188 (19)
III/non-ST17	3 (7,3)	7 (36,8)	3 (15)	110 (12,5)	17 (14,9)	127 (12,8)
III/ST17	16 (39)	9 (47,4)	3 (15)	99 (11,3)	9 (7,9)	108 (10,9)
IV	1 (2,4)	1 (5,3)	3 (15)	45 (5,1)	9 (7,9)	54 (5,4)
V	8 (19,5)	1 (5,3)	8 (40)	224 (25,5)	37 (32,5)	261 (26,3)
Σ	41 (100)	19 (100)	20 (100)	877 (100)	114 (100)	991 (100)



детектованих сојева, док су сви остали CPS типови заједно чинили 41,7%. У поређењу инвазивних неонаталних изолата са изолатима одраслих, споменута заступљеност CPS тип III (58,3% ) је била значајно већа код неонаталних изолата у односу на инвазивне изолате одраслих (30%;  $p < 0,05$ ). Истовремено, CPS тип V је био значајно више присутан код инвазивних изолата одраслих (40%) у односу на неонаталне изолате (15%;  $p < 0,05$ ).

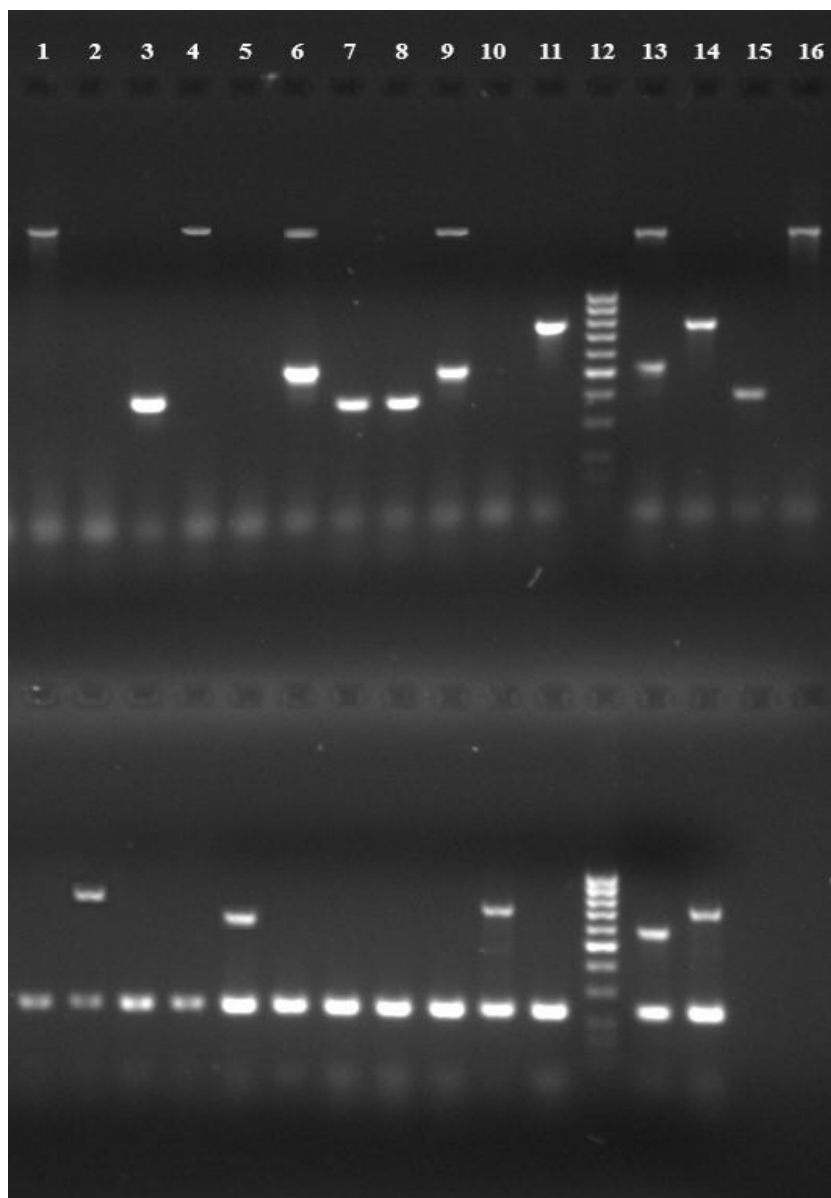
Поред тога, тип III је био и значајно чешћи код изолата новорођенчади са LOD (84,2%) у односу на изолате новорођенчади са EOD (46,3%;  $p < 0,01$ ). Такође, међу инвазивним изолатима новорођенчади, типови Ia и II су били регистровани само у случајевима EOD новорођенчади. Тип V је, поред тога што је био најчешћи CPS тип одраслих пацијената са инвазивним инфекцијама (40%), био и најчешћи и код асимптоматских колонизованих трудница (25,5%) и одраслих нетрудних пацијената са урогениталним инфекцијама (32,5%). Међу неинвазивним изолатима, треба споменути и значајно већу заступљеност CPS типа II међу изолатима асимптоматских колонизованих трудница (20%) и одраслих пацијената са урогениталним инфекцијама без трудница (11,4%;  $p < 0,05$ ). У поређењу неонаталних инвазивних сојева са сојевима асимптоматских колонизованих трудница, детектована је значајно већа заступљеност код трудница сојева CPS типа II (20% насупрот 5%;  $p < 0,001$ ) и V (25,5% насупрот 15%;  $p < 0,001$ ), као и типа III (58,3% насупрот 23,8%;  $p < 0,001$ ) код неонаталних сојева.

Израчунати потенцијал за изазивања инвазивних болести показао је да само изолати ГБС капсуларног типа III имају изражен потенцијал и већу вероватноћу да код пацијената код којих су изоловани изазову инвазивну болест ( $OR = 4,47$ ; 95% CI 2,617–7,649). Вредности израчунатих потенцијала за изазивања инвазивних болести за остале CPS типове су биле испод вредности 1, односно у распону од 0,21 до 0,74.

У погледу хомогености, односно хетерогености дистрибуције CPS типова међу инвазивним и неинвазивним, као и осталим групама пацијената, структура дистрибуције CPS типова је показала највећи степен хомогености код случајева LOD ( $SID = 0,199$ , 95% CI 0,135–0,413). Вредности Симпсоновог индекса диверзитета CPS типова за све групе пацијената су дате у Табели 14.

Током периода студије, регистроване су промене у дистрибуцији CPS типова, што је приказано на Графикону 2. У наведеном петогодишњем периоду међу 1071 инвазивних и неинвазивних сојева ГБС, регистрована је значајна промена заступљености CPS типа II, код кога је дошло до повећања са 14,4% на 21,2% ( $p (CA) = 0,005$ ), док је код типа V регистрован пад са 27,8% на 21,5% ( $p (CA) = 0,033$ ).

Поред тога, међу сојевима ГБС изолованим од асимптоматских колонизованих трудница у периоду од 2015. до 2020. године, регистрован је и значајан пад заступљености сојева CPS типа V са 27,4% на 21,2% ( $p (CA) = 0,0327$ ), што је приказано на Графикону 3.



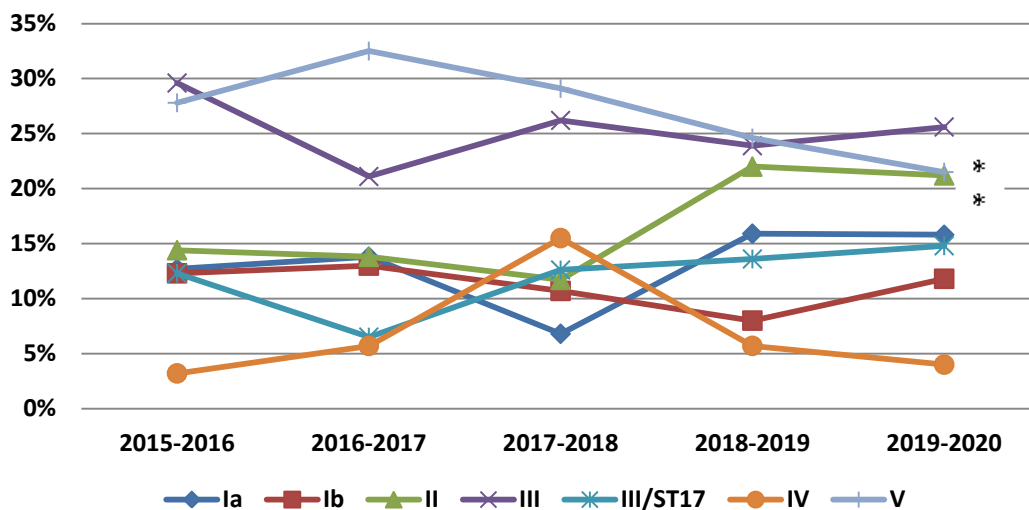
Слика 12 - Електрофореграм 2% агарозног гела; мултиплекс РСР метода капсуларне типизације сојева ГБС изолованих у Србији: Горњи ред - Микс 1: *cps Ia* – 1826bp + 521bp, *cps Ib* – 770bp, *cps II* – 397bp, *cps III* – 1826bp; Доњи ред - Микс 2: *cps IV* – 578bp *cps V* – 701bp, *dltR* – 232bp.

- Позиција 1 – Горњи ред: позитиван узорак - *cps III*; Доњи ред: позитиван узорак - *dltR*
- Позиција 2 – Горњи ред: негативан узорак; Доњи ред: позитиван узорак - *cps V* + *dltR*
- Позиција 3 – Горњи ред: позитиван узорак - *cps II*; Доњи ред: позитиван узорак - *dltR*
- Позиција 4 – Горњи ред: позитиван узорак - *cps III*; Доњи ред: позитиван узорак - *dltR*
- Позиција 5 – Горњи ред: негативан узорак; Доњи ред: позитиван узорак - *cps IV* + *dltR*

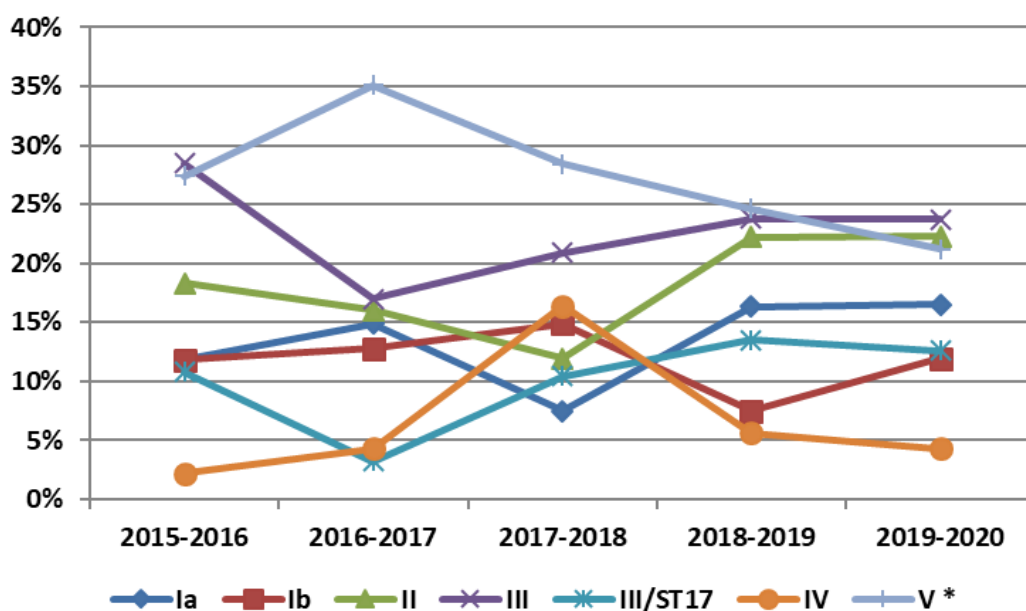
- Позиција 6 – Горњи ред: позитиван узорак - *cps Ia*; Доњи ред: позитиван узорак - *dltR*
- Позиција 7 – Горњи ред: позитиван узорак - *cps II*; Доњи ред: позитиван узорак - *dltR*
- Позиција 8 – Горњи ред: позитиван узорак - *cps II*; Доњи ред: позитиван узорак - *dltR*
- Позиција 9 – Горњи ред: позитиван узорак - *cps Ia*; Доњи ред: позитиван узорак - *dltR*
- Позиција 10 – Горњи ред: негативан узорак; Доњи ред: позитиван узорак - *cps V + dltR*
- Позиција 11 – Горњи ред: позитиван узорак - *cps Ib*; Доњи ред: позитиван узорак - *dltR*
- Позиција 12 – ДНК стандард (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas) и у горњем и у доњем реду
- Позиција 13 – Горњи ред: Контрола позитиван узорак - *cps Ia*; Доњи ред: Контрола позитиван узорак - *cps IV + dltR*
- Позиција 14 – Контрола Горњи ред: Контрола позитиван узорак - *cps Ib*; Доњи ред: Контрола позитиван узорак - *cps V + dltR*
- Позиција 15 – Горњи ред: Контрола позитиван узорак - *cps II*; Доњи ред: празна позиција
- Позиција 16 – Горњи ред: Контрола позитиван узорак - *cps III*; Доњи ред: празна позиција

**Табела 14 - Вредности Симпсоновог индекса диверзитета CPS типова**

Група	SID	95% CI
Сви	0,799	0,790 - 0,806
Инвазивни	0,671	0,572 - 0,740
Неонатални	0,623	0,491 - 0,717
EOD	0,710	0,583 - 0,781
LOD	0,282	0,193 - 0,542
Одрасли инвазивни	0,715	0,590 - 0,775
Неинвазивни	0,802	0,793 - 0,808
Труднице са асимптоматском колонизацијом	0,802	0,793 - 0,808
Одрасли без трудница –урогениталне инфекције	0,791	0,744 - 0,813



Графикон 2 – Промена дистрибуције CPS типова међу 1071 инвазивних и неинвазивних сојева ГБС од 2015. до 2020. године у Србији (\* -  $p \leq 0,05$ )

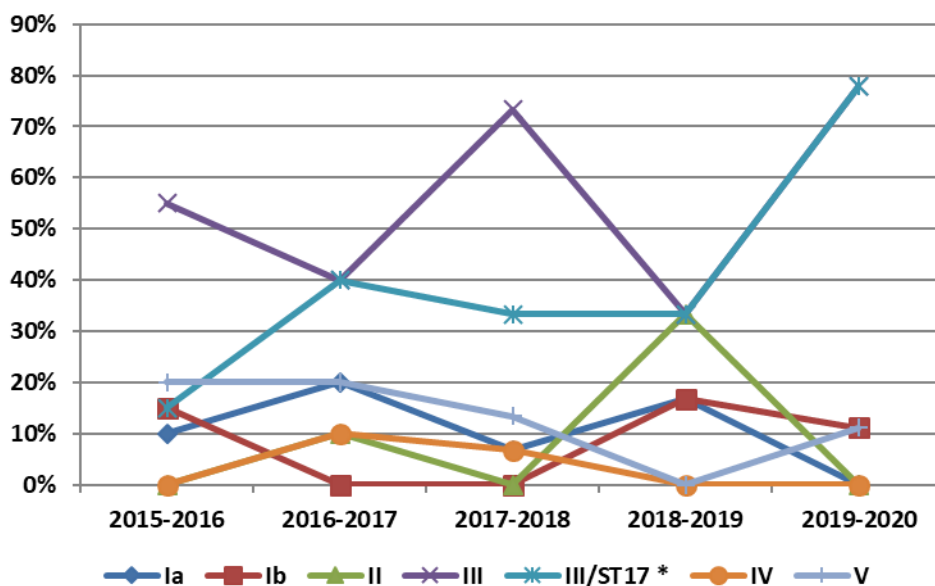


Графикон 3 – Промена дистрибуције CPS типова међу 877 сојева асимптоматских колонизованих трудница у периоду од 2015. до 2020. године у Србији (\* -  $p \leq 0,05$ )

Слика репрезентативног електрофореграма молекуларне детекције генетичке детерминанте *hvgA* gena хипервирулентног ST17 клона, приказана је на Сlici 13. У односу на све тестиране узорке, присуство *hvgA* gena је утврђено код 142 изолата ГБС, односно 13,3%. Учесталост *hvgA* gena је била статистички значајно виша код инвазивних изолата (37,5%) него код неинвазивних GBS (11,3%;  $p < 0,01$ ). Највећи број ST17 позитивних изолата ГБС откривен је међу сојевима CPS типа III (136; 95,7%), док је шест

преосталих изолата припадало CPS типу IV (4,3%). Хипервирулентни клон типа III/ST17 био је значајно заступљенији међу инвазивним изолатима ГБС (35%) у поређењу са неинвазивним изолатима (10,9%;  $p < 0,01$ ), што је приказано у Табели 13. У оквиру инвазивних изолата, хипервирулентни клон је био значајно више присутан код неонаталних изолата (41,6%) у односу на инвазивне изолате одраслих пацијената (15%;  $p = 0,03$ ). Поред тога, генотип III/ST17 је био заступљенији међу сојевима LOD (47,4%) у поређењу са сојевима EOD (39%,  $p = 0,58$ ). Са друге стране, удео ST17 позитивних изолата у оквиру CPS типа III је била већа код сојева порекла EOD (84,2%) у поређењу са LOD (56,2%;  $p = 0,13$ ). Заступљеност сојева типа III/ST17 је била значајно већа код инвазивних неонаталних изолата (41,6%) у односу на колонизоване труднице (11,3%;  $p < 0,01$ ), док је удео ST17 позитивних изолата у оквиру CPS типа III код инвазивних неонаталних изолата (71,4%) у односу на колонизоване труднице (47,4%;  $p < 0,01$ ) давао још већу разлику. Од изолата CPS типа IV код којих је детектован *hvgA* ген, два су припадала инвазивним сојевима, од чега је један био изолат EOD и други одраслог пацијента, а четири су припадала неинвазивним сојевима асимптоматски колонизованих трудница.

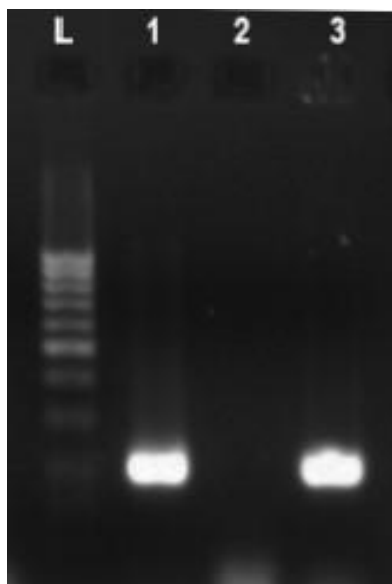
У току периода студије, међу инвазивним и неинвазивним сојевима ГБС, регистрован је благи пораст заступљености сојева хипервирулентног клона III/ST17 са 12,3% у 2015. години на 14,8% у 2020. години ( $p = 0,206$ ). Међутим, у популацији новорођенчади са инвазивним инфекцијама, забележен је значајан пораст преваленције хипервирулентног клона са 15% на 77,8% ( $p$  (CA) = 0,0040), што је приказано на Графикону 4. Такође, регистрован је и значајан раст заступљености хипервирулентног клона ST17 међу изолатима ГБС CPS типа III (са 41,7% на 57,9%;  $p$  (CA) = 0,0082), што је приказано у Табели 15.



Графикон 4 – Промена дистрибуције CPS типова и хипервирулентног клона III/ST17 међу 60 сојева неонаталних инвазивних инфекција у периоду од 2015. до 2020. године у Србији (\* -  $p \leq 0,05$ )

**Табела 15 – Заступљености хипервирулентног клона ST17 међу изолатима ГБС CPS типа III (бр. (%)) у периоду од 2015. до 2020. године у Србији**

	2015-2016	2016-2017	2017-2018	2018-2019	2019-2020	p (CA)
III/ST17	35 (41,7)	8 (30,8)	13 (48,1)	36 (57,1)	44 (57,9)	0,0082



Слика 13 - Електрофореграм 2% агарозног гела; PCR метода детекције *hvgA* гена за детектовање хипервирулентног клона ST17 код сојева ГБС изолованих у Србији; *hvgA* ген – 210bp.

Позиција L – ДНК стандард (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)

Позиција 1 – позитивна контрола (*hvgA* ген – 210bp)

Позиција 2 – негативна контрола

Позиција 3 – позитиван узорак (*hvgA* ген – 210bp)

Заступљеност сојева ГБС резистених на макролиде и тетрациклине и њихових одговарајућих генских детерминанти приказана је у Табели 16. Већина сојева ГБС којима је детектована резистентност на макролиде су сврстани у CPS типове V (36,4%) и III (23,4%), док су преостали CPS типови чинили 40,2%. Такође, и сојеви ГБС резистентни на тетрациклин су припадали CPS типовима V (26%) и III (24%), а преосталих 50% резистентних сојева је припадало осталим CPS типовима.

**Табела 16 – Заступљеност гена резистенције на макролиде и тетрациклине детектованих код изолата  
ГБС (1071) у оквиру CPS типова**

CPS тип	Бр. изолата	Сојеви ГБС резистентни на				Сојеви ГБС резистентни на				Гени резистенције на тетрациклине бр. (%)			
		<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>mefA</i>	тетрациклине	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>mefA</i>	тетрациклине	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetL</i>	тетрациклине бр. (%)
Ia	149	5 (3,4)	10 (6,7)	20 (13,4)	134 (90)	5 (3,4)	10 (6,7)	20 (13,4)	134 (90)	134 (90)	/	/	/
Ib	118	2 (1,6)	16 (13,5)	2 (1,6)	92 (78)	2 (1,6)	16 (13,5)	2 (1,6)	92 (78)	69 (58,5)	23 (19,5)	/	/
II	191	5 (2,6)	39 (20,4)	6 (3,2)	170 (89)	5 (2,6)	39 (20,4)	6 (3,2)	170 (89)	111 (58,1)	59 (30,9)	/	/
III	276	10 (3,6)	45 (16,3)	22 (7,8)	224 (81,2)	10 (3,6)	45 (16,3)	22 (7,8)	224 (81,2)	153 (55,4)	70 (25,4)	1 (0,4)	1 (0,4)
IV	59	4 (6,8)	17 (28,8)	/	55 (93,2)	4 (6,8)	17 (28,8)	/	55 (93,2)	40 (67,8)	15 (25,4)	/	/
V	278	20 (7,2)	81 (29,1)	6 (2,2)	238 (85,6)	20 (7,2)	81 (29,1)	6 (2,2)	238 (85,6)	210 (75,5)	27 (9,7)	/	/

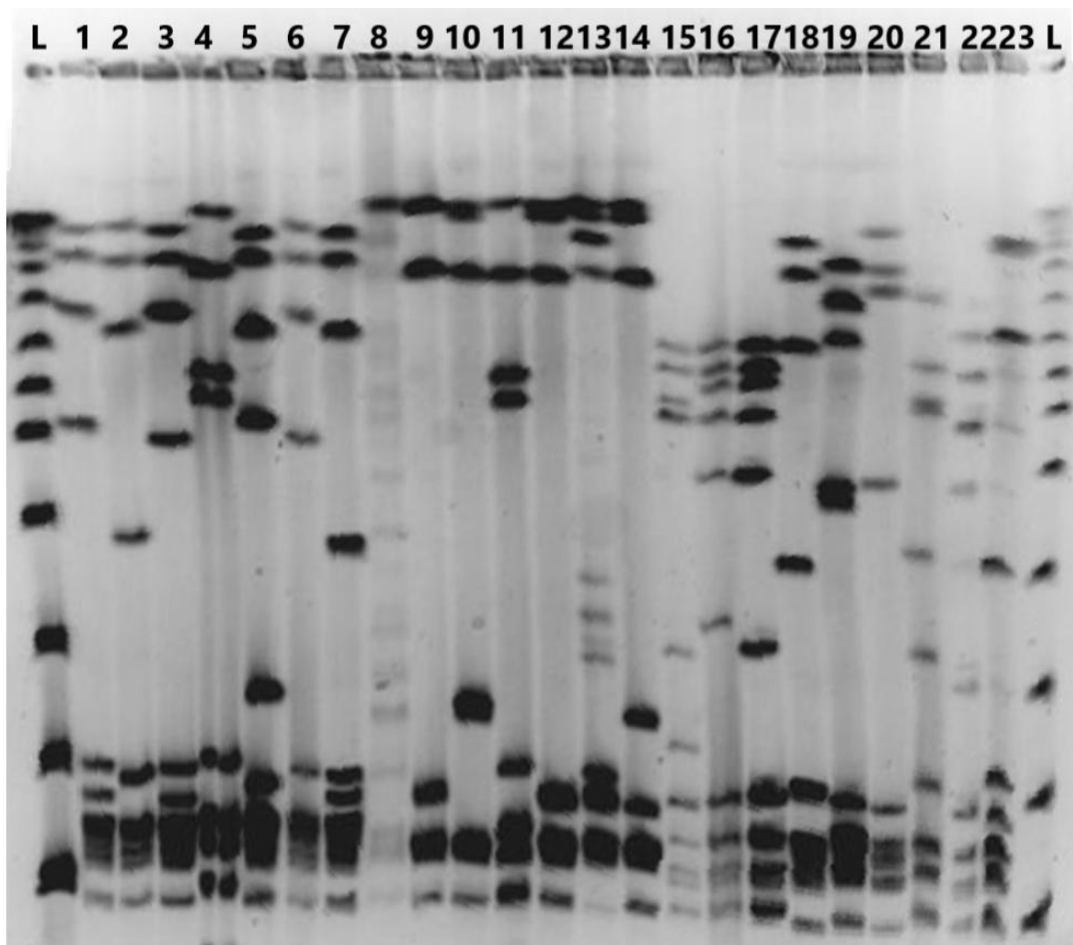
## 4.4 PFGE

Процена генетичке повезаности сојева ГБС је испитана код 69 инвазивних изолата ГБС. PFGE анализом је добијено 47 профила (Слика 14) са индексом диверзитета од  $SID = 0,971$ ; 95% CI 0,955–0,971. На основу сличности добијених профила сојева ГБС, конструисан је дендрограм (Слика 15), у коме су сојеви груписани у шест PFGE кластера (означених А, В, С, D, Е и F). Сојеви ГБС чија сличност профила је задовољавала критеријум за формирање кластера, чинили су 69,6% тестираних изолата (48), док је преосталих 21 изолата представљено на дендрограму или као мање PFGE групе (до два изолата) или као јединствени профили.

Од шест добијених кластера сојева ГБС, пет PFGE кластера (А, В, С, D и Е) се састојало искључиво од изолата истог CPS типа, док је кластер F састављен већински од сојева CPS типа Ia и једног изолата CPS типа Ib. Овакав састав кластера, односно њихова висока хомогеност у односу капсуларних типова се уочава и кроз високу вредност израчунатог Wallace-овог коефицијента ( $Wc = 0,965$ ; 95% CI 0,918–1,000), односно високог нивоа усаглашености резултата обе методе типизације у погледу CPS типа.

Насупрот хомогености пет кластера по питању CPS типова, сојеви истог CPS типа су били заступљени у различитим мањим PFGE групама и кластерима, јединственим профилима, а и PFGE кластер F је имао изолате ГБС различитог CPS типа. У погледу капсуларних типова, најхомогенији тип је био V ( $SID = 0,785$ ; 95% CI 0,561–0,836), иако су ови изолати груписани у два кластера (В и С). Највећи PFGE кластер Е (16 сојева), био је састављен од изолата хипервирулентног клона III/ST17 ( $SID = 0,875$ ; 95% CI 0,687–0,875), док су преостали изолати истог генотипа груписани или у малу PFGE групу (1 сој) или као сојеви са јединственим профилем (7 сојева). Од сојева CPS типа IV којима је детектован и ST17, један је груписан са изолатом IV/ non-ST17 у мању групу, док је други сој груписан са хипервирулентним клоном III/ST17. Треба навести и да су сви изолати ГБС са генотипом III/non-ST17 били груписани заједно у кластер D, одвојено од хипервирулентних клонова III/ST17.

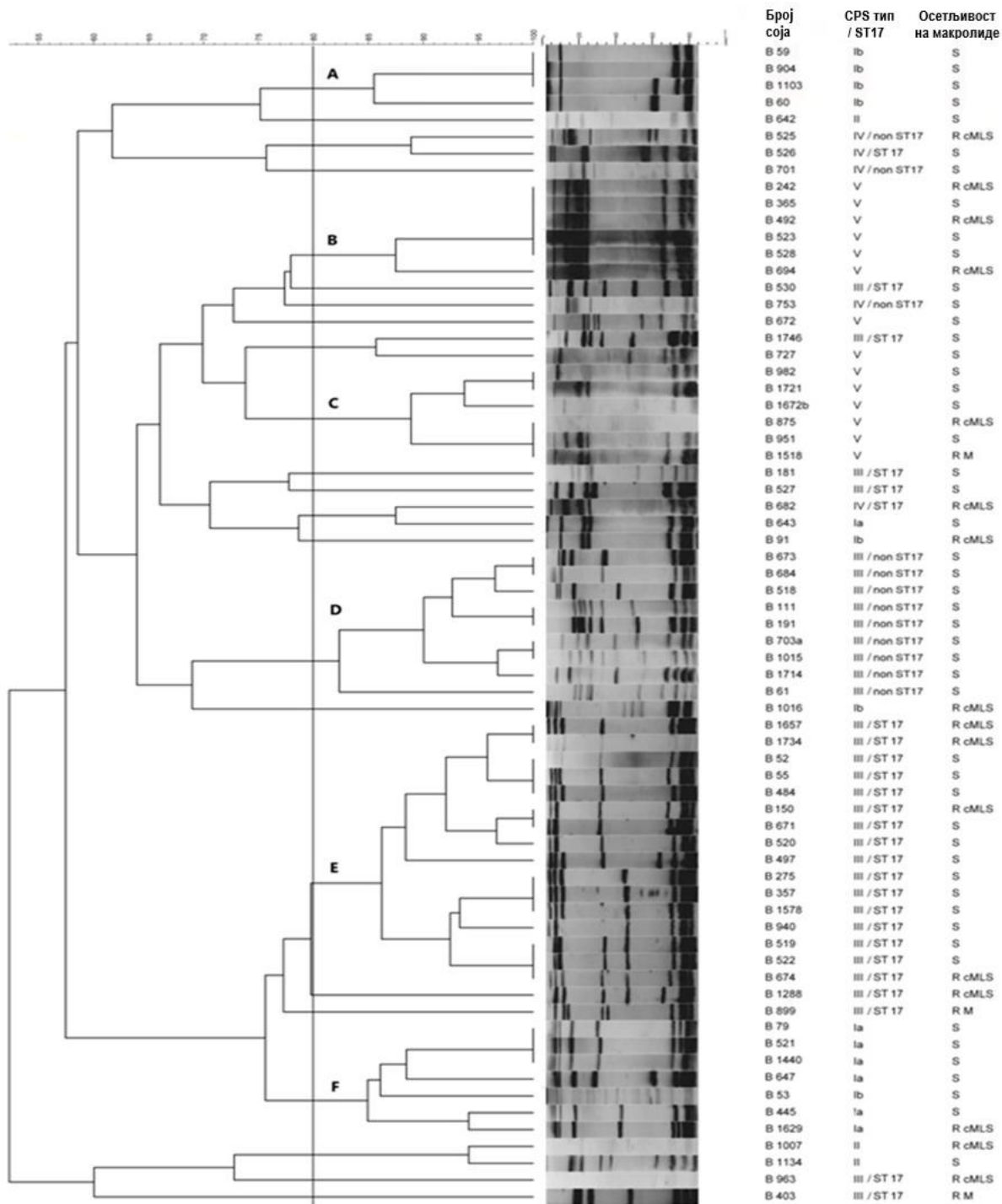




Слика 14 - Электрофореграм 1,2% агарозног гела PFGE анализе сојева ГБС; L на почетку и крају гела –  $\lambda$  - маркер (Lambda PFG Ladder, New England biolabs, САД), позиције од 1 до 23 – PFGE профили сојева ГБС.

У погледу резистенције на макролиде, тестирани сојеви PFGE анализом су дали такође веома различите профили и разврстани су већински у четири различита кластера (В, С, Е и F), а преостали у мање PFGE групе и јединствене профили. Значајан удео кластера В и С, састављених искључиво од сојева CPS типа V, је имао сојеве резистентне на макролиде (50% и 33,3%). Сојеви хипервирулентног клона III/ST17 кластеровани у кластер Е су имали 25% сојева резистентних на макролиде, док су сви изолати генотипа III/поп-ST17 били осетљиви на макролиде у оквиру кластера D.

Приказани дендрограм PFGE профила добијених дигестијом хромозомске ДНК инвазивних сојева ГБС коришћењем SmaI ензима. Дендрограм је конструисан коришћењем BioNumerics софтвера, са 1.5% позиционе толеранције, и коришћењем UPGMA алгоритма и Dice коефицијента сличности. Кластери (обележени са А, В, С, D, Е и F) су конструисани на основу коефицијента сличности профила изолата ГБС, који је морао да буде већи од 80% сличности (приказан вертикалном линијом).



Слика 15 - Дендрограм приказа генетичке сличности 69 тестираних инвазивних изолата ГБС техником PFGE профилисања уз коришћење SmaI ензима за дигестију.

У графичком приказу су означени CPS типови, хипервирулентни клон ST17, осетљивост на макролидне антибиотике и фенотипови резистенције на макролиде.

## 4.5 Биохемијски параметри оксидативног и антиоксидативног статуса

Испитивање биохемијских параметара оксидативног и антиоксидативног статуса је урађено на 124 насумично одабрана инвазивна и неинвазивна соја ГБС. Вредности добијених параметара су анализирани у функцији постојања значајности разлике или повезаности параметара са другим карактеристикама испитиваних сојева.

### 4.5.1 Анализа биохемијских параметара у функцији инвазивности сојева ГБС

У функцији испитивања биохемијских параметара оксидативног и антиоксидативног статуса између инвазивних и неинвазивних сојева ГБС, урађена је дескрипција вредности параметара са одговарајућим значајностима разлике (Табела 17).

**Табела 17 - Резултати процене значајности разлике вредности биохемијских параметара оксидативног и антиоксидативног статуса између инвазивних и неинвазивних сојева ГБС.**

Параметар	Инвазивност сојева ГБС		p-вредност
	Неинвазивни сојеви ГБС (75)	Инвазивни сојеви ГБС (49)	
ТОС <sup>1</sup>	336,76 + 37,67 <sup>Г</sup>	343,34 + 46,45 <sup>Г</sup>	p = 0,973 <sup>а</sup>
ТАС <sup>2</sup>	152,61 + 172,74 <sup>Г</sup>	0,1* + 160,35 <sup>Г</sup>	<b>p = 0,008<sup>а</sup></b>
ИОС	1,94 + 1,97 <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	<b>p = 0,012<sup>а</sup></b>
МДА <sup>3</sup>	0,1* + 4,43 <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	<b>p = 0,021<sup>а</sup></b>
АОПП <sup>4</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01 <sup>Г</sup>	p = 0,103 <sup>а</sup>
Тиоли <sup>5</sup>	0,1* + 0,13 <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01 <sup>Г</sup>	p = 0,060 <sup>а</sup>
СОД <sup>6</sup>	194,1 ± 9,27 <sup>В</sup>	152,6 ± 12,03 <sup>В</sup>	<b>p = 0,007<sup>б</sup></b>

<sup>а</sup> Ман-Витнијев тест; <sup>б</sup> Студентов т-тест за независни узорак; <sup>В</sup> Подаци са нормалном расподелом су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка; <sup>Г</sup> Подаци који немају нормалну расподелу су приказани као медијана са интерквартилним опсегом; \*-п x10<sup>-4</sup>; <sup>1</sup> Концентрација је изражена у јединицама [μmol/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> еквивалената/mg протеина]; <sup>2</sup> Концентрација је изражена у јединицама [μmol/Тролокс еквивалената/mg протеина]; <sup>3</sup> Концентрација је изражена у јединицама [μmol/mg протеина]; <sup>4</sup> Концентрација је изражена у јединицама [μmol/ хлорамин-Т еквивалената/mg протеина]; <sup>5</sup> Концентрација је изражена у јединицама [μmol/mg протеина]; <sup>6</sup> Активност ензима је изражена у јединицама [U/mg протеина].

*Значајне корелације између биохемијских параметара код инвазивних и неинвазивних сојева ГБС*

Међу неинвазивним сојевима ГБС, детектоване су следеће значајне корелације биохемијских параметара:

- ТОС и ТАС ( $\rho=0,333$ ;  $p=0,004$ )
- ТОС и ИОС ( $\rho=0,231$ ;  $p=0,046$ )
- ТОС и активност СОД ( $\rho=0,287$ ;  $p=0,013$ )
- ТОС и резистенције на макролиде ( $\rho=0,311$ ;  $p=0,007$ )
- ТАС и CPS типа ( $\rho=0,228$ ;  $p=0,049$ )

Међу инвазивним сојевима ГБС, детектоване су следеће значајне корелације биохемијских параметара:

- ТАС и ИОС ( $\rho=0,869$ ;  $p < 0,001$ )
- укупног садржаја тиола и АОПП ( $\rho=0,414$ ;  $p=0,003$ )

#### ***4.5.2 Анализа биохемијских параметара у функцији изолата ГБС различитих група пацијената***

Како би се испитало да ли постоје значајне разлике и повезаности биохемијских параметара оксидативног и антиоксидативног статуса између сојева ГБС изолованих од пацијената са раном и касном неонаталном болести, инвазивним инфекцијама одраслих, асимптоматском колонизацијом трудница и неинвазивним инфекцијама жена које нису трудне, урађена је дескрипција вредности параметара са одговарајућим значајностима разлике (Табеле 18 и 19).

**Табела 18 - Резултати процене значајности разлике вредности биохемијских параметара оксидативно/антиоксидативног статуса између 124 соја ГБС различитих група пацијента.**

Групе пацијената		Параметар		
		ТОС <sup>1</sup>	ТАС <sup>2</sup>	ИОС
Инвазивни	ЕОД	343 + 69,54 <sup>б</sup>	0,1* + 0,01* <sup>б</sup>	0,1* + 0,01* <sup>б</sup>
	ЛОД	343,33 + 33,69 <sup>б</sup>	0,1* + 172,80 <sup>б</sup>	0,1* + 1,98 <sup>б</sup>
	Одрасли	344,71 + 117,19 <sup>б</sup>	0,1* + 167,60 <sup>б</sup>	0,1* + 1,97 <sup>б</sup>
Неинвазивни	Труднице са асимптоматском колонизацијом	333,70 + 31,60 <sup>б</sup>	0,1* + 170,12 <sup>б</sup>	0,1* + 1,96 <sup>б</sup>
	Одрасли без трудница – урогениталне инфекције	339,28 + 43,40 <sup>б</sup>	163,29 + 178,46 <sup>б</sup>	1,95 + 1,97 <sup>б</sup>
p-вредност		0,743 <sup>а</sup>	<b>0,003<sup>а</sup></b>	<b>0,008<sup>а</sup></b>

<sup>а</sup> За процену значајности разлике коришћен је Краскал Волисов Х тест. <sup>б</sup> Подаци који немају нормалну расподелу су приказани као медијана са интерквартилним опсегом. \*  $\times 10^{-4}$ ; <sup>1</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2$  еквивалената/mg протеина]; <sup>2</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{Тролокс}$  еквивалената/mg протеина];

На основу резултата наведених тестова се уочава да се вредности ТАС, ИОС, укупног садржаја тиола и активности СОД се разликују у функцији порекла узорка. Коришћењем *Post hoc* тестова (за параметарске податке LSD, за непараметарске Ман-Витнијев тест) између појединачних група, запажене су значајне разлике у вредностима: ТАС између ЕОД и ЛОД ( $p=0,004$ ); ТАС и ИОС између ЕОД и трудница ( $p=0,004$  и  $p=0,005$ ); МДА и активности СОД између ЛОД и трудница ( $p=0,035$  и  $p=0,048$ ); укупног садржаја тиола између трудница и неинвазивних одраслих пацијената, као и одраслих инвазивних и неинвазивних пацијената ( $p=0,002$  и  $p=0,005$ ); активности СОД између ЛОД и неинвазивних одраслих пацијената ( $p=0,002$ ); као и вредности параметара између ЕОД и неинвазивних одраслих пацијената за ТАС ( $p<0,001$ ), ИОС ( $p<0,001$ ), АОПП ( $p=0,008$ ), укупног садржаја тиола ( $p=0,014$ ) и активности СОД ( $p=0,038$ ).

**Табела 19 - Резултати процене значајности разлике вредности биохемијских параметара оксидативно/антиоксидативног статуса између 124 соја ГБС различитих група пацијента.**

Групе пацијената		Параметар			
		МДА <sup>1</sup>	АОПП <sup>2</sup>	Тиоли <sup>3</sup>	СОД <sup>4</sup>
Инвазивни	EOD	0,1* + 1,91 <sup>Г</sup>	0,1* + 130,36 <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	154,63 ± 18,47 <sup>В</sup>
	LOD	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	0,1* + 0,1 <sup>Г</sup>	133,00 ± 17,33 <sup>В</sup>
	Одрасли	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	185,79 ± 31,45 <sup>В</sup>
Неинвазивни	Труднице са асимптоматском колонизацијом	0,1* + 7,13 <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	180,11 ± 11,00 <sup>В</sup>
	Одрасли без трудница – урогениталне инфекције	0,1* + 2,15 <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	0,03 + 0,46 <sup>Г</sup>	205,71 ± 14,17 <sup>В</sup>
p-вредност		0,138 <sup>б</sup>	0,122 <sup>б</sup>	<b>0,001<sup>б</sup></b>	<b>0,019<sup>а</sup></b>

<sup>а</sup> За процену значајности разлике коришћена је параметарска АНОВА са LSD *Post hoc* тестом. <sup>б</sup> За процену значајности разлике коришћен је Краскал Волисов Х тест. <sup>в</sup> Подаци су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка. <sup>Г</sup> Подаци који немају нормалну расподелу су приказани као медијана са интерквartilним опсегом; \*x10<sup>-4</sup>; <sup>1</sup> Концентрација је изражена у јединицама [μmol/mg протеина]; <sup>2</sup> Концентрација је изражена у јединицама [μmol/ хлорамин-Т еквивалената/mg протеина]; <sup>3</sup> Концентрација је изражена у јединицама [μmol/mg протеина]; <sup>4</sup> Активност ензима је изражена у јединицама [U/mg протеина].

#### 4.5.3 Анализа биохемијских параметара у функцији старости пацијената

У односу биохемијских параметара неонаталних и сојева одраслих пацијената, вредности дескрипције параметара са одговарајућим значајностима разлике су приказане у Табели 20.

**Табела 20 - Резултати процене значајности разлике вредности биохемијских параметара оксидативног и антиоксидативног статуса између неонаталних изолата ГБС и изолата одраслих пацијената.**

Параметар	Инвазивност сојева ГБС		p-вредност
	Неонатални сојеви ГБС (39)	Сојеви одраслих пацијената (85)	
ТОС <sup>1</sup>	343,34 + 41,90 <sup>Г</sup>	337,67 + 37,52 <sup>Г</sup>	p = 0,899 <sup>a</sup>
ТАС <sup>2</sup>	0,1* + 159,34 <sup>Г</sup>	144,96 + 172,09 <sup>Г</sup>	<b>p = 0,017<sup>a</sup></b>
ИОС	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	0,1* + 1,97 <sup>Г</sup>	<b>p = 0,014<sup>a</sup></b>
МДА <sup>3</sup>	0,1* + 0,57 <sup>Г</sup>	0,1* + 3,85 <sup>Г</sup>	p = 0,103 <sup>a</sup>
АОПП <sup>4</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	<b>p = 0,047<sup>a</sup></b>
Тиоли <sup>5</sup>	0,1* + 0,03 <sup>Г</sup>	0,1* + 0,05 <sup>Г</sup>	p = 0,466 <sup>a</sup>
СОД <sup>6</sup>	144,09 ± 12,66 <sup>В</sup>	193,13 ± 8,91 <sup>В</sup>	<b>p = 0,002<sup>b</sup></b>

<sup>a</sup> Ман-Витнијев тест; <sup>b</sup> Студентов т-тест за независни узорак; <sup>В</sup> Подаци са нормалном расподелом су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка; <sup>Г</sup> Подаци који немају нормалну расподелу су приказани као медијана са интерквartilним опсегом; \* -n x10<sup>-4</sup>; <sup>1</sup> Концентрација је изражена у јединицама [μmol/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> еквивалената/mg протеина]; <sup>2</sup> Концентрација је изражена у јединицама [μmol/Тролокс еквивалената/mg протеина]; <sup>3</sup> Концентрација је изражена у јединицама [μmol/mg протеина]; <sup>4</sup> Концентрација је изражена у јединицама [μmol/ хлорамин-Т еквивалената/mg протеина]; <sup>5</sup> Концентрација је изражена у јединицама [μmol/mg протеина]; <sup>6</sup> Активност ензима је изражена у јединицама [U/mg протеина].

*Значајне корелације између биохемијских параметара код неонаталних изолата ГБС и изолата одраслих пацијената.*

Код неонаталних изолата ГБС, детектоване су следеће значајне корелације биохемијских параметара:

- ТОС и МДА (ρ=0,374; p=0,019)
- ТАС и ИОС (ρ=0,841; p <0,001)
- активности СОД и ТАС (ρ=0,340; p=0,034)
- укупног садржаја тиола и АОПП (ρ=0,426; p=0,007)

Међу изолатима ГБС одраслих пацијената, детектоване су следеће значајне корелације биохемијских параметара:

- ТАС и ТОС (ρ=0,324; p =0,002)
- ТАС и ИОС (ρ=0,833; p <0,001)
- ТОС и ИОС (ρ=0,244; p =0,040)
- ТОС и активности СОД (ρ=0,233; p =0,032)
- ТОС и резистенције на макролиде (ρ=0,323; p =0,003)
- активности СОД и МДА (ρ=0,222; p=0,041)

#### 4.5.4 Анализа биохемијских параметара у функцији резистенције на макролиде и тетрациклин

У процени односа резистенције на макролиде и тетрациклин са вредностима биохемијских параметара оксидативног и антиоксидативног статуса сојева ГБС приказане су дескриптивне вредности и значајности разлике у Табелама 21 и 22. Код испитивања повезаности биохемијских параметара са резистенцијом на макролиде сојева ГБС, приказано је постојање значајних разлика, док резистенција на тетрациклин није показала повезаност са испитиваним биохемијским параметрима, као ни корелације.

**Табела 21 - Резултати процене значајности разлике вредности биохемијских параметара оксидативног и антиоксидативног статуса између сојева ГБС осетљивих и резистентних на макролиде.**

Параметар	Осетљивост сојева ГБС на макролиде		
	Осетљиви сојеви ГБС (90)	Резистентни сојеви ГБС (34)	р-вредност
ТОС <sup>1</sup>	336,19 + 39,61 <sup>Г</sup>	350,79 + 33,09 <sup>Г</sup>	<b>p = 0,011<sup>a</sup></b>
ТАС <sup>2</sup>	70,10 + 169,09 <sup>Г</sup>	0,1* + 179,80 <sup>Г</sup>	p = 0,448 <sup>a</sup>
ИОС	0,1* + 1,97 <sup>Г</sup>	0,1* + 1,96 <sup>Г</sup>	p = 0,850 <sup>a</sup>
МДА <sup>3</sup>	0,1* + 2,23 <sup>Г</sup>	0,1* + 2,12 <sup>Г</sup>	p = 0,495 <sup>a</sup>
АОПП <sup>4</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	<b>p = 0,038<sup>a</sup></b>
Тиоли <sup>5</sup>	0,1* + 0,03 <sup>Г</sup>	0,1* + 0,11 <sup>Г</sup>	p = 0,624 <sup>a</sup>
СОД <sup>6</sup>	176,90 ± 8,77 <sup>B</sup>	179,83 ± 14,97 <sup>B</sup>	p = 0,863 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ман-Витнијев тест; <sup>b</sup> Студентов т-тест за независни узорак; <sup>B</sup> Подаци са нормалном расподелом су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка; <sup>Г</sup> Подаци који немају нормалну расподелу су приказани као медијана са интерквartilним опсегом; \*x10<sup>-4</sup>; <sup>1</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2$  еквивалената/mg протеина]; <sup>2</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{Тролокс}$  еквивалената/mg протеина]; <sup>3</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина]; <sup>4</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{хлорамин-Т}$  еквивалената/mg протеина]; <sup>5</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина]; <sup>6</sup> Активност ензима је изражена у јединицама [U/mg протеина].

*Значајне корелације између биохемијских параметара код сојева ГБС осетљивих и резистентних на макролиде.*

Међу сојевима ГБС осетљивим на макролиде, детектоване су следеће значајне корелације биохемијских параметара:

- ТАС и ИОС ( $\rho=0,821$ ;  $p<0,001$ )
- ТАС и инвазивног потенцијала ( $\rho=0,288$ ;  $p=0,006$ )
- ИОС и инвазивног потенцијала ( $\rho=0,308$ ;  $p=0,003$ )
- МДА и инвазивног потенцијала ( $\rho=0,210$ ;  $p=0,046$ )



- СОД и инвазивног потенцијала ( $\rho=0,261$ ;  $p=0,013$ )
- МДА и активности СОД ( $\rho=0,210$ ;  $p=0,047$ )

Међу сојевима ГБС резистентним на макролиде, детектоване су следеће значајне корелације биохемијских параметара:

- ТОС и укупног садржаја тиола ( $\rho=0,442$ ;  $p=0,009$ )
- ТАС и ИОС ( $\rho=0,948$ ;  $p<0,001$ )
- ИОС и МДА ( $\rho=0,347$ ;  $p=0,045$ )

**Табела 22 - Резултати процене значајности разлике вредности биохемијских параметара оксидативно/антиоксидативног статуса између сојева ГБС осетљивих и резистентних на тетрациклин.**

Параметар	Осетљивост сојева ГБС на тетрациклине		p-вредност
	Осетљиви сојеви ГБС (15)	Резистентни сојеви ГБС (109)	
ТОС <sup>1</sup>	336,76 + 43,49 <sup>Г</sup>	342,14 + 41,70 <sup>Г</sup>	p = 0,233 <sup>а</sup>
ТАС <sup>2</sup>	0,1* + 168,17 <sup>Г</sup>	0,1* + 171,45 <sup>Г</sup>	p = 0,578 <sup>а</sup>
ИОС	0,1* + 1,96 <sup>Г</sup>	0,1* + 1,97 <sup>Г</sup>	p = 0,802 <sup>а</sup>
МДА <sup>3</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	0,1* + 2,27 <sup>Г</sup>	p = 0,377 <sup>а</sup>
АОПП <sup>4</sup>	0,1* + 126,80 <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	p = 0,153 <sup>а</sup>
Тиоли <sup>5</sup>	0,1* + 0,30 <sup>Г</sup>	0,1* + 0,03 <sup>Г</sup>	p = 0,436 <sup>а</sup>
СОД <sup>6</sup>	170,22 ± 23,22 <sup>В</sup>	178,73 ± 83,60 <sup>В</sup>	p = 0,715 <sup>б</sup>

<sup>а</sup> Ман-Витнијев тест; <sup>б</sup> Студентов т-тест за независни узорак; <sup>В</sup> Подаци са нормалном расподелом су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка; <sup>Г</sup> Подаци који немају нормалну расподелу су приказани као медијана са интерквartilним опсегом; \*x10<sup>-4</sup>; <sup>1</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2$  еквивалената/mg протеина]; <sup>2</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{Тролокс}$  еквивалената/mg протеина]; <sup>3</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина]; <sup>4</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{хлорамин-Т}$  еквивалената/mg протеина]; <sup>5</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина]; <sup>6</sup> Активност ензима је изражена у јединицама [U/mg протеина].

#### 4.5.5 *Анализа биохемијских параметара у функцији капсуларних типова и хипервирулентног клона ST17*

У погледу односа припадности сојева ГБС различитим капсуларним типовима и припадности хипервирулентном клону ST17 са вредностима биохемијских параметара оксидативног и антиоксидативног статуса, представљене су вредности дескрипције параметара и значајности разлике у Табелама 23, 24, 25 и 26. У наведеним испитивањима

повезаности није забележена значајност разлике међу различитим испитиваним групама. По припадности сојева ГБС хипервирулентном клону ST17, детектоване су значајне корелације.

**Табела 23 - Дескрипција вредности биохемијских параметара оксидативног и антиоксидативног статуса капсуларних типова 124 соја ГБС**

CPS тип	Параметар		
	ТОС <sup>1</sup>	ТАС2	ИОС
Ia	342,45 + 363,19 <sup>a</sup>	82,58 + 181, 31 <sup>a</sup>	0,1* + 1,96 <sup>a</sup>
Ib	329,85 + 57,32 <sup>a</sup>	0,1* + 171,22 <sup>a</sup>	0,1* + 1,98 <sup>a</sup>
II	345,68 + 140,02 <sup>a</sup>	172,09 + 140,02 <sup>a</sup>	1,96 + 1,48 <sup>a</sup>
III	336,43 + 36,92 <sup>a</sup>	0,1* + 161,47 <sup>a</sup>	0,1* + 1,96 <sup>a</sup>
IV	351,75 + 0,01 <sup>a</sup>	178,33 + 0,01 <sup>a</sup>	1,98* + 0,01 <sup>a</sup>
V	343,57 + 35,01 <sup>a</sup>	0,1* + 167,19 <sup>a</sup>	0,1* + 1,96 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Подаци који немају нормалну расподелу су приказани као медијана са интерквartilним опсегом; \* $\times 10^{-4}$ ; <sup>1</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2$  еквивалената/mg протеина]; <sup>2</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{Тролокс}$  еквивалената/mg протеина]

**Табела 24 - Дескрипција вредности биохемијских параметара оксидативног и антиоксидативног статуса капсуларних типова 124 соја ГБС**

CPS тип	Параметар			
	МДА <sup>1</sup>	АОП <sup>2</sup>	Тиоли <sup>3</sup>	СОД <sup>4</sup>
Ia	0,1* + 1,87 <sup>a</sup>	0,1* + 32,74 <sup>a</sup>	0,1* + 0,01 <sup>a</sup>	172,10 + 18,32 <sup>b</sup>
Ib	0,1* + 0,44 <sup>a</sup>	0,1* + 0,01* <sup>a</sup>	0,1* + 0,02 <sup>a</sup>	167,71 + 23,51 <sup>b</sup>
II	0,1* + 0,67 <sup>a</sup>	0,1* + 0,01* <sup>a</sup>	0,14 + 1,08 <sup>a</sup>	211,11 + 35,56 <sup>b</sup>
III	0,1* + 1,82 <sup>a</sup>	0,1* + 0,01* <sup>a</sup>	0,1* + 0,11 <sup>a</sup>	166,09 + 10,97 <sup>b</sup>
IV	0,1* + 0,01* <sup>a</sup>	0,1* + 0,01* <sup>a</sup>	0,1* + 0,01 <sup>a</sup>	187,19 + 79,33 <sup>b</sup>
V	0,1* + 4,96 <sup>a</sup>	0,1* + 0,01* <sup>a</sup>	0,1* + 0,03 <sup>a</sup>	199,01 + 16,16 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Подаци који немају нормалну расподелу су приказани као медијана са интерквartilним опсегом; <sup>b</sup> Подаци са нормалном расподелом су приказани као аритметичка средина  $\pm$  стандардна грешка; \* $\times 10^{-4}$ ; <sup>1</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина]; <sup>2</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{хлорамин-Т}$  еквивалената/mg протеина]; <sup>3</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина]; <sup>4</sup> Активност ензима је изражена у јединицама [U/mg протеина].

**Табела 25 - Резултати процене значајности разлике вредности биохемијских параметара оксидативно/антиоксидативног статуса између сојева ГБС различитог капсуларног типа.**

	Параметар						
	ТОС	ТАС	ИОС	МДА	АОПП	Тиоли	СОД
р-вредност	0,355 <sup>б</sup>	0,051 <sup>б</sup>	0,093 <sup>б</sup>	0,361 <sup>б</sup>	0,075 <sup>б</sup>	0,518 <sup>б</sup>	0,506 <sup>а</sup>

<sup>а</sup> За процену значајности разлике коришћена је параметарска АНОВА са LSD *Post hoc* тестом. <sup>б</sup> За процену значајности разлике коришћен је Краскал Волисов Х тест.

**Табела 26 – Дескриптивни параметри и резултати процене значајности разлике вредности биохемијских параметара оксидативно/антиоксидативног статуса између сојева ГБС хипервирулентног клона ST17 и non-ST17.**

Параметар	Сојеви ГБС хипервирулентног клона ST17 (35)	Сојеви ГБС non-ST17 (89)	р-вредност
ТОС <sup>1</sup>	342,14 + 37,76 <sup>Г</sup>	335,19 + 36,80 <sup>Г</sup>	р = 0,355 <sup>а</sup>
ТАС <sup>2</sup>	0,1* + 172,09 <sup>Г</sup>	0,1* + 169,51 <sup>Г</sup>	р = 0,341 <sup>а</sup>
ИОС	0,1* + 1,96* <sup>Г</sup>	0,1* + 1,97 <sup>Г</sup>	р = 0,591 <sup>а</sup>
МДА <sup>3</sup>	0,1* + 1,89 <sup>Г</sup>	0,1* + 2,34 <sup>Г</sup>	р = 0,649 <sup>а</sup>
АОПП <sup>4</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	0,1* + 0,01* <sup>Г</sup>	р = 0,659 <sup>а</sup>
Тиоли <sup>5</sup>	0,1* + 0,03 <sup>Г</sup>	0,1* + 0,10 <sup>Г</sup>	р = 0,997 <sup>а</sup>
СОД <sup>6</sup>	155,83 ± 11,89 <sup>В</sup>	186,31 ± 9,30 <sup>В</sup>	<b>р = 0,047<sup>б</sup></b>

<sup>а</sup> Ман-Витнијев тест; <sup>б</sup> Студентов т-тест за независни узорак; <sup>В</sup> Подаци са нормалном расподелом су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка; <sup>Г</sup> Подаци који немају нормалну расподелу су приказани као медијана са интерквartilним опсегом; \*x10<sup>-4</sup>; <sup>1</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2$  еквивалената/mg протеина]; <sup>2</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{Тролокс}$  еквивалената/mg протеина]; <sup>3</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина]; <sup>4</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{хлорамин-Т}$  еквивалената/mg протеина]; <sup>5</sup> Концентрација је изражена у јединицама [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина]; <sup>6</sup> Активност ензима је изражена у јединицама [U/mg протеина].

*Значајне корелације између биохемијских параметара код сојева ГБС хипервирулентног клона ST17 и non-ST17.*

Међу сојевима ГБС хипервирулентног клона ST17, детектоване су следеће значајне корелације биохемијских параметара:

- ТОС и ТАС ( $\rho=0,264$ ;  $p=0,012$ )
- ТОС и ИОС ( $\rho=0,323$ ;  $p=0,002$ )
- ТОС и активности СОД ( $\rho=0,210$ ;  $p=0,048$ )
- ТОС и резистенције на макролиде ( $\rho=0,230$ ;  $p=0,030$ )
- ТАС и ИОС ( $\rho=0,967$ ;  $p<0,001$ )
- ТАС и АОПП ( $\rho=0,280$ ;  $p=0,008$ )

Међу сојевима ГБС non-ST17, детектоване су следеће значајне корелације биохемијских параметара:

- ТАС и ИОС ( $\rho=0,873$ ;  $p < 0,001$ )
- МДА и укупног садржаја тиола ( $\rho=0,346$ ;  $p=0,041$ )

## 5. ДИСКУСИЈА

Група Б стрептокока као комплексна бактеријска врста, изражених способности адаптације домаћину, испољава различите модалитете односа са хуманим домаћином. Од асимптоматског колонизатора урогениталног и гастроинтестиналног тракта здравих људи, преко изазивача неинвазивних инфекција, најчешће урогениталног тракта где је и колонизатор, до изазивача инвазивних инфекција, како одраслих особа тако и новорођенчади. Пут, начин и механизми трансформације бактерије из улоге колонизатора у изазивача обољења, нису до краја разјашњени. Бројне студије се баве из различитих аспеката патогенезом и епидемиологијом болести које ГБС изазива. Тако је ГБС и препознат као један од најзначајнијих бактеријских узрочника неонаталног морбидитета и морталитета (236). Наведене студије су довеле до увида стручне јавности о размери и значају узрочника, што је узроковало увођење превентивних мера у спречавању неонаталних инфекција употребом интрапарталне антибиотске профилаксе, али и надзора над колонизацијом асимптоматских трудница и препознавању фактора ризика код симптоматских трудница (237). Регистроване су и повећане инциденције јављања инвазивних инфекција ГБС код различитих популација старијих пацијената, као и одраслих имунокомпромитовних или на други начин предиспонирних особа са одређеним факторима ризика (173). Такође су у порасту и инциденције неинвазивних инфекција одраслих особа које нису трудне, а имају одређене факторе ризика или су без јасних и препознатих предиспонирајућих фактора (123). Јављају се и високе стопе резистенције на антибиотике који се користе као антибиотици друге терапијске линије, а ту су и забрињавајући случајеви детектовања сојева који су мултирезистентни и на резервне антибиотике последње терапијске линије (154). Што се тиче пеницилина и  $\beta$ -лактамских антибиотика као антибиотика прве терапијске линије, ГБС је и даље осетљив иако се детектују све чешће претеће промене у геному које потенцијално довести и до резистенције на ове антибиотике (179). Студије прате и дистрибуцију и заступљеност капсуларних типова сојева ГБС који доминантно доводе до инфекција одговарајућих група пацијената, а у циљу препознавања патогенетских образаца и потенцијалног развоја и примене коњугованих полисахаридних вакцина које би смањиле могућност развоја неонаталних инфекција пре свега, а потенцијално и инвазивних инфекција старије популације у ризику (236). Детектује се и заступљеност и учешће хипервирулентног клона III/ST17, као доказаног честог узрочника тешких инвазивних инфекција неонатуса, посебно касних форми болести. Посебна пажња се усмерава на кретање клона и међу другим капсуларним типовима, као што је тип IV, који такође може да носи главни фактор вируленције HvgA адхезин (238). Бројни су механизми и различити фактори вируленције који су још увек непотпуно познати, а чије функције и различита регулација експресије доприноси развоју инфекције и преласку ГБС из улоге симбионта у патогена.

У овој тези је испитивана учесталост асимптоматске колонизације трудница ГБС у Србији у периоду 2015. до 2020. године, а такође и инциденција инвазивних неонаталних болести. Испитивани су фенотипови и генотипови резистенције на антибиотике који се користе терапијски за лечење пацијената, као и антибиотика од епидемиолошког значаја који утичу на удружену резистенцију (тетрациклин, флуорохинолони, гентамицин високе дозе). Такође, анализирана је дистрибуција капсуларних типова сојева ГБС различитог порекла узорака пацијената, као и присуство хипервирулентног клона. Ово је прва студија

у Србији која описује трендове у антимикумној резистенцији и дистрибуцији генотипова инвазивних и неинвазивних сојева ГБС. Испитивана је и генетска основа повезаности сојева ГБС, посебно узрочника инвазивних форми болести. Коначно, испитивани су и по први пут биохемијски параметри оксидативног и антиоксидативног стања сојева ГБС, а у функцији додатног разјашњења фундаменталних основа патогенетског механизма функционисања сојева ГБС који су у статусу асимптоматског колонизатора и изазивача инвазивне бактеријске болести. Поједини биохемијски параметри (ТОС, ТАС, ИОС) су у овој студији први пут анализирани за ову бактеријску врсту, а такође и редокс статус је по први пут испитиван у контексту клиничких изолата.

У овој студији, процењена преваленција асимптоматске колонизације трудница сојевима ГБС у Републици Србији у периоду од 2015. до 2020. године је износила 15,6%. Преваленција колонизације трудница у свету варира међу земљама и регионима и креће се од 11,1% у Азији до преко 30% у Африци. Процењена светска стопа колонизације трудница ГБС је око 18%, док је у европским земљама забележена нешто нижа преваленција, од 15,2% до 15,4%) (18). Подаци о преваленцији асимптоматске колонизације трудница у Србији су врло оскудни и сведе се на податке студије Гајић и сарадника, по којој је стопа колонизације трудница у Србији у 2015/2016. години износила 15% (239). Осим разлика у дистрибуцији преваленције колонизације трудница ГБС у различитим деловима света, на учесталост колонизације утичу и бројни други фактори (културолошки, етничке карактеристике, године живота трудница, гојазност, навике у исхрани, контакт са животињама, хигијенске навике и друге) (240). Такође, на проценат детектоване колонизације пресудно утиче примењена микробиолошка методологија, од типа узорка (брис вагинални, вагинално-ректални, ректални, један или више брисева), преко методе изолације и детекције ГБС (врсте хранљиве подлоге, коришћења бујона за предбогаћење, коришћење селективних и хромогених подлога или само КП) или коришћење молекуларних техника или имуноесеја (241). Тренутне препоруке се разликују између америчких које се и даље базирају на предбогаћењу вагинално-ректалних брисева и коришћењу селективних и хромогених подлога и европских које дају предност брзим PCR методама (242). У нашој земљи, не постоје званичне препоруке скрининга, већ се оне спорадично примењују и базирају на коришћењу вагинално-ректалних брисева и изолације на селективним и хромогеним подлогама.

Укупна процењена инциденција инвазивних неонаталних инфекција ГБС за наведени период у Србији је износила 0,18 на 1.000 живорођене деце, што је преко 2,5 пута нижа стопа од процењене светске инциденције инвазивних неонаталних ГБС болести новорођенчади, која се у периоду од 2001. до 2017. године процењена од 0,49 до 0,53 на 1.000 живорођене деце (243). У Србији се спорадично примењује скрининг трудница на вагинално-ректалну колонизацију и интрапартална примена антибиотика код колонизованих трудница, што у одређеној мери утиче на учесталост инвазивне неонаталне болести коју изазива ГБС. Узорци су прикупљани из великог броја центара којима гравитира преко 80% пацијената са територије наше земље. Такође, изолати су слати волонтерски јер у Републици Србији не постоји обавеза слања инвазивних изолата у НРЛ. Сходно томе, процењена вредност инциденције је можда потцењена. Ипак, у односу на регион, процењена инциденција је слична вредностима објављене студије са Крита где је током 22-годишњег периода праћења укупна инциденција неонаталних ГБС болести износила 0,17 на 1.000 живорођене деце (244).

Ако се посматрају појединачно случајеви ране и касне неонаталне болести, резултати ове студије показују да је инциденција EOD (0,12) виша од вредности за LOD (0,05). У поређењу са вредностима светске инциденције EOD (0,41) и LOD (0,26), инциденције у нашој земљи су доста ниже (243). У европским оквирима, вредности инциденција у нашој студији одговарају објављеним нижим вредностима: инциденције EOD у Европи се крећу од 1,43 у Данској 2014. године до 0,12 у Швајцарској 2016. године, док се вредности инциденције LOD крећу од 0,42 у Шпанији 2014. године до 0,08 у Холандији 2007. године и 0,02 у Данској 2004. године (243). Такође, однос заступљености EOD и LOD у нашој студији, упућује на недовољну примену превентивних мера за развој ране неонаталне болести. Као што је већ наведено, у земљама где се примењују превентивне мере попут скрининга на колонизацију ГБС трудница и примена интрапарталне антибиотске терапије у потпуности имплементирани, ризик за трансмисију и развој неонаталних инвазивних ГБС болести је драстично смањен (129). Треба имати и у виду да су студије указале да све до сада примењене превентивне мере у неонаталним ГБС болестима су имале значаја само у случајевима EOD, док су на LOD или имале ограничен утицај или нису уопште утицале (245). Због свега наведеног, више вредности EOD у односу на LOD се готово по правилу срећу у земљама у којима нису имплементирани превентивне мере за развој инвазивне неонаталне болести или у периоду пре него што су исте успостављене. Благи пад инциденције неонаталних болести новорођенчади забележен у овој студији у периоду од 2015. до 2020. године, није имао статистичку значајност и пре се могу приписати малом узорку и недовољном обухвату популације, него реалном значајном паду стопе случајева неонаталних болести.

Одрасли пацијенти су чинили 25% инвазивних узорака ГБС у овој студији, са просеком година око 60 и сепсом као примарном клиничком дијагнозом. У свету је забележен значајан пораст заступљености инвазивних ГБС обољења одраслих, која су до 1991. чинили око 50% пријављених инвазивних ГБС болести, док се након 2010. године тај проценат порастао на преко 66% случајева. Промена заступљености одраслих пацијената код инвазивних ГБС болести се објашњава старењем популације, факторима ризика, пре свега учесталашћу дијабетеса, али и све успешнијом превенцијом неонаталних обољења (123). У овој студији, број случајева је био сувише мали да би се донео статистички значајан закључак о порасту броја случајева инвазивних ГБС обољења старије популације ( $p=0,051$ ).

Код инвазивних форми болести, новорођенчади и одраслих пацијената, најчешћи лабораторијски узорак је била хемокултура, а сепса доминантна клиничка дијагноза. Налаз наше студије код новорођенчади одговара студији из Холандије 2019. године где је регистрован пораст броја хемокултура као узорка и сепсе као доминантне клиничке дијагнозе посебно код неонаталних инфекција у периоду 2001. до 2017. године (246). Исто тако у студији из Брисела из 2020. године, наводи се значајан пораст инвазивних инфекција одраслих пацијената са бактеријемом као најчешћом клиничком манифестацијом која је у значајном порасту од 2009. до 2018. године (247). У нашој студији, број инвазивних узорака одраслих пацијената је био сувише мали да би се уочио статистички значајан тренд пораста броја таквих инфекција.

У овој студији, сви сојеви ГБС су тестирани на осетљивост антибиотика, од којих је на макролиде и тетрациклин забележена резистенција, док на пеницилин, ванкомицин, норфлоксацин и хлорамфеникол није. Такође, нису детектовани ни сојеви са резистенцијом на гентамицин у високој дози. Обзиром да су у више земаља света регистровани мултирезистентни сојеви ГБС са резистенцијом на флуорохинолоне, повезаном са резистенцијом на хлорамфеникол, као и резистентни сојеви ГБС на ванкомицин и гентамицин високе дозе, овакви подаци су још увек задовољавајући (154).

У погледу испитивања осетљивости ГБС на пеницилин, вршено је и одређивање минималне инхибиторне концентрације у циљу детекције потенцијалних изолата са смањеном осетљивошћу. Вредности МИК пеницилина су се код свих тестираних сојева ГБС кретале од 0,06 µg/ml до 0,120 µg/ml, са мањим разликама у концентрацијама у зависности од типа пацијента, односно порекла узорка. У овој студији нису детектовани сојеви ГБС који нису задовољавали критеријуме осетљивости по EUCAST 2020. стандарду (157). По дистрибуцији пацијената, односно изолата по пореклу узорака, слична студија нашој пољских аутора, наводи нешто ужи ранг МИК вредности од 0,032 µg/ml до 0,125 µg/ml, док се у мађарској студији која се бавила одраслим пацијентима изузев трудница, МИК вредности подударају са вредностима детектованим код исте популације у нашој студији (0,016 µg/ml - 0,064 µg/ml). Први сојеви ГБС са смањеном осетљивошћу су регистровани 2007. године у САД, а Kimura и сарадници су већ 2008. године описали молекуларне основе ове појаве код сојева ГБС са смањеном осетљивошћу на пеницилин у Јапану (145). Обзиром на чињеницу да све више земаља пријављује појаву сојева који прелазе граничне вредности за осетљивост како на пеницилин, тако и на поједине цефалоспорине, важно је континуирано вршити надзор над потенцијалном појавом оваквих сојева (248). Посебан проблем представља чињеница да се овакви сојеви описују често и као мултирезистентни, односно да имају удружену резистенцију не само на макролиде и тетрациклин, већ и на флуорохинолоне и друге групе антибиотика (137).

Као што је већ речено, у студији је детектована висока стопа резистенције на макролиде и линкозамиде: 26,7% за еритромицин и 22,1% за клиндамицин. Стопе резистенције варирају у односу на географску локацију и посматрану популацију пацијената чији су изолати ГБС испитивани (173). У свету се стопе резистенције на еритромицин крећу од доста високих 74% у Кини 2016. године како код инвазивних изолата, тако и код изолата из колонизације трудница, па до ниских 4% у Литванији 2012. године и још нижих 1% у Гани 2015. године (249,163,250). Такође, и стопе резистенције за клиндамицин имају опсег од скоро 66% резистентних сојева на Тајвану 2019. године, до 1,8% код трудница у Аргентини 2013. године (166,167). И у Европи се стопе резистенције различито крећу међу државама: резистенције на еритромицин и клиндамицин се крећу од 14,5% и 14% у Шведској 2014. године, 30% и 24% у Пољској 2020. године, 30% и 28% у Швајцарској 2013. године, до 43,7% и 32,2% у Италији 2016. године (251,252,253,254). Подаци ове студије са европским регионом, највише одговарају пријављеним вредностима резистенције у Ирској 2017. године, где је 22,5% сојева ГБС резистентно на еритромицин и 21,3% на клиндамицин (165). Амерички Центар за превенцију и контролу болести означио је у свом извештају сојеве ГБС резистентне на клиндамицин као једне од претећих бактеријских патогена у погледу значаја резистенције на антибиотике у САД (255). У истом извештају, ови сојеви ГБС су са удруженом резистенцијом на еритромицин,



означени као главни узрочници инфекција код пацијената са алергијом на пеницилин, где таква ситуација представља посебан проблем у терапији (256).

У овој студији је такође регистрован значајни тренд пораста учесталости резистенције током трајања студије од 9,5% (са 19,7% на 29,2%) за еритромицин и 6,8% (са 17,3% на 24,1%) за клиндамицин. У односу на претходно објављену студију о резистенцији сојева ГБС на макролиде у Србији, укупне стопе резистенције су биле веће, и то 3,6% за еритромицин и 0,8% за клиндамицин (239). Пораст стопа резистенције на макролидне антибиотике код ГБС се широм света све чешће пријављује, а у неким земљама постаје забрињавајуће висока. Драстичан пример раста резистенције је пример Кине где је иначе висока резистенција на макролидне антибиотике порасла за еритромицин са 78,6% на 92,5% и за клиндамицин са 64,3% на 87,5% (257). У Европи се такође бележе значајни скокови стопа резистенције на макролидне антибиотике: у Енглеској је од 1991. године забележен значајан пораст резистенције до 2010. године на еритромицин са 3% на 15%, док је на клиндамицин проценат достигао 9%. Од тада, раст резистенције је на стабилних 3% годишње (173). У Норвешкој је детектован значајан пораст са 4% из периода 2004-2006. године на 22% у периоду 2016-2018. године. за еритромицин и са 4% на 20% за клиндамицин (258). У Португалу је регистрован један од значајнијих пораста резистенције у Европи од 2009. до 2015. године са око 12% на 40% за еритромицин и са око 10% на 37% за клиндамицин, а значајне порасте пријављују и у другим Европким државама (259)(260). Стопе које су најприближније порасту у нашој студији су објављене од стране Пољских аутора за 2020. годину са растом од 24% на 30,3% за еритромицин и са 20% на 24,8% за клиндамицин (252). Ако поредимо резистенцију на макролиде по пореклу изоловања сојева од пацијената, у овој студији није детектована значајна разлика у присуству резистенције на макролиде код неких пацијената више у односу на друге. У овој студији је код скоро две трећине ГБС резистентних на макролиде детектован сMLS фенотип резистенције, који се карактерише укрштеном резистенцијом на MLS антибиотике и изразито високим вредностима МИК како на еритромицин тако и на клиндамицин. Овај механизам резистенције на макролиде је препознат као најчешћи код ГБС и и од стране аутора у Пољској 2007. године Немачкој 2005. године, Француској 2001. године, Италији 2020. године, Енглеској 2013. године и Португалији 2018. године (252,261,262,260,173,259). Однос заступљености појединачних фенотипова резистенције на макролиде међу сојевима ГБС у Србији у овој студији су 60,8% за сMLS, 22% за iMLS и 17% за М фенотип. Сличне вредности дистрибуције фенотипова нашој студији пријављују и други аутори. Lopes и сарадници 2018. године истичу већу доминацију сMLS фенотипа (81%) у односу на iMLS (15,4%) и М фенотип (3,6%), док сличније вредности онима у нашој студији дају Brzychczy-Włoch и аутори 2010. године (63% за сMLS, 26% за iMLS и 11% за М фенотип), као и Kaminska и аутори 2020. године (60% за сMLS, 22% за iMLS и 18% за М фенотип) (259,37,252). У погледу вредност минималних инхибиторних концентрација на макролидне антибиотике, високе МИК вредности ( $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ ) су очекиване код сMLS фенотипа. Вредности за МИК<sub>50</sub> и МИК<sub>90</sub> еритромицин и клиндамицин у нашој студији за iMLS и М фенотип слични су подацима Brzychczy-Włoch и аутора објављеним 2010. године, осим већих вредности МИК<sub>90</sub> за еритромицин и код iMLS и М фенотип (3,25  $\mu\text{g/ml}$  и 3,5  $\mu\text{g/ml}$ ) (37). У погледу гена резистенције на макролидне антибиотике, најчешћи детектовани је био *ermB* ген, који је и повезан са претходно детектованим доминантним фенотипом резистенције на макролиде сMLS фенотипом. М фенотип је био представљен *mefA* геном, а iMLS фенотип

већински *ermA* геном. Код појединих сојева са *sMLS* фенотипом, детектовано је присуство комбинације *ermB* и *mefA* гена. Оваква дистрибуција гена за макролидну резистенцију сојева ГБС је у сагласју са налазима других аутора (37,259).

Осим резистенције на макролидне антибиотике, у студији је регистрован и висок проценат резистенције на тетрациклин (85,2%). Слична заступљеност (86%) је утврђена и у претходној студији Гајић и сарадника из Србије, а високе стопе пријављују и други аутори: 93% у Пољској 2020. године, 91% у Кини 2015. године, 86% у Холандији 2020. године, 85% у Португалији 2018. године, 82,3% у Мађарској 2019. године (239,252,164,263,259,264). Висок проценат резистенције на тетрациклин (>80%) је данас већ уобичајен код сојева ГБС услед клоналне селекције и експанзије таквих сојева. Посебна особина генетске основе резистенције на тетрациклин је да је посредована генима који се налазе на мобилним генетским елементима са којима лако долази до њихове трансмисије међу бактеријама (265). Тетрациклин није један од лекова избора за лечење инфекција посредованих ГБС, али се праћење резистенције и њен опис врши у молекуларно епидемиолошке сврхе због удружености са резистенцијом на друге антибиотске групе. Наиме истим механизмом трансфера гена резистенције долази до трансфера и гена резистенције на макролиде, али и хлорамфеникол (169). У прилог томе говори и налаз студије да су сви сојеви ГБС резистентни на макролиде, били истовремено резистентни и на тетрациклин. Пример једног таквог трансфер-механизма је и *Tn3872* транспозон, идентификован код бројних врста у оквиру рода *Streptococcus* па и ГБС, који носи управо *ermB* ген, експримирајући фенотипски *sMLS* фенотип и *tetM* ген, док су код ГБС специфично нађени *Tn916* и *Tn5801* у сојевима који су се данас издвојили као доминантни и на себи носе управо ове генске детерминанте (265,266). У овој студији, управо је *tetM* ген и био доминантно детектован, скоро 80% свих тетрациклин резистентних сојева. Уз њега детектован је још и *tetO* (20,4%) и *tetL* (0,1%) ген. Налази студије се поклапају са налазима других аутора који такође наводе доминацију *tetM* гена међу својим испитиваним сојевима, уз налазе *tetO* и *tetL* гена. Удруженост, односно истовремено јављање гена резистенције *tetM + tetO* и *tetM + tetL* је такође регистровано у нашој студији код малог броја сојева ГБС, а као тако и описано од стране других аутора који су добили исте резултате (259). У погледу заступљености резистенције на тетрациклине у различитим групама пацијената, нису детектоване значајне разлике. Током трајања студије од 2015. до 2020. године, као и у случају резистенције на макролиде, и код тетрациклина је регистрован значајан тренд пораста стопе резистенције са 82% на 90,9%. Висока заступљеност и даљи тренд раста броја сојева резистентних на тетрациклин је глобално детектована и објашњава се издвајањем клонова ГБС под селективним притиском тетрациклина од половине прошлог века који су данас доминантни у хуманој популацији (265).

Од 10 до сада препознатих капсуларних типова, у овој студији је детектовано шест типова (CPS тип Ia, Ib и од II до V). Међу њима, типови V и III су чинили преко половине (51,8%) свих сојева, док су преостала четири CPS типа заједно чинила 48,2% изолата. Дистрибуције капсуларних типова су се разликовала код појединих група пацијената. Тип III је био најчешћи у педијатријској популацији, док је тип V доминирао код адултних пацијената. Тако је тип III значајно више био заступљен међу инвазивним сојевима у односу на неинвазивне и чинио више од половине тестираних сојева. Такође и унутар инвазивних сојева је постојала разлика међу дистрибуцијом типова, која је код инвазивних

изолата одраслих више одговарала детектованој дистрибуцији код одраслих неинвазивних изолата. Тако је и CPS тип III значајно више био заступљен међу инвазивним неонаталним изолатима у односу на изолате одраслих. Са друге стране, CPS тип V значајно је више био заступљен међу инвазивним изолатима одраслих у односу на неонаталне изолате. И међу неонаталним изолатима је детектована значајна разлика у типу III, који је значајно више био заступљен међу изолатима новорођенчади са LOD формом у односу на изолате новорођенчади са EOD. Значајне разлике су регистроване и међу CPS типом II, који се значајно више јављао код неинвазивних у односу на инвазивне изолате, као и међу неинвазивним сојевима, где се значајно више јављао код асимптоматских колонизованих трудница у односу на нетрудне пацијенте са урогениталним инфекцијама. Такође, тип Ia и II нису били детектовани у популацији новорођенчади са касном формом неонаталне болети. Дистрибуција капсуларних типова се разликује и у свету у односу на географску заступљеност, али и у односу на типове пацијената, односно порекло изолата. Тако се регион Европе често групише са САД у погледу дистрибуције CPS типова, обзиром на релативну сличност, односно одсуство значајних разлика у дистрибуцији. Према подацима метаанализе из 2020. године, која је обухватила последњих 198 студија и 29247 изолата ГБС широм света, између 93% и 99% изолата обухвата истих шест CPS типова (Ia, Ib и од II до V) детектованих и у нашој студији. Типови од VI до IX су у свету доста ретки, осим у деловима Азије и западне Африке, где могу заједно чинити и до 15% сојева. Срачунате светске дистрибуције CPS типова из ових студија за наведених шест типова се наводе за 4296 сојева EOD (22%; 8%; 7%; 52%; 1% и 9%), 3849 сојева LOD (14%; 4%; 1%; 77%; 1% и 3%), 2525 инвазивних сојева одраслих пацијената (27%; 12%; 10%; 14%; 2% и 31%) и 17247 изолата асимптоматски колонизованих трудница (22%; 9%; 12%; 28%; 2% и 19%) (267). За неинвазивне одрасле пацијенте који нису труднице, светску заступљеност шест CPS типова (24,3%; 12,2%; 11,9%; 16,5%; 0,3% и 27,5%) можемо упоредити са студијом Song и сарадника из 2018. године (236). И поред варирања у процентима заступљености који се разликују по географским регионома, постоје односи који су у већини студија исти. Тако се наводи доминација CPS типа III међу инвазивним неонаталним изолатима и типа V међу неинвазивним изолатима, што је потврђено и у овој студији (267). Налаз из ове студије, разлике и већа заступљеност CPS типа III међу инвазивним неонаталним изолатима у односу на одрасле је такође утврђен и у студијама других аутора (268). Међу инвазивним неонаталним изолатима, CPS тип III се значајно више налази код LOD изолата (70%) у односу на сојеве EOD (46%). Овај налаз је у сагласју и са подацима добијеним нашом студијом. У погледу осталих CPS типова, њихове разлике се доводе у контекст осим регионалних географских разлика и у везу са клиничком дијагнозом односно типом узорка неонаталних инвазивних пацијената. Тако се разлике у дистрибуцији CPS типова између EOD и LOD детектују код типова II и V у случајевима бактеријемје, односно сепсе у корист веће заступљености наведених типова код EOD (267). Обзиром да је крв доминантан узорак, односно сепса главна клиничка манифестација неонаталних инвазивних случајева и у нашој студији, наведена већа заступљеност типова II и V се види и код наших изолата, али без статистичке значајности. Код инвазивних сојева одраслих, се метаанализом запажа пре свега доминација типа V, а затим у већини земаља типова Ia и III, док су у Азији ретки типови (VI до IX) и тип IV доста чести (267). У нашој студији су такође типови V и III детектовани у готово 70% типизираних изолата од одраслих особа са инвазивним обољењима ГБС. Међу сојевима колонизованих трудница, метаанализом се наводе три CPS типа која су најчешћа (III, Ia и

V) пре свега у Европи, Северној Америци, Африци, Аустралији и источној Азији, као и да је тип IV чешћи у Европи и Северној Америци у односу на остатак света (129). Подаци наше студије су у сагласју са наведеним заступљеностима најчешћа два типа V и III, док је тип II детектован као трећи најчешћи (20%), а затим Ia и Ib (25%). У односу на неинвазивне одрасле пацијенте са ГБС инфекцијама, резултати наше студије се слажу са налазима осталих студија у виду доминације типа V и односа осталих типова. Са друге стране, детектована је разлика у већем броју изолата типа III који је на другом месту по заступљености, на рачун типа Ia, који је у већини студија више заступљен. У погледу неонаталних инвазивних сојева и изолата колонизованих трудница, забележене су значајне разлике у заступљености CPS типова, од којих су типови II и V били више присутни код колонизованих трудница, а тип III код неонаталних изолата. Колонизоване труднице се сматрају главним резервоарима сојева ГБС који доводе до инвазивних обољења новорођенчади. Неколико студија је известило да изолати ГБС колонизованих трудница имају дистрибуцију CPS типова која се у највећој мери подудара са инвазивним неонаталним сојевима на истом географском подручју (269,270). Са друге стране, у директној студији упарених узорака колонизованих мајки и новорођенчади, узорковани изолати ГБС су показали одступања у молекуларним карактеристикама, пре свега капсуларним типовима, али и у секвенцијским типовима. Детектоване су измене између CPS типова III и Ib, V и Ia, као и између ST86 и ST176 у оквиру CC19 као последица измене на *glcK* гену (271). Остаје у даљњим истраживањима утврдити механизме измена или истовремено присуство два соја код истог пацијента.

У складу са оваквом дистрибуцијом CPS типова и разликом између инвазивних и неинвазивних изолата, јавља се различит потенцијал одређених CPS типова ГБС да изазову инвазивна обољења. У овој студији, утврђено је да изолати CPS типа III имају изражени потенцијал односно већу вероватноћу да код пацијената код којих су изоловани изазову инвазивно обољење, док су вредности потенцијала за остале типове били испод вредности 1, односно имали су смањену могућност изазивања инвазивне болести. На основу одређивања могућности за изазивање инвазивног обољења од стране других аутора, закључено је да само сојеви CPS типа III увек имају високе вредности потенцијала изнад 1 (1,8–4,2), тј. већу могућност да конкретан CPS тип изазове инвазивно обољење (121,24,272). Дистрибуција CPS типова у оквиру група пацијената, може да указује на хомогеност или хетерогеност различитих CPS типова који доводе до таквог стања. Генерална дистрибуција указује на хетерогеност CPS типова групације сојева која доводе до обољења и колонизације, међутим међу сојевима коју изазивају LOD, уочена је хомогеност типова (SID = 0,199), што се огледа и кроз заступљеност CPS типа III од преко 84% у овој форми болести. Сличан налаз диверзификације типова је претходно објављен у Србији у студији Гајић и сарадника, где су такође сојеви порекла LOD показали највећу хомогеност (SID = 0,13), предвођени такође CPS типом III (>93%), док су сојеви порекла EOD и одраслих пацијената били хетерогеног састава CPS типова (SID = 0,72 и 0,88) (239). Током периода трајања студије, дошло је и до регистровања промена у јављању одређених CPS типова, како на нивоу целе студијске групе испитиваних сојева, тако и по појединачним групама пацијената. Значајне промене су се јавиле код CPS типа II у повећању детектовања овог соја за 6,4% и пада детектовања CPS типа V за 6,3%. Наведени значајни пад јављања типа V је детектован и у групи сојева ГБС изолованих од асимптоматских колонизованих трудница. Промене у CPS типовима се често региструју, обзиром на способност ГБС за измену CPS типа (273,238). Поједини аутори наводе

промене у расту типа III, IV и V код колонизованих трудница у последњих 20 година и смањења Ia и Ib. Међу инвазивним неонаталним сојевима наводи се раст заступљености сојева ГБС типа III код EOD, док је код LOD овај тип константно високо присутан (267). Lopes и сарадници наводе са друге стране пад заступљености типа III, а пораст присуства сојева типа Ib међу инвазивним сојевима ГБС одраслих нетрудних пацијената у Португалу од 2009. до 2015. године. Такође пријављују и смањење заступљености сојева CPS типа Ia, али без статистичке значајности (259). Такође у нашој студији је, међу свим инвазивним изолатима дошло до регистровања пада типа Ib, али без статистичке значајности. Промена у типу Ib код инвазивних сојева ГБС у смислу значајног пада је детектована код пре свега изолата порекла менингитиса код неонаталних инфекција у праћењу оваквих инфекција у последњих 30 година у Холандији (268). Обзиром да је међу инвазивним неонаталним инфекцијама у нашој студије број узорака церебралне течности и менингитиса као упутне дијагнозе био релативно мали и да је у односу на претходно наведену студију наша трајала много краће, значајност пада заступљености CPS типа Ib није забележена. Налаз смањења тренда CPS типа V код сојева ГБС изолованих од асимптоматских колонизованих трудница у нашој студији је у сагласју са налазом Италијанских аутора који су такође у периоду од 2017. године па на даље забележили значајно смањење типа V и раст типа III код колонизованих трудница (260). Осим појединачног праћења типова V и Ib, треба имати на уму и њихов однос у оквиру ST1, где су Lopes и сарадници детектовали постојање капсуларне замене, из типа V у капсуларни тип Ib (259).

У студији је праћена детекција *HvgA* адhezина, специфичног за хипервирулентни клон ST17. Већина сојева детектованог клона је припадала CPS типу III (95,7%), док је само шест сојева припадало CPS типу IV (4,3%). Ово присуство *hvgA* гена је претходно описано од стране Bellais и сарадника као последица капсуларне измене променом 35kb генског сегмента (238). Присуство оваквих сојева је већ објављено у Србији од стране Гајић и сарадника, као и у Мађарској од стране Kardos и сарадника (239,264). Процент детектованих сојева хипервирулентног клона ST17 у нашој студији (41,6%) је приближан броју метаанализе аутора Bianchi-Jassir и сарадника (41%; CI 35-47) (132). У нашој студији је праћено присуство хипервирулентног клона III/ST17, који је значајно више детектован код инвазивних у односу на неинвазивне изолате ГБС, а такође је био и међу инвазивним изолатима значајно присутнији код неонаталних у односу на изолате одраслих пацијената. Овакви налази студије су у сагласју са опште познатим карактеристикама хипервирулентног клона III/ST17 о повезаности са инвазивним обољењима ГБС и чешћем присуству међу неонаталним изолатима (238,267,268). Хипервирулентни клон III/ST17 чинио је више од трећине свих инвазивних изолата, као и скоро половину изолата LOD и две трећине изолата порекла менингитиса. Повезаност хипервирулентног клона са менингитисом и LOD је већ добро описана услед способности *HvgA* адhezина за адхеренцију хороидних епителних ћелија и микроваскуларних ендотелијалних ћелија, као и инвазију ЦНС-а (80). Иако је клон био заступљенији међу LOD изолатима у односу на сојеве порекла EOD, није достигнута статистичка значајност услед малог броја узорака. Насупрот томе је детектован већи удео ST17 позитивних сојева међу CPS типом III код EOD изолата у односу на LOD, али такође без статистичке значајности услед малог броја узорака. Значајно већа заступљеност каква је нађена у нашој студији по питању заступљености хипервирулентног клона код LOD (47%) у односу на EOD (38%;  $p=0,045$ ) и удела ST17 позитивних изолата у CPS типом III код EOD (56%) у односу на LOD (33%;  $p=0,01$ ) је пријављена као таква од стране других аутора (268). Током трајања студије,

детектоване су и промене у кретању заступљености хипервирулентног клона III/ST17 у целој студијској групи, без статистичке значајности, али и значајног пораста у оквиру неонаталних сојева, као и укупног удела ST17 позитивних сојева међу изолатима ГБС CPS типа III од 2015. до 2020. године. Сличан значајан налаз нам дају и аутори из Холандије код којих је током 30 година праћења ST17 позитивних сојева, број порастао са 35% на 43% ( $p=0,04$ ) (268). Током њиховог праћења еволуције клонова ГБС, детектовано је издвајање неколико линија CC17 које су средином 1990-тих година 20-тог века почеле да преузимају доминантну нишу, пре свега међу инвазивним неонаталним изолатима, повећавајући своје присуство из године у годину. Сматра се да је до овога сценарија допринело обезбеђивање нових способности клона, пре свега преко фага  $\phi$ Stag1. Овакви сојеви нису детектовани пре 1997. године, а од 2000. године имају стабилан раст заступљености (263).

У овој студији, сојеви хипервирулентног клона III/ST17 су детектовани у значајно мањем броју код асимптоматских колонизованих трудница у односу на инвазивне неонаталне изолате. Мања је била и заступљеност ST17 позитивних сојева у оквиру свих сојева CPS типа III између ове две групе узорака. Таква диспропорција у карактеристикама између сојева ГБС порекла трудница и новорођенчади је описана кроз мењање молекуларних карактеристика током вертикалног преноса (271).

У превенцији инфекција ГБС, пре свих неонаталних инвазивних и стања колонизације трудница, све чешће се помињу вакцине различитог састава капсуларних типова. Прве формулисане вакцине су биле тровалентне коњуговане (Ia, Ib и III), затим петовалентне (Ia, Ib, II, III и V), па шестовалентне (Ia, Ib, II, III, IV и V) (274). Процењена покривеност новорођенчади коњугованим вакцинама у развоју би износила 76,6% за тровалентну, 96,6% за петовалентну и у случају шестовалентне би покрила све сојеве. Ипак, забележени пораст учесталости капсуларног типа IV ће потенцијално у будућности довести до мање покривености сојева ГБС у Србији петовалентном вакцином. Претпостављена покривеност за тровалентну и петовалентну коњуговану вакцину је слична извештају Lu и сарадника, док је за шестовалентну у нашој студији и виша од процењених 98% од стране *Vanman* и сарадника (275,274).

Учесталост резистенције на макролиде и тетрациклине се разликовала код изолата ГБС са различитим капсуларним типом. Највише заступљености резистенције на макролиде су забележене код изолата са типовима V, IV, II и III. Више студија је потврдило да су сојеви CPS типа V често удружени са резистенцијом на макролиде као и корезистенцијом на тетрациклин. Мађарски аутори 2019. године истичу типове V, III и Ib као носиоце резистенције на макролиде изолата неинвазивних инфекција одраслих пацијената (264). Аутори из Италије 2020. године такође наводе типове V и III као носиоце резистенције на макролиде код трудница у петогодишњем периоду праћења, са типом II као трећим најчесталијим, односно другим у погледу заступљености M фенотипа после типа V (260). Како су сви сојеви ГБС резистентни на макролиде били и корезистентни на тетрациклине, доминантни генотипови наших сојева резистентних на макролиде су били: V/*ermB/tetM*, IV/*ermB/tetM*, III/*ermB/tetM*, II/*ermB/tetM*, Ia/*mefA/tetM* и Ib/*ermB/tetM*. Слични резултати у виду заступљености генотипова III/*ermB/tetM*, V/*ermB/tetM* и II/*ermB/tetM* су већ препознати и описани у претходно публикованом истраживању у Србији 2019. године (239). *Orregaard* и сарадници су 2020. године у

периоду од 2004. до 2018. године детектовали следеће генотипове: III/*ermB/tetM*, V/*ermB/tetM*, IV/*ermA/tetM* и Ia/*mefA/tetM*. Дакле, у Норвешкој су сојеви типа IV имали индуцибилан фенотип резистенције на макролиде удружен са резистенцијом на тетрациклине, док су у нашој средини идентификовани сојеви са испим типом, IV, али конститутивном резистенцијом на макролиде и резистенцијом на тетрациклине. Ови налази указују да осим клоналне експанзије одређених резистентних сојева ГБС, на дисеминацију резистенције и њено ширење међу овом бактеријском врстом, велики утицај има пре свега трансфер мобилних генетичких елемената (258).

Анализа PFGE профила инвазивних сојева ГБС је очекивано показала разноврсност профила (47 профила од 69 тестираних сојева), која се огледала и у високом индексом диверзитета. Бројне студије које су се бавиле профилисањем сојева ГБС користећи PFGE методу, добиле су високу хетерогеност профила сојева, односно PFGE се показао као врло дискриминативна метода за разликовање профила сојева ГБС (37,276). Профили типизираних сојева су кластеровани на основу своје сличности у шест кластера. Сви формирану PFGE кластери, осим једног, су били састављени од профила сојева ГБС истог CPS типа. Овакав налаз као и висока вредност Wallace коефицијента указују на врло добру предиктивну вредност PFGE профилисања за CPS тип. Насупрот томе, сојеви истог CPS типа су били истовремено детектовани и у кластерима и дистрибуирани по мањим PFGE групама и појединачним профилима, те предиктивност у том смеру није задовољавајућа. Сличне налазе су дале и друге студије које указују да кластеровани ГБС профили могу делити исти CPS тип, док се један CPS тип може налазити у различитим PFGE кластерима (24). Највећи степен хомологије међу PFGE кластерима, исказао је CPS тип V, што наводе и други аутори у претходно објављеним студијама (276,37). Највећи кластер у PFGE анализи сојева ГБС су чинили изолати хипервирулентног клона III/ST17, док су сојеви CPS типа III *hvgA* негативни били груписани у други кластер. Груписање профила изолата CPS типа III у највеће кластере описују и други аутори (277). Интересантан налаз је да су сојеви клона III/ST17, на основу PFGE профила показали нижу вредност хомологије од сојева типа V. Овакав налаз доводи до хипотезе да PFGE профилисање ових сојева може извршити осетљивије разликовање сојева у оквиру клона III/ST17 (264). Два инвазивна соја ГБС CPS типа IV/ST17 профилисана PFGE, показала су да је један изолат био груписани са типом IV/non-ST17, а други са сојевима III/ST17. Овако кластеровање сојева указује на могућност настанка сојева IV/ST17 путем оба претходно објављена механизма генетске рекомбинације, односно стицањем *HvgA* адхезина код сојева са капсуларним типом IV или капсуларном изменом соја који је променио генотип из III/ST17 у IV/ST17 (238). PFGE профилисање инвазивних ГБС изолата показало је такође да су доминантни сојеви носиоци резистенцији на макролиде сојеви CPS типа V, али и изолати хипервирулентног клона III/ST17, за разлику од изолата III/non-ST17. Управо повећање заступљености хипервирулентног клона може доприносити повећању резистенције на макролиде, као и на тетрацилин. Доминација CPS типа V као носиоца резистенције у PFGE профилисању ГБС сојева је претходно описана од других аутора (278). За разлику од добре предиктивне вредности PFGE профила у односу на CPS типове, у односу на резистенцију на макролиде је слаба, односно ова група је сувише хетерогена у нашој студији, у чему се слажу и резултати Brzychczy-Włoch и сарадника 2010. године (37).

Филогенетска анализа испитиваних сојева ГБС, указала је на висока генетичку сродност највећег дела циркулишућих сојева. Добијени резултати указују да је у Србији, популација ГБС доминантно састављена од сојева који су се фиксирани у популацији и успешно пропагирани. Један од широко дисеминованих генотипова је и добро описан хипервирулентни клон III/ST17 који је најзначајнији узрочних инвазивних инфекција како код нас у земљи, тако и на светском нивоу (267). Такође, селективни притисак антибиотика који се примењују не само у терапији инфекција изазваних ГБС, већ и оних који се примењују у сточарству, попут тетрациклина, у великој мери профилишу сојеве који су у нашој циркулацији, што се манифестује њиховом генетичком повезаношћу и релативно високом учесталосту (265). Сходно томе, мере превенције које имају за циљ смањење учесталости инвазивних инфекција, би највећим делом морале бити усмерене управо на описани хипервирулентни сој III/ST17, на генотип IV/ST17, чија учесталост расте, не само у нашој земљи, већ и у другим регионима широм света, али и на тип V који је важан изазивач инвазивних инфекција у адултној популацији (238).

Испитивање биохемијских параметара бактеријског метаболизма је након бројних студија и значајних фундаменталних открића, крајем 20. века, постало од секундарног значаја, препуштајући тада новим молекуларно-генетичким испитивањима предност. У међувремену, поново на почетку 21. века, број истраживања и комбиновања нових метода са опробаним испитивањима биохемијских параметара се полако повећава. У недостатку нових антибиотика на терену познавања досадашњих механизма функционисања бактеријских ћелија, прибегава се откривању и испитивању биохемијских и функционисања бројних других путева у бактеријама који до сада нису били испитани до краја и њихова улога у патогенези болести. Један од битних параметара је управо и оксидативно – редуccionи потенцијал бактеријског метаболизма, као један од кључних система који омогућава преживљавање и адаптацију бактерија на домаћина и услове средине у успостављању како колонизације тако и патогеног потенцијала. Посебно је битан потенцијал у избегавању имунског одговора и преживљавању разорног оксидативног утицаја имунских ћелија, који је код неких бактеријских врста изузетно развијен. Истраживања у овом смеру код рода *Streptococcus* су код неких врста попут *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* доста одмакла и донела увид у многе до сада непознате механизме и односе бактерија и домаћина (192,194). Са друге стране, код *Streptococcus agalactiae*, испитивања су и даље доста оскудна и сведе се на још увек молекуларно-генетичке анализе претраге генома у циљу детекције протеина од интереса за одговарајући биохемијски механизам и малобројне радове који су описали неке од кључних ензима и биохемијских путева у смислу антиоксидативног потенцијала (279,280). Ипак, као што и сами аутори ревијских прегледа о улози различитих биохемијских параметара у патогенетском механизму ГБС закључују, пуно тога тек треба да се испита. С тим у вези, испитивањем биохемијских параметара оксидативног и антиоксидативног статуса бактеријских сојева ГБС у функцији различитих клиничких, фенотипских и генотипских карактеристика, желели смо да дамо по први пут увид у потенцијално постојање разлика у оксидативно - редуccionом статусу сојева ГБС.

Као и остали чланови рода *Streptococcus*, и ГБС често започиње своје присуство у хуманом домаћину у виду колонизације, да би касније у одговарајућим условима потенцијално прешао у ширење ткивима и органима и изазивања болести. На свакој локацији за колонизацију, ГБС мора да се прилагоди различитим условима средине и



односа са ћелијама домаћина, посебно имунским. Утицај на оксидативно стање бактеријске ћелије могу да имају бројни егзогени фактори средине, као што су оксидативни, термални, нутритивни, вредности рН средине и бројни други. На оксидативно стање могу да утичу и ендогени фактори, или приликом свог физиолошког функционисања и продукције реактивних интермедијера који доводе до оштећења услед постојања јединствене средине цитоплазме бактеријске ћелије, односно непостојања компартмана, или услед одговора на прилагођавање спољашњим утицајима средине. Код рода *Streptococcus*, регулација одговора на овакве услове је регулисана углавном преко двокомпонентних регулаторних система који регулишу одговарајуће гене, односно ниво експресије њихових продуката. Само главни такав систем код ГБС CsrS/R, односно CovR/S регулише око 400 гена, односно око 7% генома ГБС (220,113,281).

У овој студији су мерени биохемијски параметри оксидативног и антиоксидативног стања бактеријских сојева ГБС у циљу детектовања редокс статуса сојева у њиховом нативном стању. С тим у вези, предузете су мере униформности услова култивације, манипулације и специфичног лизирања сојева ултразвучном иглом у циљу елиминисања придружених фактора који утичу на редокс статус.

У погледу инвазивности сојева ГБС, детектоване су значајне разлике у одређеним параметрима. Неинвазивни сојеви ГБС су показали значајно више антиоксидативне способности у односу на инвазивне сојеве, које се огледају кроз више вредности ТАС, као и активности СОД. Такође, и вредности ИОС, параметра који осликава укупан однос између количине оксиданата и антиоксиданата, је био значајно нижи код инвазивних у односу на неинвазивне сојеве ГБС. У прилог томе је и вредност МДА, који указује да је детектовано присуство липидне пероксидације било значајно веће код неинвазивних сојева у односу на инвазивне сојеве, што сугерише да је липидна пероксидација главни механизам који доприноси већем ИОС код неинвазивних сојева.

Ради детаљнијег увида у односе између инвазивних и неинвазивних сојева ГБС, урађено је и групно поређење биохемијских параметара у функцији поделе сојева према типу пацијената где су изоловани: колонизацију и инфекције одојчади и одраслих. Као значајни параметри који се разликују су се истакле вредности ТАС, ИОС, укупног садржаја тиола и активности СОД. У примени *Post hoc* тестова, детектовани су тачни односи параметара унутар наведених група. Претходна утврђена значајно виша антиоксидативна способност неинвазивних у односу на инвазивне сојеве, детектована је и у односу сојева EOD и трудница. Више вредности ТАС су биле детектоване код сојева изолованих код трудница у односу на сојеве EOD, као и вредности ИОС који је био значајно нижи код сојева EOD. Такође и између сојева порекла LOD и трудница су детектоване разлике у погледу активности СОД, који је био значајно већи код сојева трудница.

Као што је претходно речено, ГБС је пре свега колонизатор урогениталне регије жена. Да би се прилагодио оваквој средини где владају кисели рН услови (3,8-4,5) које узрокују како ендогени фактори домаћина, тако и резидентна микрофлора у виду пре свега *Lactobacillus spp.* Лактобацили врше одбрану своје нише у виду одржања рН вредности испод 4,5 и продукцијом различитих антимикуробних супстанци, као што су млечна киселина, водоник-пероксид и бројни бактериоцини (282,283). У таквој средини, ГБС треба да преживи и обезбеди себи адхеренцију за епител. Иако ГБС не поседује

каталазу као један од најбитнијих ензима антиоксидативне заштите, ипак врло добро подноси ефекте реактивних кисеоничних радикала. Доказ за то је да у односу на каталазу позитивни *Staphylococcus aureus* преко 10 пута мање осетљив на оштећење узроковано водоник-пероксидом (284). Такође, поседује потентну манган зависну СОД као главни ензим антиоксидативне заштите (214).

У складу са претходно наведеним, резултати појачане антиоксидативне способности неинвазивних сојева у односу на инвазивне, пре свега колонизујућих сојева, говоре у прилог њихове потребе да се заштите од континуираног дејства фактора спољашње средине. Виши ниво антиоксидативне заштите осим што се види у односу на ТАС, односно укупне антиоксидативне ензимске и неензимске капацитете, види се и кроз повећану активност СОД код неинвазивних сојева, трудница и одраслих неинвазивних пацијената у односу на LOD, као и код одраслих неинвазивних пацијената у односу на EOD. Овакви налази се могу потенцијално објаснити утицајем услова средине ниске рН на ГБС. Претходно је показано на примерима *Streptococcus oralis* и *Streptococcus mutans* да при излагању условима са ниским вредностима рН долази до индукције синтезе СОД (285,286). Као што је већ споменуто, за активност СОД ГБС неопходан је  $Mn^{2+}$  који за ГБС обезбеђује транспортер MntH, кодиран од стране истоименог гена *mntH*. Показано је да су управо у условима ниских рН вредности, MntH транспортер и последична активност СОД су неопходни за преживљавање ГБС, односно детектована је већа експресија гена за *sodA* и *mntH* који су под контролом двокомпонентног регулатора генске експресије CovR/S. Осим функције обезбеђивања довољних количина  $Mn^{2+}$  за потребе активности СОД и обезбеђивање довољних количина Fe за раст и размножавање, показано је да MntH има улогу и у адхеренцији за компоненте екстрацелуларног матрикса ламинина и фибронектина при рН=5, чиме олакшава колонизацију гениталног тракта (215).

Међу инвазивним неонаталним сојевима ГБС је детектована разлика у укупној антиоксидативној способности, која се огледала кроз веће вредности ТАС код сојева LOD у односу на сојеве EOD. Овакав налаз се може објаснити потенцијално већим потребама за антиоксидативном заштитом сојева LOD у односу на сојеве EOD, услед дужег инкубационог периода и периода до развоја клиничких симптома, односно дужег патогенетског процеса, али и различитих механизма антиоксидативне заштите. У корелацијама EOD сојева ГБС, уочава се значај тиола, односно глутатиона као главног представника. Глутатион је осим антиоксидативне активности, показао да доприноси и вируленцији сојева ГБС (287). Са друге стране код LOD, већи потенцијал антиоксидативне способности је вероватно изражен путем каротеноидног пигмента. Као што је у уводу наведено, осим СОД ГБС продукује и јединствени каротеноидни пигмент, који му у погледу антиоксидативне заштите обезбеђује неутрализацију супероксида, водоник-пероксида, хипохлорита и синглетног кисеоника, као и у склопу преживљавања фагоцитозе (106). Такође, и ген за каротеноидни пигмент *cytE* је под контролом двокомпонентног регулатора експресије CovR/S. Управо овај регулатор је одговоран како за експресију фактора адхезије и инвазије које користе LOD сојеви, тако и за факторе антиоксидативне заштите и преживљавање фагоцитозе (288). У прилог теорији је и сазнање да је продукција глутатиона мања код сојева ГБС који имају јаку експресију каротеноидног пигмента, јер он својим потенцијалом задовољава потребе бактерије за антиоксидативном заштитом. Овакав налаз је детектован у поређењу соја типа V који је имао већу продукцију глутатиона, док је основ јаке антиоксидативне заштите код соја ГБС

типа III био каротеноидни пигмент (106). У поређењу сојева наше студије, проценат сојева типа III је био значајно већи код LOD изолата, као и процентуално већи број изолата типа V код EOD.

Запажена је и значајна разлика у укупној количини тиола код неинвазивних сојева одраслих у односу на изолате трудница и инвазивне сојеве ГБС одраслих. Осим већ наведених механизма антиоксидативне заштите, ГБС поседује и ниско молекуларни тиол глутатион као неензимски молекул антиоксидативне заштите. Значај глутатиона је код ГБС посебно интересантан, обзиром да поседује изузетно високе концентрације, које су два до 10 пута веће од милимоларних концентрација којепроизводе еукариотске ћелије (289). Међу бактеријама, ГБС такође има највеће концентрације глутатиона, а у поређењу са рецимо врстом *Staphylococcus aureus* и 100 пута више (211). Наиме, за разлику од других стрептокока који своје количине глутатиона обезбеђују уносом из средине, ГБС га и синтетише у великој количини (290). Добијени резултати ове студије у погледу тиола се могу објаснити његовом варијацијом у производњи међу различитим типовима сојева ГБС и уделу у антиоксидативној заштити. Тако је утврђено да је сој ГБС CPS типа V изолован од одраслог пацијента неинвазивног обољења имао значајно већу продукцију глутатиона од соја CPS типа III изолованог из хемокултуре одраслог пацијента (287). У нашим резултатима, преко трећине изолата одраслих неинвазивних пацијената је управо CPS типа V. Такође, у истој студији је показано да и у зависности од стресогеног фактора, долази до различите активације глутатиона и његовог удела у заштити ГБС, као и да се та варијабилност додатно разликује у зависности од CPS типа.

У погледу односа биохемијских параметара између изолата неонаталних инфекција и изолата одраслих пацијената, уочава се сличан однос као између инвазивних и неинвазивних изолата. Видљив је значајно већи капацитет антиоксидативне заштите изолата одраслих пацијената у односу на изолате неонаталних инфекција. Капацитет се огледа кроз веће вредности TAC и активности СОД код изолата одраслих пацијената, односно ниже вредности ИОС код изолата неонаталних инфекција и више вредности оксидације протеина. Овакав налаз указује, као што је претходно споменуто, на веће потребе за антиоксидативном заштитом изолата одраслих, пре свега из колонизоване урогениталне регије трудница, које су исто показале више вредности TAC и ИОС у односу на EOD. Допринос активности СОД је такође већ забележен код сојева неинвазивних у односу на инвазивне, као и код изолата трудница и неинвазивних одраслих пацијената без трудница у односу на LOD изолате. Такође, већа активност СОД је уочена и код неинвазивних изолата одраслих пацијената у односу на EOD изолате. Значај АОПП, се огледа кроз детектовано веће присуство оксидације протеина код неинвазивних одраслих пацијената у односу на EOD изолате.

Детектована способност резистенције на антибиотике као фактора варијабилности биохемијских параметара оксидативног и антиоксидативног статуса ГБС сојева је разматрана у погледу резистенције на макролиде и тетрациклин. Док су у односу на резистенцију на макролиде детектоване значајне разлике маркера оксидације, у односу на тетрациклин нису детектоване значајне разлике. Код односа параметара у односу на резистенцију на макролиде, детектован је значајно већи ниво оксидације код резистентних сојева ГБС, као и постојање већег нивоа АОПП код осетљивих сојева ГБС на макролиде. Овакав однос нивоа оксиданата код резистентних сојева ГБС се може коментарисати

основом њихове резистенције. Наиме, као што је претходно наведено, резистенција на макролиде је посредована или ензимском метилацијом рибозома или активним ефлуksom. Активне ефлуks пумпе за макролиде могу бити посредоване енергијом АТР (фамилија АВС транспортера) или секундарним активним транспортом (MFS фамилија транспортера). Код ГБС, функционисање пумпи за активни транспорт је посредован симпортом  $H^+$  јона, уз који долази и до ослобађања електрона који изазивају генерисање слободних радикала (291). У испитиваној колекцији, било је више од 20% сојева чија је основа резистенције управо овај механизам. Да би се ова теорија потпуно утврдила, био би неопходан већи број сојева резистентних на макролиде са овим механизмом резистенције, како би се испитао њихов однос и претпоставио механизам утицаја нивоа оксиданата на ефлуks активним транспортом. Потенцијална потврда теорије утицаја активног транспорта ефлуks пумпи би се могао видети у непостојању сличних резултата код сојева резистентних на тетрациклинe, обзиром да је код ових сојева доминантан детектован механизам резистенције заштита рибозома, док је активни ефлуks као механизам детектован само код једног соја у колекцији (*tetL*). Треба напоменути да је занимљива корелација ГОС са резистенцијом на макролиде претходно детектована међу неинвазивним сојевима ГБС. Код сојева резистентних на макролиде увиђамо да глутатион представља вероватно главни антиоксидативни механизам и да његова истрошеност доприноси повишеној оксидацији. Ово стање се огледа и у односу ИОС са липидним пероксидима, који очигледно овом приликом настају. Са друге стране, код сојева осетљивих на макролиде детектујемо значајно већу оксидацију протеина кроз вредност АОПП у односу на резистентне сојеве ГБС, који су вероватно овде неспецифични акцептори реактивних кисеоничних радикала.

Биохемијски параметри редокс стања су анализирани и у погледу детектованих капсуларних типова ГБС сојева. У овој анализи, није детектована зависност параметара оксидативног и антиоксидативног стања и капсуларног типа ГБС. Са једне стране, овакав налаз се може коментарисати тиме да експресија капсуларног типа не утиче пресудно на различиту експресију антиоксидативне заштите, односно оксидативног стања. Регулација експресија гена за CPS типове није до краја разјашњена и базира се на специфичности за сој или серотип, односно код неких сојева је детектован CovR/S, а код неких RogB регулатор. Такође и за већину антиоксидативних механизма, CovR/S је одговоран регулатор експресије (292). У студији интрацелуларног преживљавања ГБС унутар фагозома, показано је да ни CPS тип ни MLST тип не показују значајан утицај на преживљавање, већ је кључан фактор била способност CovR/S регулаторног система да изрши одговарајућу експресију на задате стресогене услове (288). Да ипак може потенцијално постојати разлика у редокс статусу ГБС сојева у односу на CPS тип, упућује студија испитивања синтезе глутатиона у којој су детектоване значајне варијације у продукцији. Конкретно, сој CPS типа V имао је 10 до 13 пута веће детектоване количине глутатиона од соја CPS типа III (287). Такође, ту је и корелација укупног антиоксидативног капацитета са поделом сојева на капсуларне типове код неинвазивних сојева ГБС раније детектована у овој студији. Будући да је вредност гранично значајна, као што и на нивоу свих тестираних сојева ТАС гранично није значајан, неопходно је повећати узорак и конципирати посебно истраживање са упареним групама узорака по типу и капсуларном типу како би се подробније испитао утицај CPS типова на редокс статус и донели адекватни закључци. У овом тренутку налаз параметара другачије није могуће коментарисати.

Однос антиоксиданата и оксиданата испитиваних сојева ГБС је разматран и у односу на детекцију *hvgA* гена. Детектована је значајно мања активност СОД код сојева хипервирулентног клона ST17 од осталих изолата ГБС. У студији Royart и сарадника, активност СОД је означена као значајна за интрацелуларно преживљавање у макрофазима (108). Такође, сојеви ГБС нису показали различит ниво преживљавања у макрофазима у односу на CPS или MLST тип, па ни хипервирулентни клон ST17 (288). Изражена вирулентност клонова ГБС овог типа се и огледа у специфичности пре свега његовог адхезина HvgA, чију регулацију обавља такође CovR/S регулаторни систем, као и FbsA и FbsB, Srg2 и експресији *iagA* гена за потребе уградње одговарајућих липотеихоинских киселина (80,293,294). С тога, можемо претпоставити да сојевима овог клоналног типа, није од пресудне значајности експресија виших концентрација СОД од осталих облика ГБС који немају тако изражене факторе вируленције. Томе у прилог иде и корелација ТОС са активношћу СОД, а такође и пероксидација протеина који се понашају као неспецифични акцептори оксидативних радикала у прилог вредности ТАС.

Након свега наведеног, у студији су приказани значајни подаци инциденције одговарајућих стања и обољења ГБС, стању резистенције и дистрибуцији капсуларних типова сојева ГБС на репрезентативном броју узорака у периоду од пет година у Србији. Детектоване су и значајне промене у резистенцији на макролидне антибиотици као алтернативне терапијске линије, као и на тетрациклин као епидемиолошки битан параметар. Такође су детектоване значајне промене у заступљености како одређених капсуларних типова ГБС, тако и хипервирулентног клона међу циркулишућим изолатима ГБС у Србији. Посебан допринос је и посматрање дистрибуције наведених параметара у односу на инвазивне и неинвазивне узорке, као и унутар њихових под група раних и касних неонаталних инфекција, инвазивних одраслих инфекција, као и асимптоматски колонизованих трудница и неинвазивних одраслих инфекција. Осим ових параметара, по први пут је вршено испитивање директног редокс статуса већег броја изолата ГБС у функцији детектовања односа оксидативних и антиоксидативних параметара код различитих сојева ГБС. Посебан значај студији даје број испитиваних биохемијских параметара који до сада није био обухваћен и који по први пут даје свеобухватни приказ редокс односима међу различитим сојевима ГБС, али и отвара пуно нових поља за истраживање и потребу за увођењем додатних параметара. Да би се добијени резултати у овој студији у овом контексту додатно потврдили и разрадили, потребан је свакако већи број сојева са мечованим односима група сојева, увођење додатних параметара како биохемијских, тако и других битних фактора вируленције у испитивање међусобних односа и утицаја на патогенезу болести и функционисање саме бактеријске ћелије. Осим оваквих фундаменталних сазнања, њихова примена у медицини би се могла исказати кроз коришћење механизма антиоксидативне заштите у конструисању нових класа антибиотских лекова који би на њих деловали. Примери за такве потенцијалне кандидате су свакако ензим синтезе глутатиона који се и структурно и функционално разликује од два ензима и три гена који обављају његову функцију у хуманим ћелијама, као и тиоредоксин редуктаза која се такође структурно разликује (211,295).

На крају, треба истаћи да је осим молекуларно-епидемиолошких студија праћења и описивања сојева ГБС, потребно и паралелно вршити молекуларно-биохемијска и генетичка испитивања сојева у циљу што детаљнијих фундаменталних сазнања о механизмима функционисања како самих бактерија, тако и њиховог односа са домаћином.

На тај начин ће се доћи и до побољшања превентивних мера где још увек постоје недоумице, бољих дијагностичких и терапијских смерница, али и коначно значајних сазнања у погледу креирања нових потенцијалних лекова и ефикасних вакцина. Имајући у виду све резултате, предност ове студије је највећи број различитих узорака сојева ГБС од различитих група пацијената и праћење њихових фенотипских и генотипских карактеристика у петогодишњем периоду од 2015. до 2020. године у Србији. Значајно је и по први пут испитивање појединих биохемијских параметара редокс статуса ГБС (ТОС, ТАС и ИОС), а посебан значај доприноси посматрање по први пут овако великог броја биохемијских параметара из угла клиничких узорака и њихов међусобни однос.

Да би се добијени налази ове студије додатно потврдили, а поједини односи и додатно разјаснили, потребан је обухват већег броја сојева, пре свега инвазивних. Потребно је увођењем обавезног пријављивања и слања инвазивних сојева ГБС у НРЛ за стрептокок, као и увођење скрининга и надзора над колонизацијом трудница и неонаталним инфекцијама. У оквиру резистенције, потребно је даље праћење кретања резистенције на MLS групу, тетрациклин, флуорохинолоне и гентамицин високе дозе, али и пратити потенцијално јављање сојева са смањеном осетљивошћу на пеницилин. Ради додатног разјашњења биохемијских односа, потребно је проширити серију узорака са одређеним карактеристикама од интереса и укључити додатне биохемијске параметре.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

У складу са задатим циљевима студије, а на основу представљених резултата, могу се извести следећи закључци:

1. Процењена преваленције асимптоматске колонизације трудница ГБС у Србији у периоду 2015. до 2020. године, износила је 15,6%, што одговара детектованој учесталости колонизације и у другим европским земаљама. Инциденција за ЕОД износила је 0,12 на 1.000 (95% CI 0,1–0,2), односно 0,05 на 1000 (95% CI 0,0–0,1) живорођене деце за LOD случајеве.
2. Сојеви ГБС били су потпуно осетљиви на пеницилин, ванкомицин, норфлоксацин, хлорамфеникол и гентамицин у високој дози. Резистенција на еритромицин је износила 26,7%, на клиндамицин 22,1% и на тетрациклин 85,2% сојева ГБС. Доминантан фенотип резистенције на макролиде био је *sMLS* (60,8%), посредован *ermB* геном. У периоду студије, детектован је значајан пораст тренда резистенције од 9,5% за еритромицин, 6,8% за клиндамицин и 8,1% за тетрациклин.
3. Најчешћи детектовани CPS типови ГБС у током студије су били тип V (26%) и III (25,8%), док су сојеви Ia, Ib, II и IV чинили 48,2% испитиваних сојева. Детектоване су значајне разлике у дистрибуцији CPS типови међу инвазивним и неинвазивним сојевима ГБС, као и значајне промене у тренду одређених типова међу циркулишућим сојевима током периода студије. Такође је регистрована и значајна већа у заступљеност хипервирулентног клона III/ST17 међу инвазивним у односу на неинвазивне сојеве ГБС, као и тренд пораста заступљености овог клона међу циркулишућим сојевима током периода студије.
4. Преко 50% сојева ГБС резистентних на макролиде и тетрациклин су припадали CPS типовима V и III. Наведени сојеви су показали генетичку повезаност, што је потврдила и PFGE кластер анализа. Најчешћи генотипови резистентних сојева ГБС су били: V/*ermB/tetM*, IV/*ermB/tetM*, III/*ermB/tetM*, II/*ermB/tetM*, Ia/*mefA/tetM* и Ib/*ermB/tetM*.
5. Биохемијски параметри редокс статуса су показали значајне разлике у погледу антиоксидативних капацитета инвазивних у односу на неинвазивне сојеве, као и заступљеност одређених механизма заштите сојева у различитим групама узорака. У погледу резистенције на макролиде, параметри оксидације су били већи код резистентних у односу на осетљиве сојеве. Међу сојевима хипервирулентног клона III/ST17 забележена је смањена антиоксидативна способност СОД у односу на остале сојеве ГБС.

На основу резултата и закључака истраживања, праћење фенотипских и генотипских карактеристика циркулишућих сојева ГБС у популацији Србије је битно за успостављање националне стратегије превенције и лечења инфекција ГБС, а одређивање параметара редокс статуса би се могло искористити као додатни инструмент за процену биолошког понашања сојева, као и потенцијално развијање нових лекова и стратегија лечења ове бактеријске врсте.

## 7. ЛІТЕРАТУРА

1. Schuchat A, Wenger JD. Epidemiology of group b streptococcal disease: Risk factors, prevention strategies, and vaccine development. *Epidemiol Rev.* 1994;16(2):374–402.
2. Lancefield RC, Hare R. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. *J Exp Med.* 1935;61(3):335–50.
3. Fry RM. Fatal infections by hæmolytic streptococcus group B. *Lancet.* 1938;231(5969):199–201.
4. Lerner PI, Gopalakrishna KV, Wolinsky E, McHenry MC, Tan JS, Rosenthal M. Group B streptococcus (*S. agalactiae*) bacteremia in adults: analysis of 32 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1977;56(6):457-473.
5. Le Doare K, Heath PT. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine.* 2013;31(S4):D7–12.
6. Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(42):15611–6.
7. Makarova KS, Koonin E V. Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria clusters of orthologous genes of lactobacillales: a framework for comparative genomics and a tool for genome annotation. *J Bacteriol.* 2007;189(4):1199–208.
8. Schottmuller H. Die Artunterscheidung der für den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar. *Münchener med Wochenschrift.* 1903;50:848-853.
9. Brown JH. The use of blood agar for the study of streptococci. 9th ed. New York: The Rockefeller Institute for Medical Research; 1919.
10. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med.* 1933;57(4):571–94.
11. Rosan B. Antigens of *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun.* 1973;7(2):205–11.
12. Hoshino T, Fujiwara T, Kilian M. Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):6073–85.
13. Ferretti J, Köhler W. History of Streptococcal Research . *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations.* University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016.
14. Lupo A, Ruppen C, Hemphill A, Spellerberg B, Sendi P. Phenotypic and molecular characterization of hyperpigmented group B Streptococci. *Int J Med Microbiol.* 2014;304(5–6):717–24.
15. Burnham CAD, Tyrrell GJ. Virulence factors of group B Streptococci. *Reviews in*



- Medical Microbiology. 2003;14(4):109-118.
16. Imperi M, Pataracchia M, Alfaroni G, Baldassarri L, Orefici G, Creti R. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. *J Microbiol Methods*. 2010;80(2):212–4.
  17. Yao K, Poulsen K, Maione D, Daniela Rinaudo C, Baldassarri L, Telford JL, et al. Capsular gene typing of *streptococcus agalactiae* compared to serotyping by latex agglutination. *J Clin Microbiol*. 2013;51(2):503–7.
  18. Russell NJ, Seale AC, O’Driscoll M, O’Sullivan C, Bianchi-Jassir F, Gonzalez-Guarin J, et al. Maternal Colonization with Group B *Streptococcus* and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*. 2017;65(Suppl 2):S100–11.
  19. Lindahl G, Stålhammar-Carlemalm M, Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev*; 2005; 102–27.
  20. Ferrieri P, Flores AE. Surface protein expression in Group B streptococcal invasive isolates. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* . Springer New York LLC; 1997; 635–7.
  21. Gabrielsen C, Mæland JA, Lyng RV, Radtke A, Afset JE. Molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* strains deficient in alpha-like protein encoding genes. *J Med Microbiol*. 2017;66(1):26–33.
  22. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V., Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology; 1995; 2233–9.
  23. Skjaervold NK, Bergh K, Bevanger LS. Distribution of PFGE types of invasive Norwegian group B streptococci in relation to serotypes. *Indian J Med Res Suppl*. 2004;119:201–4.
  24. Martins ER, Pessanha MA, Ramirez M, Melo-Cristino J, Lopes P, Calheiros I, et al. Analysis of group B streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness. *J Clin Microbiol*. 2007;45(10):3224–9.
  25. Butte AJ, Dzau VJ, Glueck SB. Further defining housekeeping, or “maintenance,” genes Focus on “A compendium of gene expression in normal human tissues”. *Physiological genomics*. American Physiological Society; 2001; 95–6.
  26. Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, Oliver KA, Chan MS, Kunst F, et al. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *J Clin Microbiol*. 2003;41(6):2530–6.
  27. Jolley KA, Chan MS, Maiden MCJ. mlstdbNet - Distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics*. 2004;5(1):86.

28. Ramaswamy S V., Ferrieri P, Flores AE, Paoletti LC. Molecular characterization of nontypeable group B streptococcus. *J Clin Microbiol.* 2006;44(7):2398–403.
29. Kang HM, Lee HJ, Lee H, Jo DS, Lee HS, Kim TS, et al. Genotype Characterization of Group B Streptococcus Isolated from Infants with Invasive Diseases in South Korea. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36(10):e242–7.
30. Lo C-W, Liu H-C, Lee C-C, Lin C-L, Chen C-L, Jeng M-J, et al. Serotype distribution and clinical correlation of Streptococcus agalactiae causing invasive disease in infants and children in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2019;52(4):578–84.
31. Skov Sørensen UB, Poulsen K, Ghezzi C, Margarit I, Kilian M. Emergence and global dissemination of host-specific Streptococcus agalactiae clones. *MBio.* 2010;1(3).
32. Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR - A widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(3):181–6.
33. Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell.* Cell Press; 2014; 234–44.
34. Shariat N, Dudley EG. CRISPRs: Molecular Signatures Used for Pathogen Subtyping . *Applied and Environmental Microbiology.* American Society for Microbiology (ASM); 2014;430–9.
35. Lopez-Sanchez M-J, Sauvage E, Da Cunha V, Clermont D, Ratsima Hariniaina E, Gonzalez-Zorn B, et al. The highly dynamic CRISPR1 system of *Streptococcus agalactiae* controls the diversity of its mobilome. *Mol Microbiol.* 2012;85(6):1057–71.
36. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(11):722–36.
37. Brzywczy-Włoch M, Gosiewski T, Bodaszewska M, Pabian W, Bulanda M, Kochan P, et al. Genetic characterization and diversity of Streptococcus agalactiae isolates with macrolide resistance. *J Med Microbiol.* 2010;59(7):780–6.
38. Yazdankhah SP, Lindstedt B-A. Variable Number Tandem Repeat Typing of Bacteria. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). *Methods Mol Biol*; 2007;395–405.
39. Radtke A, Lindstedt BA, Afset JE, Bergh K. Rapid Multiple-Locus Variant-Repeat Assay (MLVA) for genotyping of Streptococcus agalactiae. *J Clin Microbiol.* 2010;48(7):2502–8.
40. Rosenau A, Martins K, Amor S, Gannier F, Lanotte P, Van Der Mee-Marquet N, et al. Evaluation of the ability of Streptococcus agalactiae strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the fbsA and fbsB genes. *Infect Immun.* 2007;75(3):1310–7.
41. Maisey HC, Doran KS, Nizet V. Recent advances in understanding the molecular basis of group B Streptococcus virulence. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* Cambridge

- University Press; 2008; 1–16.
42. Paoletti LC, Kasper DL. Surface Structures of Group B *Streptococcus* Important in Human Immunity. In: Gram-Positive Pathogens. Washington, DC, USA: ASM Press; 2019; 204–27.
  43. Cieslewicz MJ, Kasper DL, Wang Y, Wessels MR. Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci. *J Biol Chem*. 2001;276(1):139–46.
  44. Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, Rodrigues S, et al. Structural and genetic diversity of group B *Streptococcus* capsular polysaccharides. *Infect Immun*. 2005;73(5):3096–103.
  45. Brochet M, Couvé E, Zouine M, Vallaëys T, Rusniok C, Lamy MC, et al. Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microbes Infect*. 2006;8(5):1227–43.
  46. Martin TR, Ruzinski JT, Rubens CE, Chi EY, Wilson CB. The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of group b streptococci from the lungs of infant and adult rats. *J Infect Dis*. 1992;165(2):306–14.
  47. Chang YC, Olson J, Beasley FC, Tung C, Zhang J, Crocker PR, et al. Group B *Streptococcus* Engages an Inhibitory Siglec through Sialic Acid Mimicry to Blunt Innate Immune and Inflammatory Responses In Vivo. *PLoS Pathog*. 2014;10(1).
  48. Hulse ML, Smith S, Chi EY, Pham A, Rubens CE. Effect of type III group B streptococcal capsular polysaccharide on invasion of respiratory epithelial cells. *Infect Immun*. 1993;61(11):4835–41.
  49. Nizet V, Kim KS, Stins M, Jonas M, Chi EY, Nguyen D, et al. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infect Immun*. 1997;65(12):5074–81.
  50. Gendrin C, Merillat S, Vornhagen J, Coleman M, Armistead B, Ngo L, et al. Diminished Capsule Exacerbates Virulence, Blood-Brain Barrier Penetration, Intracellular Persistence, and Antibiotic Evasion of Hyperhemolytic Group B *Streptococci*. *J Infect Dis*. 2018;217(7):1128–38.
  51. Siboo IR, Chambers HF, Sullam PM. Role of SraP, a serine-rich surface protein of *Staphylococcus aureus*, in binding to human platelets. *Infect Immun*. 2005;73(4):2273–80.
  52. Takamatsu D, Bensing BA, Cheng H, Jarvis GA, Siboo IR, López JA, et al. Binding of the *Streptococcus gordonii* surface glycoproteins GspB and Hsa to specific carbohydrate structures on platelet membrane glycoprotein Iba. *Mol Microbiol*. 2005;58(2):380–92.
  53. Seo HS, Minasov G, Seepersaud R, Doran KS, Dubrovskaya I, Shuvalova L, et al. Characterization of fibrinogen binding by glycoproteins Srr1 and Srr2 of *Streptococcus agalactiae*. *J Biol Chem*. 2013;288(50):35982–96.

54. Six A, Bellais S, Bouaboud A, Fouet A, Gabriel C, Tazi A, et al. Srr2, a multifaceted adhesin expressed by ST-17 hypervirulent Group B Streptococcus involved in binding to both fibrinogen and plasminogen. *Mol Microbiol.* 2015;97(6):1209–22.
55. Seifert KN, Adderson EE, Whiting AA, Bohnsack JF, Crowley PJ, Brady LJ. A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen ( $\epsilon$ ) associated with a virulent lineage of serotype III Streptococcus agalactiae. *Microbiology.* 2006;152(4):1029–40.
56. Jiang S, Wessels MR. BsaB, a novel adherence factor of group B Streptococcus. *Infect Immun.* 2014;82(3):1007–16.
57. Buscetta M, Papasergi S, Firon A, Pietrocola G, Biondo C, Mancuso G, et al. FbsC, a novel fibrinogen-binding protein, promotes Streptococcus agalactiae-host cell interactions. *J Biol Chem.* 2014;289(30):21003–15.
58. Schubert A, Zakikhany K, Schreiner M, Frank R, Spellerberg B, Eikmanns BJ, et al. A fibrinogen receptor from group B Streptococcus interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Mol Microbiol.* 2002;46(2):557–69.
59. Gutekunst H, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ. The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes Streptococcus agalactiae invasion into epithelial cells. *Infect Immun.* 2004;72(6):3495–504.
60. Al Safadi R, Amor S, Hery-Arnaud G, Spellerberg B, Lanotte P, Mereghetti L, et al. Enhanced Expression of lmb Gene Encoding Laminin-Binding Protein in Streptococcus agalactiae Strains Harboring IS1548 in scpB-lmb Intergenic Region. *PLoS One.* 2010;5(5).
61. Tenenbaum T, Spellerberg B, Adam R, Vogel M, Kim KS, Schrotten H. Streptococcus agalactiae invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. *Microbes Infect.* 2007;9(6):714–20.
62. Rangunathan P, Sridaran D, Weigel A, Shabayek S, Spellerberg B, Ponnuraj K. Metal Binding Is Critical for the Folding and Function of Laminin Binding Protein, Lmb of Streptococcus agalactiae. Song Y-H, editor. *PLoS One.* 2013;8(6):e67517.
63. Sridharan U, Rangunathan P, Spellerberg B, Ponnuraj K. Molecular dynamics simulation of metal free structure of Lmb, a laminin-binding adhesin of Streptococcus agalactiae: metal removal and its structural implications. *J Biomol Struct Dyn.* 2019;37(3):714–25.
64. Moulin P, Patron K, Cano C, Zorgani MA, Camiade E, Borezée-Durant E, et al. The Adc/Lmb system mediates zinc acquisition in Streptococcus agalactiae and contributes to bacterial growth and survival. *J Bacteriol.* 2016;198(24):3265–77.
65. Mu R, Kim BJ, Paco C, Del Rosario YD, Courtney HS, Doran KS. Identification of a group B streptococcal fibronectin binding protein, SfbA, that contributes to invasion of brain endothelium and development of meningitis. *Infect Immun.* 2014;82(6):2276–86.
66. Stoner TD, Weston TA, Trejo J, Doran KS. Group B streptococcal infection and activation of human astrocytes. *PLoS One.* 2015;10(6):1–18.

67. Gendrin C, Shubin NJ, Boldenow E, Merillat S, Clauson M, Power D, et al. Mast cell chymase decreases the severity of group B *Streptococcus* infections. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(1):120-129.e6.
68. Buscetta M, Firon A, Pietrocola G, Biondo C, Mancuso G, Midiri A, et al. PbsP, a cell wall-anchored protein that binds plasminogen to promote hematogenous dissemination of group B *Streptococcus*. *Mol Microbiol*. 2016;101(1):27–41.
69. Cook LCC, Hu H, Maienschein-Cline M, Federle MJ. A vaginal tract signal detected by the group b streptococcus saers system elicits transcriptomic changes and enhances murine colonization. *Infect Immun*. 2018;86(4).
70. De Gaetano GV, Pietrocola G, Romeo L, Galbo R, Lentini G, Giardina M, et al. The *Streptococcus agalactiae* cell wall-anchored protein PbsP mediates adhesion to and invasion of epithelial cells by exploiting the host vitronectin/ $\alpha$ vintegrin axis. *Mol Microbiol*. 2018;110(1):82–94.
71. Maisey HC, Hensler M, Nizet V, Doran KS. Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. In: *Journal of Bacteriology*. *J Bacteriol*. 2007;1464–7.
72. Dramsi S, Caliot E, Bonne I, Guadagnini S, Prévost MC, Kojadinovic M, et al. Assembly and role of pili in group B streptococci. *Mol Microbiol*. 2006;60(6):1401–13.
73. Banerjee A, Kim BJ, Carmona EM, Cutting AS, Gurney MA, Carlos C, et al. Bacterial Pili exploit integrin machinery to promote immune activation and efficient blood-brain barrier penetration. *Nat Commun*. 2011;2(1):1–11.
74. Pezzicoli A, Santi I, Lauer P, Rosini R, Rinaudo D, Grandi G, et al. Pilus Backbone Contributes to Group B *Streptococcus* Paracellular Translocation through Epithelial Cells. *J Infect Dis*. 2008;198(6):890–8.
75. Maisey HC, Quach D, Hensler ME, Liu GY, Gallo RL, Nizet V, et al. A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. *FASEB J*. 2008;22(6):1715–24.
76. Rosini R, Rinaudo CD, Soriani M, Lauer P, Mora M, Maione D, et al. Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol*. 2006;61(1):126–41.
77. Santi I, Scarselli M, Mariani M, Pezzicoli A, Masignani V, Taddei A, et al. BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood. *Mol Microbiol*. 2007;63(3):754–67.
78. Santi I, Maione D, Galeotti CL, Grandi G, Telford JL, Soriani M. BibA Induces Opsonizing Antibodies Conferring In Vivo Protection against Group B *Streptococcus*. *J Infect Dis*. 2009;200(4):564–70.
79. Lamy MC, Dramsi S, Billoët A, Réglie-Poupet H, Tazi A, Raymond J, et al. Rapid detection of the “highly virulent” group B streptococcus ST-17 clone. *Microbes Infect*.

- 2006;8(7):1714–22.
80. Tazi A, Disson O, Bellais S, Bouaboud A, Dmytruk N, Dramsi S, et al. The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *J Exp Med*. 2010;207(11):2313–22.
  81. Bohnsack JF, Chang JK, Hill HR. Restricted ability of group B streptococcal C5a-ase to inactivate C5a prepared from different animal species. *Infect Immun*. 1993;61(4):1421–6.
  82. Cheng Q, Carlson B, Pillai S, Eby R, Edwards L, Olmsted SB, et al. Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci. *Infect Immun*. 2001;69(4):2302–8.
  83. Beckmann C, Waggoner JD, Harris TO, Tamura GS, Rubens CE. Identification of novel adhesins from group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infect Immun*. 2002;70(6):2869–76.
  84. Hull JR, Tamura GS, Castner DG. Interactions of the streptococcal C5a peptidase with human fibronectin. *Acta Biomater*. 2008;4(3):504–13.
  85. Tamura GS, Hull JR, Oberg MD, Castner DG. High-affinity interaction between fibronectin and the group B streptococcal C5a peptidase is unaffected by a naturally occurring four-amino-acid deletion that eliminates peptidase activity. *Infect Immun*. 2006;74(10):5739–46.
  86. Pritchard DG, Lin B. Group B streptococcal neuraminidase is actually a hyaluronidase. *Infect Immun*. 1993;61(8):3234–9.
  87. Li S, Jedrzejewski MJ. Hyaluronan Binding and Degradation by *Streptococcus agalactiae* Hyaluronate Lyase. *J Biol Chem*. 2001;276(44):41407–16.
  88. Gendrin C, Vornhagen J, Armistead B, Singh P, Whidbey C, Merrillat S, et al. A Nonhemolytic Group B *Streptococcus* Strain Exhibits Hypervirulence. *J Infect Dis*. 2018;217(6):983–7.
  89. Kolar SL, Kyme P, Tseng CW, Soliman A, Kaplan A, Liang J, et al. Group B *Streptococcus* Evades Host Immunity by Degrading Hyaluronan. *Cell Host Microbe*. 2015;18(6):694–704.
  90. Vornhagen J, Quach P, Boldenow E, Merrillat S, Whidbey C, Ngo LY, et al. Bacterial hyaluronidase promotes ascending GBS infection and preterm birth. *MBio*. 2016;7(3):1–10.
  91. Devaux L, Sleiman D, Mazzuoli M-V, Gominet M, Lanotte P, Trieu-Cuot P, et al. Cyclic di-AMP regulation of osmotic homeostasis is essential in Group B *Streptococcus*. Kearns DB, editor. *PLOS Genet*. 2018;14(4):e1007342.
  92. Andrade WA, Firon A, Schmidt T, Hornung V, Fitzgerald KA, Kurt-Jones EA, et al. Group B *Streptococcus* Degrades Cyclic-di-AMP to Modulate STING-Dependent Type I Interferon Production. *Cell Host Microbe*. 2016;20(1):49–59.

93. Kristian SA, Datta V, Weidenmaier C, Kansal R, Fedtke I, Peschel A, et al. D-alanylation of teichoic acids promotes group A *Streptococcus* antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J Bacteriol.* 2005;187(19):6719–25.
94. Saar-Dover R, Bitler A, Nezer R, Shmuel-Galia L, Firon A, Shimoni E, et al. D-Alanylation of Lipoteichoic Acids Confers Resistance to Cationic Peptides in Group B *Streptococcus* by Increasing the Cell Wall Density. Peschel A, editor. *PLoS Pathog.* 2012;8(9):e1002891.
95. Gryllos I, Tran-Winkler HJ, Cheng MF, Chung H, Bolcome R, Lu W, et al. Induction of group A *Streptococcus* virulence by a human antimicrobial peptide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(43):16755–60.
96. Bryan JD, Liles R, Cvek U, Trutschl M, Shelver D. Global transcriptional profiling reveals *Streptococcus agalactiae* genes controlled by the MtaR transcription factor. *BMC Genomics.* 2008;9(1):607.
97. Pritzlaff CA, Chang JCW, Kuo SP, Tamura GS, Rubens CE, Nizet V. Genetic basis for the  $\beta$ -haemolytic/cytolytic activity of group B streptococcus. *Mol Microbiol.* 2001;39(2):236–48.
98. Carey AJ, Tan CK, Mirza S, Irving-Rodgers H, Webb RI, Lam A, et al. Infection and Cellular Defense Dynamics in a Novel 17 $\beta$ -Estradiol Murine Model of Chronic Human Group B *Streptococcus* Genital Tract Colonization Reveal a Role for Hemolysin in Persistence and Neutrophil Accumulation. *J Immunol.* 2014;192(4):1718–31.
99. Patras KA, Wang NY, Fletcher EM, Cavaco CK, Jimenez A, Garg M, et al. Group B *Streptococcus* CovR regulation modulates host immune signalling pathways to promote vaginal colonization. *Cell Microbiol.* 2013;15(7):1154–67.
100. Randis TM, Gelber SE, Hooven TA, Abellar RG, Akabas LH, Lewis EL, et al. Group B *Streptococcus*  $\beta$ -hemolysin/cytolysin breaches maternal-fetal barriers to cause preterm birth and intrauterine fetal demise in vivo. *J Infect Dis.* 2014;210(2):265–73.
101. Whidbey C, Harrell MI, Burnside K, Ngo L, Becraft AK, Iyer LM, et al. A hemolytic pigment of Group B *Streptococcus* allows bacterial penetration of human placenta. *J Exp Med.* 2013;210(6):1265–81.
102. Nizet V, Gibson RL, Chi EY, Framson PE, Hulse M, Rubens CE. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect Immun.* 1996;64(9):3818–26.
103. Doran KS, Liu GY, Nizet V. Group B streptococcal  $\beta$ -hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *J Clin Invest.* 2003;112(5):736–44.
104. Jürgens D, Sterzik B, Fehrenbach FJ. Unspecific binding of group B streptococcal cocytolysin (camp factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. *J Exp Med.* 1987;165(3):720–32.

105. Hensler ME, Quach D, Hsieh CJ, Doran KS, Nizet V. CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B Streptococcus. *Microb Pathog.* 2008;44(1):84–8.
106. Liu GY, Doran KS, Lawrence T, Turkson N, Puliti M, Tissi L, et al. Sword and shield: Linked group B streptococcal  $\beta$ -hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(40):14491–6.
107. Christie K, Atkins N, Munch-Petersen E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1944;22(3):197–200.
108. Poyart C, Pellegrini E, Gaillot O, Boumaila C, Baptista M, Trieu-Cuot P. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun.* 2001;69(8):5098–106.
109. Xia F Di, Mallet A, Caliot E, Gao C, Trieu-Cuot P, Dramsi S. Capsular polysaccharide of Group B Streptococcus mediates biofilm formation in the presence of human plasma. *Microbes Infect.* 2015;17(1):71–6.
110. Ho YR, Li CM, Yu CH, Lin YJ, Wu CM, Harn IC, et al. The enhancement of biofilm formation in Group B streptococcal isolates at vaginal pH. *Med Microbiol Immunol.* 2013;202(2):105–15.
111. D’Urzo N, Martinelli M, Pezzicoli A, De Cesare V, Pinto V, Margarit I, et al. Acidic pH strongly enhances in vitro biofilm formation by a subset of hypervirulent ST-17 Streptococcus agalactiae strains. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(7):2176–85.
112. Faralla C, Metruccio MM, De Chiara M, Mu R, Patras KA, Muzzi A, et al. Analysis of two-component systems in group B streptococcus shows that RgfAC and the novel FspSR modulate virulence and bacterial fitness. *MBio.* 2014;5(3).
113. Lamy MC, Zouine M, Fert J, Vergassola M, Couve E, Pellegrini E, et al. CovS/CovR of group B streptococcus: A two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol.* 2004;54(5):1250–68.
114. Rajagopal L, Clancy A, Rubens CE. A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in Streptococcus agalactiae reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. *J Biol Chem.* 2003;278(16):14429–41.
115. Raabe VN, Shane AL. Group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiol Spectr.* 2019;7(2):10.1128/microbiolspec.GPP3-0007-2018.
116. Brzychczy-Wloch M, Pabian W, Majewska E, Zuk M, Kielbik J, Gosiewski T, et al. Dynamics of colonization with group B streptococci in relation to normal flora in women during subsequent trimesters of pregnancy. *New Microbiol.* 2014;37(3):307–19.
117. Bianchi-Jassar F, Seale AC, Kohli-Lynch M, Lawn JE, Baker CJ, Bartlett L, et al. Preterm Birth Associated with Group B Streptococcus Maternal Colonization Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clinical Infectious Diseases.* Oxford University Press. 2017;S133–42.



118. Hall J, Adams NH, Bartlett L, Seale AC, Lamagni T, Bianchi-Jassir F, et al. Maternal Disease with Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses . Vol. 65, *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press. 2017;S112–24.
119. Madrid L, Seale AC, Kohli-Lynch M, Edmond KM, Lawn JE, Heath PT, et al. Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*. 2017;65(Suppl 2):S160–72.
120. Van Dyke MK, Phares CR, Lynfield R, Thomas AR, Arnold KE, Craig AS, et al. Evaluation of Universal Antenatal Screening for Group B Streptococcus. *N Engl J Med*. 2009;360(25):2626–36.
121. Berardi A, Rossi C, Lugli L, Creti R, Reggiani MLB, Lanari M, et al. Group b streptococcus late-onset disease: 2003-2010. *Pediatrics*. 2013;131(2):2003–10.
122. Schrag SJ, Farley MM, Petit S, Reingold A, Weston EJ, Pondo T, et al. Epidemiology of invasive early-onset neonatal sepsis, 2005 to 2014. *Pediatrics*. American Academy of Pediatrics; 2016; 138 (6): e20162013.
123. Skoff TH, Farley MM, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Gershman K, et al. Increasing Burden of Invasive Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults, 1990-2007. *Clin Infect Dis*. 2009;49(1):85–92.
124. Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2008;299(17):2056–65.
125. CDC. Active Bacterial Core Surveillance (ABCs) Report Emerging Infections Program Network Group B Streptococcus, 2015.
126. Ballard MS, Schönheyder HC, Knudsen JD, Lyytikäinen O, Dryden M, Kennedy KJ, et al. The changing epidemiology of group B streptococcus bloodstream infection: A multi-national population-based assessment. *Infect Dis*. 2016;48(5):386–91.
127. Franciosi RA, Knostman JD, Zimmerman RA. Group B streptococcal neonatal and infant infections. *J Pediatr*. 1973 Apr 1;82(4):707–18.
128. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Morbidity and Mortality Weekly Report Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2010;59:1–31.
129. Russell NJ, Seale AC, O’Sullivan C, Le Doare K, Heath PT, Lawn JE, et al. Risk of Early-Onset Neonatal Group B Streptococcal Disease with Maternal Colonization Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*. 2017;65(Suppl 2):S152–9.
130. Nuccitelli A, Rinaudo CD, Maione D. Group B Streptococcus vaccine: state of the art . *Ther Adv Vaccines*. 2015;3(3):76–90.
131. Heath PT. Status of vaccine research and development of vaccines for GBS. *Vaccine*. 2016;34(26):2876–9.

132. Seale AC, Bianchi-Jassir F, Russell NJ, Kohli-Lynch M, Tann CJ, Hall J, et al. Estimates of the Burden of Group B Streptococcal Disease Worldwide for Pregnant Women, Stillbirths, and Children. *Clin Infect Dis*. 2017;65(Suppl 2):S200–19.
133. Kobayashi M, Vekemans J, Baker CJ, Ratner AJ, Le Doare K, Schrag SJ. Group B Streptococcus vaccine development: Present status and future considerations, with emphasis on perspectives for low and middle income countries. *F1000Res*. 2016;5:2355.
134. Absalon J, Segall N, Block SL, Center KJ, Scully IL, Giardina PC, et al. Safety and immunogenicity of a novel hexavalent group B streptococcus conjugate vaccine in healthy, non-pregnant adults: a phase 1/2, randomised, placebo-controlled, observer-blinded, dose-escalation trial. *Lancet Infect Dis*. 2021;21(2):263–74.
135. Lin SM, Zhi Y, Ahn KB, Lim S, Seo HS. Status of group B streptococcal vaccine development. *Clin Exp Vaccine Res*. 2018;7(1):76–81.
136. Kimura K, Nishiyama Y, Shimizu S, Wachino JI, Matsui M, Suzuki S, et al. Screening for group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in clinical isolates obtained between 1977 and 2005. *Jpn J Infect Dis*. 2013;66(3):222–5.
137. Seki T, Kimura K, Reid ME, Miyazaki A, Banno H, Jin W, et al. High isolation rate of MDR group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in Japan. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(10):2725–8.
138. Piccinelli G, Gargiulo F, Corbellini S, Ravizzola G, Bonfanti C, Caruso A, et al. Emergence of the first levofloxacin-resistant strains of streptococcus agalactiae isolated in Italy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(4):2466–9.
139. Wehbeh W, Rojas-Diaz R, Li X, Mariano N, Grenner L, Segal-Maurer S, et al. Fluoroquinolone-resistant Streptococcus agalactiae: Epidemiology and mechanism of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2495–7.
140. Park SY, Park Y, Chung JW, Huh HJ, Chae SL, Kim YA, et al. Group B streptococcal bacteremia in non-pregnant adults: results from two Korean centers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(10):1785–90.
141. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Tleyjeh IM, Rybak MJ, et al. Infective endocarditis in adults: Diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: A scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins; 2015;1435–86.
142. American Academy of Pediatrics. In: Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS, eds. *Red Book: 2015 Report of the Committee on Infectious Diseases*. 30th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2015.
143. Ghuysen JM. Serine  $\beta$ -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews Inc.; 1991;37–67.
144. Jamin M, Hakenbeck R, Frere JM. Penicillin binding protein 2x as a major contributor to intrinsic  $\beta$ -lactam resistance of Streptococcus pneumoniae. *FEBS Lett*. 1993;331(1–

- 2):101–4.
145. Kimura K, Suzuki S, Wachino JI, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, et al. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(8):2890–7.
  146. Kimura K, Nagano N, Arakawa Y. Classification of group B streptococci with reduced  $\beta$ -lactam susceptibility (GBS-RBS) based on the amino acid substitutions in PBPs. *J Antimicrob Chemother.* 2014;70(6):1601–3.
  147. Dahesh S, Hensler ME, Van Sorge NM, Gertz RE, Schrag S, Nizet V, et al. Point mutation in the group B streptococcal *pbp2x* gene conferring decreased susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(8):2915–8.
  148. Morozumi M, Wajima T, Takata M, Iwata S, Ubukata K. Molecular characteristics of group B streptococci isolated from adults with invasive infections in Japan. *J Clin Microbiol.* 2016;54(11):2695–700.
  149. Gaudreau C, Lecours R, Ismaïl J, Gagnon S, Jetté L, Roger M. Prosthetic hip joint infection with a *Streptococcus agalactiae* isolate not susceptible to penicillin G and ceftriaxone. *J Antimicrob Chemother.* 2009;65(3):594–5.
  150. Leclercq R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clin Infect Dis.* 2002;34(4):482–92.
  151. Tu D, Blaha G, Moore PB, Steitz TA. Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. *Cell.* 2005 Apr 22;121(2):257–70.
  152. Nichols WW. Permeability of bacteria to antibacterial agents. In: *Antibiotic Discovery and Development.* Springer US; 2012;849–79.
  153. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society for Microbiology; 1995; 577–85.
  154. Hayes K, O’Halloran F, Cotter L. A review of antibiotic resistance in Group B *Streptococcus*: the story so far . Vol. 46, *Critical Reviews in Microbiology.* Taylor and Francis Ltd; 2020;253–69.
  155. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society for Microbiology; 1999 ;2823–30.
  156. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression . Vol. 20, *Clinical Microbiology Reviews.* American Society for Microbiology (ASM); 2007;79–114.
  157. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>.

158. Sharkey LKR, Edwards TA, O'Neill AJ. ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection. *MBio*. 2016;7(2).
159. Sharkey LKR, O'Neill AJ. Antibiotic Resistance ABC-F Proteins: Bringing Target Protection into the Limelight. *ACS Infectious Diseases*. American Chemical Society; 2018;239–46.
160. Malbruny B, Werno AM, Anderson TP, Murdoch DR, Leclercq R. A new phenotype of resistance to lincosamide and streptogramin A-type antibiotics in *Streptococcus agalactiae* in New Zealand. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(6):1040–4.
161. Hawkins PA, Law CS, Metcalf BJ, Chochua S, Jackson DM, Westblade LF, et al. Cross-resistance to lincosamides, streptogramins A and pleuromutilins in *Streptococcus agalactiae* isolates from the USA. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(7):1886–92.
162. De Azavedo JCS, McGavin M, Duncan C, Low DE, McGeer A. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive group B streptococcus isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(12):3504–8.
163. Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Maleckiene L, Vitkauskiene A, Nadisauskiene R. Group B streptococcus and *Escherichia coli* colonization in pregnant women and neonates in Lithuania. *Int J Gynecol Obstet*. 2012;117(1):69–73.
164. Wang P, Tong JJ, Ma XH, Song FL, Fan L, Guo CM, et al. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* isolates circulating in Beijing, China. *PLoS One*. 2015;10(3):1–13.
165. Hayes K, Cotter L, Barry L, O'Halloran F. Emergence of the L phenotype in Group B Streptococci in the South of Ireland. *Epidemiol Infect*. 2017;145(16):3535–42.
166. Kao Y, Tsai MH, Lai MY, Chu SM, Huang HR, Chiang MC, et al. Emerging serotype III sequence type 17 group B streptococcus invasive infection in infants: The clinical characteristics and impacts on outcomes. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):1–8.
167. Oviedo P, Pegels E, Laczeski M, Quiroga M, Vergara M. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. First study in a province of Argentina. *Brazilian J Microbiol*. 2013;44(1):253–8.
168. Chopra I. Genetic and biochemical basis of tetracycline resistance. *J Antimicrob Chemother*. 1986;18:51–6.
169. Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65(2):232–60.
170. Yamaguchi A, Ono N, Akasaka T, Noumij T, Sawai T. Metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter of *Escherichia coli* encoded by a transposon, Tn10. The role of the conserved dipeptide, Ser65-Asp66, in tetracycline transport. *The Journal Of Biological Chemistry*. 1990;265(26):15525-15530.

171. Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology Journals; 2003;3675–81.
172. Duarte RS, Bellei BC, Miranda OP, Brito MAVP, Teixeira LM. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(1):97–103.
173. Lamagni TL, Keshishian C, Efstratiou A, Guy R, Henderson KL, Broughton K, et al. Emerging trends in the epidemiology of invasive group B streptococcal disease in England and Wales, 1991-2010. *Clin Infect Dis*. 2013;57(5):682–8.
174. Scheld WM. Maintaining fluoroquinolone class efficacy: Review of influencing factors . *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2003.
175. Anderson VE, Zaniewski RP, Kaczmarek FS, Gootz TD, Osheroff N. Quinolones Inhibit DNA Religation Mediated by *Staphylococcus aureus* Topoisomerase IV Changes. *J Biol Chem*. 1999;274(50):35927-35932
176. Wu HM, Janapatla RP, Ho YR, Hung KH, Wu CW, Yan JJ, et al. Emergence of fluoroquinolone resistance in group B streptococcal isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(5):1888–90.
177. Dang TND, Srinivasan U, Britt Z, Marrs CF, Zhang L, Ki M, et al. Efflux-mediated Resistance Identified Among Norfloxacin Resistant Clinical Strains of Group B *Streptococcus* From South Korea. *Epidemiol Health*. 2014;36:e2014022.
178. Kawamura Y, Fujiwara H, Mishima N, Tanaka Y, Tanimoto A, Ikawa S, et al. First *Streptococcus agalactiae* Isolates Highly Resistant to Quinolones, with Point Mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(11):3605–9.
179. Nagano N, Nagano Y, Toyama M, Kimura K, Tamura T, Shibayama K, et al. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(4):849–56.
180. Tazi A, Gueudet T, Varon E, Gilly L, Trieu-Cuot P, Poyart C. Fluoroquinolone-resistant group B streptococci in acute exacerbation of chronic bronchitis. *Emerging Infectious Diseases*. 2008;349–50.
181. Prevention of Early-onset Neonatal Group B Streptococcal Disease. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2017;124(12):e280–305.
182. Ruppen C, Lupo A, Decosterd L, Sendi P. Is Penicillin Plus Gentamicin Synergistic against Clinical Group B *Streptococcus* isolates?: An In vitro Study. *Front Microbiol*. 2016;7:1680.
183. Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;3249–56.

184. Anderson JS, Matsushashi M, Haskin MA, Strominger JL. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. II. Phospholipid carriers in the reaction sequence. *J Biol Chem.* 1967;242(13):3180–90.
185. Buu-Hoi A, Le Bouguenec C, Horaud T. High-level chromosomal gentamicin resistance in *Streptococcus agalactiae* (Group B). *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(6):985–8.
186. Hays C, Louis M, Plainvert C, Dmytruk N, Touak G, Trieu-Cuot P, et al. Changing epidemiology of group B *Streptococcus* susceptibility to fluoroquinolones and aminoglycosides in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(12):7424–30.
187. Park C, Nichols M, Schrag SJ. Two cases of invasive vancomycin-resistant group B streptococcus infection. *N Engl J Med.* 2014;370(9):885–6.
188. Trieu-Cuot P, De Cespedes G, Bentorcha F, Delbos F, Gaspar E, Horaud T. Study of heterogeneity of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) genes in streptococci and enterococci by polymerase chain reaction: Characterization of a new CAT determinant. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(12):2593–8.
189. Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1999; 893:13–8.
190. Cabiscol Català E, Tamarit Sumalla J, Ros Salvador J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol.* 2000; 3(1):3-8.
191. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol;* 2008; 295(4):C849-68.
192. Henningham A, Döhrmann S, Nizet V, Cole JN. Mechanisms of group A *Streptococcus* resistance to reactive oxygen species. *FEMS Microbiology Reviews.* 2015;39(4):488-508.
193. Lushchak VI. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry (Moscow).* Springer. 2001; 66(5):476–89.
194. Yesilkaya H, Andisi VF, Andrew PW, Bijlsma JJE. *Streptococcus pneumoniae* and reactive oxygen species: An unusual approach to living with radicals. *Trends Microbiol;* 2013; 21(4):187–95.
195. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the fenton reaction in vivo and in vitro. *Science.* 1988;240(4852):640–2.
196. Lushchak VI. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology.* 2011;153:175–90.
197. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell.* 2007;130(5):797–810.
198. Albesa I, Becerra MC, Battán PC, Páez PL. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;317(2):605–9.

199. Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, Cody MacDonald I, Martell JD, Takahashi N, et al. Antibiotics induce redox-related physi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(20):E2100–9.
200. Kumar A, Pandey AK, Singh SS, Shanker R, Dhawan A. Engineered ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(10):1872–81.
201. Pericone CD, Overweg K, Hermans PWM, Weiser JN. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun*. 2000;68(7):3990–7.
202. Saito M, Ohga S, Endoh M, Nakayama H, Mizunoe Y, Hara T, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-nonproducing *Streptococcus pyogenes* strains: Survival in stationary phase and virulence in chronic granulomatous disease. *Microbiology*. 2001;147(9):2469–77.
203. Dryden M, Cooke J, Salib R, Holding R, Pender SLF, Brooks J. Hot topics in reactive oxygen therapy: Antimicrobial and immunological mechanisms, safety and clinical applications. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2017;8:194–8.
204. Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003;531:5–23.
205. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014: 360438.
206. Avery S V. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J*; 2011; 201–10.
207. Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2004;820–32.
208. Keppler LD, Novacky A. The initiation of membrane lipid peroxidation during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Physiol Mol Plant Pathol*. 1987;30(2):233–45.
209. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. BioMed Central Ltd.; 2012; 9–19.
210. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2006;389–406.
211. Janowiak BE, Griffith OW. Glutathione synthesis in *Streptococcus agalactiae*: One protein accounts for  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activities. *J Biol Chem*. 2005;280(12):11829–39.
212. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutas. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1987;22(2):111–80.

213. Benovs LT, Fridovich I. Escherichia coli Expresses a Copper-and Zinc-containing Superoxide Dismutase. *The Journal Of Biological Chemistry*. 1994; 269.
214. Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol*. 1998;36(1):41–7.
215. Shabayek S, Bauer R, Mauerer S, Mizaikoff B, Spellerberg B. A streptococcal NRAMP homologue is crucial for the survival of *Streptococcus agalactiae* under low pH conditions. *Mol Microbiol*. 2016;100(4):589–606.
216. Janulczyk R, Ricci S, Björck L. MtsABC is important for manganese and iron transport, oxidative stress resistance, and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun*. 2003;71(5):2656–64.
217. Higuchi M, Yamamoto Y, Poole LB, Shimada M, Sato Y, Takahashi N, et al. Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidative stress of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 1999;181(19):5940–7.
218. Yamamoto Y, Pargade V, Lamberet G, Gaudu P, Thomas F, Texereau J, et al. The Group B *Streptococcus* NADH oxidase Nox-2 is involved in fatty acid biosynthesis during aerobic growth and contributes to virulence. *Mol Microbiol*. 2006;62(3):772–85.
219. La Carbona S, Sauvageot N, Giard JC, Benachour A, Posteraro B, Auffray Y, et al. Comparative study of the physiological roles of three peroxidases (NADH peroxidase, Alkyl hydroperoxide reductase and Thiol peroxidase) in oxidative stress response, survival inside macrophages and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol*. 2007;66(5):1148–63.
220. Santi I, Grifantini R, Jiang SM, Brettoni C, Grandi G, Wessels MR, et al. CsrRS regulates group B *Streptococcus* virulence gene expression in response to environmental pH: A new perspective on vaccine development. *J Bacteriol*. 2009;191(17):5387–97.
221. Births and deaths. Statistical Office of the Republic of Serbia. <https://www.stat.gov.rs/en-US/oblasti/stanovnistvo/rodjeni-i-umrli/>
222. Compain F, Hays C, Touak G, Dmytruk N, Trieu-Cuot P, Joubrel C, et al. Molecular characterization of streptococcus agalactiae isolates harboring small erm(T)-Carrying Plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(11):6928–30.
223. Poyart C, Tazi A, Réglie-Poupet H, Billoët A, Tavares N, Raymond J, et al. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *J Clin Microbiol*. 2007;45(6):1985–8.
224. Kojic M, Strahinic I, Fira D, Jovic B, Topisirovic L. Plasmid content and bacteriocin production by five strains of *Lactococcus lactis* isolated from semi-hard homemade cheese. *Can J Microbiol*. 2006;52(11):1110–20.
225. Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J. Identification of macrolide-resistant clones of *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(6):513–8.



226. Chudobova D, Dobes J, Nejdil L, Maskova D, Angel Merlos Rodrigo M, Nedecky B-R, et al. Oxidative Stress in *Staphylococcus aureus* Treated with Silver(I) Ions Revealed by Spectrometric and Voltammetric Assays. *Int J Electrochem Sci*. 2013;8:4422-4440.
227. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.
228. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103-11.
229. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37(4):277-85.
230. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996;49(5):1304-13.
231. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351-8.
232. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem*. 1978;90(1):81-9.
233. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82(1):70-7.
234. Grundmann H, Hori S, Tanner G. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):4190-2.
235. Pinto FR, Melo-Cristino J, Ramirez M. A Confidence Interval for the Wallace Coefficient of Concordance and Its Application to Microbial Typing Methods. Scalas E, editor. *PLoS One*. 2008;3(11):e3696.
236. Song JY, Lim JH, Lim S, Yong Z, Seo HS. Progress toward a group B streptococcal vaccine. *Hum Vaccines Immunother*. 2018;14(11):2669-81.
237. Raabe VN, Shane AL. Group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiol Spectr*. 2019;7(2): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0007-2018
238. Bellais S, Six A, Fouet A, Longo M, Dmytruk N, Glaser P, et al. Capsular switching in group B streptococcus CC17 hypervirulent clone: A future challenge for polysaccharide vaccine development. *J Infect Dis*. 2012;206(11):1745-52.
239. Gajic I, Plainvert C, Kekic D, Dmytruk N, Mijac V, Tazi A, et al. Molecular epidemiology of invasive and non-invasive group B *Streptococcus* circulating in Serbia. *Int J Med Microbiol*. 2019;309(1):19-25.
240. Chen J, Fu J, Du W, Liu X, Rongkavilit C, Huang X, et al. Group B streptococcal colonization in mothers and infants in western China: Prevalences and risk factors. *BMC*

- Infect Dis. 2018;18(1): 291.
241. Daniels J, Gray J, Pattison H, Gray R, Hills R, Khan K. Intrapartum tests for group B streptococcus: Accuracy and acceptability of screening. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2011;118(2):257–65.
  242. Le Doare K, Heath PT, Plumb J, Owen NA, Brocklehurst P, Chappell LC. Uncertainties in Screening and Prevention of Group B Streptococcus Disease. *Clin Infect Dis.* 2019;69(4):720–5.
  243. Madrid L, Seale AC, Kohli-Lynch M, Edmond KM, Lawn JE, Heath PT, et al. Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clinical Infectious Diseases.* 2017;65:S160–72.
  244. Vergadi E, Manoura A, Chatzakis E, Karavitakis E, Maraki S, Galanakis E. Changes in the incidence and epidemiology of neonatal group B Streptococcal disease over the last two decades in Crete, Greece. *Infect Dis Rep.* 2018;10(3):56–9.
  245. Jordan HT, Farley MM, Craig A, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, et al. Revisiting the need for vaccine prevention of late-onset neonatal group b streptococcal disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(12):1057–64.
  246. de Gier B, van Kassel MN, Sanders EAM, van de Beek D, Hahné SJM, van der Ende A, et al. Disease burden of neonatal invasive Group B Streptococcus infection in the Netherlands. *PLoS One.* 2019;14(5).
  247. Graux E, Hites M, Martiny D, Maillart E, Delforge M, Melin P, et al. Invasive group B Streptococcus among non-pregnant adults in Brussels-Capital Region, 2005–2019. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40(3):515–23.
  248. Piccinelli G, Carlentini G, Gargiulo F, Caruso A, De Francesco MA. Analysis of Point Mutations in the *pbp2x*, *pbp2b*, and *pbp1a* Genes of *Streptococcus agalactiae* and Their Relation with a Reduced Susceptibility to Cephalosporins. *Microb Drug Resist.* 2017;23(8):1019–24.
  249. Lu B, Chen X, Wang J, Wang D, Zeng J, Li Y, et al. Molecular characteristics and antimicrobial resistance in invasive and noninvasive Group B Streptococcus between 2008 and 2015 in China. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;86(4):351–7.
  250. Vinnemeier CD, Brust P, Owusu-Dabo E, Sarpong N, Sarfo EY, Bio Y, et al. Group B *Streptococci* serotype distribution in pregnant women in Ghana: assessment of potential coverage through future vaccines. *Trop Med Int Heal.* 2015;20(11):1516–24.
  251. Fröhlicher S, Reichen G, Müller M, Surbek D, Droz S, Spellerberg B, et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of group B streptococci in pregnant women: Results from a Swiss tertiary centre. *Swiss Med Wkly.* 2014;144:1–6.
  252. Kaminska D, Ratajczak M, Szumała-Kąkol A, Długaszewska J, Nowak-Malczewska DM, Gajecka M. Increasing resistance and changes in distribution of serotypes of streptococcus agalactiae in poland. *Pathogens.* 2020;9(7):1–14.

253. Capanna F, Emonet SP, Cherkaoui A, Irion O, Schrenzel J, De Tejada BM. Antibiotic resistance patterns among group B Streptococcus isolates: Implications for antibiotic prophylaxis for early-onset neonatal sepsis. *Swiss Med Wkly*. 2013;143:w13778.
254. Matani C, Trezzi M, Matteini A, Catalani C, Messeri D, Catalani C. Streptococcus agalactiae: Prevalence of antimicrobial resistance in vaginal and rectal swabs in Italian pregnant women. *Infez Med*. 2016;24(3):217–21.
255. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/gbs-508.pdf>
256. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019, Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. *Cent Dis Control Prev*. 2019.
257. Wang P, Ma Z, Tong J, Zhao R, Shi W, Yu S, et al. Serotype distribution, antimicrobial resistance, and molecular characterization of invasive group B Streptococcus isolates recovered from Chinese neonates. *Int J Infect Dis*. 2015;37:115–8.
258. Oppegaard O, Skrede S, Mylvaganam H, Kittang BR. Emerging Threat of Antimicrobial Resistance in  $\beta$ -Hemolytic Streptococci. *Front Microbiol*. 2020;11:797.
259. Lopes E, Fernandes T, Machado MP, Carriço JA, Melo-Cristino J, Ramirez M, et al. Increasing macrolide resistance among Streptococcus agalactiae causing invasive disease in non-pregnant adults was driven by a single capsular-transformed lineage, Portugal, 2009 to 2015. *Eurosurveillance*. 2018;23(21).
260. Genovese C, D'Angeli F, Di Salvatore V, Tempera G, Nicolosi D. Streptococcus agalactiae in pregnant women: serotype and antimicrobial susceptibility patterns over five years in Eastern Sicily (Italy). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(12):2387–96.
261. Schoening TE, Wagner J, Arvand M. Prevalence of erythromycin and clindamycin resistance among Streptococcus agalactiae isolates in Germany. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(7):579–82.
262. De Mouy D, Cavallo JD, Leclercq R, Fabre R. Antibiotic susceptibility and mechanisms of erythromycin resistance in clinical isolates of Streptococcus agalactiae: French multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(8):2400–2.
263. Jamroz D, Bijlsma MW, de Goffau MC, van de Beek D, Kuijpers TW, Parkhill J, et al. Increasing incidence of group B streptococcus neonatal infections in the Netherlands is associated with clonal expansion of CC17 and CC23. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–13.
264. Kardos S, Tóthpál A, Laub K, Kristóf K, Ostorházi E, Rozgonyi F, et al. High prevalence of group B streptococcus ST17 hypervirulent clone among non-pregnant patients from a Hungarian venereology clinic. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):1–10.
265. Da Cunha V, Davies MR, Douarre PE, Rosinski-Chupin I, Margarit I, Spinali S, et al. Streptococcus agalactiae clones infecting humans were selected and fixed through the extensive use of tetracycline. *Nat Commun*. 2014;5:1–12.
266. Varaldo PE, Montanari MP, Giovanetti E. Genetic elements responsible for erythromycin

- resistance in streptococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology Journals; 2009;343–53.
267. Bianchi-Jassir F, Paul P, To KN, Carreras-Abad C, Seale AC, Jauneikaite E, et al. Systematic review of Group B Streptococcal capsular types, sequence types and surface proteins as potential vaccine candidates. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2020;6682–94.
  268. van Kassel MN, de Boer G, Teeri SAF, Jamrozy D, Bentley SD, Brouwer MC, et al. Molecular epidemiology and mortality of group B streptococcal meningitis and infant sepsis in the Netherlands: a 30-year nationwide surveillance study. *The Lancet Microbe*. 2021;2(1):e32–40.
  269. Medugu N, Iregbu KC, Parker RE, Plemmons J, Singh P, Audu LI, et al. Group B streptococcal colonization and transmission dynamics in pregnant women and their newborns in Nigeria: implications for prevention strategies. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(9):673.e9-673.e16.
  270. Teatero S, Ramoutar E, McGeer A, Li A, Melano RG, Wasserscheid J, et al. Clonal Complex 17 Group B Streptococcus strains causing invasive disease in neonates and adults originate from the same genetic pool. *Sci Rep*. 2016;6:1–9.
  271. Li S, Wen G, Cao X, Guo D, Yao Z, Wu C, et al. Molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* in a mother-baby prospective cohort study: Implication for vaccine development and insights into vertical transmission. *Vaccine*. 2018;36(15):1941–8.
  272. Madzivhandila M, Adrian P V., Cutland CL, Kuwanda L, Schrag SJ, Madhi SA. Serotype distribution and invasive potential of group B streptococcus isolates causing disease in infants and colonizing maternal-newborn dyads. *PLoS One*. 2011;6(3):2–7.
  273. Martins ER, Melo-Cristino J, Ramirez M. Evidence for rare capsular switching in *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol*. 2010;192(5):1361–9.
  274. Buurman ET, Timofeyeva Y, Gu J, Kim J, Kodali S, Liu Y, et al. A Novel Hexavalent Capsular Polysaccharide Conjugate Vaccine (GBS6) for the Prevention of Neonatal Group B Streptococcal Infections by Maternal Immunization. *J Infect Dis*. 2019;220(1):105–15.
  275. Lu B, Chen X, Wang J, Wang D, Zeng J, Li Y, et al. Molecular characteristics and antimicrobial resistance in invasive and noninvasive Group B Streptococcus between 2008 and 2015 in China. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;86(4):351–7.
  276. Pillai P, Srinivasan U, Zhang L, Borchardt SM, Debusscher J, Marrs CF, et al. *Streptococcus agalactiae* pulsed-field gel electrophoresis patterns cross capsular types. *Epidemiol Infect*. 2009; 137(10):1420–1425.
  277. Martins ER, Andreu A, Correia P, Juncosa T, Bosch J, Ramirez M, et al. Group B streptococci causing neonatal infections in barcelona are a stable clonal population: 18-Year surveillance. *J Clin Microbiol*. 2011;49(8):2911–8.
  278. Gherardi G, Imperi M, Baldassarri L, Pataracchia M, Alfarone G, Recchia S, et al.

- Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2909–16.
279. Shabayek S, Spellerberg B. Acid stress response mechanisms of group B streptococci. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:1–13.
280. Nguyen CT, Park SS, Rhee DK. Stress responses in *Streptococcus* species and their effects on the host. *Journal of Microbiology. Microbiological Society of Korea;* 2015;741–9.
281. Jiang SM, Ishmael N, Hotopp JD, Puliti M, Tissi L, Kumar N, et al. Variation in the group B *Streptococcus* CsrRS regulon and effects on pathogenicity. *J Bacteriol.* 2008;190(6):1956–65.
282. Boris S, Barbés C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect.* 2000;2(5):543–6.
283. Pybus V, Onderdonk AB. Microbial interactions in the vaginal ecosystem, with emphasis on the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Microbes and Infection. Elsevier Masson SAS;* 1999;285–92.
284. Wilson CB, Weaver WM. Comparative susceptibility of group b streptococci and staphylococcus aureus to killing by oxygen metabolites. *J Infect Dis.* 1985;152(2):323–9.
285. Wilkins JC, Homer KA, Beighton D. Analysis of *Streptococcus mutans* proteins modulated by culture under acidic conditions. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(5):2382–90.
286. Wilkins JC, Beighton D, Homer KA. Effect of acidic pH on expression of surface-associated proteins of *Streptococcus oralis*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(9):5290–6.
287. Walker EA, Port GC, Caparon MG, Janowiak BE. Glutathione synthesis contributes to virulence of streptococcus agalactiae in a murine model of sepsis. *J Bacteriol.* 2019;201(20).
288. Cumley NJ, Smith LM, Anthony M, May RC. The CovS/CovR acid response regulator is required for intracellular survival of group B *Streptococcus* in macrophages. *Infect Immun.* 2012;80(5):1650–61.
289. Yang X, Yao H, Chen Y, Sun L, Li Y, Ma X, et al. Inhibition of Glutathione Production Induces Macrophage CD36 Expression and Enhances Cellular-oxidized Low Density Lipoprotein (oxLDL) Uptake. *J Biol Chem.* 2015;290(36):21788–99.
290. Janowiak BE, Hayward MA, Peterson FC, Volkman BF, Griffith OW.  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase-glutathione synthetase: Domain structure and identification of residues important in substrate and glutathione binding. *Biochemistry.* 2006;45(35):10461–73.
291. Golkar T, Zielinski M, Berghuis AM. Look and outlook on enzyme-mediated macrolide resistance. *Frontiers in Microbiology.* 2018; 9: 1942.

292. Armistead B, Oler E, Adams Waldorf K, Rajagopal L. The Double Life of Group B Streptococcus: Asymptomatic Colonizer and Potent Pathogen. *Journal of Molecular Biology*. Academic Press; 2019; 2914–31.
293. Al Safadi RA, Mereghetti L, Salloum M, Lartigue MF, Virlogeux-Payant I, Quentin R, et al. Two-component system RgfA/C activates the fbsB gene encoding major fibrinogen-binding protein in highly virulent CC17 clone group B streptococcus. *PLoS One*. 2011;6(2).
294. Doran KS, Engelson EJ, Khosravi A, Maisey HC, Fedtke I, Equils O, et al. Blood-brain barrier invasion by group B Streptococcus depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. *J Clin Invest*. 2005;115(9):2499–507.
295. Lanotte P, Perivier M, Haguenoer E, Mereghetti L, Burucoa C, Claverol S, et al. Proteomic Biomarkers Associated with Streptococcus agalactiae Invasive Genogroups. Beall B, editor. *PLoS One*. 2013;8(1):e54393.

## Листа скраћеница

ГБС	– група Б стрептокока
ДНК	– дезоксирибонуклеинска киселина
РНК	– рибонуклеинска киселина
БХС	– бета хемолитички стрептокок
rRNK	– рибозомска РНК
CPS	– капсуларни полисахарид (енг. capsular polysaccharide)
PFGE	– гел електрофореза у пулсном пољу (енг. Pulsed-field gel electrophoresis)
MLST	– типизација секвенцирањем више локуса (енг. multi-locus sequence typing)
RAPD	– типизација умножавањем насумичних поновака ДНК (енг. Random Amplified Polymorphic DNA)
rep-PCR	– типизација базирана на понављајућим секвенцама умножених реакцијом ланчаног умножавања (енг. Repetitive-sequence-based Polymerase Chain Reaction)
MLVA	– типизација варијабилних поновака на више локуса (енг. multi-locus variant-repeat assay)
CRISPR	– кластерована регулаторних међупросторних кратких палиндромских поновака (енг. clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
ST	– секвенци тип (енг. sequence type)
Alp	– $\alpha$ -like протеин
PCR	– реакција ланчаног умножавања (енг. Polymerase Chain Reaction)
CC	– клонски комплекс (енг. clonal complex)
Cas протеини	– CRISPR повезани протеини (енг. CRISPR-associated proteins)
VNTR	– различит број тандемских поновака (енг. variable numbers of tandem repeats)
Siglecs	– имуноглобулин слични лектини везујући за сијаличну киселину (енг. Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins)
Srr протеини	– протеини богати серинским поновцима (енг. Serine-rich repeat proteins)
Fbs протеини	– фибриноген везујући протеини (енг. fibrinogen-binding proteins)

Lmb протеин	– ламинин везујући протеин (енг. laminin binding protein)
SfbA протеин	– стрептококни фибронектин везујући протеин (енг. Streptococcal fibronectin binding protein)
ЦНС	– централни нервни систем
PbsP протеин	– плазминоген везујући протеин (енг. plasminogen-binding surface protein)
BibA	– имуногени бактеријски адхезин (енг. GBS immunogenic bacterial adhesin)
HvgA	– хипервирулентни ГБС адхезин (енг. hypervirulent GBS adhesin)
ХК	– хијалуронска киселина
ROS	– реактивни кисеонични радикали (енг. reactive oxygen species)
DAMPs	– молекуларни образци оштећења (енг. damage-associated molecular patterns)
TLRs	– Тол слични рецептори (енг. Toll-like receptors)
PAMPs	– молекуларни образци препознавања патогена (енг. pathogen-associated molecular patterns)
c-di-AMP	– циклични ди-аденозин монофосфат (енг. c-di-adenosine monophosphate)
IFN-β	– интерферона бета
ЛТА	– липотеихоинска киселина
ГАС	– групе А стрептокока
САМП фактор	– енг. Christie, Atkins и Munch-Petersen фактор
СОД	– супероксид дизмутаза
ЕОД	– рана неонатална болест (енг. early onset disease)
ЛОД	– касна неонатална болест (енг. late onset disease)
ИАП	– интрапартална антибиотска профилакса
САД	– Сједињене Америчке Државе
GSK	– GlaxoSmithKline
БЛА	– β-лактамски антибиотици
PBPs	– пеницилин-везујући протеини (енг. penicillin binding proteins)
MLS група	– макролиди, линкозамиди и стрептограмини (енг. macrolide, lincosamide and streptogramin)
tRNK	– транспортна РНК
cMLS	– конститутивни фенотип резистеције на MLS групу



iMLS	– индуцибилни фенотип резистенције на MLS групу
<i>erm</i>	– ген резистенције на макролиде (енг. erythromycin ribosome methylation)
АТП	– аденозин-3-фосфат
ABC	– суперфамилија транспортера АТП-везујућих касета (енг. ATP-binding cassette)
MFS	– суперфамилија главних извршитеља (енг. major facilitator superfamily)
Меф	– макролидне ефлукс пумпе
CDC	– Амерички центар за контролу и превенцију болести (енг. Centers for Disease Control and Prevention)
QRDRs	– детерминишући региони хинолонске резистенције (енг. quinolone resistance determining regions)
УВ зрачење	– ултравиолетно зрачење
ГСХ	– глутатион
Трх	– тиол пероксидаза
НРЛ	– Национална референтна лабораторија
ККА	– Колумбија крвни агар
EUCAST	– Европски комитет за тестирање антимикробне осетљивости (енг. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
ФР	– физиолошки раствор
МХКА	– Милер Хинтон крвни агар
McF	– McFarland
$\beta$ -NAD	– $\beta$ -никотинамид аденин динуклеотид
МИК	– минимална инхибиторна концентрација
mm	– милиметар
bp	– базни парови
V	– волт
mA	– милиампер
ВНІ	– мождано-срчани бујон (енг. Brain Heart Infusion)
UPGMA	– метода груписања непондерисаних парова са аритметичким просеком (енг. unweighted pair group method with arithmetic mean)
ТОС	– тотални оксидативни статус

TAC	– тотални антиоксидативни статус
АБТС	– 2,2'-азино-ди-(3-етилбенз-тиазолин-сулфонат)
ИОС	– индекс оксидативног стреса
АОПП	– садржаја завршних производа оксидације протеина
ДТНБ	– 5,5'-дитиобис-(2-нитробензоева киселина)
СА	– тест линеарних трендова (енг. Cochran-Armitage test)
SID	– Симпсонов индекс диверзитета (енг. Simpson's index of diversity)
CI	– интервал поверења (енг. Confidence Interval)
Wc	– Wallace коефицијент
OR	– односа квота (енг. odds ratio)
Taq полимераза	– термостабилна ДНК полимераза изолована из термофилне бактерије <i>Thermus aquaticus</i>
ТАЕ пуфер	– Tris ацетат-EDTA пуфер
EDTA	– етилендиаминтетрасирћетна киселина
SDS	– натријум додецил сулфат (енг. Sodium dodecyl sulfate)

## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Душан Кекић, рођен је у Београду 30. маја 1987. године од мајке Љиљане и оца Љубомира. Основну огледну школу „Владисав Рибникар“ и гимназију „Свети Сава“, завршио је у Београду. Медицински факултет Универзитета у Београду уписао је 2006. године, а докторске академске студије Молекуларне медицине 2013. године. Специјализацију из медицинске микробиологије је започео 2015. године.

Учествовао је на градским и републичким такмичењима из биологије, на којима је освојао неко од прва три места. Био је лауреат Специјалне Награде гимназије "Свети Сава" за допринос развоју школе. Био је стипендиста Фонда за младе таленте Републике Србије 2006. године. Током студија, био је демонстратор на предмету хумана генетика у току пет школских година, а такође се укључио у рад више лабораторија: хумане генетике, хемије у медицини, биохемије и микробиологије. Учествовао је у више домаћих и страних студентских конгреса као аутор или коаутор радова. Један је од оснивача Међународног студентског конгреса „GSC Belgrade“ и Logistic team coordinator током првог одржавања у октобру 2014. године.

Као истраживач приправник 2015. године започиње рад на пројекту 175039, "Бактерије резистентне на антибиотике у Србији: фенотипска и генотипска карактеризација " под руководством проф др Лазара Ранина. Изабира се у истраживача сарадника 2016. године. Као сарадник у настави за предмет Микробиологија ради од 2016. године, а као асистент од 2018. године. Аутор је више од 50 радова који су публиковани или презентовани на стручним састанцима у земљи и иностранству, од којих је 19 индексирано, као и коаутор уџбеника из Микробиологије.

Током пандемије вируса САРС Ковид 19, учествује у молекуларној дијагностици вируса на Институту за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“.

Говори енглески и француски језик.

Прилог број 1

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора : Душан Кекић

Број индекса : ММ06/13

### Изјављујем

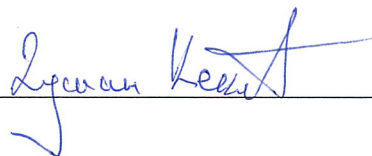
да је докторска дисертација под насловом:

### Генотипске, фенотипске и редокс карактеристике сојева групе Б стрептокока изолованих у Србији

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, 09.06.2021. године

Потпис докторанда

  
\_\_\_\_\_

## Прилог број 2

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора : Душан Кекић

Број индекса : ММ06/13

Студијски програм : Молекуларна медицина

Наслов рада : Генотипске, фенотипске и редокс карактеристике сојева групе Б стрептокока изолованих у Србији

Ментор : Проф. др Лазар Ранин

Коментор: Проф. др Кристина Гопчевић

Потписани: Душан Кекић

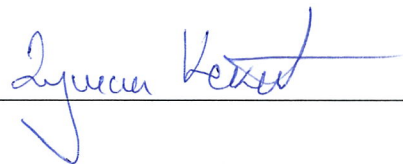
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 09.06.2021. године

Потпис докторанда

  
\_\_\_\_\_

## Прилог број 3

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

#### **Генотипске, фенотипске и редокс карактеристике сојева групе Б стрептокока изолованих у Србији**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прерада
6. Ауторство – делити под истим условима

У Београду, 09.06.2021. године

Потпис докторанда

