

## PREVENZIONE DELLE INFEZIONI DA GBS

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

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

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

### Vaccini polisaccaridici e glicoconiugati

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

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

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

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

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

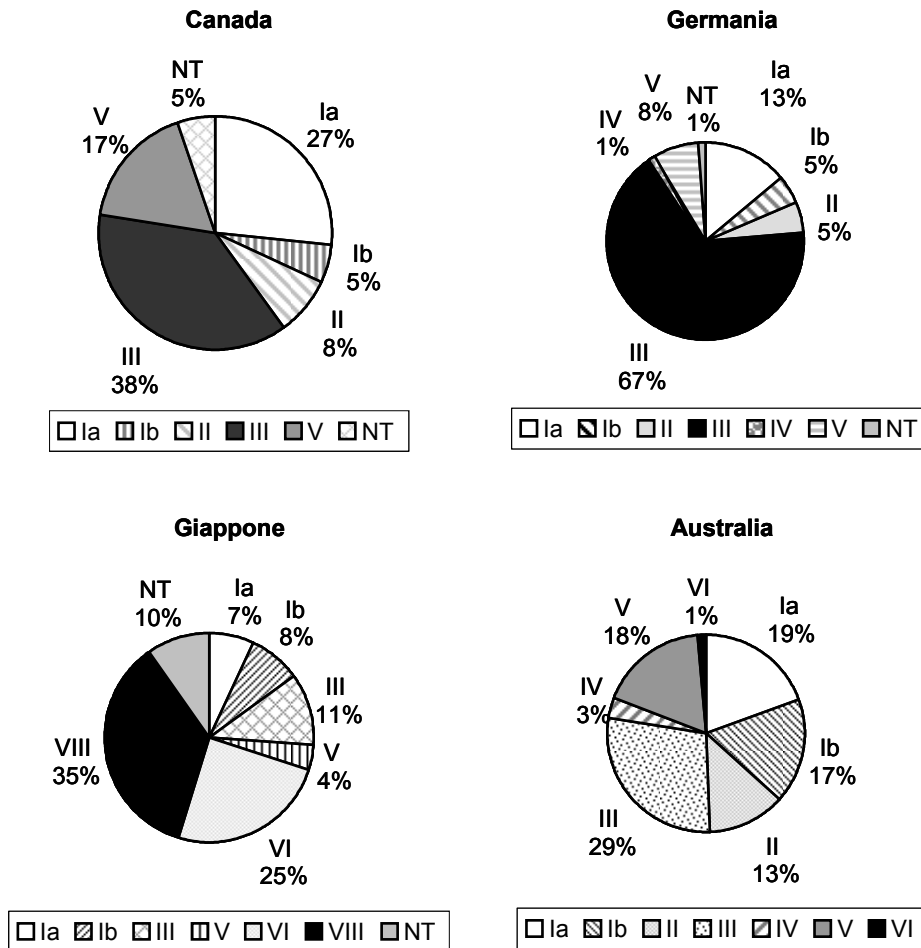


Figura 1. Distribuzione dei serotipi tra i ceppi clinici di GBS isolati negli ultimi anni in Canada, Germania e Australia da neonati e in Giappone da donne colonizzate

### Vaccini proteici

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

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

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

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

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

## Nuovi approcci genomici

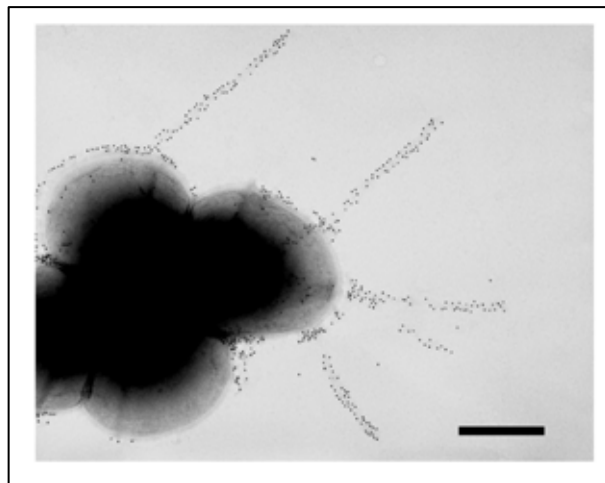
Negli ultimi anni si sono aperte nuove prospettive per la ricerca di un vaccino universale contro GBS, grazie alla disponibilità di nuove tecnologie che hanno consentito di decifrare la sequenza genomica di interi microrganismi. Questa informazione può essere utilizzata per la predizione in silico di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

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

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

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

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



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

## Bibliografia

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

4. Baker CJ, Kasper DL. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N Engl J Med* 1976;294:753-6.
5. Lancefield RC, McCarty M, Everly WN. Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci. Special reference to antibodies effective against protein antigens. *J Exp Med* 1975;14:165-179.
6. Baker CJ, Rench MA, Edwards MS, Carpenter RJ, Hays BM, Kasper DL. Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B streptococcus. *N Engl J Med* 1988;319:1180-5.
7. Baker CJ, Kasper DL. Vaccination as a measure for prevention of neonatal GBS infection. *Antibiot Chemother* 1985, 35:281-90.
8. Ada G, Isaacs D. Carbohydrate-protein conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:79-85.
9. Finn A. Bacterial polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Br Med Bull* 2004;31:1-14.
10. Baker CJ, Rench MA, Fernandez M, Paoletti LC, Kasper DL, Edwards MS. Safety and immunogenicity of a bivalent group B streptococcal conjugate vaccine for serotypes II and III. *J Infect Dis* 2003;188:66-73.
11. Baker CJ, Paoletti LC, Rench MA, Guttormsen HK, Edwards MS, Kasper DL. Immune response of healthy women to 2 different group B streptococcal type V capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. *J Infect Dis* 2004;189:1103-12.
12. Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, Ichiman Y, Ohtsuka H, Kaku M, Paoletti LC, Ferrieri P, Madoff LC. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J Infect Dis* 1999;179:1030-3.
13. Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, Wessels MR, Paulsen IT, *et al.* Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12391-6.
14. Wizemann TM, Adamou JE, Langermann S. Adhesins as targets for vaccine development. *Emerg Infect Dis* 1999;5:395-403.
15. Michel JL, Madoff LC, Olson K, Kling DE, Kasper DL, Ausubel FM. Large, identical, tandem repeating units in the C protein alpha antigen gene, bca, of group B streptococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;1;89:10060-4.
16. Madoff LC, Michel JL, Gong EW, Rodewald AK, Kasper DL. Protection of neonatal mice from group B streptococcal infection by maternal immunization with beta C protein. *Infect Immun* 1992;60:4989-94.
17. Stalhammar-Carlemalm M, Stenberg L, Lindahl G. Protein rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *J Exp Med* 1993;177:1593-1603.
18. Brodeur BR, Boyer M, Charlebois I, Hamel J, Couture F, Rioux CR, Martin D. Identification of group B streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity. *Infect Immun* 2000;68:5610-8.
19. Cheng Q, Carlson B, Pillai S, Eby R, Edwards L, Olmsted SB, Cleary P. Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci. *Infect Immun* 2001;69:2302-8.
20. Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Arico B, Comanducci M, *et al.* Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 2000;287:1816-20.
21. Glaser P, Rusniok C, Buchrieser C, Chevalier F, Frangeul L, Msadek T, Zouine M, Couve E, Lalioui L, Poyart C, Trieu-Cuot P, Kunst F. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol Microbiol* 2002;45:1499-513.

22. Tettelin H, Maignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, *et al.* Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:13950-5.
23. Maione D, Margarit I, Rinaudo CD, Maignani V, Mora M, Scarselli M, *et al.* Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. *Science* 2005;309:148-50.
24. Buccato S, Maione D, Rinaudo CD, Volpini G, Taddei AR, Rosini R, Telford JL, Grandi G, Margarit I. Use of *Lactococcus lactis* Expressing Pili from Group B Streptococcus as a Broad-Coverage Vaccine against Streptococcal Disease. *J Infect Dis* 2006;194:331-40.