

PATOGENESI E FATTORI DI VIRULENZA

Lucilla Baldassarri, Roberta Creti

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

Gli streptococchi sono batteri sferici gram-positivi disposti in coppie o catenelle. Sono molto diffusi in natura; alcuni costituiscono una gran parte della popolazione microbica normale orale e faringea, e possono essere rinvenuti lungo tutto il tratto intestinale, nonché a livello vaginale e cutaneo. Sono capsulati, immobili, asporigeni, Gram-positivi e ossidasi negativi (queste due proprietà insieme alla morfologia cellulare li distinguono dalle Neisserie, Gram negative e ossidasi positive) e catalasi negativi (che li distinguono dagli stafilococchi e micrococchi). A seconda della specie, sono più o meno esigenti dal punto di vista nutrizionale. La crescita è favorita dall'arricchimento dei terreni solidi con sangue e dall'incubazione in atmosfera di CO₂ al 5%.

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

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

Patogenesi

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

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

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

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

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

Fattori di virulenza

Capsula

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

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

Emolisina

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

Proteine di superficie

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

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

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

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

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

C5a-peptidasi

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

Acido Lipoteicoico

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

Bibliografia

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

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

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