

**Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski**



Małgorzata Bodaszewska-Lubaś

**Charakterystyka szczepów paciorkowców z gatunku
Streptococcus agalactiae wyizolowanych z zakażeń
inwazyjnych i przypadków kolonizacji**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Piotr B. Heczko

Pracę wykonano w Katedrze Mikrobiologii Collegium Medicum UJ

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. med. Piotr B. Heczko

Kraków, 2011

Składam Serdeczne Podziękowania:

Panu Prof. dr hab. med. Piotrowi Heczko

za opiekę naukową i gotowość do dzielenia się wiedzą,

Pani Dr hab. Magdalenie Strus

za przychylność i wsparcie,

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Katedry Mikrobiologii UJ CM

za wszelką udzieloną pomoc i okazaną życzliwość,

Mojej Rodzinie

za ciągłe i nieustające wsparcie oraz motywację.

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	3
INDEKS SKRÓTÓW	7
I. WSTĘP	11
I.1. STREPTOCOCCUS AGALACTIAE, PACIORKOWIEC GRUPY B.....	11
<i>I.1.1 Rys historyczny zakażeń wywołanych przez Streptococcus agalactiae</i>	<i>11</i>
<i>I.1.2 Bakteriologia Streptococcus agalactiae.....</i>	<i>12</i>
I.1.2.1 Bakterie z rodzaju Streptococcus	12
I.1.2.2 Streptococcus agalactiae	13
I.1.2.2.1 Chorobotwórczość bakterii na przykładzie S. agalactiae oraz czynniki wirulencji odpowiedzialne za przebieg tego procesu	14
I.1.2.2.1.1 Polisacharydy powierzchniowe.....	17
I.1.2.2.1.2 Białka powierzchniowe S. agalactiae z rodziny alfa-podobnych.....	17
I.1.2.2.1.3 Korelacja pomiędzy występowaniem białek Alp oraz polisacharydów powierzchniowych CPS.....	18
I.1.2.2.2 Mechanizmy lekooporności szczepów S. agalactiae.....	19
<i>I.1.3 Epidemiologia zakażeń Streptococcus agalactiae</i>	<i>19</i>
I.1.3.1 Nosicielstwo GBS wśród kobiet ciężarnych.....	20
I.1.3.2 Zakażenia GBS wśród noworodków.....	21
I.1.3.3 Zakażenia GBS w grupie osób dorosłych.....	23
I.2. BAKTERIE KWASU MLEKOWEGO LAB	24
I.2.1 Komensalna flora bakteryjna przewodu pokarmowego i pochwy oraz jej rola	25
I.2.2 Produkty metabolizmu bakterii z rodzaju Lactobacillus oraz mechanizmy działania antybakteryjnego tych substancji	26
I.2.2.1 Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, nadtlenek wodoru, dwutlenek węgla	26
I.2.2.2 Bakteriocyny.....	27
I.2.2.2.1 Klasa I bakteriocyn.....	28
I.2.2.2.2 Klasa II bakteriocyn	30
I.2.2.2.3 Klasy III i IV bakteriocyn	31
I.2.2.2.4 Bakteriocyny wydzielane przez LAB, ich zastosowanie oraz nadzieje związane z zastosowaniem tych peptydów jako substancji leczniczych.....	32
II. CEL PRACY	35
III. MATERIAŁY I METODY	37
III.1 MATERIAŁY	37
III.1.1 Aparatura i sprzęt.....	37
III.1.2 Odczynniki i zestawy testowe	38
III.1.2.1 Podłoża mikrobiologiczne.....	38

III.1.2.2	Antybiotyki	39
III.1.2.3	Zestaw do izolacji DNA	39
III.1.2.4	Reagenty reakcji PCR	39
III.1.2.4.1	Sład mieszanin reakcyjnych poszczególnych reakcji PCR	39
III.1.2.4.1.1	Reakcja PCR z użyciem gatunkowo specyficznych starterów Sag59 oraz Sag190 dla <i>S. agalactiae</i>	39
III.1.2.4.1.2	Reakcja multipleks PCR służąca do detekcji genów polisacharydów powierzchniowych GBS	40
III.1.2.4.1.3	Reakcja multipleks PCR służąca do detekcji genów białek powierzchniowych z klasy Alp	41
III.1.2.5	Odczynniki i drobny sprzęt do prowadzenia hodowli linii komórkowych	42
III.1.2.6	Pozostałe odczynniki	42
III.1.3.	<i>Bakterie</i>	43
III.1.3.1	Szczepy bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i> oraz izolaty <i>Streptococcus agalactiae</i> pochodzenia ludzkiego	43
III.1.3.2	Szczepy wzorcowe	44
III.1.4	<i>Linie komórkowe</i>	46
III.2	METODY	47
III.2.1	<i>Izolaty Streptococcus agalactiae</i>	47
III.2.1.1	Diagnostyka materiałów klinicznych w kierunku <i>S. agalactiae</i> wraz z obowiązującymi zaleceniami CDC	47
III.2.1.2	Badanie oporności izolatów <i>S. agalactiae</i> na antybiotyki z uwzględnieniem mechanizmu MLSB oraz fenotypu M	50
III.2.1.2.1	Interpretacja uzyskanych wyników oznaczenia lekooporności	50
III.2.2	<i>Szczepy Streptococcus agalactiae</i> izolowane z dróg rodnych kobiet oraz od noworodków	51
III.2.2.1	Szczepy <i>Streptococcus agalactiae</i> izolowane od kobiet niebędących w ciąży	51
III.2.2.2	Szczepy <i>Streptococcus agalactiae</i> izolowane od kobiet ciężarnych	51
III.2.2.3	Izolaty GBS pochodzenia noworodkowego	52
III.2.3	<i>Oznaczenie serotypów szczepów S. agalactiae</i>	52
III.2.3.1	Oznaczenie serotypów GBS metodą serologiczną	52
III.2.3.2	Oznaczenie serotypów GBS metodą molekularną	53
III.2.4	<i>Detekcja genów kodujących białka powierzchniowe GBS</i>	55
III.2.5	<i>Izolacja bakterii z rodzaju Lactobacillus z pochwy</i>	56
III.2.6	<i>Postępowanie ze szczepami wzorcowymi bakterii kwasu mlekowego</i>	57
III.2.7	<i>Ocena antagonizmu bakterii z rodzaju Lactobacillus wobec wybranych szczepów S. agalactiae metodą hodowli w zawiesinie</i>	57
III.2.7.1	Przygotowanie hodowli GBS	57
III.2.7.2	Przygotowanie hodowli LAB	57
III.2.7.3	Przeprowadzenie eksperymentu oceniającego właściwości antibakteryjne LAB wobec GBS	58
III.2.7.3.1	Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i> pochodzenia pochwowego wobec wybranych szczepów GBS	58
III.2.7.3.2	Wstępna ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej szczepów wzorcowych LAB wobec GBS	59

III.2.7.3.3 Badania właściwe nad aktywnością szczepów wzorcowych LAB produkujących peptydy antybakteryjne wobec GBS	61
III.2.8 Porównanie działania antybakteryjnego chemicznie czystej nizinyny oraz szczepu <i>L. lactis</i> ATCC 11454 wobec GBS	61
III.2.9 Ocena adherencji szczepów <i>Streptococcus agalactiae</i> do komórek linii pochwowej A-431 oraz komórek linii raka jelita grubego HT-29	62
III.2.9.1 Hodowla tkanki HT-29	62
III.2.9.2 Hodowla tkanki A-431	62
III.2.9.3 Określenie liczby komórek w hodowli tkankowej	62
III.2.9.4 Przygotowanie szczepów GBS	63
III.2.9.5 Wykonanie badania adherencji izolatów GBS do linii komórkowych HT-29 i A-431	63
III.3 ANALIZA STATYSTYCZNA UZYSKANYCH WYNIKÓW	64
III.3.1 Metody zastosowane do analizy statystycznej uzyskanych wyników	64
IV. WYNIKI	66
IV.1 SZCZEGÓŁOWA CHARAKTERYSTYKA IZOLATÓW <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	66
IV.1.1 Wyniki oznaczenia serotypów badanych szczepów <i>Streptococcus agalactiae</i>	70
IV.1.2 Zależność występowania polisacharydów powierzchniowych, ich genów oraz genów białek powierzchniowych alfa-podobnych GBS	76
IV.1.3 Wyniki oznaczenia mechanizmu oporności MLSB i fenotypu M	77
IV.2 BADANIE HAMUJĄCEGO DZIAŁANIA BAKTERII KWASU MLEKOWEGO LAB WOBEC WYBRANYCH IZOLATÓW <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	79
IV.2.1 Ocena działania antybakteryjnego szczepów LAB izolowanych z pochwy wobec GBS	80
IV.2.1.1 Różnice między wybranymi gatunkami LAB w działaniu hamującym wzrost GBS	81
IV.2.1.2 Zależność wrażliwości <i>S. agalactiae</i> na działanie przeciwbakteryjne LAB izolowanych z pochwy od serotypu GBS	81
IV.2.1.2 Zależność wrażliwości <i>S. agalactiae</i> na działanie przeciwbakteryjne LAB od genów białek powierzchniowych z klasy Alp	83
IV.2.1.3 Wrażliwość szczepów GBS na antagonistyczne działanie LAB izolowanych z pochwy zależna od serotypu oraz genów białek z rodziny alfa-podobnych	83
IV.2.2 Porównanie wrażliwości szczepów GBS izolowanych od kobiet i noworodków na działanie antagonistyczne LAB	83
IV.2.3 Wrażliwość izolatów GBS z grup IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB na działanie przeciwdrobnoustrojowe LAB	84
IV.3 OCENA DZIAŁANIA ANTYBAKTERYJNEGO SZCZEPÓW WZORCOWYCH LAB WOBEC WYBRANYCH IZOLATÓW GBS	86
IV.3.1 Porównanie właściwości antybakteryjnych szczepów wzorcowych LAB wobec GBS	86
IV.3.2 Zależność wrażliwości <i>S. agalactiae</i> na działanie przeciwbakteryjne szczepów wzorcowych LAB od serotypu GBS	88
IV.3.3 Zależność wrażliwości <i>S. agalactiae</i> na działanie przeciwbakteryjne szczepów wzorcowych LAB od genów białek z klasy Alp	89

<i>IV.3.4 Wrażliwość izolatów GBS na antagonistyczne działanie szczepów wzorcowych LAB zależna od serotypu oraz genów białek z rodziny alfa-podobnych</i>	89
<i>IV.3.5 Porównanie wrażliwości szczepów GBS z grup K i N oraz IA, IB, IIA, IIB, IIIA i IIIB na oddziaływanie szczepów wzorcowych LAB</i>	89
IV.4 PORÓWNANIE DZIAŁANIA ANTYBAKTERYJNEGO NIZYNY ORAZ SZCZEPU <i>L. LACTIS</i> ATCC 11454	91
IV.5 WYNIKI ADHERENCJI WYBRANYCH IZOLATÓW GBS DO KOMÓREK LINII TKANKOWYCH A-431 ORAZ HT-29	91
<i>IV.5.1 Zależność adherencji GBS do komórek linii tkankowych A-431 i HT-29 od serotypu</i>	95
<i>IV.5.2 Zależność adherencji GBS do komórek linii tkankowych A-431 oraz HT-29 od genów białek z klasy Alp</i>	96
<i>IV.5.3 Porównanie adherencji szczepów GBS pomiędzy grupami K i N oraz pomiędzy grupami IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB</i>	98
V. DYSKUSJA	99
VI. WNIOSKI	108
VII. STRESZCZENIE	110
VIII. SUMMARY	112
IX. WYKAZ ZAŁĄCZNIKÓW	114
IX.1 WYKAZ RYCIN	114
IX.2 WYKAZ TABEL	116
X. PIŚMIENNICTWO	118

INDEKS SKRÓTÓW

A-549	linia komórkowa raka płuc (ATCC no. CCL-185 TM)
Alfa C	białko Alfa C
Alp	białka z rodziny alfa-podobnych (ang. alpha-like proteins)
Alp2	białko Alp2
<i>alp2</i>	gen białka Alp2
Alp3	białko Alp3
<i>alp3</i>	gen białka Alp3
Alp4	białko Alp4
<i>alp4</i>	gen białka Alp4
ATP	adenozynotrifosforan
AMPs	antymicrobial peptides
BBB	blood brain barrier
<i>bca</i>	gen białka Alfa C
BibA	białko BibA
BLIS	Bacteriocin Like Substances
β-H/C	β-hemolizyna/cytolizyna
C5a	czynnik C5a układu dopełniacza
C3b	podjednostka konwertazy C3
CAMP	czynnik CAMP (Christie Atkins Munch Peterson)
CDC	Center for Disease Control and Prevention

CPS	sialic acid-rich capsular polysaccharide
<i>cps</i>	gen polisacharydu CPS
DNA	kwasy dezoksyrybonukleinowe
DPPC	dipalmitoylofosfatydylocholina
DTP	dezoksyrybonukleotydy
ECM	extracellular matrix
EOD	Early Onset Disease
Epsilon	białko Epsilon
<i>epsilon</i>	gen białka Epsilon
erm	erythromycin ribosome methylase
<i>erm</i>	erythromycin ribosome methylase gene
<i>erm(A)</i>	erythromycin ribosome methylase A gene
<i>erm(B)</i>	erythromycin ribosome methylase B gene
<i>erm(C)</i>	erythromycin ribosome methylase C gene
FbsA	fibrynogen binding protein A
FbsB	fibrynogen binding protein B
Fn	fibronektyna
GAS	paciorkowce grupy serologicznej A (ang. Group A streptococcus)
GBS	paciorkowce grupy serologicznej B (ang. Group B streptococcus)
G-C	para zasad guanina-cytozyna
H	Complement Factor H
I	Complement Factor I

iMLSB	macrolide, lincosamide and streptogramin B-inductive-type resistance
kMLSB	macrolide, lincosamide and streptogramin B-constitutive-type resistance
LAB	Lactic Acid Bateria
LAN	lantionina
Lmb	laminin binding protein
LOD	Late Onset Disease
M	fenotyp M
<i>mefA</i>	gen kodujący pompę protonową paciorkowców grupy A
<i>mefE</i>	gen kodujący pompę protonową pneumokoków
MeLan	3-metyllantonina
MLSB	macrolide, lincosamide and streptogramin B resistance
MLST	multilocus sequence typing
mPCR/RLB	multiplex PCR-based reverse line-blot hybridization
NADH	dinukleotydyd nikotynamidoadeninowy
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<i>neuA</i>	gen enzymu katalizującego reakcje O-acetylacji CPS
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	pulsed field gel electrophoresis
PilA	pilus protein component A
PilB	pilus protein component B
PilC	pilus protein component C
PlnA	plantarycyna A

PlnE	plantarycyna E
PlnF	plantarycyna F
PlnJ	plantarycyna J
PlnK	plantarycyna K
RDP	restriction digested pattern
Rib	białko Rib
<i>rib</i>	gen białka Rib
RNA	kwas rybonukleinowy
rRNA	rybosomalny kwas rybonukleinowy
RofA	RofA-like protein
ScpB	GBS C5a protease
SE	błąd standardowy (ang. standard estimation)
SD	odchylenie standardowe (ang. standard deviation)
Srr	serine-rich repeat protein
YGNGVXCXXXXCXV	konserwatywny motyw sekwencyjny w N-terminalnej części cząsteczki bakteriocyn klasy II

I. WSTĘP

I.1. *Streptococcus agalactiae*, paciorkowiec grupy B

I.1.1 Rys historyczny zakażeń wywołanych przez *Streptococcus agalactiae*

W pierwszej połowie XIX wieku węgierski lekarz Ignac Semmelweiss praktykując w wiedeńskiej klinice położniczej, zaobserwował wśród pacjentek przerażająco wysoką śmiertelność z powodu gorączki połogowej (ang. puerperal fever; childbed fever). Po przeprowadzeniu dokładnego dochodzenia, wywnioskował, że tak duży współczynnik zachorowalności i śmiertelności kobiet po porodzie może być spowodowany przeniesieniem zakażenia na zdrowe kobiety przez personel medyczny, który wcześniej dokonywał sekcji zwłok zmarłych na gorączkę połogową. Dodatkowym dowodem potwierdzającym domysł Semmelweisa była śmierć jego bliskiego współpracownika, profesora Jakuba Kolletschki. Profesor zmarł na skutek choroby o podobnym przebiegu do gorączki połogowej, którą to zakaził się przeprowadzając sekcję zwłok pacjentki zmarłej po porodzie. Semmelweis przypuszczał, że choroba może być przenoszona na płód, zwłaszcza w przypadku przedłużającego się porodu lub w wyniku wielokrotnego przezpochwowego badania pacjentek przez lekarzy. Skutecznym sposobem zapobiegania przeniesieniu zakażeniom nakazanym personelowi medycznemu przez Semmelweisa, było przemywanie rąk roztworem chloru. Ten sposób antyseptyki znacznie zmniejszył zachorowalność i śmiertelność pacjentek na gorączkę połogową oraz ocalił życie wielu dzieci. Odkrycie uczonego spotkało się jednak ze sprzeciwem współpracowników, odrzucających skierowane przeciwko Nim oskarżenia o zakażeniu pacjentek podczas przeprowadzania badania (Raju, 1999).

W latach trzydziestych XX wieku Fry zanotował trzy przypadki śmierci kobiet z powodu gorączki połogowej, której czynnikiem etiologicznym był *S. agalactiae*. Przez kolejne lata obserwowano sporadyczne przypadki zakażeń noworodków i dorosłych wywołanych przez ten drobnoustrój (Edwards, 2008). Od lat sześćdziesiątych XX wieku zaczęto obserwować dramatycznie narastającą zachorowalność i śmiertelność noworodków poniżej trzeciego miesiąca życia w wyniku zakażeń paciorkowcem z grupy B (ang. Group B

streptococcus, GBS). W Stanach Zjednoczonych znacznie zredukowano częstość zakażeń *S. agalactiae* wśród noworodków poprzez wprowadzenie w latach 90-tych XX wieku zaleceń CDC (Center for Disease Control and Prevention). Rekomendacje zostały również przyjęte w innych państwach. Od 2008 roku także w Polsce obowiązują rekomendacje dotyczące badania nosicielstwa GBS wśród kobiet ciężarnych przygotowane przez Polskie Towarzystwo Ginekologiczne na wzór zaleceń amerykańskich (Heczko i wsp., 2008).

I.1.2 Bakteriologia *Streptococcus agalactiae*

I.1.2.1 Bakterie z rodzaju *Streptococcus*

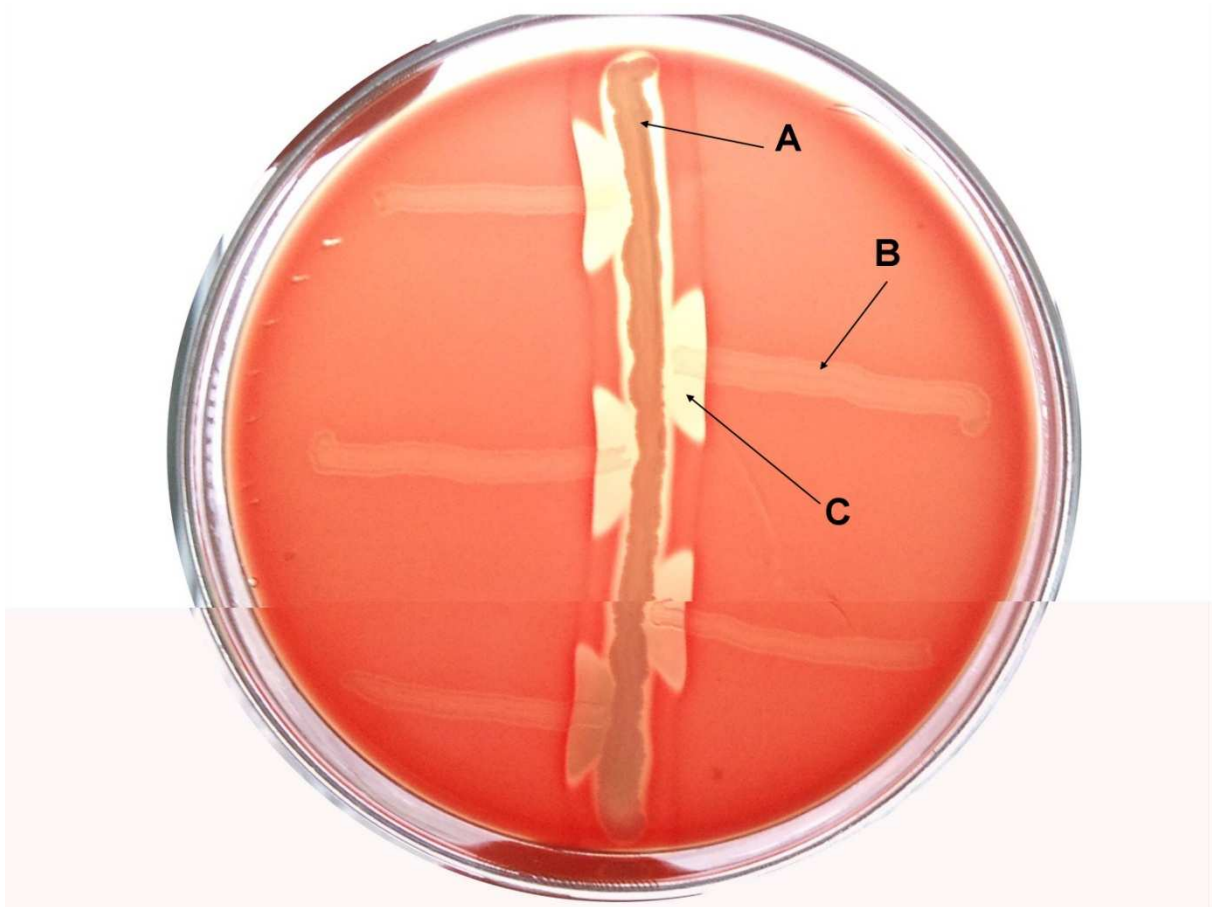
Bakterie należące do rodzaju *Streptococcus* to Gram-dodatnie, katalazo-ujemne ziarenkowce o średnicy ok. 2µm, wzrastające w postaci paciorków lub w parach. Bakterie te klasyfikowane są jako α-hemolizujące, β-hemolizujące i γ-hemolizujące w zależności od typu tworzonej strefy hemolizy wokół wzrastających kolonii bakteryjnych na podłożach hodowlanych zawierających krew baranią. W przypadku gdy dochodzi do redukcji żelaza w hemoglobinie i zazielenienia strefy wokół kolonii bakteryjnej świadczy to o wzroście paciorkowców α-hemolizujących. β-hemoliza oznacza całkowitą lizę erytrocytów i odbarwienie podłoża wokół kolonii bakteryjnej. γ-hemoliza oznacza brak hemolizy i brak zmian barwy podłoża w sąsiedztwie wzrastających kolonii bakterii. Paciorkowce β-hemolizujące są klasyfikowane w oparciu o obecność antygenowych polisacharydów powierzchniowych, zwanych grupowymi. Podział ten został zaproponowany przez Lancefield w 1935 r. i uwzględnia istnienie grup A-H oraz K-V. Przykładami paciorkowców o dużym znaczeniu w medycynie klinicznej są *Streptococcus pyogenes* z grupy serologicznej A (ang. Group A streptococcus, GAS), *Streptococcus agalactiae* z grupy serologicznej B (GBS), czy też *Streptococcus pneumoniae* zaliczany do paciorkowców α-hemolizujących.

I.1.2.2 *Streptococcus agalactiae*

Kolonie *S. agalactiae* są drobne, szare i lśniące, otoczone wąską strefą β -hemolizy. Niekiedy kolonie bakterii GBS wykazują pigmentację wynikającą z nagromadzenia pomarańczowego barwnika. Istnieją szczepy GBS γ -hemolizujące o wyglądzie kolonii przypominającym bakterie z rodzaju *Enterococcus*. Do cech charakterystycznych *S. agalactiae*, wykorzystywanych w testach diagnostycznych umożliwiających identyfikację gatunku, należą obecność antygeny grupowego B, czynnik CAMP (Christie Atkins Munch Peterson) oraz zdolność do hydrolizy hipuranu (Murray i wsp., 2007, Gillespie i wsp., 2005).

Reakcja CAMP została po raz pierwszy opisana w 1944 r. przez Christie, Atkins i Munch-Petersen. Polega ona na synergistycznym działaniu β -hemolizyny produkowanej przez szczep wzorcowy *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i czynnika CAMP pochodzenia paciorkowcowego. Efektem końcowym reakcji CAMP jest powstanie trójkątnej strefy β -hemolizy w miejscu zetknięcia wysianych prostopadle względem siebie szczepów wzorcowego *S. aureus* ATCC 25923 i badanego szczepu paciorkowca na płycie zawierającej krew baranią po 24 godzinnej hodowli w 37 °C w warunkach tlenowych (Ryc. 1).

Test hydrolizy hipuranu jest testem alternatywnym dla testu CAMP. Jeśli po dodaniu ninhydryny do hodowli bakterii GBS w wodnym roztworze hipuranu sodu dochodzi do zmiany barwy zawiesiny na ciemno fioletowy kolor, test uznaje się za pozytywny (Philips EA i wsp. 1980).



A- linia posiewu szczepu wzorcowego *S. aureus* 25923

B- linia posiewu badanego szczepu *S. agalactiae* prostopadła względem linii posiewu *S. aureus* 25923

C- trójkątna strefa β -hemolizy

Ryc.1. Pozytywny wynik testu CAMP

I.1.2.2.1 Chorobotwórczość bakterii na przykładzie *S. agalactiae* oraz czynniki wirulencji odpowiedzialne za przebieg tego procesu

Zjadliwość (wirulencja) jest miarą chorobotwórczości i jest zjawiskiem złożonym, zależnym od rozpatrywanego czynnika patogennego jak i gospodarza. Składa się z następujących etapów: adherencji do komórek gospodarza, kolonizacji tkanek, inwazji i wnikania bakterii do komórek nabłonka i śródbłonka oraz ewazji (przeciwdziałanie mechanizmom obronnym atakowanego organizmu gospodarza).

Adherencja GBS do komórek nabłonkowych m. in. pochwy i odbytu jest inicjującym etapem umożliwiającym następującą kolonizację tkanki. Przebiega w wyniku interakcji pomiędzy adhezynami bakterii oraz białkami macierzy pozakomórkowej gospodarza (ang. extracellular matrix, ECM). Do białek ECM zalicza się fibronektynę (Fn), fibrynogen, lamininę, kolagen oraz integryny. GBS posiada na swej powierzchni adhezyny wiążące poszczególne białka macierzy pozakomórkowej ECM, do których można zaliczyć m. in. białka wiążące fibrynogen (FbsA oraz FbsB), białko wiążące lamininę (Lmb), białka Srr bogate w powtórzenia serynowe, peptydazę (ScpB), białko BibA oraz fimbrie. Również niektóre z białek Alp (Rib, Alfa C) są ważnymi czynnikami umożliwiającymi adhezję GBS do nabłonka gospodarza poprzez wiązanie się do glikozaminoglikanu, a tym samym ułatwienie inwazji bakterii GBS. Białka Alp są również silnymi antygenami indukującymi odpowiedź immunologiczną modeli zwierzęcych na zakażenie GBS (Baron i wsp. 2004; Creti i wsp., 2008; Stalhammar-Carlemalm i wsp., 1999).

Adhezyny GBS pełnią również inne, istotne funkcje w przebiegu zakażenia. Przykładowo czynnikiem, który może wiązać jedno z białek ECM, fibronektynę jest peptydaza ScpB posiadająca w swej cząsteczce miejsce o niskim oraz o dużym powinowactwie względem fibronektyny. Dodatkową, istotną dla przebiegu procesu kolonizacji GBS funkcją ScpB jest dezaktywacja czynnika C5a, który wzmaga chemotaksję neutrofilów do miejsca zakażenia (Hull i wsp., 2008; Cheng i wsp., 2002). Białko wiążące fibrynogen FbsA zakotwiczone w ścianie komórkowej bakterii oraz N koniec białka FbsB przypuszczalnie wydzielanego do substancji pozakomórkowej odpowiadają za wiązanie fibrynogenu (Devi i wsp., 2010; Gutekunst i wsp., 2004). Inną, prawdopodobną funkcją białka FbsB jest ułatwienie inwazji i wnikania bakterii do komórek gospodarza. Istotną rolę w adherencji, a następnie tworzeniu biofilmu odgrywiają fimbrie. Są to białka zbudowane z trzech podjednostek PilA pełniących rolę adhezyny, PilB, która jest główną komponentą fimbrii oraz PilC. Podjednostkami odpowiedzialnymi za tworzenie biofilmu a tym samym nasilanie procesu adhezji są PilA i PilB (Maisey i wsp., 2006; Konto-Ghiorghi i wsp., 2009).

Przypuszczalnie adherencja szczepów GBS do nabłonka zależy od pH otaczającego środowiska. Bakterie adaptują się do różnych warunków poprzez regulację ekspresji genów, których produkty biorą czynny udział w reakcji drobnoustrój-gospodarz. Stąd przypuszczenie, że zmiana pH otoczenia może wpływać na funkcjonowanie genów kodujących poszczególne adhezyny (Kubin i wsp., 1983; Zawaneh i wsp. 1979; Santi i wsp., 2009)

Do czynników wirulencji GBS uszkodzających komórki gospodarza poprzez tworzenie porów i umożliwienie wnikania bakterii do wnętrza komórek gospodarza, należą czynnik CAMP oraz β -hemolizyna/cytolizyna (β -H/C). β -hemolizyna/cytolizyna m. in. ułatwia bakteriom niszczenie nabłonka oraz śródbłonka płuc oraz przenikanie przez barierę krew-mózg (ang. blood brain barrier, BBB). Prawdopodobnie istnieje powiązanie pomiędzy czynnikiem CAMP a β -hemolizyną/cytolizyną. W przypadku szczepów pozbawionych czynnika CAMP, β -H/C może działać zastępczo, wypełniając rolę CAMP. Natomiast CAMP może być niezbędnym czynnikiem uszkodzającym komórki gospodarza w tych niszach ekologicznych, gdzie działanie β -H/C jest zniesione. Przykładowo CAMP może odgrywać kluczową rolę jako czynnik uszkodzający komórki gospodarza w płucach, gdzie dochodzi do wiązania i neutralizacji β -H/C przez główny składnik surfaktantu płucnego dipalmitoylofosfatydynocholinę (DPPC). Badania eksperymentalne wskazują na to, że β -hemolizyna/cytolizyna jest także ważnym czynnikiem indukującym apoptozę makrofagów i monocytów. *S. agalactiae* wykazuje również zdolność przeżycia *in vitro* wewnątrz makrofagów (Cornacchione i wsp., 1998; Fettucciari i wsp., 2000; Liu i wsp., 2004). Z syntezą β -H/C jest związana produkcja pomarańczowego pigmentu *S. agalactiae*, który chroni bakterie przed działaniem aktywnych form tlenu. Brak genu *celE* kodującego β -hemolizynę/cytolizynę jest równoznaczny z brakiem ekspresji pigmentu u danego szczepu, natomiast szczepy GBS o silnych właściwościach hemolitycznych wykazują bardziej intensywne zabarwienie (Rajagopal, 2009).

Wiele czynników GBS znosi działanie układu immunologicznego lub eliminuje wrażliwość bakterii na mechanizmy obronne gospodarza. Do czynników tych można niewątpliwie zaliczyć polisacharydy powierzchniowe (CPS), peptydazę C5a oraz pomarańczowy pigment. Polisacharydy powierzchniowe stanowią główny czynnik wirulencji GBS. Ich funkcja polega na zapobieganiu opsonizacji i fagocytozie bakterii w wyniku hamowania drogi alternatywnej aktywacji dopełniacza (modulacje w cząsteczkach czynników H, I oraz C3b) (Marques i wsp., 1992).

Innymi, ważnymi czynnikami wirulencji są m. in. fimbrie oraz białka wiążące penicylinę znoszące wrażliwość GBS na działanie peptydów antybakteryjnych (ang. antimicrobial peptides, AMPs).

I.1.2.2.1.1 Polisacharydy powierzchniowe

Na powierzchni komórek bakterii z gatunku *S. agalactiae* znajdują się polisacharydy powierzchniowe (ang. sialic acid-rich capsular polysaccharide, CPS), warunkujące przynależność szczepów GBS do określonych serotypów. Wyróżnia się dziesięć serotypów *S. agalactiae*: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII oraz serotyp IX opisany w ostatnich latach (Harrison i wsp., 1998; Hilman i wsp., 1999; Slotved i wsp., 2007). Polisacharydy powierzchniowe są modyfikowane w procesie *O*-acetylacji, co może mieć wpływ na zmiany odpowiedzi immunologicznej gospodarza na inwazję GBS (Chaffin i wsp. 2005). Proces acetylacji dotyczy od 5 do 55% całkowitej puli CPS. Enzym katalizujący reakcję *O*-acetylacji jest kodowany przez gen *neuA*. Transkrypcja genów polisacharydów powierzchniowych *cps* jest regulowana ujemnie przez białko RogB z rodziny RofA-podobnych (Gutekunst i wsp., 2003; Tettelin i wsp., 2005).

I.1.2.2.1.2 Białka powierzchniowe *S. agalactiae* z rodziny alfa-podobnych

Białka z klasy Alp (ang. alpha-like proteins) są najlepiej poznanymi i opisanymi białkami powierzchniowymi GBS. W tej klasie białek wyróżnia się białka zwane Alfa C, Epsilon (znane również pod nazwą Alp1, Epsilon/Alp1), Rib, Alp2, Alp3 oraz Alp4. Białko Alfa C wraz z białkiem Beta C, które nie należy do klasy białek Alp, są komponentami antygeny C, pierwszego opisanego antygeny białkowego GBS (Wilkinson i wsp., 1971).

Białka Alp posiadają cząsteczki o strukturze chimerycznej, która po raz pierwszy została opisana dla białka Alp3. Cechą charakterystyczną białek z rodziny Alp jest występowanie w ich cząsteczkach sekwencji tandemowo powtórzonych o identycznym składzie aminokwasów (Creti i wsp., 2004; Gherardi i wsp., 2007). Powtarzające się wielokrotnie sekwencje tandemowe białek Alp są takie same w obrębie jednego białka, ale różne pomiędzy poszczególnymi białkami. Ilość powtórzeń aminokwasowych w obrębie jednego białka jest cechą charakterystyczną danego szczepu GBS. Oznacza to, że pomiędzy izolatami GBS posiadającymi to samo białko z rodziny Alp istnieje różnica w masie cząsteczkowej tego samego białka (Lachenauer i wsp., 2000). Przykładowo masa białka Rib może wynosić od ok. 65 kDa do ok. 125 kDa, co odpowiada ilości od 8 do 15 powtórzeń aminokwasów (Stalhammar-Carlemalm i wsp., 1993). Liczba powtórzeń fragmentów

w obrębie białka może mieć związek ze inwazyjnością szczepu. Możliwe jest, że zjadliwość szczepu jest tym większa, im większa liczba sekwencji tandemowych powtórzonych w obrębie cząsteczki białka.

Białka Alfa C, Epsilon, Rib, Alp2, Alp3 oraz Alp4 są kodowane odpowiednio przez alleliczne geny *bca*, *epsilon*, *rib*, *alp2*, *alp3* i *alp4* (Creti i wsp., 2004; Gherardi i wsp., 2007; Persson i wsp., 2008). Każdy z genów białek Alp posiada w swej strukturze tandemowy region powtórzeń (ang. tandem repeated region) oraz konserwatywne końce N i C. Budowę genów białek Alp określa się jako mozaikową, co oznacza, że geny określonych białek mogą zawierać konserwatywne fragmenty genów innych białek. Taka budowa genów oraz ich produktów białkowych tłumaczy występowanie reakcji krzyżowych pomiędzy białkami Alp, a surowicami diagnostycznymi stosowanymi do typowania serologicznego (Lachenauer et al., 2000).

I.1.2.2.1.3 Korelacja pomiędzy występowaniem białek Alp oraz polisacharydów powierzchniowych CPS

Nie istnieje ścisła współzależność w występowaniu określonych białek Alp oraz polisacharydów CPS, jednak wykazano, że określone białka Alp znacznie częściej występują u kilku, ale nie wszystkich serotypów. Istnieje również możliwość, że w danym serotypie prawie nigdy nie będzie występować tylko jedno z białek z klasy Alp. Przykładowo, do ekspresji białka C najczęściej dochodzi u izolatów GBS z serotypów Ia, Ib i II oraz bardzo rzadko z serotypu V i III. Białko Rib przeważnie występuje u GBS z serotypów III i II oraz rzadziej z serotypu V. Z kolei białko Alp3 przeważnie jest obecne u szczepów GBS z serotypów V i VIII, a białko Alp2 u szczepów GBS z serotypów Ia, III i V (Areschoug i wsp., 1999; Stalhammar-Carlemalm i wsp., 1993; Tettelin i wsp., 2003).

I.1.2.2.2 Mechanizmy lekooporności szczepów *S. agalactiae*

Opisano mechanizmy oporności *S. agalactiae* na antybiotyki: mechanizm typu MLSB typu konstytutywnego (kMLSB) oraz mechanizm typu indukcyjnego (iMLSB), a także fenotyp M.

Mechanizm oporności GBS na makrolidy, linkozamidy oraz streptograminy B zwany MLSB jest warunkowany aktywnością metylaz *erm* (ang. erythromycin ribosome methylase, *erm*). Działanie enzymów prowadzi do przyłączenia jednej lub dwóch reszt metylowych do konserwatywnej reszty adeninowej w V domenie 23S rRNA wiążącej makrolidy. Metylazy są kodowane przez geny *erm* (*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*) zlokalizowane w rybosomalnym DNA. Typ mechanizmu MLSB konstytutywnego oraz indukcyjnego nie jest zależny od klasy *erm*. U szczepów GBS z najczęściej występującym mechanizmem oporności typu kMLSB, znacznie częściej wykazuje się obecność genu *erm(B)* niż pozostałych genów *erm(A)* i *erm(C)* (Gherardi i wsp., 2007). Interesujący jest fakt, że u wszystkich izolatów GBS z mechanizmem kMLSB należących do serotypu V wykazano obecność genu *erm(B)* (Brzywczy-Włoch i wsp., 2010).

Fenotyp M jest warunkowany przez obecność genu *mefA* lub *mefE*. Geny te kodują pompę protonową odpowiadającą za transport antybiotyków poza komórkę bakteryjną. Fenotyp M jest częsty wśród izolatów GBS z serotypu Ia (Brzywczy-Włoch i wsp., 2010, Hsueh i wsp., 2001).

I.1.3 Epidemiologia zakażeń *Streptococcus agalactiae*

GBS jest bakterią komensalną kolonizującą dolny odcinek przewodu pokarmowego oraz pochwę. Grupą w szczególny sposób narażoną na zakażenia spowodowane przez GBS są noworodki, a w mniejszym stopniu również kobiety ciężarne. Coraz częściej notuje się wzrost częstości zakażeń paciorkowcowych w grupie osób dorosłych cierpiących na choroby przewlekłe oraz u osób po 65 roku życia.

I.1.3.1 Nosicielstwo GBS wśród kobiet ciężarnych

Ciąża jest stanem predysponującym do zwiększonego namnażania się GBS w środowisku pochwy. U skolonizowanych kobiet ciężarnych może dochodzić do przedwczesnego pęknięcia błon płodowych, przedwczesnego porodu, gorączki śródpołogowej, zakażenia jamy owodni, zakażenia dróg moczowych, poporodowego zapalenia jamy macicy, poporodowego zakażenia rany, a w niektórych przypadkach nawet do posocznicy (Phares i wsp. 2008, Krohn i wsp., 1999).

Dane uzyskane przez pracowników Katedry Mikrobiologii UJ CM w latach 2004-2008 wskazywały na 20% nosicielstwo GBS wśród kobiet z ciążą powikłaną oraz 17,2% nosicielstwo GBS wśród kobiet z prawidłowym przebiegiem ciąży (Strus i wsp., 2009). Dane zebrane kilka lat później w okresie od 2007 r. do 2009 r. przez naukowców z tej samej placówki wykazują na wzrost nosicielstwa GBS wśród kobiet ciężarnych do 30% (Brzychczy-Włoch i wsp., 2009). Różnice te mogą być spowodowane m. in. udoskonalaniem metod diagnostycznych identyfikujących paciorkowce z grupy B. W krajach europejskich takich jak Czechy, Niemcy, Włochy, Belgia, Grecja nosicielstwo GBS u ciężarnych wynosiło odpowiednio 29,3%, 16%, 18%, 24%, 6,6% (Motlova i wsp., 2004; Brimil i wsp., 2005; Savoia i wsp., 2007; El Aila i wsp., 2009; Tsoia i wsp., 2003). Podobne dane epidemiologiczne uzyskano w Stanach Zjednoczonych, gdzie nosicielstwo GBS wśród ciężarnych wynosi 19,1%. Z kolei kolonizacja kobiet ciężarnych przez GBS w państwach azjatyckich takich jak Korea i Birma wynosiła odpowiednio 8% i 7,1% (Lee i wsp., 2010; Thinkhamrop, 2003).

Występowanie poszczególnych serotypów GBS jest zależne od regionu geograficznego, zjadliwości szczepu oraz rasy ludzkiej. Grupą szczególnie narażoną na zakażenia GBS jest rasa czarna oraz Latynosi (Murray i wsp., 2007). W Europie i w Stanach Zjednoczonych oraz Korei najczęściej izolowanymi serotypami GBS są III, Ia, V i II, z kolei w Japonii przeważająca liczba szczepów GBS należy do serotypów VI i VIII (Hickman i wsp., 1999; Thinkhamrop, 2003; Lee i wsp., 2010, Lachnauer i wsp., 1999). W Zjednoczonych Emiratach Arabskich dominuje serotyp IV (Amin i wsp., 2002). Istnieją interesujące doniesienia amerykańskie opisujące izolację z jednorazowo pobranego wymazu z pochwy od pacjentek niebędących w ciąży dwóch lub nawet trzech szczepów GBS, z których każdy należał do innego serotypu (Ferrieri i wsp., 2004).

I.1.3.2 Zakażenia GBS wśród noworodków

W czasie porodu istnieje niebezpieczeństwo kolonizacji noworodka przez GBS drogą wertykalną od matki z mikroflory pochwy, kanału szyjki macicy, skóry lub śliny. GBS kolonizuje jamę ustną noworodka, a następnie drogi oddechowe i przewód pokarmowy. Ryzyko transmisji GBS w czasie porodu wynosi 70%. *Streptococcus agalactiae* może wywołać u noworodków wczesną postać choroby (ang. Early Onset Disease, EOD), późną postać choroby (ang. Late Onset Disease, LOD) oraz opóźnioną postać choroby.

Wczesna postać choroby może rozwinąć się już od pierwszych godzin po narodzinach do 7 dnia życia dziecka. Jednak najczęściej EOD notuje się w pierwszym dniu po urodzeniu i dotyczy to ok. 60% przypadków zachorowań. W przybliżeniu 32% wczesnej postaci choroby rozwija się w czasie 24-48 godz. po urodzeniu. Pozostałe 8% zakażeń występuje między 2, a 7 dniem życia noworodka. EOD najczęściej przebiega pod postacią chorób układu oddechowego, zapalenia płuc, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, posocznicy i rzadziej zakażenia kości i stawów. EOD charakteryzuje wysoka śmiertelność wynosząca od 5 do 20%. Ryzyko rozwoju późnej postaci choroby występuje od 8 do 90 dnia życia dziecka. Przebieg LOD jest niespecyficzny, objawia się gorączką, zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych lub posocznicą (Schrage i wsp., 2000; Zaleźnik i wsp., 2000). Śmiertelność z powodu LOD wynosi od 2 do 6%. Po trzecim miesiącu życia dziecka może dojść do rozwoju opóźnionej postaci choroby, która charakteryzuje się łagodnym przebiegiem. Śmiertelność dzieci w wyniku opóźnionego zakażenia GBS wynosi około 1% (Słomko i wsp., 2001).

Przypuszczalnie inwazyjność szczepu GBS i zdolność do wywołania choroby u noworodków jest ściśle związana z jego serotypem. Potwierdzają to dane epidemiologiczne wykazujące, że serotyp III GBS w 25% jest przyczyną wczesnej postaci choroby EOD, a w 90% przyczyną późnej postaci choroby LOD (Lin i wsp., 1998).

W Stanach Zjednoczonych znacznie zredukowano częstość zakażeń noworodków paciorkowcami z grupy serologicznej B poprzez wprowadzenie w latach 90-tych XX wieku zaleceń CDC (Center for Disease Control and Prevention). Przeprowadzanie badań przesiewowych kobiet ciężarnych w kierunku nosicielstwa GBS oraz zastosowanie antybiotykoterapii okołoporodowej znacznie zmniejszyło liczbę zachorowań i zgonów wśród amerykańskich noworodków. Przed wprowadzeniem zaleceń CDC notowano 2-3 przypadków zakażeń paciorkowcowych na 1000 żywo narodzonych noworodków. Liczba ta zmniejszyła się do 1,8/1000 przypadków zachorowań na początku wprowadzenia zaleceń

CDC gdy nie były one jeszcze powszechnie stosowane. Pod koniec lat 90-tych XX w. obserwowano dalszy spadek zachorowań do 0,5 przypadków na 1000 żywo urodzonych dzieci (spadek o 70%). Od roku 2008 w Polsce obowiązują rekomendacje dotyczące badania nosicielstwa GBS wśród kobiet ciężarnych oraz zapobiegania zakażeniom noworodków wywołanym przez GBS przygotowane na wzór zaleceń amerykańskich przez Polskie Towarzystwo Ginekologiczne. Zgodnie z obowiązującymi rekomendacjami każdej kobiecie między 35, a 37 tygodniem ciąży zleca się wykonanie badań przesiewowych w kierunku nosicielstwa GBS według określonych procedur. W przypadku stwierdzenia nosicielstwa GBS u kobiet ciężarnych, w czasie porodu należy zastosować antybiotykoterapię okołoporodową. Rekomendowanym lekiem jest penicylina G, którą można zastąpić ampicyliną. W przypadku, gdy pacjentka zgłasza nadwrażliwość na penicylinę i nie stwierdza się u niej szczepu GBS z mechanizmem MLSB, stosuje się erytromycynę bądź klindamycynę. U pacjentek, u których obecny jest szczep GBS z mechanizmem MLSB zaleca się stosowanie wankomycyny lub cefazoliny. W sytuacji, gdy brak informacji na temat nosicielstwa GBS u ciężarnej, należy postępować tak jak w obecności szczepu GBS z fenotypem MLSB. Podobna procedura powinna obowiązywać, gdy szczep GBS jest oporny lub wykazuje średnią wrażliwość na erytromycynę bądź klindamycynę, choć dopuszcza się zastosowanie jednego z tych antybiotyków (Heczko i wsp., 2008).

Antybiotykprofilaktyka okołoporodowa skierowana przeciwko GBS chroni noworodki przed wystąpieniem wczesnej postaci choroby EOD, jak również może zapobiegać zakażeniom kobiet po porodzie (Zangwill i wsp., 1992; Schrag i wsp., 2000). Nie przeciwdziała jednak rozwinięciu się późnej postaci choroby LOD. Dodatkowo częste stosowanie antybiotyków może powodować narastanie oporności wśród szczepów GBS na stosowane antybiotyki. O ile nie notuje się oporności szczepów GBS na penicylinę i ampicylinę, coraz częściej analizowane szczepy wykazują mechanizm oporności MLSB (Andrews i wsp., 2000; Lin i wsp., 2000). Przykładowo w Stanach Zjednoczonych w latach osiemdziesiątych XX wieku oporność izolatów GBS na erytromycynę wynosiła 1,2%, ale już w latach dziewięćdziesiątych zwiększyła się do 18% (De Mouy i wsp., 2001). Panda i wsp. (2009) wykazali, że w Stanach Zjednoczonych 25% szczepów GBS jest opornych na erytromycynę oraz 21% opornych na klindamycynę. Oporność szczepów GBS na erytromycynę we Włoszech wynosi 16,5% i jest bliska danym zebranym w Polsce. Na 169 szczepów wyizolowanych od kobiet ciężarnych z terenu Małopolski zgodnie z zaleceniami CDC u 27 z nich (16%) wykazano obecność mechanizmu oporności MLSB lub fenotypu M. Największy odsetek stanowiły izolaty z fenotypem kMLSB (63%),

następnie z fenotypem iMLSB (26%) oraz z fenotypem M (11%) (Brzychczy-Włoch i wsp., 2010). Ośrodek warszawski podaje, że oporność na erytromycynę wśród szczepów GBS izolowanych z zakażeń oraz nosicielstwa GBS w Polsce wynosi 18,4% (Sadowy i wsp., 2010).

Skutecznym sposobem zapobiegania zakażeniom paciorkowcowym, a zwłaszcza LOD, wydaje się być zastosowanie szczepionki skierowanej przeciwko GBS. Istnieją jednak trudności ze skonstruowaniem skutecznej szczepionki wynikające z różnic geograficznych rozkładu serotypów, czy też zróżnicowanego wzoru antygenowego szczepów oraz rozmieszczenia populacji ludzkiej. W Stanach Zjednoczonych przeprowadzono badania kliniczne 1-go i 2-go stopnia nad monowalentną szczepionką pięciu poszczególnych serotypów GBS skojarzonych z toksoidem tężcowym (ang. tetanus toxoid, TT). U 93-100% pacjentów, którzy otrzymali monowalentną szczepionkę przeciwko GBS, po ośmiu tygodniach od momentu immunizacji stwierdzono czterokrotny lub większy wzrost poziomu przeciwciał klasy IgG. Jedynie w grupie pacjentek, które otrzymały szczepionkę przeciwko szczepom z serotypu Ib-TT stwierdzono obecność przeciwciał po 8 tygodniach u 80% kobiet. W innych badaniach nad skonstruowaniem szczepionki skierowanej przeciwko GBS dokonuje się prób wykorzystania jako jej składników białek GBS np. fimbrii, rekombinowanego białka β -C (BCP), rekombinowanych konserwatywnych fragmentów białek ScaAB i peptydazy ScpB (Margarit i wsp., 2009; Savorov i wsp., 2010; Yang i wsp., 2007).

I.1.3.3 Zakażenia GBS w grupie osób dorosłych

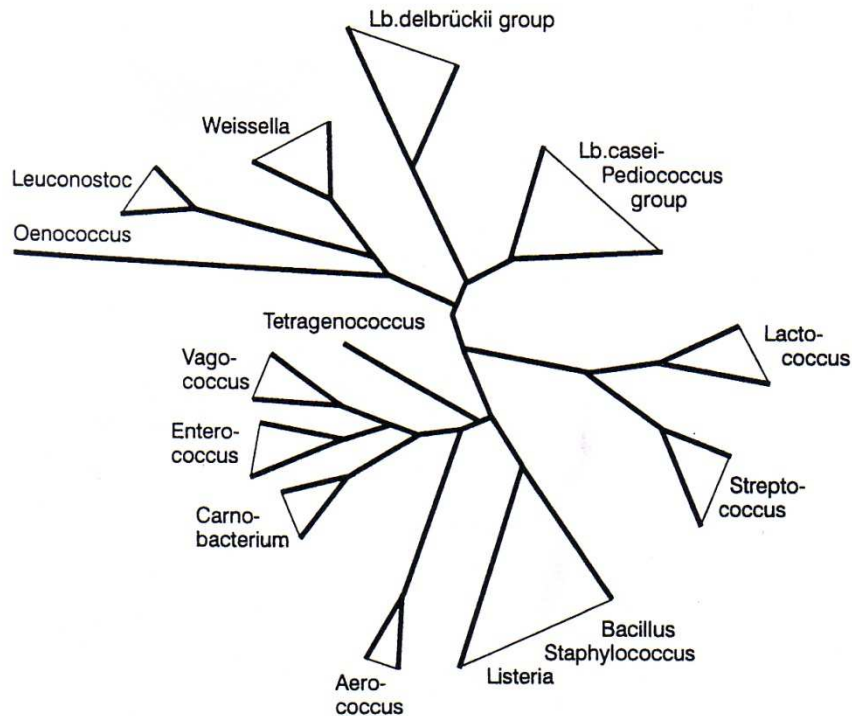
Streptococcus agalactiae najczęściej wywołuje zakażenia noworodków, jednak coraz częściej notuje się zakażenia paciorkowcami grupy B wśród osób dorosłych. Do czynników zwiększających ryzyko wystąpienia zakażenia należą m. in. wiek powyżej 65 roku życia, cukrzyca, nowotwory oraz upośledzenie funkcjonowania układu odpornościowego. GBS jest najczęściej izolowany z układu moczowo-płciowego (pochwa, szyjka macicy, cewka moczowa) oraz odbytu, natomiast rzadziej z gardła i skóry. Nosicielstwo GBS wśród osób dorosłych wynosi od 20% do 35%, przy czym jest ono częstsze u osób aktywnych seksualnie. Jak wskazują amerykańskie badania epidemiologiczne, występowanie zakażeń o etiologii paciorkowcowej w grupie osób dorosłych podwoiło się w okresie 1990-2007 z 3,6/100000 na 7,3/100000 przypadków. GBS u osób starszych najczęściej wywołuje

posocznicę, zakażenia skóry bądź tkanek miękkich, zapalenie płuc, zapalenie wsierdza (Sendi i wsp., 2008; Phares i wsp., 2008). Szczepy GBS izolowane z zakażeń w grupie dorosłych należą do serotypu V oraz kolejno do serotypów Ia, II i III. Szczepy GBS z serotypu V są najczęściej izolowanymi w grupie pacjentów w wieku 18-39 lat (Skoff i wsp., 2009).

I.2. Bakterie kwasu mlekowego LAB

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* zaliczane są do bakterii kwasu mlekowego (ang. Lactic Acid Bateria, LAB). Do tej grupy drobnoustrojów należą się bakterie Gram-dodatnie, niesporujące, względnie beztlenowe, wytwarzające kwas mlekowy jako główny produkt procesu fermentacji cukrów. Bakterie kwasu mlekowego dzieli się na homofermentujące, których produktem fermentacji glukozy jest tylko kwas mlekowy oraz na heterofermentujące produkujące prócz kwasu mlekowego także etanol, kwas octowy oraz dwutlenek węgla. Do LAB zalicza się następujące rodziny bakterii: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactobacillus* oraz *Carnobacterium*.

Klasyfikację mikroorganizmów uwzględniającą pokrewieństwo ewolucyjne oraz filogenezę umożliwia analiza sekwencji 16S rybosomalnego RNA (rRNA) określająca procentową zawartość par zasad guanina-cytosyna (mol% G-C). Bakterie Gram-dodatnie dzieli się na dwa główne typy ze względu na pochodzenie zawierające mniej lub więcej niż 50 mol% par G-C. Typ zwany *Clostridium* (<50 mol% G-C) obejmuje bakterie z rodzajów *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Ruminococcus*. Typ drugi bakterii zwany *Actinomycetes* (>50 mol% G-C) stanowią rodzaje *Bifidobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Actinomyces* oraz *Streptomyces*. Poszczególne rodzaje LAB tworzą spójne grupy pod względem filogenetycznym (Ryc.2). Przykładowo rodzaje *Carnobacterium*, *Enterococcus* oraz *Vagococcus* stanowią rozgałęzienie filogenetyczne i są ze sobą bardziej spokrewnione niż inne bakterie kwasu mlekowego. Rodzaje *Lactococcus* oraz *Streptococcus* również są spokrewnione jednak w mniejszym stopniu w porównaniu do LAB z typu *Enterococcus*. Rodzaje bakterii *Lactobacillus* oraz *Pediococcus* stanowią podtyp, w obrębie którego wyróżnia się typy *L. delbrueckii* oraz *L. casei* *Pediococcus* (Salminen i wsp., 1998).



Ryc. 2. Drzewo filogenetyczne bakterii kwasu mlekowego LAB uwzględniające bakterie tlenowe oraz względnie beztlenowe bakterie Gram-dodatnie z typu *Clostridium* (zawartość par G-C < 50 mol%) (Salminen i wsp., 1998).

I.2.1 Komensualna flora bakteryjna przewodu pokarmowego i pochwy oraz jej rola

Bakterie *Streptococcus agalactiae* kolonizując dolny odcinek przewodu pokarmowego lub pochwę stanowią część złożonego ekosystemu, w którego skład wchodzi inne mikroorganizmy komensalne oraz bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.

Na mikroflorę przewodu pokarmowego składają się głównie bakterie beztlenowe (*Clostridium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*; *Bifidobacterium*), bakterie tlenowe oraz względnie beztlenowe (*Enterobacteriaceae*; *Streptococcus*; *Staphylococcus*; *Lactobacillus*) (Hill i wsp., 1975). Liczba komórek bakteryjnych zasiedlających ludzkie jelito wynosi około 10^{14} , a w jednym mililitrze treści jelitowej znajduje się około 10^{11} komórek bakterii (Ley i wsp., 2006). Przeważającą część flory pochwy, bo aż 90% populacji (10^7 - 10^8 cfu/ml; ang. colony-forming units per milliliter) stanowią bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Do innych mikroorganizmów bytujących w pochwie w niskich populacjach ($<10^2$ cfu/ml) można prócz *S. agalactiae* zaliczyć m. in. *E. faecalis*, *E. coli*, grzyby z rodzaju *Candida*.

Najczęściej izolowanymi bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* od kobiet w wieku rozrodczym są bakterie zaliczane do grupy acidofilnej obejmujące gatunki *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*. W mniejszym stopniu pochwa jest kolonizowana przez gatunki *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* (May i wsp., 1999; Strus i wsp., 2005).

Aktywność antybakteryjna LAB zarówno w środowisku pochwy jak i dolnego odcinka przewodu pokarmowego polega na współzawodnictwie o receptory powierzchniowe nabłonka, a tym samym zapobieganiu adherencji mikroorganizmów chorobotwórczych, konkurencji o składniki odżywcze, produkcji związków o właściwościach antybakteryjnych m. in. substancji o charakterze bakteriocyn (ang. Bacteriocin Like Substances, BLIS), nadtlenu wodoru, krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych zapewniających kwaśne pH pochwy w zakresie 4,0-4,5 (Martirosian i wsp., 2003). Dzięki tym mechanizmom komensalna flora bakteryjna chroni jelito oraz pochwę przed inwazją mikroorganizmów patogennych, umożliwia tworzenie oporności na kolonizację i stymulację układu immunologicznego organizmu gospodarza (Dicks i wsp., 2010).

I.2.2 Produkty metabolizmu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz mechanizmy działania antybakteryjnego tych substancji

I.2.2.1 Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, nadtlenek wodoru, dwutlenek węgla

Powstające w procesie fermentacji kwas mlekowy oraz kwas octowy wnikają do wnętrza komórek drobnoustrojów, gdzie ulegają dysocjacji. Uwolnienie protonów prowadzi do zmian pH cytoplazmy, zaburzenia metabolizmu komórkowego oraz zahamowania wzrostu. Inni badacze jako przyczynę zahamowania wzrostu drobnoustrojów podają nagromadzenie się reszt kwasowych we wnętrzu komórek, co może skutkować zaburzeniami procesów syntezy oraz transportu substancji do przestrzeni pozakomórkowej. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe wykazują silną aktywność hamującą wobec bakterii Gram-ujemnych oraz grzybów (Holzapfel i wsp., 1995; Gilliland, 1989).

W obecności tlenu niektóre gatunki *Lactobacillus* produkują nadtlenek wodoru dzięki zawierającej flawoproteinę oksydazie NADH. Głównym mechanizmem działania antybakteryjnego nadtlenu wodoru jest utlenianie grup sulfhydrylowych enzymów katalizujących proces glikolizy (Carlson i wsp., 1983; Vallor i wsp., 2001). Nadtlenek wodoru posiada również silne właściwości utleniające wobec komórek drobnoustrojów, grup

sulfhydrylowych białek komórkowych oraz lipidów błony komórkowej. Dodatkowo podczas produkcji nadtlenu wodoru uwalniane są aktywne formy tlenu zabójcze dla mikroorganizmów.

W wyniku przebiegu reakcji metabolicznych bakterie wydzielają dwutlenek węgla, który powoduje nie tylko powstawanie warunków beztlenowych, ale także poprzez nagromadzenie się w warstwie lipidowej błony komórkowej zaburza jej funkcjonowanie oraz przepuszczalność.

I.2.2.2 Bakteriocyny

Bakteriocyny należą do grupy peptydów o działaniu hamującym wobec drobnoustrojów AMPs (ang. antimicrobial peptides, AMPs). Peptydy te są produkowane i wydzielane przez bakterie, grzyby, rośliny, owady oraz kręgowce. AMPs posiadają amfipatyczną strukturę oraz zwykle zawierają od 12 do 120 aminokwasów w swoich cząsteczkach. Znane jest działanie hamujące AMPs skierowane przeciwko wirusom otoczkowym, bakteriom, grzybom, pasożytom, a także komórkom nowotworowym. AMPs pochodzenia ludzkiego, β -defenzyny oraz katelicydyny m. in. aktywują chemotaksję monocytów, neutrofilii, komórek dendrytycznych oraz limfocytów do miejsca zakażenia, stymulują produkcję chemokin i cytokin oraz indukują proces angiogenezy i gojenia ran (Palffy i wsp., 2009).

Bakteriocyny to małe, termostabilne peptydy kodowane przez rybosomalne DNA lub plazmidy (Heng i wsp., 2006) o działaniu antybakteryjnym najczęściej wobec bakterii blisko spokrewnionych filogenetycznie (wąskie spektrum działania), ale także wobec innych drobnoustrojów (szerokie spektrum aktywności). Ich mechanizm działania polega na perforacji błony komórkowej mikroorganizmów. Bakteriocyny zostały podzielone na cztery klasy ze względu na ich strukturę chemiczną, masę cząsteczkową, wrażliwość na działanie enzymów, zawartość modyfikowanych aminokwasów oraz mechanizm działania (Tabela 1). Prócz przedstawionego poniżej podziału bakteriocyn istnieją jeszcze inne sposoby klasyfikacji sugerowane przez różnych autorów. Przykładowo Zouhir i wsp. (2010) proponuje podział bakteriocyn na 12 grup w oparciu o różnice w strukturze chemicznej cząsteczek peptydów oraz pokrewieństwo filogenetyczne.

Tab. 1. Klasyfikacja i ogólna charakterystyka bakteriocyn.

Klasa bakteriocyn	Opis klasy	Podklasa bakteriocyn	Masa cząsteczkowa	Cechy charakterystyczne klasy/podklasy	Przykład bakteriocyn
Klasa I	modyfikowane w obróbce potranslacyjnej	A	< 5 kDa	bakteriocyny	nizyna
		B		lantybiotykowe	marsacydyna alametycyna
Klasa II	brak zmian potranslacyjnych cząsteczek	IIa	< 10 kDa	bakteriocyny pediocyno-podobne	sakacyna A, sakacyna P, kurwatycyna A
		IIb		bakteriocyny dipeptydowe	laktacyna F
		IIc		bakteriocyny sec zależne	carno-bakteriocyna A
Klasa III	peptydy o dużych cząsteczkach		>30 kDa	każda z bakteriocyn posiada indywidualne właściwości	laktokocyna B
Klasa IV	kompleksy białkowo-lipidowe oraz białkowo-węglowodanowe		peptydy o dużych cząsteczkach	aktywność bakteriocyny zależna od obecności komponenty lipidowej lub węglowodanowej	leukocyna S, mesenterocyna 52

I.2.2.2.1 Klasa I bakteriocyn

Do klasy I bakteriocyn należą lantybiotyki, termostabilne peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 5 kDa zawierające w swych cząsteczkach lantoninę, aminokwas, który powstaje w wyniku obróbki potranslacyjnej peptydu. Modyfikacja potranslacyjna cząsteczki polega na dehydratacji seryny oraz treoniny i powstaniu odpowiednio dehydroalaniny i dehydrobuteryny. Następnie do podwójnych wiązań przekształconych aminokwasów dodawane są reszty siarkowe cysteiny. W procesie tym formowana jest lantonina (Lan)

i 3-metyllantonina (MeLan) oraz tworzone są cykliczne struktury cząsteczek peptydu (Hechard i wsp., 2002; Xie i wsp., 2004).

Na podstawie różnic w strukturze cząsteczek bakteriocyn klasy I, przebiegu reakcji ich syntezy oraz mechanizmów działania wyodrębniono dwie podklasy lantybiotyków A i B. Lantybiotyki należące do typu A to bakteriocyny o liniowych, elastycznych molekułach i pozytywnym ładunku. W tym typie lantybiotyków Lan oraz MeLan są formowane w wyniku reakcji grup sulfhydrylowych cysteiny z proksymalnymi cząsteczkami dehydroaminokwasów. Przykładem lantybiotyku A jest nizyna. Lantybiotyki typu B posiadają cząsteczki globularne o ładunku negatywnym lub neutralnym. Globularna struktura peptydów jest rezultatem powstawania Lan oraz MeLan, w wyniku reakcji reszt sulfhydrylowych cysteiny z dystalnymi dehydroaminokwasami. Do tego typu lantybiotyków należą marsacydyna i alametycyna (Twomey i wsp., 2002).

Najlepiej poznaną i opisaną bakteriocyną z klasy lantybiotyków jest nizyna syntezowana przez *Lactococcus lactis*. Jej działanie hamujące w stosunku do drobnoustrojów jest wielokierunkowe. Według doniesień Linnet i wsp. (1973) nizyna zaburza syntezę peptydoglikanu poprzez wiązanie się do jego błonowej formy prekursorowej zwanej lipidem II, co pociąga za sobą osłabienie ściany komórkowej. Dodatkowo związanie nizyny z lipidem II skutkuje permabilizacją błony komórkowej drobnoustrojów. Ponadto nizyna może wpływać na aktywność enzymów autolitycznych, zaburzać proces tworzenia spor przez bakterie oraz zaburzać syntezę makromolekuł takich jak DNA, RNA, białka czy też polisacharydu (Hechard i wsp., 2002). Nizyna jest peptydem o właściwościach antybakteryjnych skierowanych przeciwko bakteriom Gram-dodatnim. Aktywność hamująca czystej chemicznie nizyny wobec gatunków bakterii zaliczanych do Gram-ujemnych ujawnia się dopiero w obecności innych substancji (np. p-cymen). Prawdopodobnie związki o działaniu synergistycznym z nizyną wywołują zmiany w błonie komórkowej bakterii ułatwiając w ten sposób tworzenie porów przez nizynę (Rattanachaikunsopon i wsp., 2010).

Istnieje kilka hipotez modeli formowania porów przez lantybiotyki. Przykładem może być model beczułkowy (ang. barrel-stave model) oraz klinowy (ang. wedge model) permabilizacji błony komórkowej (Oren i wsp., 1998; Moll i wsp., 1996). W modelu klinowym, który jest najbardziej prawdopodobnym mechanizmem działania lantybiotyków, cząsteczka peptydu przyjmuje amfipatyczną konformację w kontakcie z błoną komórkową drobnoustroju, dzięki czemu przyjmuje ona najbardziej korzystne i stabilne ułożenie. Jonowe oddziaływania pomiędzy dodatnio naładowanymi resztami aminokwasów w cząsteczce peptydu, a fosfolipidami błony komórkowej o ładunku ujemnym prowadzą do równoległego

ułożenia peptydu względem błony komórkowej. Następnie peptydy wnikają do wnętrza błony komórkowej i powodują zmianę transmembranowego potencjału elektrycznego oraz zniszczenie uporządkowanej dwuwarstwowej struktury błony. Poprzez utworzone pory dochodzi do utraty składników niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania i metabolizmu komórek mikroorganizmu (van den Hooven i wsp., 1996; Driessen i wsp., 1995).

I.2.2.2.2 Klasa II bakteriocyn

Klasę II bakteriocyn stanowią bakteriocyny nielantybiotyczne nieulegające obróbce potranslacyjnej o masie cząsteczkowej mniejszej niż 10 kDa. Mechanizm permabilizacji błony komórkowej przez bakteriocyny klasy II opisuje model beczułki (ang. barrel-stave model) lub dywanu (ang. carpet model). W obrębie klasy drugiej bakteriocyn wyróżnia się trzy podklasy: IIa, IIb oraz IIc.

Bakteriocyny pediocynopodobne wykazujące podobieństwo do związku peptydowego pediocyny, należą do podklasy IIa. Zawierają konserwatywny motyw sekwencyjny YGNGVXCXXXXCXV w N-terminalnej części cząsteczki oraz dwie cząsteczki cysteiny tworzące mostek disiarczkowy. Bakteriocyny z podklasy IIa wykazują dużą aktywność hamującą wobec *Listeria* spp. Działanie permabilizujące błonę komórkową przez bakteriocyny klasy IIa najlepiej opisuje model beczułkowy. W modelu tym α -helikalne, amfipatyczne części cząsteczek peptydów w wyniku oddziaływań elektrostatycznych wiążą się równolegle z powierzchnią błony komórkowej. Przypuszczalnie za wiązanie peptydów do błony mogą być odpowiedzialne elementy fosfotransferazy mannozowej, pełniące funkcję receptorów błonowych dla peptydów. Następnie dochodzi do oddziaływania pomiędzy hydrofobowymi częściami peptydów w ich C-końcowej części, a fosfolipidowymi łańcuchami błony. Bakteriocyny aby uniknąć niekorzystnego ułożenia względem błony układają się w pakiety. Niepolarnie części peptydów wnikają do wnętrza błony i w wyniku hydrofobowego oddziaływania z łańcuchami lipidowymi dochodzi do perforacji i utraty ciągłości błony komórkowej oraz zaburzenia potencjału membranowego i gradientu pH. Poprzez powstałe pory traczone są jony potasu co z kolei prowadzi do utraty potencjału błonowego i zatrzymania transportu aminokwasów (Pilarczyk, 2007).

Do podklasy IIb zalicza się bakteriocyny dipeptydowe (ang. two-peptides). Aktywność tych bakteriocyn zależy od komplementarnego działania obu peptydów. Część bakteriocyn z tej klasy np. lactokocyna G wykazuje zupełny brak aktywności pojedynczych

podjednostek. Z kolei podjednostki peptydowe innych bakteriocyn tej podklasy wykazują każda z osobna niewielką aktywność, a kombinacja obu tych podjednostek powoduje synergistyczny efekt ich działania (np. laktacyjna F) (Oppegard i wsp., 2007; Nissen-Meyer i wsp., 2010).

Najbardziej prawdopodobny mechanizm permabilizacji bakteriocyn klasy IIB opisuje model dywanu. Amfipatyczne α -helisy cząsteczki peptydu układają się równolegle do powierzchni błony, co ułatwia wnikanie hydrofobowych fragmentów α -helisy do hydrofobowej wewnętrznej części błony. W wyniku zaburzenia układu fosfolipidów w błonie dochodzi do jej permabilizacji. Powstałe pory w zależności od działającej bakteriocyny są przepuszczalne dla kationów sodu, potasu, litu, cezu, rubidu, czy też wodoru. Ostatecznie śmierć komórki jest powodowana utratą jonów potasu z równoczesnym rozkładem ATP przez enzymy ATP-azy.

Lactobacillus plantarum C 11 w wyniku stymulacji przez feromon plantarycynę A (PlnA) syntetyzuje oraz wydziela plantarycyny J (PlnJ) i K (PlnK) oraz E (PlnE) i F (PlnF) zaklasyfikowane do klasy IIB. Plantarycyny te tworzą pory w błonie komórkowej prowadząc do utraty przez nią elektrycznego potencjału transmembranowego oraz zaburzeń pH. Poprzez pory powstałe pod wpływem plantarycyny EF dochodzi do utraty przez komórkę głównie kationów. Z kolei plantarycyna JK powoduje ubytek poprzez pory w błonie komórkowej anionów i w małym stopniu kationów. W ten sposób działanie plantarycyn JK i EF dopełnia się powodując skuteczne hamowanie wzrostu mikroorganizmów (Kristiansen i wsp., 2005; Moll i wsp., 1999).

Podklasa bakteriocyn IIC zawiera wszystkie bakteriocyny nienantybiotykowe nienależące do pozostałych podklas IIA i IIB. Bakteriocyny z klasy IIC wykazują duże zróżnicowanie. Ponieważ wydzielane są z komórki za pomocą białek sec, bakteriocyny te zwane są sec zależnymi. Mechanizm działania tej klasy bakteriocyn nie jest ostatecznie poznany. Do tej klasy bakteriocyn zalicza się m. in. laktokocynę B (Pilarczyk, 2007).

I.2.2.2.3 Klasy III i IV bakteriocyn

Peptydy o masie cząsteczkowej powyżej 30 kDa będące enzymami litycznymi uszkodzającymi ścianę komórkową zaliczane są do klasy III. Są to bakteriocyny termolabilne. W obrębie tej klasy bakteriocyn wyróżnia się podklasę bakteriolizyn (IIIa) oraz peptydy pozbawione funkcji litycznej (IIIb).

Do IV klasy bakteriocyn zaliczane są peptydy, które do pełnej aktywności antagonistycznej wobec drobnoustrojów wymagają obecności komponenty lipidowej lub węglowodanowej w cząsteczce. Do tej klasy bakteriocyn zalicza się m. in. leukocynę S i mesenterocynę 52 (Kawai i wsp., 2004; Gwiazdowska i wsp., 2005; Nissen-Meyer i wsp., 2009; Maqueda i wsp., 2008).

I.2.2.2.4 Bakteriocyny wydzielane przez LAB, ich zastosowanie oraz nadzieje związane z zastosowaniem tych peptydów jako substancji leczniczych

Bakteriocyny wydzielane przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* przynależą do klasy I oraz II i są aktywne już w pikomolarnych i nanomolarnych stężeniach powodując permabilizację błony komórkowej. Substancje te są najbardziej aktywne wobec bakterii blisko spokrewnionych filogenetycznie.

Przeprowadzono wiele eksperymentów, w których udowodniono działanie antagonistyczne bakteriocyn wydzielanych przez LAB wobec wielu gatunków i szczepów bakterii (Tabela 2). Przykładowo w wyniku synergistycznego oddziaływania dipeptydowych plantarycyn JK i EF wydzielanych przez *L. plantarum* C 11 dochodzi do zahamowania wzrostu m. in. takich szczepów jak *L. plantarum* 965, *L. sake* NCDO 2714, *L. viridescens* NCDO 1655, *L. plantarum* UI50 (Andersen i wsp., 1998). Jones i wsp. (2009) wykazali aktywność antybakteryjną sakacyny wobec gatunku *L. monocytogenes* oraz *C. jejuni*.

Szczepy LAB syntetyzujące oraz wydzielające bakteriocyny a także czyste chemicznie bakteriocyny (nizyna, pediocyna, bawarycyna, piscikolina, jensenina, kurwatycyna, laktycyna i sakacyna) znalazły zastosowanie jako środki konserwujące żywność. Szczepy LAB produkujące bakteriocyny używane do inicjacji procesu fermentacji żywnościowych produktów fermentowanych przeciwdziałają rozwojowi drobnoustrojów chorobotwórczych będących częstym zanieczyszczeniem żywności np. *Listeria* spp. w fermentowanej kielbasie i serach lub też bakterii z rodzaju *Clostridium* produktach mlecznych (Steinka i wsp., 2009; Leroy i wsp., 2004). Jako bezpieczne do stosowania w żywności uznaje się bakterie z rodzajów *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* (de Vuyst i wsp., 2007).

Obiecujące są badania nad zastosowaniem bakteriocyn jako substancji będących alternatywą coraz mniej skutecznych w leczeniu zakażeń antybiotyków. Badania

przeprowadzone na modelach mysich przez Millette i wsp. (2008), w których określano wpływ hamujący płynów pochodzących *L. lactis* MM 19 oraz *P. acidilactici* MM 33 produkujących odpowiednio nizinę i pediocynę na enterokoki wankomycynooporne (ang. vancomycin-resistant *Enterococcus*, VRE) wykazały redukcję populacji enterokoków w jelicie. Z kolei Kruszewska i wsp. (2004) wykazali antagonistyczne działanie marsacydyny syntezowanej przez *Bacillus* sp. wobec szczepów *Staphylococcus aureus* (ang. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) prowadzące do eliminacji kolonizacji bakterii ze śluzówki nosa myszy. Wyniki autorów Fernandez i wsp. (2008 r.) wskazywały na skuteczność nizyny w leczeniu zapalenia sutka u kobiet wywołanego przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus* należących do bakterii Gram-dodatnich. Przeprowadzane są także badania nad skonstruowaniem formy podania nizyny zwiększającej jej skuteczność antybakteryjną (Colas i wsp., 2007). Nizyna oraz laktacyna znalazły zastosowanie w weterynarii w leczeniu oraz profilaktyce zapalenia wymion u bydła (Twomey i wsp., 2002).

Wzrasta zainteresowanie możliwością zastosowania bakteriocyn jako substancji o działaniu przeciwnowotworowym. Istnieją badania nad wykorzystaniem plantarycyny A syntetyzowanej przez *L. plantarum* C11 do permabilizacji błony komórkowej komórek nowotworowych przysadki u myszy oraz ludzkich zarówno niezmiennych jak i zmienionych nowotworowo limfocytów (Zhao i wsp., 2006).

Tab. 2. Przykłady bakteriocyn z poszczególnych klas produkowane przez LAB, miejsce izolacji szczepu LAB oraz zakres aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Producent	Szczep	Źródło	Bakteriocyna	Klasa bakteriocyn	Znana aktywność hamująca bakteriocyn
<i>E. faecium</i>	H41B	ser	Enterocyna A Enterocyna P	II	Aktywność hamująca wobec <i>Listeria</i> spp. Brak działania min. wobec <i>E.coli</i> O157:H7, <i>S.sonei</i> , <i>S.epidremidis</i> (Renyé i wsp., 2009)
<i>L. gasseri</i>	LA 39	kał niemowlęcia	Gasserycyna A	IV	Działanie hamujące wobec <i>L.monocytogenes</i> , <i>S.ureus</i> , <i>B. cereus</i> (Kawai i wsp., 1994)
<i>L. acidophilus</i>	M 46	kał niemowlęcia	Acydocyna B	IV	Aktywność hamująca wobec min. <i>L.monocytogenes</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>L. fermentum</i> oraz <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> . Brak aktywności hamującej wobec innych gatunków z rodzaju <i>Lactobacillus</i> (Leer et al., 1995)
<i>L.plantarum</i>	C 11	kiszzone ogórki	Plantarycyna JK (PlnJ, PlnK) Plantarycyna EF (PlnE, PlnF)	II b	Aktywność hamująca wobec szczepów wskaźnikowych <i>L. plantarum</i> 965, <i>L. sake</i> NCDO 2714, <i>L. viridescens</i> NCDO 1655, <i>L. plantarum</i> UI50 (Andersen i wsp., 1998)
			Plantarycyna A (PlnA)	feromon	Indukcja syntezy Pln J, PlnK, PlnE, PlnF; aktywność antybakteryjna (Kristiansen i wsp., 2005); cytotoksyczna wobec komórek nowotworowych (Zhao i wsp., 2006)
<i>L.sakei</i>	DSMZ 6333	próżniowo pakowana wieprzowina	Sakacyna A	II a	Aktywność hamująca wobec <i>Listeria</i> ; oraz <i>L. sake</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>C.piscicola</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>E. faecalis</i> (Jones i wsp., 2009)
<i>L.lactis</i>	ATCC 11454	mięso	Nizyna	I (typ A)	Szerokie spektrum działania antybakteryjnego; używana jako konserwant środków spożywczych (Steinka i wsp., 2009)

II. CEL PRACY

Ogólnym celem niniejszej rozprawy była szczegółowa charakterystyka 99 izolatów *Streptococcus agalactiae* izolowanych zarówno od kobiet skolonizowanych, od kobiet z klinicznymi objawami stanu zapalnego pochwy, jak i od kobiet ciężarnych rutynowo badanych w kierunku nosicielstwa GBS. Pozostałe izolaty pochodziły od noworodków, które z różnych przyczyn zostały przyjęte na oddział noworodkowy, a także od noworodków skolonizowanych GBS bez objawów zakażenia. Szczegółowe cele badawcze przedstawiono poniżej:

1. Charakterystyka fenotypowa i genotypowa izolatów GBS w oparciu o:

- oznaczenie polisacharydów powierzchniowych szczepów GBS reprezentujących poszczególne serotypy Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII,
- detekcja genów kodujących polisacharydy powierzchniowe,
- detekcja genów białek powierzchniowych *epsilon*, *bca*, *rib*, *alp2*, *alp3*, *alp4*,
- wykazanie zależności pomiędzy występowaniem genów kodujących poszczególne białka powierzchniowe, a serotypami badanych izolatów w odniesieniu do miejsca izolacji,
- określenie mechanizmu oporności MLSB typu konstytutywnego lub indukcyjnego, czy też fenotypu M oraz poszukiwanie związku pomiędzy jego obecnością, a serotypem GBS i przynależnością do badanej grupy.

2. Wykazanie wrażliwości wybranych izolatów *Streptococcus agalactiae* na działanie szczepów bakterii *Lactococcus lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus plantarum* C11, *Lactobacillus sakei* DSMZ 6333 produkujących bakteriocyny o odmiennych mechanizmach uszkodzenia błony komórkowej oraz określonych gatunków *Lactobacillus* stanowiących podstawowy składnik flory fizjologicznej dróg rodnych. Porównanie, który ze szczepów wzorcowych bakterii kwasu mlekowego wykazuje ze względu na klasę produkowanej bakteriocyny najsilniejszą aktywność hamującą wobec GBS. Dodatkowo porównanie wrażliwości szczepów GBS w zależności od ich serotypów, genów białek z klasy Alp oraz pochodzenia izolatu, na działanie LAB.

3. Badanie adherencji izolatów *S.agalactiae* do komórek linii nabłonka pochwy A-431 oraz komórek linii jelita grubego HT-29. Ocena zależności zdolności przylegania paciorkowców

z grupy B do komórek obu linii tkankowych od serotypu, genów białek z klasy Alp oraz miejsca pochodzenia szczepu.

III. MATERIAŁY I METODY

III.1 Materiały

III.1.1 Aparatura i sprzęt

Cieplarka WS 140	Bolarus, Bochnia, Polska
Komora do hodowli organizmów beztlenowych	dw Scintific, Shipley, Wielka Brytania
Cieplarka CLN ECO	POL-ECO Aparatura, Wodzisław Śląski, Polska
Inkubator CO2 HERACELL	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zamrażarka niskotemperaturowa	SANYO Electric Co., Ltd, Japonia
Ultra Low Temperature Freezer MDF-U5386S	
Mikroskop optyczny	Carl Zeiss, Warszawa, Polska
Mikroskop odwrócony	Hund, Wetzlar, Niemcy
Kuchenka mikrofalowa	Technostar, Kraków, Polska
Waga laboratoryjna	RADWAG, Radom, Polska
Spektrofotometr UV/VIS V-550	Jasco, Paczkowo, Polska
Wirówka	Sigma, Poznań, Polska
Termoblok Thermo Stat plus	Eppendorf, Kraków, Polska
Termocykler DNA Engine	BioRad, Warszawa, Polska
Komora laminarna UVT-S-AR	Biogenet, Warszawa, Polska
Zestaw do elektroforezy PowerPac Basic	BioRad, Warszawa, Polska
Aparat Geldoc 2000	BioRad, Warszawa, Polska
Program QuantityOne	BioRad, Warszawa, Polska

Program SAS JMP 7.0.1	SAS Campus Drive, Cary NC, USA Nr licencji GSE8SNJ0JT
R-packet 8.01	The R Foundation for Statistical Computing, USA
Microsoft Excel 2007	Microsoft Corp
Microsoft Word 2007	Microsoft Corp.
Program API LAB plus	bioMerieux, Warszawa, Polska
Komputer Dell	Dell, Kraków Polska

III.1.2 Odczynniki i zestawy testowe

III.1.2.1 Podłoża mikrobiologiczne

Podłoże Columbia (Columbia Blood Agar) z dodatkiem krwi baraniej (5%)	Biocorp, Warszawa, Polska
Bulion Todd Hewitta z dodatkiem gentamycyny (8 µg/ml) i kwasu nalidyksowego (15 µg/ml)	bioMerieux, Warszawa, Polska
Podłoże według Islama (GBS Agar Base, Islam)	Oxoid, Poznań, Polska
Podłoże z żółcią, eskuliną i azydkiem sodu (Bile Aesculin Agar)	Oxoid, Poznań, Polska
Bulion TSB (Tryptic Soy Broth)	Difco, Warszawa, Polska
Bulion MRS (De Man, Rogosa i Sharpe)	Oxoid, Poznań, Polska
Agar MRS (De Man, Rogosa i Sharpe)	Oxoid, Poznań, Polska
Agar Mueller-Hintona z dodatkiem krwi baraniej (5%)	Oxoid, Poznań, Polska
Podłoże transportowe (Amies)	bioMerieux, Warszawa, Polska
Podłoże do mrożenia drobnoustrojów tlenowych (Nutrient Broth) z glicerolem (15%)	Difco, Warszawa, Polska
Podłoże do mrożenia drobnoustrojów beztlenowych (Schaedler Broth) z glicerolem (10%)	Oxoid, Poznań, Polska

III.1.2.2 Antybiotyki

Krażki antybiotykowe - klindamycyna (2 µg)	Oxoid, Poznań, Polska
Krażki antybiotykowe - erytromycyna (15 µg)	Oxoid, Poznań, Polska

III.1.2.3 Zestaw do izolacji DNA

Genomic mini DNA	DNA Gdańsk, Gdańsk, Polska
------------------	----------------------------

III.1.2.4 Reagenty reakcji PCR

Startery	Genomed, Warszawa, Polska
Polimeraza Yellow Taq 2.0 U	EURx, Gdańsk, Polska
DTP	Roche Diagnostic, Warszawa, Polska
Bufor dla polimerazy	DNA Gdańsk, Gdańsk, Polska
Chlorek magnezu MgCl ₂	EURx, Gdańsk, Polska

III.1.2.4.1 Ślad mieszanin reakcyjnych poszczególnych reakcji PCR**III.1.2.4.1.1 Reakcja PCR z użyciem gatunkowo specyficznych starterów Sag59 oraz Sag190 dla *S. agalactiae***

Skład mieszaniny reakcyjnej na jedną próbę:

Mix 1x	[µl]
Woda	11,25
Bufor do polimerazy	2,5
DTP	2,5
Sag59	2,5
Sag190	2,5
MgCl ₂	1,5
Polimeraza 2U/ml	0,25
Matryca DNA	2,0

III.1.2.4.1.2. Reakcja multipleks PCR służąca do detekcji genów polisacharydów powierzchniowych GBS

W reakcji multipleks PCR zostały użyte dwie mieszaniny primerów – pierwsza zawierająca pary starterów Ia-F, Ia-R, Ib-F, Ib-R, II-F, II-R, III-F, III-R, IV-F, IV-R (mix I), oraz druga złożona z par starterów V-F, V-R, VI-F, VI-R, VII-F, VII-R, VIII-F, VIII-R (mix II).

Mieszaniny reakcyjne zawierały:

mix 1x	Mix I (Ia, Ib-IV)	mix 1x	Mix II (V-VIII)
	[μl]		[μl]
Woda	3,0	Woda	9,0
Bufor (NH ₄) ₂ SO ₄	4,0	Bufor (NH ₄) ₂ SO ₄	4,0
dNTP	5,0	dNTP	5,0
Ia-F	1,0	V-F	2,0
Ia-R	1,0	V-R	2,0
Ib-F	2,0	VI-F	1,0
Ib-R	2,0	VI-R	1,0
II-F	1,0	VII-F	1,0
II-R	1,0	VII-R	1,0
III-F	2,0	VIII-F	1,0
III-R	2,0	VIII-R	1,0
IV-F	2,0	MgCl ₂	7,0
IV-R	2,0	Polimeraza 1U/ μ l	2,0
MgCl ₂	7,0	Matryca DNA	3,0
Polimeraza 1U/ μ l	2,0		
Matryca DNA	3,0		

III.1.2.4.1.3 Reakcja multipleks PCR służąca do detekcji genów białek powierzchniowych z klasy Alp

W reakcji użyto startery odwrotne Alpha-C, Epsilon, Rib, Alp2/3, Alp4 dla określonych genów i jeden wspólny dla nich starter wiodący Universal.

Mix 1x	[μ l]
Woda	1,75
Bufor	2,5
dNTP	2,5
Universal	1,0
Alpha	1,0
Rib	1,0
Epsilon	1,0
Alp 2/3	1,0
Alp 4	1,0
MgCl ₂	1,0
Polimraza 1 U/ μ l	0,25
Matryca DNA	2,0

W reakcji użyto starter odwrotny Alp3 dla genu *alp3* oraz starter wiodący Universal.

Mix 1x	[μ l]
Woda	11,75
Bufor	2,5
dNTP	2,5
Universal	2,5
Alp 3	2,5
MgCl ₂	1,0
Polimraza 1 U/ μ l	0,25
Matryca DNA	2,0

III.1.2.5 Odczynniki i drobny sprzęt do prowadzenia hodowli linii komórkowych

Podłoże hodowlane Dulbecco (DMEM)	IITD PAN, Wrocław, Polska
Podłoże hodowlane RPMI-1640	IITD PAN, Wrocław, Polska
Surowica bydlęca płodowa	Sigma, Poznań, Polska
Bufor fosforanowy PBS (bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+})	IITD PAN, Wrocław, Polska
Roztwór antybiotyków penicylina-streptomycyna	Sigma, Poznań, Polska
Trypsyna (roztwór 0,25%)	Sigma, Poznań, Polska
Błękit trypanu	Sigma, Poznań, Polska
Płytki 24-dółkowa	TPP, Trasadingen, Szwajcaria
Butelki hodowlane 25 ml	POLGEN, Łódź, Polska
Szkiełka nakrywkowe o średnicy 12 mm	GREENPOL, Zielona Góra, Polska
Szkiełka podstawowe	GREENPOL, Zielona Góra, Polska
Komora Buerkera	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Niemcy
Formaldehyd	POCH, Gliwice, Polska

III.1.2.6. Pozostałe odczynniki

Zestaw lateksowy do oznaczania serotypów GBS (Group B Streptococcus GBS Serotyping Test)	Essum AB, Umea, Szwecja
Lateksowy test aglutynacyjny do identyfikacji paciorkowców grupy B (Slidex Strepto Plus B)	bioMerieux, Warszawa, Polska
Test API 50 CHL	bioMerieux, Warszawa, Polska
Test API Strep	bioMerieux, Warszawa, Polska
Odczynnik VP1	bioMerieux, Warszawa, Polska
Odczynnik VP2	bioMerieux, Warszawa, Polska
Odczynnik ZYM A	bioMerieux, Warszawa, Polska
Odczynnik ZYM B	bioMerieux, Warszawa, Polska
Odczynnik NIN	bioMerieux, Warszawa, Polska
Skala McFarlanda	bioMerieux, Warszawa, Polska
Bromek etydyny	BioRad, Warszawa, Polska

Agaroza PLUS	Prona, Gdańsk, Polska
Bufor TRIS Borate-EDTA (TBE)	Sigma, Poznań, Polska
Marker DNA Perfect™ 100 bp DNA	EURx, Gdańsk, Polska
Bufor obciążający (błękit bromofenolowy 0,25g/ml, glicerol 20%)	Sigma, Poznań, Polska
Nizyna	Sigma-Aldrich, Poznań, Polska
Odczynniki do metody Grama:	
Fiolet krystaliczny fenolowy	ANALAB, Warszawa, Polska
Płyn Lugola	ANALAB, Warszawa, Polska
Odbarwiacz	ANALAB, Warszawa, Polska
Fuksyna karbolowa	ANALAB, Warszawa, Polska

III.1.3. Bakterie

III.1.3.1 Szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz izolaty *Streptococcus agalactiae* pochodzenia ludzkiego

Szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* izolowane z pochwy i izolaty *S. agalactiae* pochodziły z kolekcji własnej Pracowni Ekologii Drobnoustrojów Zakładu Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii Katedry Mikrobiologii UJCM. Izolaty zgromadzono w ramach projektów finansowanych z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 3 PO5E 084 25, nr 2 PO5E 004 30 i nr NN 401 042337 oraz badań statutowych nr K/ZDS/000648, które realizowano za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum nr KBET/267/B/2002 oraz nr KBET/143/B/2007 .

Wybór izolatów *Streptococcus agalactiae* (n=99) został dokonany według następujących kryteriów:

1. Szczepy GBS izolowane z wymazów z pochwy kobiet niebędących w ciąży:
 - a) pochodzące od kobiet z klinicznymi objawami stanu zapalnego pochwy określonymi w oparciu o kryteria Amsela oraz skalę Nugenta (Thomas i wsp., 2005 r.; Nugent i wsp., 1991r.) - grupa IA (badana)
 - b) izolowane od kobiet zdrowych - grupa IB (kontrolna)

2. Szczepy GBS izolowane z wymazów z pochwy lub odbytu od kobiet ciężarnych

a) pochodzące od kobiet z ciążą wysokiego ryzyka - grupa IIA (badana),

b) uzyskane od kobiet z prawidłowym przebiegiem ciąży - grupa IIB (kontrolna).

3. Szczepy GBS izolowane od noworodków:

a) izolaty pochodzące od noworodków urodzonych przez matki z ciążą patologiczną, przyjętych na oddział neonatologiczny z różnych wskazań; szczepy zostały wyizolowane z jamy ustnej, ucha zewnętrznego lub krwi noworodków - grupa IIIA (badana)

b) izolaty GBS pochodzące z kolonizacji wyizolowane z jamy ustnej lub ucha zewnętrznego noworodków urodzonych przez matki z prawidłowym przebiegiem ciąży - grupa IIIB (kontrolna).

Szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* izolowane z pochwy (n=10) należały do następujących gatunków:

- *L. plantarum* (n=3),
- *L. fermentum* (n=2),
- *L. gasseri* (n=2),
- *L. rhamnosus* (n=3)

III.1.3.2 Szczepy wzorcowe

Streptococcus agalactiae DSMZ 2134

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen
und Zellkulturen GmbH (DSMZ),
Braunschweig, Niemcy

Szczep *S. agalactiae* DSMZ 2134 γ -hemolizujący, należy do serotypu II. W teście CAMP szczep ten daje wynik pozytywny. Szczep posiada gen *rib*, kodujący białko Rib z rodziny alfa-podobnych.

Streptococcus agalactiae ATCC 12403

American Type Culture Collection
(ATCC), Manassas, Stany Zjednoczone

Szczep *S. agalactiae* ATCC 12403 należący do serotypu III został wyizolowany z przypadku posocznicy. Szczep posiada gen *alp2*, kodujący białko Alp2 z rodziny alfa-podobnych.

Streptococcus agalactiae BAA-611 American Type Culture Collection (ATCC),
Manassas, Stany Zjednoczone

Szczep *S. agalactiae* BAA-611 należący do serotypu V, wyizolowany z materiału klinicznego pochodzenia ludzkiego. Szczep posiada gen *rib*, kodujący białko Rib z rodziny alfa-podobnych.

Lactobacillus rhamnosus GG ATCC 53103 American Type Culture Collection
(ATCC), Manassas, Stany Zjednoczone

L. rhamnosus GG ATCC 53103 wyizolowano z kału ludzkiego. Szczep ten produkuje związki o właściwościach antybakteryjnych.

Lactobacillus plantarum C 11 Department of Chemistry, Biotechnology
and Food Science, Norwegian University
of Life Sciences, As, Norwegia

Szczep *L. plantarum* C 11 uzyskano z kolekcji Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, As, Norwegia, dzięki uprzejmości Pana Prof. Bao Dzung Diep. *L. plantarum* C 11 został wyizolowany z kiszonych ogórków. Szczep *L. plantarum* C 11 wydziela plantarycynę A, która pełni funkcję aktywatora produkcji przez ten szczep substancji o udowodnionych właściwościach antybakteryjnych plantarycyny JK i plantarycyny EF.

Lactobacillus sakei DSMZ 6333 Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen
und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
Braunschweig, Niemcy

L. sakei DSMZ 6333 został wyizolowany z wieprzowiny próżniowo pakowanej. *L. sakei* DSMZ 6333 wytwarza sakacynę A.

Lactococcus lactis ATCC 11454 American Type Culture Collection

(ATCC), Manassas, Stany Zjednoczone

L. lactis ATCC 11454 produkujący nizinę został wyizolowany z mięsa.

Staphylococcus aureus ATCC 25923

American Type Culture Collection

(ATCC), Manassas, Stany Zjednoczone

Szczep *S. aureus* ATCC 25923 został wyizolowany z materiału klinicznego. Jest używany m. in. do wykonania testu CAMP, wykorzystywanego do identyfikacji *S. agalactiae*.

III.1.4 Linie komórkowe

Linia komórkowa raka nabłonkowego

Deutsche Sammlung von

Mikroorganismen

pochwy A 431 (DSMZ nr ACC 91)

und Zellkulturen GmbH (DSMZ)

Braunschweig, Niemcy

Komórki linii A 431 zostały pozyskane z guza nowotworowego nabłonka pochwy 85-letniej kobiety.

Linia komórkowa gruczolakoraka

Deutsche Sammlung von

Mikroorganismen

okreźnicy HT-29 (DSMZ nr ACC 299)

und Zellkulturen GmbH (DSMZ)

Braunschweig, Niemcy

Komórki linii HT-29 zostały pozyskane z guza pierwotnego gruczolakoraka określonej 44-letniej kobiety rasy kaukaskiej w 1964 roku.

III.2 Metody

III.2.1 Izolaty *Streptococcus agalactiae*

III.2.1.1 Diagnostyka materiałów klinicznych w kierunku *S. agalactiae* wraz z obowiązującymi zaleceniami CDC

Wymazówki z pobranym materiałem klinicznym umieszczano w podłożu transportowym Amies (namnażająco-różnicujące) i w jak najkrótszym czasie dostarczano do laboratorium.

Wymazówki przenoszono z podłoża transportowego do podłoża bulionowego Todd Hewitta z dodatkiem gentamycyny (8 µg/ml) i kwasu nalidyksowego (15 µg/ml). Wysiane podłoża inkubowano od 18 godz. do 24 godz., w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych (Cieplarka WS 140) lub w atmosferze wzbogaconej o 5% CO₂ (Cieplarka CLN ECO). Po czasie inkubacji 10 µl hodowli bakteryjnej przenoszono na podłoże stałe wzbogacone (podłoże Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej) i rozsiewano metodą redukcyjną. Tak przygotowane płytki inkubowano w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych lub w atmosferze wzbogaconej o 5% CO₂ od 18 godz. do 24 godz.

Po tym czasie na płytkach poszukiwano kolonii bakterii o morfologii charakterystycznej dla paciorkowców grupy B otoczonych wąską strefą β-hemolizy. Biorąc pod uwagę możliwy wzrost na podłożu kolonii paciorkowców pozbawionych hemolizy, inkubację płytek kontynuowano przez kolejne 24 godz.

W poszukiwaniu ziarenkowców Gram-dodatnich z wybranych kolonii bakterii wykonywano preparaty barwiony metodą Grama, a następnie posiewy różnicujące paciorkowce grupy B od enterokoków. W tym celu bakterie wysiewano na podłoża według Islama (GBS Agar Base, Islam) z dodatkiem inaktywowanej surowicy końskiej oraz na podłoże z żółcią, eskuliną i azydkiem sodu (Bile Aesculin Agar). Płytki z podłożem według Islama inkubowano się przez 18-24 godz. w temperaturze 37°C w warunkach beztlenowych, natomiast płytki z żółcią, eskuliną i azydkiem sodu inkubowano 18-24 godz. w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych. Kolonie bakterii podejrzane o przynależność do gatunku *S. agalactiae* wzrastały w postaci zabarwionych na pomarańczowo kolonii na podłożu wg. Islama oraz nie wytwarzały zabarwienia lub nie wykazywały wzrostu na podłożu z żółcią i eskuliną i azydkiem sodu. Dodatkowo w wątpliwych przypadkach wykonano test

CAMP, polegający na prostopadłym wysianiu względem badanego szczepu paciorkowca szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na wzbogaconym podłożu z dodatkiem krwi baraniej. Jeśli po czasie 18-24 godzinnej inkubacji płytek w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych stwierdzano na płytkach obecność trójkątnej strefy β -hemolizy, wstępnie szczep identyfikowano jako *S. agalactiae*. Jednocześnie przygotowano hodowlę wtórną analizowanego szczepu poprzez przesianie go na podłoże Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej. Płytkę z podłożem inkubowano 18-24 godz. w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych.

Przynależność zidentyfikowanego szczepu do gatunku *S. agalactiae* potwierdzano poprzez wykonanie lateksowego testu aglutynacyjnego do oznaczenia grup serologicznych paciorkowców grupy B (Slidex Strepto Plus B). W tym celu zawieszono od 3 do 5 kolonii *S. agalactiae* w 0,4 ml enzymu ekstrakcyjnego. Zawiesinę inkubowano 10 min. w temperaturze 37 °C. 0,15 μ l uzyskanego ekstraktu nakropiono obok umieszczonej uprzednio na odpowiednie pole jednorazowej płytki kropli lateksu. Krople ekstraktu i lateksu zmieszano za pomocą pałeczki, a następnie rozprowadzono po całej powierzchni pola reakcyjnego. Po około dwóch minutach delikatnego wytrząsania mieszaniny odczytano wynik. O wyniku dodatnim, a tym samym przynależności badanego szczepu bakterii do paciorkowców grupy B świadczyła dobrze widoczna, powstała w czasie krótszym niż 2 min. aglutynacja w postaci agregatów cząsteczek lateksu. Brak aglutynacji odczytano jako wynik ujemny. Dodatkowo dla każdej serii testu Slidex Strepto Plus B oznaczono aktywność odczynników lateksowych oraz specyficzność testu aglutynacji. W obu przypadkach postępowano podobnie jak przy oznaczaniu przynależności szczepów bakterii do grupy serologicznej B, z tym że w pierwszym przypadku zamiast ekstraktu bakterii użyto kontrolę dodatnią, a w drugim roztwór chlorku sodu o stężeniu 0,15 mol/l i pH=7. Za wynik prawidłowy oznaczenia aktywności lateksów uznawano aglutynację pomiędzy kontrolą dodatnią a odczynnikiem lateksowym w czasie krótszym niż 2 min., natomiast za wynik właściwy oznaczenia specyficzności testu uznawano brak aglutynacji w mieszaninie chlorku sodu i lateksu.

W wątpliwych przypadkach wykonano dla wyizolowanego szczepu dostępny komercyjnie test biochemiczny identyfikujący paciorkowce (test API Strep). W celu wykonania testu przygotowywano pasek testowy API 20 Strep zawierający odwodnione substraty (pasek testowy zawiera kolejno testy VP, HIP, ESC, PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP, ADH, RIB, ARA, MAN, SOR, LAC, TRE, INU, RAF, AMD, GLYG) oraz komorę inkubacyjną, którą napełniano 5 ml wody destylowanej. Za pomocą wymazówki

zbierano kolonie bakteryjne z hodowli wtórnej, a następnie przenoszono je do ampułki API (API Suspension Medium) w celu wykonania zawiesiny bakteryjnej o gęstości 4 w skali McFarlanda. Przygotowaną zawiesiną napełniano mikroprobówki testów od VP do ADH. Pozostałą część zawiesiny bakterii przenoszono do ampułki API (API GP Medium) i tak uzyskaną zawiesiną napełniano mikroprobówki testów od RIB do GLYG. Napełnienie mikroprobówek zawiesiną bakterii powodowało rozpuszczenie substratów. Następnie wgłębienia mikroprobówek testowych od ADH do GLYG napełniano olejem mineralnym, tak aby utworzył się menisk wypukły. Pasek testowy umieszczano w komorze inkubacyjnej i inkubowano przez 4 godz. Po okresie inkubacji do mikroprobówki VP dodano po kropli odczynników VP1 i VP2, do mikroprobówki HIP dwie krople odczynnika NIN, a do mikroprobówek testowych α GAL, β GUR, β GAL, PAL i LAP dodano po kropli odczynników ZYMA oraz ZYMB. Następnie pasek testowy inkubowano przez 10 min. Kolor zawiesiny w mikrostudzienkach po okresie inkubacji stanowił podstawę odczytu reakcji poprzez porównanie z Tabelą Odczytów. Do identyfikacji gatunku bakterii użyto programu API LAB plus.

Przeprowadzano również reakcję PCR z użyciem gatunkowo specyficznych starterów Sag59 i Sag190 (skład mieszaniny reakcyjnej został opisany w punkcie III.1.2.4.1.1). DNA szczepów bakterii izolowano za pomocą zestawu do izolacji DNA Genomic mini DNA.

Reakcja PCR przebiegała według programu (Termocykler DNA Engine):

1. 94°C- 3 min
 2. 95°C- 1s
 3. 55°C- 30s
 4. 72°C- 2 min
 5. 72°C- 5 min
- } 40x

Wynikiem pozytywnym badania molekularnego, potwierdzającym wynik podstawowej diagnostyki mikrobiologicznej, była obecność na żelu agarozowym prążka o masie 153 pz. Kontrola ujemna (jałowa woda) wykazywała bark prążka. Kontrolę dodatnią stanowiło DNA wyizolowane ze szczepu wzorcowego *S. agalactiae* DSMZ 2134.

Wyizolowane szczepy *S. agalactiae* przechowywano w podłożu Nutrient Broth z dodatkiem glicerolu (15%) w temperaturze -70 °C (Zamrażarka niskotemperaturowa -85 °C Ultra Low Temperature Freezer).

III.2.1.2 Badanie oporności izolatów *S. agalactiae* na antybiotyki z uwzględnieniem mechanizmu MLSB oraz fenotypu M

Ocena mechanizmu oporności MLSB oraz fenotypu M izolatów GBS została wykonana metodą dyfuzyjno-krażkową. Z 24-godzinnej hodowli GBS na podłożu Columbia z krwią baranią 5% została zebrana i zawieszona w roztworze jałowej soli fizjologicznej jedna kolonia bakteryjna w celu otrzymania gęstości 0,5 w skali McFarlanda (uzyskaną zawiesinę bakterii porównano z zawiesiną wzorcową o gęstości 0,5 w skali McFarlanda). Sporządzoną zawiesinę bakterii wysiewano na podłoże Mueller-Hintona z krwią baranią (5%). Następnie na płytkę nakładano za pomocą jałowej pęsety krążki antybiotykowe: erytromycynę (krążek 15µg) i klindamycynę (krążek 2 µg) w odległości 1, 5 cm od krawędzi krążków. Płytki inkubowano od 18 do 24 godz. w temperaturze 37°C, w warunkach tlenowych. Strefy zahamowania wzrostu mierzono (w mm), a wyniki interpretowano zgodnie z wytycznymi National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) dotyczącymi szczepów *Streptococcus* innych niż *S. pneumoniae*.

III.2.1.2.1 Interpretacja uzyskanych wyników oznaczenia lekooporności

Mechanizm oporności typu konstytutywnego (kMLSB) stwierdzano wtedy, gdy badany szczep wykazywał oporność lub średnią wrażliwość na klindamycynę (2 µg), przy czym średnica strefy zahamowania wzrostu wynosiła ≤ 19 mm oraz oporność lub średnią wrażliwość na erytromycynę (15µg), gdy średnica zahamowania wzrostu wynosiła ≤ 21 mm. W przypadku gdy badany szczep *S. agalactiae* wykazywał oporność lub średnią wrażliwość na erytromycynę, wrażliwość na klindamycynę oraz dodatkowo wokół krążka z klindamycyną obserwowano charakterystyczną, ściętą strefę zahamowania wzrostu, stwierdzono obecność mechanizmu indukcyjnego MLSB (iMLSB).

W sytuacji, gdy obserwowano oporność czy też średnią wrażliwość tylko na erytromycynę lub tylko na klindamycynę, przy zachowaniu pełnej wrażliwości na drugi z antybiotyków, stwierdzano fenotyp M (Heczko i wsp., 2008 r.).

III.2.2 Szczepy *Streptococcus agalactiae* izolowane z dróg rodnych kobiet oraz od noworodków

III.2.2.1 Szczepy *Streptococcus agalactiae* izolowane od kobiet niebędących w ciąży

Wymazy z tylnego sklepienia pochwy w celu izolacji GBS pobierano od kobiet niebędących w ciąży. W czasie badania wykonywano pomiar pH pochwy oraz dodatkowy wymaz z pochwy w celu wykonania preparatu barwionego metodą Grama. Hodowla i identyfikacja GBS została wykonana zgodnie z zaleceniami Centers for Disease Control and Prevention (CDC) opisanymi w punkcie III.2.1.1.

Zgromadzone na potrzeby pracy doktorskiej izolaty GBS (n=40) pochodzące od kobiet niebędących w ciąży podzielono na dwie grupy uwzględniając obecność lub brak objawów klinicznych zapalenia pochwy, wyniki rutynowego badania ginekologicznego oraz wyniki diagnostyki mikrobiologicznej:

- **grupa IA** - szczepy GBS pochodzące od kobiet z klinicznymi objawami stanu zapalnego pochwy (n=20) określonymi w oparciu o kryteria Amsela oraz skalę Nugenta. U pacjentek stwierdzono obecność *S. agalactiae* w liczbie wyższej niż 1×10^5 cfu/ml, a w niektórych przypadkach również obecność innych bakterii lub grzybów drożdżopodobnych w liczbie mniejszej niż 1×10^5 cfu/ml. Liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wynosiła mniej niż 1×10^7 cfu/ml lub nie odnotowano wzrostu tych bakterii podczas diagnostyki mikrobiologicznej,

- **grupa IB** - szczepy GBS izolowane od kobiet zdrowych (n=20), u których nie stwierdzono objawów klinicznych zakażenia pochwy na podstawie kryteriów Amsela oraz skali Nugenta, a liczba GBS wynosiła mniej niż 1×10^5 cfu/ml. W przypadku stwierdzenia flory mieszanej pochwy liczba innych bakterii lub grzybów drożdżopodobnych wynosiła również mniej niż 1×10^5 cfu/ml. Liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wynosiła powyżej 1×10^7 cfu/ml.

III.2.2.2 Szczepy *Streptococcus agalactiae* izolowane od kobiet ciężarnych

Wymazy z pochwy lub odbytu od kobiet ciężarnych w celu określenia nosicielstwa GBS były pobierane pomiędzy 35, a 37 tygodniem ciąży, a następnie poddane diagnostyce mikrobiologicznej zgodnie z zaleceniami CDC (punkt III.2.1.1). Szczepy GBS pochodzące od kobiet ciężarnych podzielono na dwie grupy:

- **grupa IIA** - szczepy GBS izolowane z pochwy i/lub odbytu kobiet z tzw. ciążą wysokiego ryzyka (n=14). U kobiet tych notowano we wcześniejszych ciążach epizody poronienia lub porody przedwczesne, lub w czasie ciąży niejednokrotnie dochodziło u nich do ogólnych infekcji, co wiązało się z koniecznością zastosowania antybiotykoterapii. W przypadkach, gdy podawano ciężarnym antybiotyki, leczenie zostało zakończone na miesiąc przed planowanym porodem,
- **grupa IIB**- izolaty uzyskane od kobiet ciężarnych (n=15) z prawidłowym przebiegiem ciąży, u których stwierdzono nosicielstwo GBS w pochwie i/lub odbycie. Kobiety te nie stosowały antybiotyków w czasie ciąży.

III.2.2.3 Izolaty GBS pochodzenia noworodkowego

Szczepy *S. agalactiae* izolowane od noworodków urodzonych przez matki, u których stwierdzono nosicielstwo GBS w badaniu przesiewowym zalecanym przez CDC, zostały podzielone na dwie grupy:

- **grupa IIIA** – szczepy GBS izolowane od noworodków (n=16) urodzonych przez matki z ciążą zagrożoną. Od dzieci przyjętych na oddział neonatologiczny z różnych wskazań pobierano wymaz z jamy ustnej lub ucha. Diagnostyka mikrobiologiczna materiałów klinicznych uzyskanych od noworodków przebiegła zgodnie z zaleceniami CDC (procedura opisana w punkcie III.2.1.1). Dwa szczepy GBS wyizolowane z krwi noworodków z objawami zakażenia otrzymano z Zakładu Bakteriologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie,
- **grupa IIIB** – izolaty GBS pochodzące od noworodków skolonizowanych (n=14), u których nie zanotowano objawów zakażenia. Miejscem izolacji szczepów GBS od dzieci było ucho zewnętrzne i jama ustna. Diagnostyka mikrobiologiczna materiałów klinicznych uzyskanych od noworodków przebiegła zgodnie z zaleceniami CDC opisanymi w punkcie III.2.1.1.

III.2.3 Oznaczenie serotypów szczepów *S. agalactiae*

III.2.3.1 Oznaczenie serotypów GBS metodą serologiczną

Serotypy izolatów *Streptococcus agalactiae* zostały oznaczone za pomocą testu lateksowego Group B Streptococcus GBS Serotyping Test. Zasada testu została oparta

na reakcji aglutynacji. Cząstki lateksu zostały opłaszczane króliczymi przeciwciałami klasy IgG, specyficznymi dla poszczególnych polisacharydów powierzchniowych: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII.

Każdy ze 99 skolekcjonowanych izolatów GBS został przeanalizowany za pomocą dwóch zestawów odczynników, pierwszego, zawierającego odczynnik do oznaczenia serotypów od Ia, Ib, II do V oraz drugiego zestawu służącego do oznaczenia serotypów od VI do VIII.

Kilka kolonii szczepu GBS zbierano za pomocą jałowej ezy i mieszano z kroplą odczynnika o objętości ok. 40 μ l. Jeśli po czasie ok. 1 min. mieszanina pozostawała homogenna, nie stwierdzano przynależności badanego szczepu do serotypu odpowiadającemu użytym odczynnikiem. Obecność strąków powstałych w wyniku reakcji przeciwciał opłaszczających cząsteczki lateksu z polisacharydami bakteryjnymi interpretowano jako przynależność do określonego serotypu. Kontrolę dodatnią testu stanowił antygen kontrolny (serotyp III). Kroplę zawiesiny antygeny kontrolnego oraz kroplę odczynnika testowego serotypu III nanoszono na pole płytki i mieszano. O prawidłowym wykonaniu testu świadczyła obecność strąków w mieszaninie odczynnika kontrolnego i testowego po czasie ok. 1 min.

III.2.3.2 Oznaczenie serotypów GBS metodą molekularną

Detekcja genów polisacharydów powierzchniowych została wykonana zgodnie ze zmodyfikowaną procedurą Poyart i wsp. (2007) oraz Brzychczy-Włoch i wsp. (2009). Chromosomalne DNA izolowano przy użyciu kolumnkowego zestawu Genomic Mini. Próbę negatywną stanowiła jałowa woda, a kontrolę pozytywną mieszanina DNA szczepów wzorcowych GBS. W reakcji multipleks PCR zostały użyte dwie mieszaniny primerów – pierwsza zawierająca pary starterów Ia-F, Ia-R, Ib-F, Ib-R, II-F, II-R, III-F, III-R, IV-F, IV-R (mix I), oraz druga złożona z par starterów V-F, V-R, VI-F, VI-R, VII-F, VII-R, VIII-F, VIII-R (mix II) (Tabela 3).

Tabela 3. Startery specyficzne dla poszczególnych polisacharydów powierzchniowych GBS oraz wielkość produktów reakcji multipleks PCR (pz) (Poyart i wsp., 2007)

Nazwa starteru	Sekwencja (5' i 3')	Gen	Wielkość produktu (pz)
Ia-F Ia-R	GGTCAGACTGGATTAATGGTATGC GTAGAAATAGCCTATATACGTTGAATGC	<i>cps1aH</i> <i>cps1aH</i>	521 oraz 1826
Ib-F Ib-R	TAAACGAGAATGGAATATCACAAACC GAATTAACCTCAATCCCTAAACAATATCG	<i>cps1bJ</i> <i>cps1bK</i>	770
II-F II-R	GCTTCAGTAAGTATTGTAAGACGATAG TTCTCTAGGAAATCAAATAATTCTATAGGG	<i>cps2K</i> <i>cps2K</i>	397
III-F III-R	TCCGTACTACAACAGACTCATCC AGTAACCGTCCATACATTCTATAAGC	<i>cps1a/2/3I</i> <i>cps1a/2/3J</i>	1826
IV-F IV-R	GGTGGTAATCCTAAGAGTGAAGTGT CCTCCCAATTCGTCCATAATGGT	<i>cps4N</i> <i>cps4N</i>	578
V-F V-R	GAGGCCAATCAGTTGCACGTAA AACCTTCTCCTTCACACTAATCCT	<i>cps5O</i> <i>cps5O</i>	701
VI-F VI-R	GGACTTGAGATGGCAGAAGGTGAA CGTTCGGACTATCCTGATGAATCTC	<i>cps6I</i> <i>cps6I</i>	487
VII-F VII-R	CCTGGAGAGAACAATGTCCAGAT GCTGGTCGTGATTTCTACACA	<i>cps7M</i> <i>cps7M</i>	371
VIII-F VIII-R	AGGTCAACCACTATATAGCGA TCTTCAAATTCGCTGACTT	<i>cps8J</i> <i>cps8J</i>	287

Próbki (skład mieszaniny pojedynczej próby opisano w punkcie III.1.2.4.1.2) poddawano amplifikacji w termocyklerze (Termocykler DNA Engine), zgodnie z następującym programem:

1. 95°C - 5 min
 2. 95°C - 60 sek
 3. 0,5°C/s do 60°C
 4. 60°C - 60 sek
 5. 72°C - 3 min
 6. 72°C - 5 min
- } 50x

Otrzymane produkty amplifikacji analizowano w 1,5% żelu agarozowym (PLUS agaroz, bufor TRIS Borate-EDTA) w obecności bromku etydyny (zestaw do elektroforezy PowerPac Basic). Uzyskany obraz poddano obróbce przy pomocy programu QuantityOne oraz aparatu GelDoc 2000.

III.2.4 Detekcja genów kodujących białka powierzchniowe GBS

Metodę multipleks PCR w oparciu o metodę Creti i wsp. (2004) użyto do detekcji genów *bca*, *epsilon*, *rib*, *alp2*, *alp3* oraz *alp4* kodujących antygenowe białka powierzchniowe, odpowiednio białko Alpha-C, Epsilon, Rib, Alp2, Alp3, Alp4. Chromosomalne DNA izolowano przy użyciu kolumnkowego zestawu Genomic Mini. W reakcji użyto startery odwrotne Alpha-C, Epsilon, Rib, Alp2/3, Alp4 dla określonych genów i jeden wspólny dla nich starter wiodący Universal. Próbę negatywną stanowiła jałowa woda, a kontrolę pozytywną mieszanina DNA szczepów wzorcowych GBS. Dla rozróżnienia genów *alp2* i *alp3* przeprowadzono dodatkową reakcję PCR z zastosowaniem odwrotnego starteru dla genu *alp3* (oraz starteru wiodącego Universal (Tabela 4).

Tabela 4. Startery specyficzne dla poszczególnych białek powierzchniowych GBS z klasy Alp oraz wielkość produktów reakcji multipleks PCR (pz).

Nazwa stearteru	Sekwencja (5' i 3')	Gen	Wielkość produktu (pz)
Universal forward	TGATACTTCACAGACGAAACAACG		
Alpha-C reverse	TACATGTGGTAGTCCATCTTCACC	<i>bca</i>	398
Rib reverse	CATACTGAGCTTTTAAATCAGGTGA	<i>rib</i>	295
Epsilon/Alp1 reverse	CCAGATACATTTTTTACTAAAGCGG	<i>epsilon</i>	200
Alp2/3 reverse	CACTCGGATTACTATAATATTTAGCAC	<i>alp2/3</i>	334
Alp4 reverse	TTAATTTGCACCGGATTAACACCAC	<i>alp4</i>	110
Alp3 reverse	TTTTGGTTCGTTGCTATCCTTAAGC	<i>alp3</i>	1243

Próbki (skład pojedynczych mieszanin reakcyjnych został opisany w punkcie III.1.2.4.1.3) poddawano amplifikacji w termocyklerze (Termocykler DNA Engine) zgodnie z następującym programem:

- | | | |
|-------------------------------|---|-----|
| 1. 96 ^o C - 3 min | } | 30x |
| 2. 95 ^o C - 60 sek | | |
| 3. 58 ^o C- 45sek | | |
| 4. 72 ^o C - 45 sek | | |
| 5. 72 ^o C - 10 min | | |

Otrzymane produkty amplifikacji analizowano w 2,0% żelu agarozowym (PLUS agarosa, bufor TRIS Borate-EDTA) w obecności bromku etydyny (zestaw do elektroforezy PowerPac Basic).

III.2.5 Izolacja bakterii z rodzaju *Lactobacillus* z pochwy

Wymazy z tylnego sklepienia pochwy w celu izolacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus* były pobierane od kobiet w wieku rozrodczym. Pacjentki nie zgłaszały klinicznych objawów zakażenia pochwy, pH pochwy wynosiło < 4,5, a ocena mikroskopowa wymazu z pochwy barwionego metodą Grama w oparciu o kryteria Nugenta wynosiła 1-3 punktów. W celu wyhodowania i izolacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus* zostało użyte podłoże Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej oraz podłoże MRS. Przynależność gatunkowa poszczególnych szczepów *Lactobacillus* została określona za pomocą testów API 50 CHL (Strus i wsp., 2006). W przypadku trudności w ocenie fenotypowej szczepów, została wykonana reakcja PCR z użyciem specyficznych gatunkowo starterów (Walter i wsp., 2000). Szczepy *Lactobacillus* składowano w temperaturze -70 °C (Zamrażarka niskotemperaturowa -85°C ULTRA FREEZER) po wcześniejszym umieszczeniu bakterii w płynnym podłożu Schaedler Broth z glicerolem (10%).

III.2.6 Postępowanie ze szczepami wzorcowymi bakterii kwasu mlekowego

Dostępne komercyjnie szczepy wzorcowe bakterii kwasu mlekowego w postaci liofilizatu zostały przeniesione do płynnego podłoża MRS zgodnie z załączoną instrukcją. Ożywione szczepy pasażowano kilkakrotnie na podłożu stałym MRS, a następnie umieszczano je w płynnym podłożu Schaedler Broth z glicerolem (10%) i składowano w temperaturze -70°C (Zamrażarka niskotemperaturowa -85°C Ultralow Freezer).

III.2.7 Ocena antagonizmu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wobec wybranych szczepów *S. agalactiae* metodą hodowli w zawiesinie

III.2.7.1 Przygotowanie hodowli GBS

Do eksperymentu zostało wybranych 26 izolatów GBS reprezentujących najczęściej izolowane serotypy Ia (n=8), Ib (n=3), II (n=4), III (n=9), V (n=2). Jako szczep kontrolny wybrano szczep wzorcowy *S. agalactiae* DSMZ 2134.

Bakterie GBS wysiewano i pasażowano na podłożu Columbia Blood Agar Broth z dodatkiem krwi baraniej (5%). Jedno oczko ezy o objętości 1 µl hodowli bakterii GBS na podłożu stałym przenoszono do 5 ml płynnego podłoża TSB. Tak przygotowaną hodowlę bakterii GBS inkubowano w warunkach tlenowych przez 24 godz. w temperaturze 37 °C (Ciepłarka WS 140) do uzyskania gęstość hodowli GBS rzędu ok. 1×10^6 cfu/ml (OD przy długości fali 600 nm w zakresie 0,3-0,4).

III.2.7.2 Przygotowanie hodowli LAB

Bakterie kwasu mlekowego namnażano i pasażowano na podłożu stałym MRS i inkubowano przez 24 godz. w temperaturze 37°C w warunkach beztlenowych (Komora do hodowli organizmów beztlenowych). Następnie bakterie (w ilości oczka ezy o objętości 1 µl) wysiewano do 5 ml płynnego podłoża MRS. Bakterie inkubowano w warunkach beztlenowych przez 24 godz. w określonych dla danego szczepu temperaturach (Tabela 5) (Buchman i wsp., 1988, Aasen i wsp., 2000). W celu przygotowania hodowli *L. plantarum* C 11 wytwarzającego plantarycyny, początkowo bakterie były inkubowane

przez 8 godz., a następnie do hodowli dodawano plantarycynę A (PlnA), substancję, która indukuje produkcję plantarycyny JK i plantarycyny EF przez ten szczep. Końcowe stężenie plantarycyny A w hodowli *L. plantarum* C 11 wynosiło 1μl/ml. Hodowlę szczepu prowadzono przez kolejne 6 godz., do momentu, kiedy produkcja plantarycyn JK i EF osiągnęła poziom maksymalny (Hauge i wsp., 1998 r.).

Przed rozpoczęciem eksperymentu antagonizmu została zmierzona gęstość optyczna 24 godzinnych płynnych hodowli szczepów LAB. Gęstość optyczna hodowli użytych w eksperymencie przy długości fali 600 nm wynosiła 0,6-0,7.

Tabela 5. Warunki hodowli poszczególnych szczepów bakterii kwasu mlekowego.

Szczepy bakterii	Podłoże hodowlane	Warunki wzrostu		
		Czas (godziny)	Temperatura (°C)	Atmosfera
LAB izolowane z pochwy	MRS	24	37	beztlenowa
<i>L. rhamnosus</i> GG ATCC 53103		24	37	
<i>L. plantarum</i> C 11 + PlnA		8 + 6 po dodaniu PlnA	30	
<i>L. lactis</i> ATCC 11454		24	32	
<i>L. sakei</i> DSMZ 6333		24	20	

III.2.7.3 Przeprowadzenie eksperymentu oceniającego właściwości antybakteryjne LAB wobec GBS

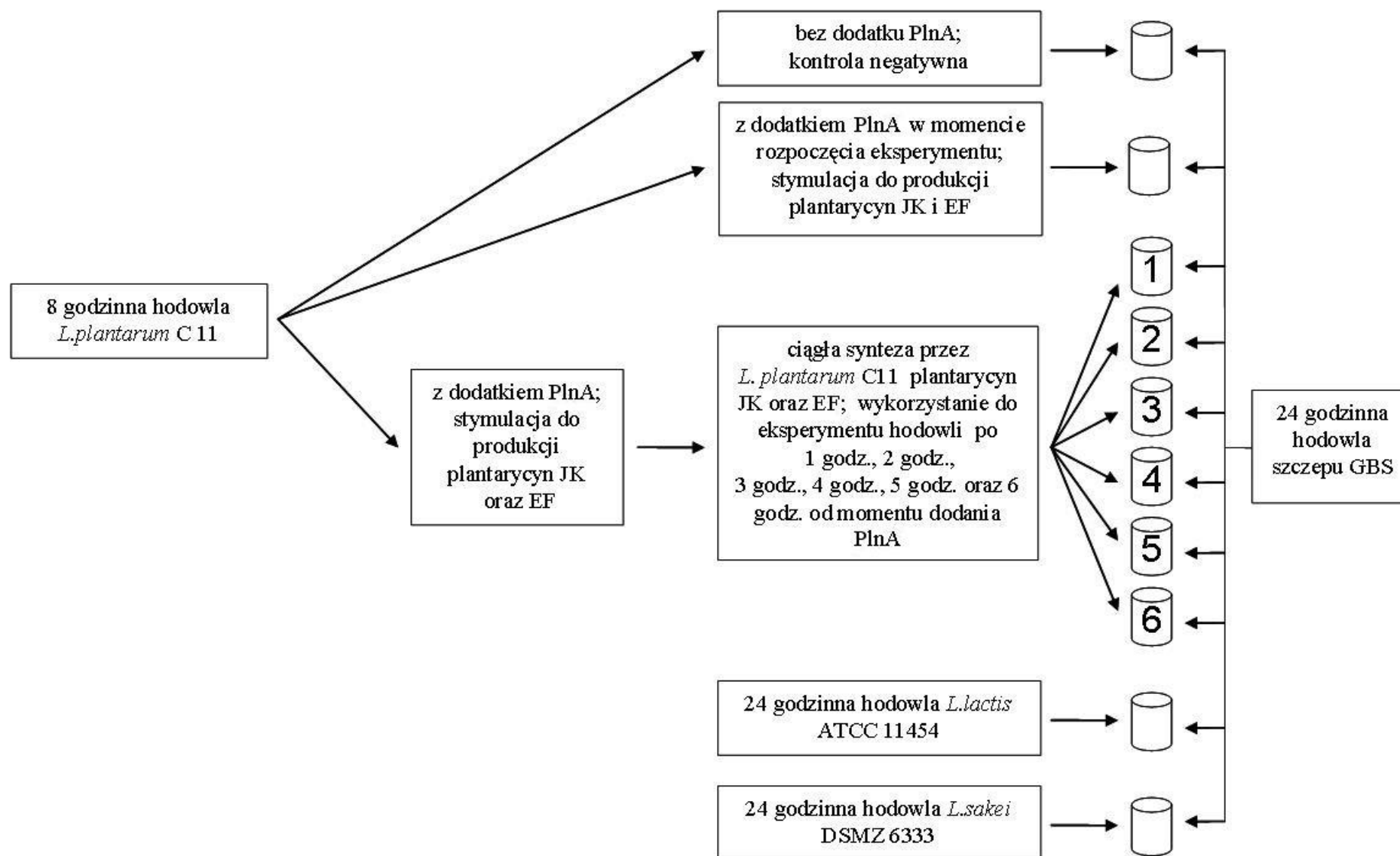
III.2.7.3.1 Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej bakterii z rodzaju *Lactobacillus* pochodzenia pochwowego wobec wybranych szczepów GBS

Badanie antagonizmu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* izolowanych z dróg rodnych kobiet wobec wybranych szczepów *S. agalactiae* przeprowadzono metodą hodowli w zawiesinie. Zawiesiny LAB i GBS łączono w proporcjach 9:1 i inkubowano w 37 °C w warunkach mikroaerofilnych (cieplarka CLN ECO). Próbę kontrolną GBS przygotowywano poprzez zawieszenie w płynnym podłożu MRS hodowli GBS w stosunku 9:1. Jako szczep kontrolny dla LAB został użyty *L. rhamnosus* GG ATCC 53103.

Mieszaniny hodowli LAB-GBS wysiewano na płytki krwawe w rozcieńczeniach (0, -2, -4, -6) w czasie 10 min., 2 godz., 4 godz. i 6 godz. od momentu ich połączenia. Wysiane płytki inkubowano 48 godz. w warunkach mikroaerofilnych w 37 °C. Następnie zliczano wyrosnięte kolonie GBS oraz LAB, których liczba została podana w jednostkach cfu/ml. Przebieg badania antagonizmu *S. agalactiae* wobec bakterii z rodzaju *Lactobacillus* był zgodny z powyższą procedurą, z tym że stosunek objętości zawiesin bakteryjnych GBS do LAB wynosił odpowiednio 9:1.

III.2.7.3.2. Wstępna ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej szczepów wzorcowych LAB wobec GBS

Eksperyment wstępny przeprowadzono w celu wybrania optymalnych punktów czasowych oceny aktywności antybakteryjnej szczepów *L. lactis* ATCC 11454, *L. sakei* DSMZ 6333 i *L. plantarum* C 11 wobec GBS oraz sprawdzenia aktywności antybakteryjnej hodowli *L. plantarum* C 11 wobec GBS po dodaniu plantarycyny A (PlnA). Zastosowane warianty zawiesin szczepów wzorcowych produkujących bakteriocyny przedstawia rycina 3. Zawiesiny hodowli szczepów wzorcowych LAB oraz zawiesiny wybranych kilku szczepów GBS łączono w proporcjach 9:1 i inkubowano w warunkach mikroaerofilnych (cieplarka CLN ECO) w temperaturach odpowiednich dla poszczególnych szczepów wzorcowych LAB (Tabela 5). Mieszaniny hodowli LAB-GBS wysiewano na podłoża Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej w rozcieńczeniach (0, -2, -4, -6) w czasie 10 min., 1 godz., 2 godz., 3 godz., 4 godz., 5 godz., 6 godz. od momentu ich połączenia. Wysiane płytki z podłożami inkubowano 48 godz. w warunkach mikroaerofilnych w 37 °C. Następnie zliczano wyrosnięte kolonie GBS oraz LAB, których liczba została podana w jednostkach cfu/ml.



Ryc. 3. Warianty hodowli szczepów wzorcowych LAB zastosowane we wstępnej ocenie ich właściwości antagonistycznych wobec szczepów GBS.

III.2.7.3.3 Badania właściwe nad aktywnością szczepów wzorcowych LAB produkujących peptydy antybakteryjne wobec GBS

Badanie antagonizmu szczepów wzorcowych LAB produkujących bakteriocyny wobec GBS przebiegało podobnie do procedury zapisanej w podpunkcie III.2.7.3.2 z tą różnicą, że na podstawie wyników wstępnych badań zdecydowano wykonywać rozcieńczenia mieszanin LAB-GBS w pięciu wybranych punktach czasowych: 10 min., 1 godz., 2 godz., 3 godz., 4 godz. od momentu rozpoczęcia eksperymentu oraz do eksperymentu wybrano hodowlę *L. plantarum* C 11 po 6 godzinnej aktywacji plantarycyną A.

III.2.8 Porównanie działania antybakteryjnego chemicznie czystej nizyny oraz szczepu *L. lactis* ATCC 11454 wobec GBS

Sporządzono roztwór nizyny w PBS o stężeniu 100 µg/ml. Roztwór nizyny połączono w takim stosunku objętości z poszczególnymi zawiesinami szczepów GBS, aby uzyskać ostatecznie stężenie nizyny 1µg/ml i 0,5 µg/ml w powstałych mieszaninach. Zawiesinę *L. lactis* ATCC 11454 zmieszano z zawiesiną szczepów GBS w stosunku objętościowym 9:1. Opis przygotowania hodowli GBS oraz *L. lactis* ATCC 11454 do eksperymentu przedstawiono odpowiednio w podpunktach III.2.7.1 oraz III.2.7.2. Mieszaniny inkubowano w 37 °C w warunkach mikroaerofilnych (cieplarka CLN ECO). Mieszaniny hodowli LAB-GBS oraz nizyna-GBS wysiewano na płytki krwawe w rozcieńczeniach (0, -2, -4, -6) w czasie 10 min., 1 godz., 3 godz. i 4 godz. od momentu ich połączenia. Wysiane płytki inkubowano 48 godz. w warunkach mikroaerofilnych w 37 °C. Następnie zliczano wyrosnięte kolonie GBS oraz LAB, których liczba została podana w jednostkach cfu/ml.

III.2.9 Ocena adherencji szczepów *Streptococcus agalactiae* do komórek linii pochwowej A-431 oraz komórek linii raka jelita grubego HT-29

III.2.9.1 Hodowla tkanki HT-29

Hodowlę komórek linii HT-29 prowadzono w podłożu DMEM z dodatkiem 10% inaktywowanej surowicy bydlęcej (30 min, 56°C) oraz antybiotyków (Penicylina-Streptomycyna), w temperaturze 37°C, w atmosferze o zwiększonej wilgotności i 5% stężeniu CO₂ (Inkubator CO₂ HERACELL). W celu wykonania eksperymentu zawiesinę komórek o gęstości 4x10⁴ wysiewano na płytki 24 dołkowe, na których dnie umieszczono wcześniej szkiełka nakrywkowe o średnicy 12 mm. Aby uzyskać hodowlę jednowarstwową komórek, była ona prowadzona na płytkach przez 20 dni, a podłoże hodowlane wymieniano codziennie.

III.2.9.2 Hodowla tkanki A-431

Hodowlę komórek linii A-431 prowadzono w podłożu RPMI 1640 z dodatkiem 10% inaktywowanej surowicy bydlęcej (30 min, 56°C) oraz antybiotyków (Penicylina-Streptomycyna), w temperaturze 37°C, w atmosferze o zwiększonej wilgotności i 5% stężeniu CO₂ (Inkubator CO₂ HERACELL). W celu wykonania eksperymentu zawiesinę komórek o gęstości 5x10⁵ wysiewano do płytek 24 dołkowych z umieszczonym na dnie szkiełkiem nakrywkowym o średnicy 12 mm. Hodowlę komórek na płytkach prowadzono przez 48 godz.

III.2.9.3 Określenie liczby komórek w hodowli tkankowej

W celu sprawdzenia liczby komórek poszczególnych tkanek, które przygotowano do przeprowadzenia eksperymentu, każda tkanka w dwóch dołkach została poddana trawieniu trypsyną przez 10 min. w temperaturze pokojowej. Następnie zawiesinę komórek przenoszono do probówek i wirowano 10 min. przy 3000 rpm. Komórki zawieszano w podłożu hodowlanym. W celu barwienia komórek mieszano zawiesinę z błękitem trypanu w stosunku objętości 1:10, a następnie komórki zliczano w komorze Buerkera. Gęstość tkanek wynosiła 1x10⁶ cfu/ml.

III.2.9.4 Przygotowanie szczepów GBS

Szczepy GBS hodowano w bulionie TSB przez 24 godz. w warunkach tlenowych. 24 godzinna hodowla GBS została zwirowana (10 min., 3000 rpm) przepłukana trzykrotnie PBS i zawieszona w podłożu DMEM lub RPMI 1640, w zależności od wymagań hodowlanych tkanki, z którą przeprowadzano eksperyment. Gęstość uzyskanej zawiesiny bakteryjnej została sprawdzona poprzez pomiar spektrofotometryczny. Gęstość optyczna zawiesiny GBS przy długości fali 600 nm w zakresie 0,6-0,7 wynosiła 1×10^8 cfu/ml.

III.2.9.5 Wykonanie badania adherencji izolatów GBS do linii komórkowych HT-29 i A-431

Po okresie inkubacji do hodowli komórkowych o gęstości 1×10^6 cfu/ml zostały dodane bakterie GBS o gęstości 1×10^8 cfu/ml zawieszona w podłożu hodowlanym DMEM lub RPMI 1640 w objętości 1 ml. Kontrolę dodatnią stanowiły szczepy *S. agalactiae* DSMZ 2134, *S. agalactiae* ATCC 12403, *S. agalactiae* BAA-611, a kontrolę ujemną PBS. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze 37°C, w atmosferze o zwiększonej wilgotności i 5% stężeniu CO₂ (Inkubator CO₂ HERACELL), hodowla z zaadherowanymi komórkami GBS została przemyta PBS, utrwalona formaldehydem oraz barwiona metodą Grama. Następnie szkiełka nakrywkowe po wyjęciu z dołków w płytce, w której przeprowadzano badanie, mocowano na szkiełku podstawowym i oceniano pod mikroskopem optycznym. Adherencja została określona półilościowo, poprzez zliczenie komórek GBS w 20 losowo wybranych polach widzenia. Wynik końcowy był średnią z 20 pól.

III.3 Analiza statystyczna uzyskanych wyników

Dane do analiz przechowywano w bazie danych założonej w programie MS Excel, zaś procedury statystyczne wykonywano przy zastosowaniu pakietu SAS JMP 7.01. Wyjątek stanowiły analizy testem Steela wykonywane w pakiecie „R”.

III.3.1 Metody zastosowane do analizy statystycznej uzyskanych wyników

Metody stosowane do statystycznego opisu oraz analiz zebranego materiału uzależnione były od testowanych hipotez oraz charakteru i rozkładu uzyskanych zmiennych. W przypadku zmiennych o charakterze interwałowym (liczbowym), do opisu materiału wykorzystywano średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe SD (ang. standard deviation). Ponieważ jednak pomiary te w przypadku rozkładów danych istotnie odbiegających od rozkładu normalnego były podatne na artefakty w badanym materiale jako miarę tendencji centralnej wykorzystywano medianę. W przypadku zmiennych o charakterze kategoriowym (nominalnym) posługiwano się częstością występowania danych kategorii w próbie.

Do testowania hipotez stosowano następujące techniki z zakresu statystyki indukcyjnej. Zależności pomiędzy zmiennymi kategoriowymi (np. grupa), a zmiennymi o charakterze liczbowym w przypadku dychotomicznej zmiennej grupującej badano przy pomocy testu t-studenta. Jeżeli zmienna grupująca posiadała więcej wariantów, wykorzystywano analizę wariancji (ANOVA). Ponieważ technika ta nie pozwala określić, które różnice pomiędzy grupami danych odpowiadają za istotność statystyczną całego modelu, uzupełniano ją o analizę post-hoc (a’posteriori). Do tego celu wykorzystywano test Tuckeya–Kramera pozwalający na określenie istotności różnic pomiędzy poszczególnymi kategoriami zmiennych grupujących, a następnie przypisanie ich do homogennych grup. (Sokal, 1995; Ferguson, 2009).

Stosowanie powyższych technik było nieuprawnione jeżeli rozkład zmiennej liczbowej istotnie odbiegał od krzywej Gaussa. W takich wypadkach stosowano nieparametryczne alternatywy opisanych wyżej testów: test Wilcoxon w miejsce testu t-Studenta, test Kruscalla-Wallisa jako alternatywę ANOVA oraz test Steela zamiast testu Tuckeya Krammera (Stevens, 1989).

Badanie zależności pomiędzy zmiennymi o charakterze nominalnym – np. w przypadku antagonizmu – polegało na wykorzystaniu testów badających istotność różnic frakcji w poszczególnych grupach. Jako podstawowe narzędzie statystyczne wykorzystywano w tym przypadku test χ^2 (ang. *chi square*). W sytuacjach kiedy układ danych nie spełniał założeń testu – np. obecności zerowych wartości frekwencji – stosowano jego słabszy, ale mniej wymagający odpowiednik: test G (ang. *likelihood ratio*).

Większość analiz statystycznych prowadzono z wykorzystaniem programu SAS JMP 7.0. Wyjątek stanowił nieparametryczny test Steela, który obliczano przy pomocy programu R-packet 8.01.

IV. WYNIKI

IV.1 Szczegółowa charakterystyka izolatów *Streptococcus agalactiae*

Badania i eksperymenty zostały przeprowadzone na puli 99 szczepów GBS, podzielonych na sześć grup w oparciu o miejsce ich izolacji:

I. Szczepy GBS izolowane z wymazów z pochwy kobiet niebędących w ciąży:

- a) pochodzące od kobiet z klinicznymi objawami stanu zapalnego pochwy określonymi w oparciu o kryteria Amsela oraz skalę Nugenta - grupa IA (badana),
- b) izolowane od kobiet zdrowych - grupa IB (kontrolna).

II. Szczepy GBS izolowane z wymazów z pochwy lub odbytu od kobiet ciężarnych

- a) pochodzące od kobiet z ciążą wysokiego ryzyka - grupa IIA (badana),
- b) uzyskane od kobiet z prawidłowym przebiegiem ciąży - grupa IIB (kontrolna).

III. Szczepy GBS izolowane od noworodków:

- a) izolaty pochodzące od noworodków urodzonych przez matki z ciążą patologiczną, przyjętych na oddział neonatologiczny z różnych wskazań; szczepy GBS zostały wyizolowane z jamy ustnej, ucha zewnętrznego lub krwi noworodków - grupa IIIA (badana),
- b) izolaty GBS pochodzące z kolonizacji wyizolowane z jamy ustnej lub ucha zewnętrznego noworodków urodzonych przez matki z prawidłowym przebiegiem ciąży - grupa IIIB (kontrolna).

Ze względu na małą liczebność wyżej wymienionych grup, a tym samym trudności w interpretacji uzyskanych wyników, zdecydowano o przeprowadzeniu dodatkowej analizy opartej na podziale izolatów GBS na dwie grupy: grupę szczepów izolowanych od kobiet (grupa K), do której zaliczały się grupy IA, IB, IIA, IIB oraz grupę szczepów pozyskanych od noworodków (grupa N) złożoną z grup IIIA i IIIB.

Poniżej, w tabeli 6 przedstawiono cechy szczegółowo przebadanych izolatów *S. agalactiae*, ich liczbę w poszczególnych grupach oraz wyniki przeprowadzonych badań z zastosowaniem następujących metod: posiewu mikrobiologicznego, testu lateksowego do oznaczenia polisacharydów powierzchniowych, reakcji multipleks PCR użytej do detekcji

genów polisacharydów powierzchniowych oraz detekcji genów białek powierzchniowych z klasy Alp, a także metody dyfuzyjno-krażkowej do oznaczenia lekooporności.

Tabela 6. Tabela zbiorcza izolatów GBS (n=99) oraz wyników oznaczenia serotypów metodą lateksową, detekcji genów polisacharydów powierzchniowych i białek z klasy Alp oraz oceny lekooporności szczepów GBS.

Lp.	Symbol szczepu	Serotyp		Geny białek powierzchniowych z klasy Alp	Lkooporność		
		Oznaczenie przeprowadzone metodą lateksową	Oznaczenie przeprowadzone metodą multipleks PCR		Klindamycyna (2 µg) [mm]	Erytromycyna (15 µg) [mm]	Mechanizm oporności
GRUPA IA							
1	K-A1	V	V	<i>epsilon</i>	27	28	-
2	K-A2	III	III	<i>rib</i>	23	24	-
3	K-A3	III	III	<i>alp2</i>	24	27	-
4	K-A4	Ib	Ib	<i>bca</i>	27	30	-
5	K-A5	Ib	Ib	<i>bca</i>	24	27	-
6	K-A6	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	24	25	-
7	K-A7	Ia	Ia	<i>bca</i>	24	26	-
8	K-A8	III	III	<i>rib</i>	26	29	-
9	K-A9	V	V	<i>bca</i>	25	28	-
10	K-A10	III	III	<i>alp2</i>	27	30	-
11	K-A11	III	III	<i>alp2</i>	25	28	-
12	K-A12	II	II	<i>bca</i>	22	5	iMLSb
13	K-A13	V	V	<i>alp2</i>	23	26	-
14	K-A14	V	V	<i>alp2</i>	22	13	iMLSb
15	K-A15	Ib	Ib	<i>bca</i>	26	28	-
16	K-A16	III	Ia	<i>epsilon</i>	25	27	-
17	K-A17	V	V	<i>alp2</i>	24	15	iMLSB
18	K-A18	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	27	28	-
19	K-A19	II	II	<i>rib</i>	32	32	-
20	K-A20	Ib	IV	<i>epsilon</i>	22	26	-
GRUPA IB							
21	K-B1	III	III	<i>rib</i>	26	28	-
22	K-B2	III	III	<i>rib</i>	26	29	-
23	K-B3	II	II	<i>bca</i>	24	26	-
24	K-B4	III	III	<i>rib</i>	25	28	-
25	K-B4	III	III	<i>Alp2</i>	27	29	-

26	K-B6	III	II	<i>bca</i>	28	32	-
27	K-B7	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	23	26	-
28	K-B8	III	Ib	<i>bca</i>	24	26	-
29	K-B9	V	V	<i>Alp3</i>	24	26	-
30	K-B10	Ib	Ib	<i>epsilon</i>	20	24	-
31	K-B11	II	II	<i>rib</i>	27	29	-
32	K-B12	III	III	<i>rib</i>	26	29	-
33	K-B13	II	II	<i>rib</i>	29	32	-
34	K-B14	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	26	12	fenotyp M
35	K-B15	Ia	Ia	<i>bca</i>	25	27	-
36	K-B16	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	24	28	-
37	K-B17	Ib	Ib	<i>epsilon</i>	25	27	-
38	K-B18	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	29	32	-
39	K-B19	Ia	IV	<i>epsilon</i>	26	28	-
40	K-B20	III	III	<i>alp2</i>	26	28	-
GRUPA IIA							
41	KC-A1	III	IV	<i>epsilon</i>	27	29	-
42	KC-A2	Ia	IV	<i>epsilon</i>	26	30	-
43	KC-A3	II	II	<i>bca</i>	28	30	-
44	KC-A4	•NT	III	<i>rib</i>	20	15	iMLSB
45	KC-A5	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	25	29	-
46	KC-A6	Ia	Ia	<i>alp2</i>	27	29	-
47	KC-A7	Ib	Ib	<i>bca</i>	23	26	-
48	KC-A8	III	III	<i>alp2</i>	25	23	-
49	KC-A9	Ia	Ia	<i>bca</i>	23	24	-
50	KC-A10	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	24	25	-
51	KC-A11	III	III	<i>alp2</i>	25	28	-
52	KC-A12	III	III	<i>rib</i>	24	26	-
53	KC-A13	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	20	25	-
54	KC-A14	III	III	<i>rib</i>	24	17	iMLSB
GRUPA IIB							
55	KC-B1	III	II	<i>bca</i>	29	31	-
56	KC-B2	III	III	<i>alp2</i>	26	30	-
57	KC-B3	III	III	<i>alp2</i>	27	29	-

58	KC-B4	III	III	<i>alp2</i>	27	30	-
59	KC-B5	V	V	<i>rib</i>	29	31	-
60	KC-B6	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	26	29	-
61	KC-B7	III	III	<i>rib</i>	29	33	-
62	KC-B8	III	IV	<i>epsilon</i>	28	30	-
63	KC-B9	III	III	<i>bca</i>	30	36	-
64	KC-B10	V	V	<i>epsilon</i>	31	35	-
65	KC-B11	III	III	<i>rib</i>	28	30	-
66	KC-B12	*NT	II	<i>bca</i>	27	30	-
67	KC-B13	III	III	<i>alp2</i>	29	34	-
68	KC-B14	II	II	<i>bca</i>	28	29	-
69	KC-B15	V	V	<i>alp2</i>	24	27	-
GRUPA IIIA							
70	N-A1	III	III	<i>rib</i>	28	35	-
71	N-A2	II	II	<i>rib</i>	24	26	-
72	N-A3	II	II	<i>rib</i>	25	27	-
73	N-A4	II	III	<i>alp2</i>	23	26	-
74	N-A5	III	III	<i>alp2</i>	25	26	-
75	N-A6	Ib	Ib	<i>epsilon</i>	23	28	-
76	N-A7	II	II	<i>rib</i>	25	27	-
77	N-A8	Ia	Ia	<i>bca</i>	26	29	-
78	N-A9	III	III	<i>bca</i>	5	5	kMLSb
79	N-A10	III	III	<i>rib</i>	25	28	-
80	N-A11	II	II	<i>bca</i>	5	5	kMLSb
81	N-A12	Ib	Ib	<i>bca</i>	25	30	-
82	N-A13	III	III	<i>alp2</i>	21	22	-
83	N-A14	III	III	<i>rib</i>	26	23	-
84	N-A15	V	V	<i>alp3</i>	21	23	-
85	N-A16	III	III	<i>alp2</i>	23	20	-
GRUPA IIIB							
86	N-B1	III	III	<i>alp2</i>	23	25	-
87	N-B2	II	II	<i>bca</i>	25	26	-
88	N-B3	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	28	31	-

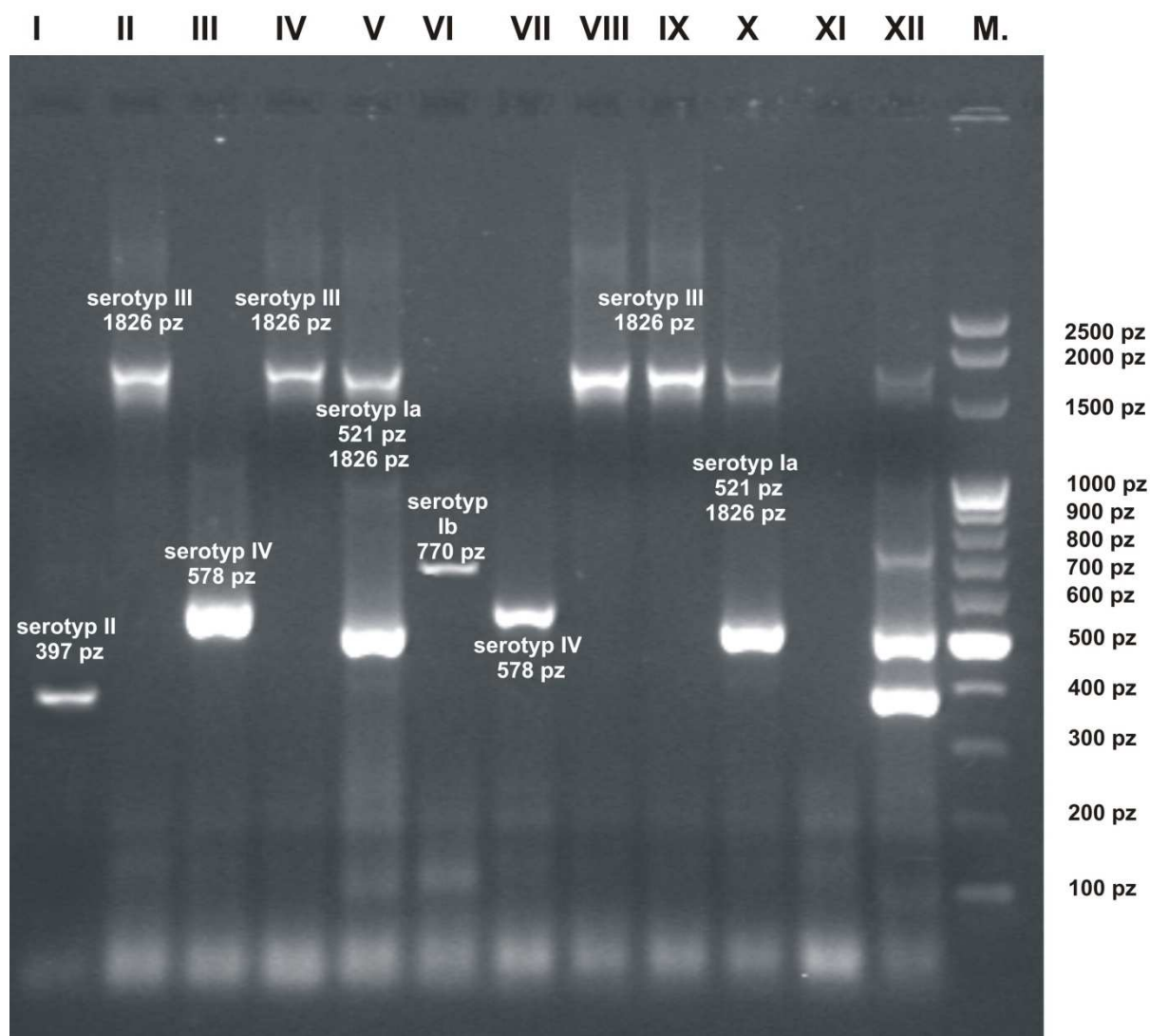
89	N-B4	III	III	<i>rib</i>	25	29	-
90	N-B5	III	III	<i>alp2</i>	5	24	fenotyp M
91	N-B6	III	III	<i>alp2</i>	25	28	-
92	N-B7	III	III	<i>alp2</i>	27	31	-
93	N-B8	III	III	<i>alp2</i>	25	26	-
94	N-B9	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	28	29	-
95	N-B10	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	28	31	-
96	N-B11	IV	V	<i>bca</i>	29	31	-
97	N-B12	Ia	Ia	<i>epsilon</i>	27	29	-
98	N-B13	III	III	<i>alp2</i>	26	31	-
99	N-B14	Ia	III	<i>alp2</i>	26	29	-

*NT – nie uzyskano wyniku oznaczenia serotypu danego szczepu GBS za pomocą wybranej metody

IV.1.1 Wyniki oznaczenia serotypów badanych szczepów *Streptococcus agalactiae*

Serotypy zgromadzonych 99 izolatów GBS oznaczono metodą serologiczną i molekularną. Wykazano, że szczepy GBS przynależały do serotypów Ia, Ib, II, III, IV lub V. W kilku przypadkach, stosując metodę serologiczną, nie było możliwości oznaczenia serotypów oraz zaklasyfikowania szczepów GBS do żadnego serotypu za pomocą tej metody. W przypadku jednego szczepu dochodziło do reakcji z dwoma odczynnikami lateksowymi z zestawu Ia, Ib-V, a tym samym otrzymania wyników trudnych do interpretacji. Dla sprawdzenia wyników testu serologicznego oraz próby określenia przynależności do serotypów izolatów GBS, które nie zostały zaklasyfikowane za pomocą testu lateksowego, przeprowadzono reakcję multipleks PCR, umożliwiającą detekcję genów kodujących poszczególne polisacharydy powierzchniowe warunkujące przynależność szczepów do danego serotypu (Ryc. 4). Na 99 przebadanych szczepów GBS, wyniki reakcji PCR potwierdziły wyniki uzyskane za pomocą testu lateksowego dla 85 izolatów GBS. Określenie przynależności szczepów GBS do serotypu IV było możliwe jedynie dzięki zastosowaniu metody molekularnej, ponieważ test lateksowy nie wykazał obecności izolatów GBS z tego serotypu. Nie zanotowano różnic istotnych statystycznie pomiędzy wynikami oznaczeń uzyskanych za pomocą metody lateksowej i multipleks PCR. Stosując metodę serologiczną i molekularną oznaczenia serotypów GBS nie stwierdzono obecności wśród badanych izolatów serotypów VI, VII, czy też VIII. Wykazano istotną statystycznie różnicę w prawdopodobieństwie występowania poszczególnych serotypów ($p=0,0022$). Wyniki

oceny serotypów uzyskane za pomocą obu metod oraz różnice oznaczeń wynikające z zastosowania tych metod przedstawiono w tabeli 7.



Ryc. 4. Produkty amplifikacji PCR otrzymane z wykorzystaniem starterów dla poszczególnych serotypów GBS (IaF, IaR, IbF, IbR, IIF, IIR, IIIF, IIIR, IVF, IVR). Ścieżki od lewej: I-X szczepy GBS z poszczególnych serotypów Ia, Ib-IV, XI-próba negatywna, XII-próba pozytywna, M- marker wielkości 100-2500 pz).

Wykazano, że największa liczba szczepów z przebadanej kolekcji GBS należała do serotypów III (n=39) oraz kolejno do serotypów: Ia (n=20), II (n=15), V (n=11), Ib (n=9) i IV (n=5). W grupie szczepów GBS izolowanych od kobiet oraz w grupie szczepów GBS uzyskanych od noworodków serotyp III występował najczęściej, następnie serotyp Ia i II, przy czym w grupie noworodków oznaczono taką samą liczbę szczepów z serotypem Ia i II

(Tabela 8). Stwierdzono, że prawdopodobieństwa występowania poszczególnych serotypów GBS różnią się od siebie, a różnice te są statystycznie istotne ($p=0,0022$).

W grupach szczepów GBS wyodrębnionych na podstawie miejsca izolacji (grupy IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB) dominującym serotypem był typ III, natomiast częstość występowania pozostałych serotypów była różna w zależności od grupy (Tabela 9).

Tabela 7. Porównanie wyników oznaczenia serotypów GBS za pomocą metody serologicznej i multipleks PCR (n=99).

Serotyp	Wyniki testu lateksowego	Liczba oznaczeń metodą serologiczną potwierdzona przez reakcję multipleks PCR	Liczba oznaczeń reakcją multipleks PCR nie potwierdzona metodą serologiczną	Wyniki uzyskane za pomocą reakcji multipleks PCR
Ia	22	19	1	20
Ib	9	8	1	9
II	13	12	3	15
III	42	36	3	39
IV	1	-	5	5
V	10	10	1	11
NT*	2*	-	-	-
Suma	99	85	14	99

*NT – nie uzyskano wyniku oznaczenia serotypu danego szczepu GBS za pomocą wybranej metody

Tabela 8. Występowanie serotypów badanych izolatów GBS w grupach K oraz N.

SEROTYPY	GRUPY BADANE GBS (n=99)	
	Grupa K	Grupa N
Ia	15	5
Ib	7	2
II	10	5
III	23	16
IV	5	-
V	9	2
Suma	69	30

Grupa K- szczepy GBS izolowane od kobiet

Grupa N- szczepy GBS izolowane od noworodków

Tabela 9. Występowanie serotypów badanych izolatów GBS w grupach wyodrębnionych na podstawie miejsca izolacji szczepów.

SEROTYPY	GRUPY BADANE (n=99)					
	Grupa IA (n=20)	Grupa IB (n=20)	Grupa IIA (n=14)	Grupa IIB (n=15)	Grupa IIIA (n=16)	Grupa IIIB (n=14)
Ia	4	5	5	1	1	4
Ib	3	3	1	-	2	-
II	2	4	1	3	4	1
III	5	6	5	7	8	8
IV	1	1	2	1	-	-
V	5	1	-	3	1	1
Suma	20	20	14	15	16	14

Grupa IA- szczepy GBS izolowane od kobiet ze stwierdzonym stanem zapalnym pochwy

Grupa IB - szczepy GBS izolowane z pochwy od kobiet zdrowych

Grupa IIA- szczepy izolowane z pochwy od kobiet w ciąży zagrożonej

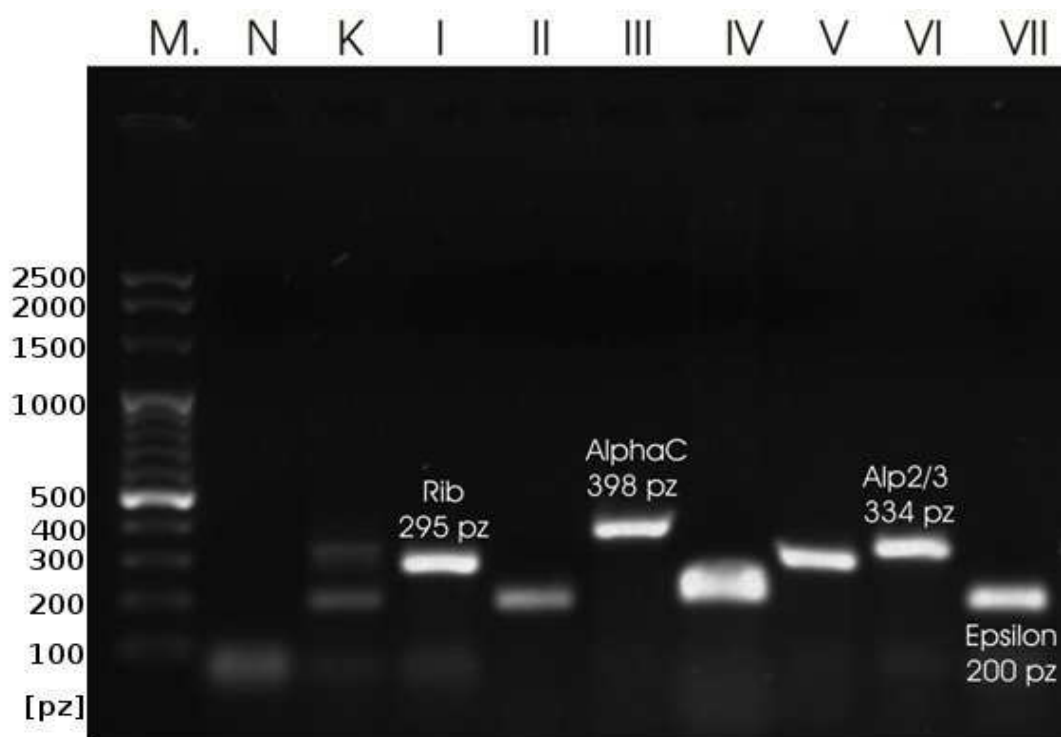
Grupa IIB- szczepy izolowane z pochwy od kobiet z prawidłowym przebiegiem ciąży

Grupa IIIA- szczepy GBS izolowane z ucha zewnętrznego, jamy ustnej lub krwi noworodków przyjętych na oddział neonatologiczny z różnych wskazań, urodzonych przez matki z ciążą wysokiego ryzyka

Grupa IIIB- szczepy GBS izolowane z jamy ustnej oraz ucha zewnętrznego noworodków urodzonych przez matki z prawidłowym przebiegiem ciąży

IV.1.2 Wyniki oznaczenia genów białek z klasy Alp metodą multipleks PCR

W kolekcji badanych 99 szczepów GBS oznaczono geny białek z klasy Alp *bca*, *epsilon*, *rib*, *alp2* oraz *alp3* stosując metodę multipleks PCR (Ryc. 5; Tabela 6). Nie stwierdzono obecności genu *alp4* w analizowanej kolekcji szczepów. Ponieważ wybrana reakcja multipleks PCR umożliwiała jedynie stwierdzenie obecności u danego szczepu genów *alp2/alp3* konieczne było przeprowadzenie dodatkowej reakcji PCR pozwalającej na rozróżnienie tych genów wśród badanych szczepów. Dominującymi genami w zebranej kolekcji izolatów GBS okazały się być geny *alp2* (n=27) i *epsilon* (n=25) oraz kolejno *bca* (n=23), *rib* (n=22) oraz *alp3* (n=2). Stwierdzono, że prawdopodobieństwa występowania poszczególnych genów białek z klasy Alp różnią się od siebie, a różnice te są statystycznie istotne (p=0,0087). Analizując każdy z genów białek pod względem prawdopodobieństwa wystąpienia w grupie szczepów GBS izolowanych kobiet (grupa K) i noworodków (grupa N) nie wykazano istotności statystycznej. W grupie 69 szczepów GBS izolowanych od kobiet najwięcej izolatów (n=20) posiadało gen *epsilon*, 17 szczepów gen *bca*, 16 szczepów gen *alp2*, 15 szczepów gen *rib* oraz jeden szczep gen *alp3*. W grupie 30 szczepów izolowanych od noworodków dominowały izolaty z genem *alp2* (n=11), 7 szczepów posiadało gen *rib*, 6 szczepów gen *bca*, 5 szczepów gen *epsilon* oraz jeden szczep gen *alp3* (Tabela 10). Genami białek z klasy Alp najczęściej występującymi w grupach GBS wyodrębnionych na podstawie miejsca izolacji szczepów były geny *alp2* i *bca* w grupie IA (n=6 odpowiednio dla każdego genu), gen *alp2* w grupach IIB (n=5) oraz IIIB (n=7), gen *epsilon* w grupie IB (n=7) oraz IIA (n=5) oraz gen *rib* w grupie IIIA (n=6) (Tabela 11).



Ryc. 5. Produkty amplifikacji PCR otrzymane z wykorzystaniem starterów dla poszczególnych białek powierzchniowych GBS z klasy Alp (Universal forward, Alpha C reverse, Rib reverse, Epsilon/Alp1 reverse, Alp2/3 reverse, Alp4 reverse). Ścieżki od lewej: M- marker 100-2500 pz., N- próba negatywna, K-próba pozytywna, pozostałe ścieżki przedstawiają produkty amplifikacji genów *rib*, *bca*, *alp2/3*, *epsilon*.

Tabela 10. Występowanie genów białek z rodziny alfa-podobnych w grupach K i N.

Geny białek	GRUPY BADANE (n=99)	
	Grupa K	Grupa N
<i>bca</i>	17	6
<i>alp2</i>	16	11
<i>alp3</i>	1	1
<i>epsilon</i>	20	5
<i>rib</i>	15	7
Suma	69	30

Grupa K- szczepy GBS izolowane od kobiet

Grupa N- szczepy GBS izolowane od noworodków

Tabela 11. Występowanie genów białek z rodziny alfa-podobnych w badanych grupach GBS wyodrębnionych na podstawie miejsca ich izolacji.

Geny białek alfa-podobnych	GRUPY BADANE (n=99)					
	Grupa IA (n=20)	Grupa IB (n=20)	Grupa IIA (n=14)	Grupa IIB (n=15)	Grupa IIIA (n=16)	Grupa IIIB (n=14)
<i>bca</i>	6	4	3	4	4	2
<i>alp2</i>	6	2	3	5	4	7
<i>alp3</i>	-	1	0	0	1	0
<i>epsilon</i>	5	7	5	3	1	4
<i>rib</i>	3	6	3	3	6	1
Suma	20	20	14	15	16	14

Grupa IA- szczepy GBS izolowane od kobiet ze stwierdzonym stanem zapalnym pochwy

Grupa IB- szczepy GBS izolowane z pochwy od kobiet zdrowych

Grupa IIA- szczepy izolowane z pochwy od kobiet w ciąży zagrożonej

Grupa IIB- szczepy izolowane z pochwy od kobiet z prawidłowym przebiegiem ciąży

Grupa IIIA- szczepy GBS izolowane z ucha zewnętrznego, jamy ustnej lub krwi noworodków przyjętych na oddział neonatologiczny z różnych wskazań, urodzonych przez matki w ciąży wysokiego ryzyka

Grupa IIIB- szczepy GBS izolowane z jamy ustnej oraz ucha zewnętrznego noworodków urodzonych przez matki z prawidłowym przebiegiem ciąży

IV.1.2 Zależność występowania polisacharydów powierzchniowych, ich genów oraz genów białek powierzchniowych alfa-podobnych GBS

Zaobserwowano zależność w występowaniu określonych genów białek powierzchniowych z klasy Alp i polisacharydów powierzchniowych CPS oraz ich genów. 15 izolatów z serotypu Ia na 20 oznaczonych posiadało gen białka *epsilon*, natomiast pozostałe szczepy z tego serotypu gen *bca* (n=4) i *alp2* (n=1). Gen *bca* znacznie częściej był oznaczany u szczepów z serotypów Ib (n=6) oraz II (n=9). Przeważająca liczba izolatów GBS z serotypu III (n=39) wykazywała obecność genów *alp2* (n=22) *rib* (n=15). Gen białka *epsilon* był obecny u wszystkich izolatów należących do serotypu IV (Tabela 12). Różnice

w prawdopodobieństwie występowania genów białek z klasy Alp pomiędzy poszczególnymi serotypami GBS wykazywały istotność statystyczną ($p < 0,0001$).

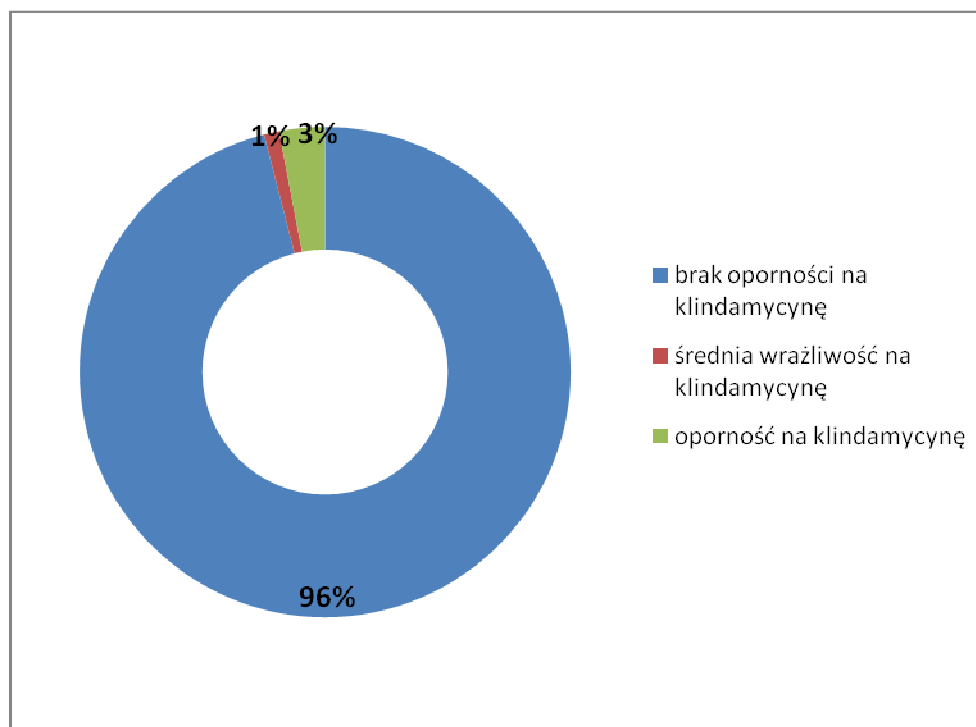
Tabela 12. Występowanie serotypów badanych szczepów GBS wraz z genami białek powierzchniowych GBS z klasy Alp.

SEROTYPY	GENY BIAŁEK Z RODZINY ALFA-PODOBNYCH					SUMA
	<i>bca</i>	<i>alp2</i>	<i>alp3</i>	<i>epsilon</i>	<i>rib</i>	
Ia	4	1	-	15	-	20
Ib	6	-	-	3	-	9
II	9	-	-	-	6	15
III	2	22	-	-	15	39
IV	-	-	-	5	-	5
V	2	4	2	2	1	11
SUMA	23	27	2	25	22	99

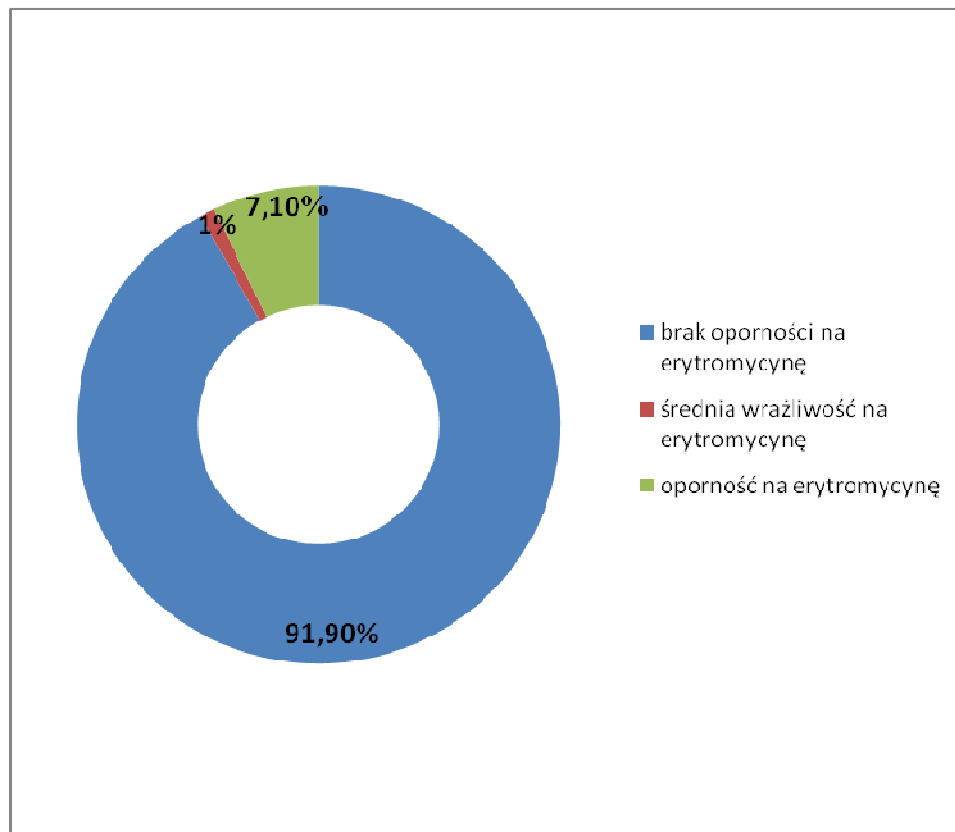
IV.1.3 Wyniki oznaczenia mechanizmu oporności MLSB i fenotypu M

Oznaczono wrażliwość 99 izolatów GBS na klindamycynę (2 µg) i erytromycynę (15µg). 90 izolatów GBS było wrażliwych na zastosowane antybiotyki. Średnią wrażliwość zarówno na erytromycynę jak i na klindamycynę wykazywały dwa szczepy GBS. Z całej puli zebranych izolatów siedem było opornych na erytromycynę, a trzy na klindamycynę (Ryc.6, Ryc. 7). Mechanizm oporności MLSB wykazano u 7 szczepów GBS. Mechanizm oporności MLSB typu konstytutywnego był obecny u 2 szczepów,

natomiast mechanizm oporności MLSB typu indukcyjnego odnotowano u 5 izolatów. Fenotyp M był obecny w przypadku dwóch szczepów.



Ryc.6. Podział procentowy badanych izolatów GBS na podstawie lekooporności na klindamycynę.



Ryc. 7. Podział procentowy badanych izolatów GBS na podstawie lekooporności na erytromycynę.

IV.2 Badanie hamującego działania bakterii kwasu mlekowego LAB wobec wybranych izolatów *Streptococcus agalactiae*

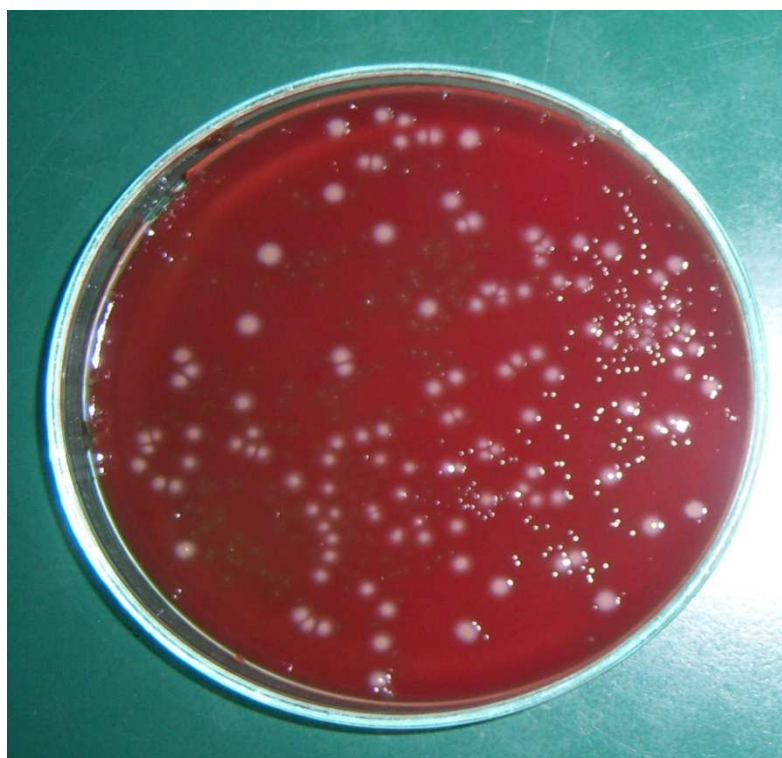
Do eksperymentu umożliwiającego ocenę wrażliwości *S. agalactiae* na hamujące działanie bakterii kwasu mlekowego zostało wybranych 26 szczepów GBS oraz szczep wzorcowy *S. agalactiae* DSMZ 2134. Szczepy GBS zostały wybrane po kilka z każdej z badanych grup (n=6) izolatów GBS (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB) z uwzględnieniem serotypów oraz obecności genów białek powierzchniowych z klasy Alp (Tabela 13).

Tabela 13. Charakterystyka wybranych izolatów GBS w oparciu o serotypy i geny białek powierzchniowych z klasy Alp.

Lp.	Symbol szczepu	Serotyp	Gen białka Alp	Grupa
1	K-A5	Ib	<i>bca</i>	IA
2	K-A2	III	<i>rib</i>	
3	K-A6	Ia	<i>epsilon</i>	
4	K-A15	II	<i>bca</i>	
5	K-A18	Ia	<i>epsilon</i>	
6	K-A17	V	<i>alp2</i>	
7	K-A14	V	<i>alp3</i>	
8	K-B10	Ib	<i>epsilon</i>	IB
9	K-B18	Ia	<i>epsilon</i>	
10	K-B14	III	<i>eib</i>	
11	K-B15	Ia	<i>bca</i>	
12	K-B11	II	<i>rib</i>	
13	KC-A5	Ia	<i>epsilon</i>	IIA
14	KC-A11	III	<i>alp2</i>	
15	KC-A13	Ia	<i>epsilon</i>	
16	KC-B6	Ia	<i>epsilon</i>	IIB
17	KC-B11	III	<i>rib</i>	
18	KC-B13	III	<i>alp2</i>	
19	N-A2	II	<i>rib</i>	IIIA
20	N-A3	II	<i>rib</i>	
21	N-A9	III	<i>bca</i>	
22	N-A13	Ib	<i>bca</i>	
23	N-A10	III	<i>rib</i>	
24	N-B3	Ia	<i>epsilon</i>	IIIB
25	N-B4	III	<i>rib</i>	
26	N-B13	III	<i>alp2</i>	
27	DSMZ 2134	II	<i>rib</i>	szczep wzorcowy

IV.2.1 Ocena działania antybakteryjnego szczepów LAB izolowanych z pochwy wobec GBS

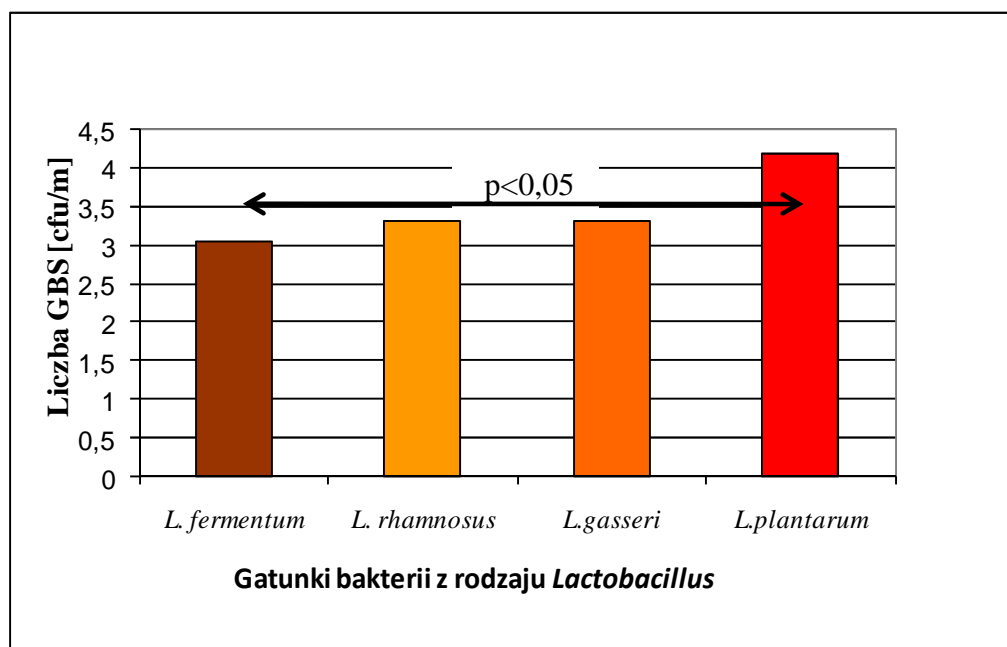
W wyniku przeprowadzonego eksperymentu wykazano bardzo silną aktywność antagonistyczną szczepów LAB wobec izolatów GBS. Już po czasie 2 godz. od rozpoczęcia eksperymentu w środowisku kilku szczepów *Lactobacillus* zaobserwowano spadek liczby *S. agalactiae* o 1 do 5 logarytmów lub całkowitą redukcję populacji GBS. Po 4 godz. trwania eksperymentu zanotowano dalszy spadek liczebności populacji GBS, a w większości przypadków całkowity brak wzrostu. Po czasie 6 godz. tylko nieliczne szczepy GBS przeżywały w obecności LAB. W przebiegu badań nie stwierdzono wpływu szczepów GBS na obniżenie populacji LAB. Liczba kolonii *Lactobacillus*, w czasie 10 min. od rozpoczęcia eksperymentu utrzymywała się na stałym poziomie przez cały czas jego trwania (Ryc. 8). Ze względu na znaczne zmniejszenie populacji GBS już w 2 godz. od rozpoczęcia eksperymentu, a także zaznaczenie się różnic w liczebności pomiędzy szczepami GBS, do analizy statystycznej wybrano wyniki uzyskane w tym czasie inkubacji i odniesiono je do liczby początkowej GBS.



Ryc. 8. Wzrost szczepu GBS o symbolu N-A9 oraz *L. gasseri* na podłożu Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej.

IV.2.1.1 Różnice między wybranymi gatunkami LAB w działaniu hamującym wzrost GBS

Wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy gatunkami bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w działaniu hamującym wobec wybranych izolatów GBS ($p=0,0039$). Najmniejszy wpływ na redukcję populacji GBS wykazywały szczepy bakterii z gatunku *L. fermentum*, natomiast największy szczepy bakterii z gatunku *L. plantarum*. Różnica w działaniu hamującym pomiędzy szczepami bakterii należącymi do gatunków *L. fermentum* i *L. plantarum* wobec badanych szczepów GBS była istotna statystycznie ($p<0,05$) (Ryc. 9).

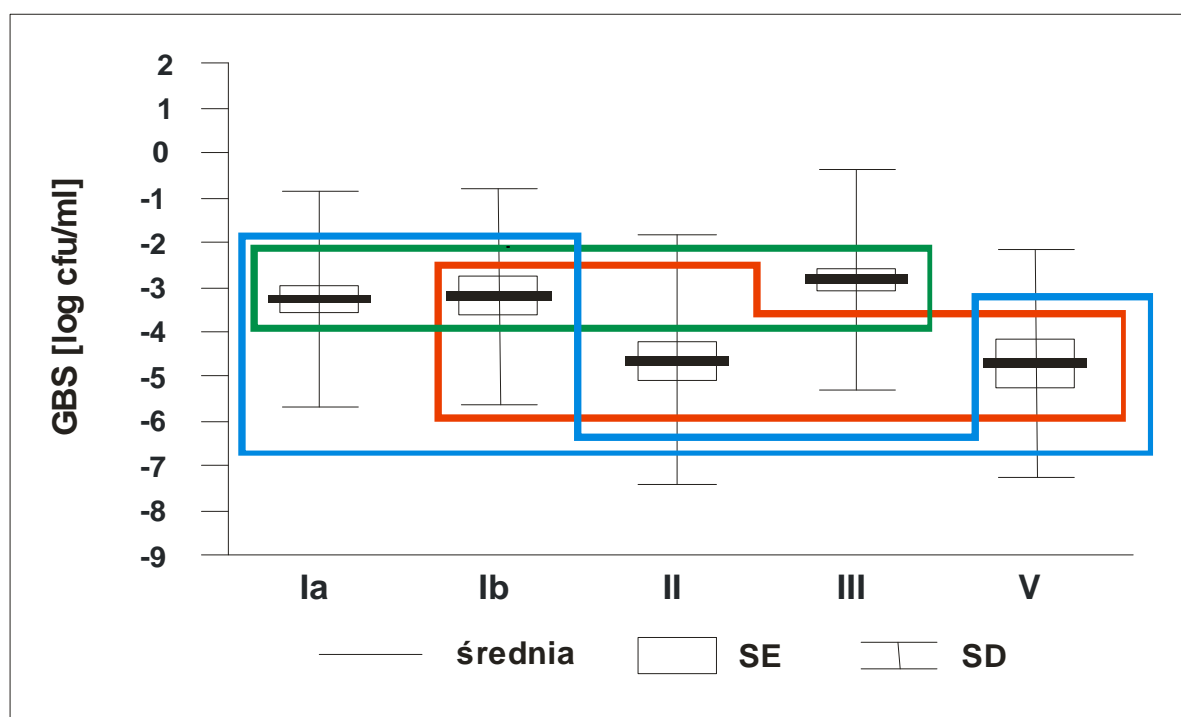


Ryc 9. Porównanie działania hamującego gatunków LAB wobec GBS jako spadek liczby GBS (cfu/ml) w czasie 2 godz. od rozpoczęcia eksperymentu.

IV.2.1.2 Zależność wrażliwości *S. agalactiae* na działanie przeciwbakteryjne LAB izolowanych z pochwy od serotypu GBS

Szczegółowa analiza wyników eksperymentu, z uwzględnieniem przynależności GBS do poszczególnych serotypów Ia, Ib, II, III oraz V, wskazała istotne różnice pomiędzy badanymi serotypami GBS we wrażliwości na oddziaływanie bakterii z rodzaju

Lactobacillus ($p=0,0052$). Największy spadek populacji GBS zaobserwowano u szczepów należących do serotypów II oraz V (spadek liczby GBS o ok. 5 rzędów wielkości), a najmniejszy wśród izolatów należących do serotypów III i Ia (spadek liczebności GBS o ok. 3 rzędy wielkości). Potwierdziła to dalsza analiza, która wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy serotypami III i II ($p<0,05$), III i V ($p<0,05$) oraz serotypami Ia i II ($p<0,05$) (Ryc. 10). Aktywność antybakteryjna szczepów bakterii z gatunku *L. plantarum* wobec izolatów GBS z poszczególnych serotypów nie różniła się istotnie od aktywności antybakteryjnej pozostałych gatunków bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (*L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*).



Znaczenie symboli:

średnia – średnia dla próby

SE – błąd standardowy (ang. standard estimation, SE)

SD – odchylenie standardowe dla próby (ang. standard deviation, SD)

Ryc 10. Porównanie zmian liczb GBS z poszczególnych serotypów (log cfu/ml) po 2 godz. trwania eksperymentu. Ten sam kolor grupy serotypów oznacza brak różnic statystycznych pomiędzy nimi.

IV.2.1.2 Zależność wrażliwości *S. agalactiae* na działanie przeciwbakteryjne LAB od genów białek powierzchniowych z klasy Alp

Największy spadek liczebności GBS (cfu/ml) zanotowano w przypadku szczepów z genami *bca* i *alp3*, natomiast najmniejszy wśród szczepów z genem *alp2* ($p=0,0078$). Po dwóch godzinach od momentu rozpoczęcia eksperymentu liczba GBS z genem *alp2* spadła o ok. 2 logarytmy, a szczepów z genami białek *bca* i *alp3* o ok. 5 logarytmów.

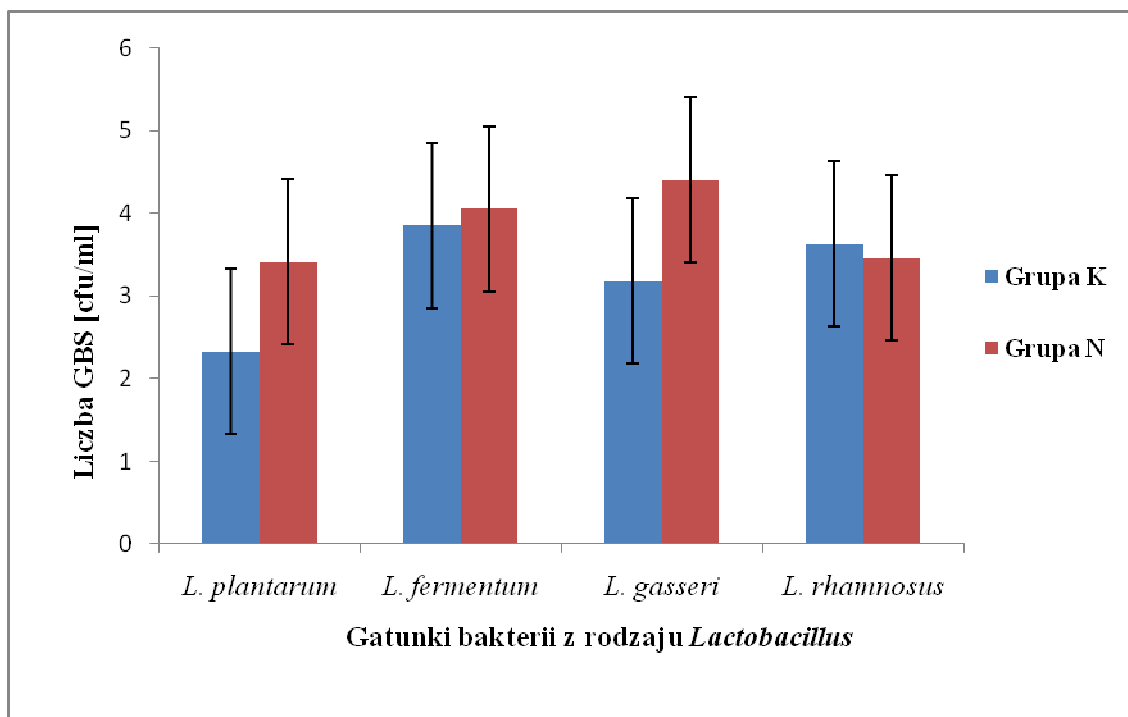
Dalsza analiza wykazała, że wrażliwość izolatów GBS z genem białka *alp2* na działanie antybakteryjne LAB różniła się istotnie statystycznie od wrażliwości szczepów GBS z genami *bca* i *alp3* ($p<0,05$). Wrażliwość szczepów GBS posiadających geny *epsilon* i *alp3* była różna i istotna statystycznie ($p<0,05$).

IV.2.1.3 Wrażliwość szczepów GBS na antagonistyczne działanie LAB izolowanych z pochwy zależna od serotypu oraz genów białek z rodziny alfa-podobnych

Zaobserwowano podobną zależność we wrażliwości na działanie LAB pomiędzy izolatami GBS przynależącymi do określonego serotypu i posiadającymi odpowiadające temu serotypowi białko powierzchniowe. Szczepy z serotypu III z genem *alp2* wykazywały mniejszą wrażliwość na oddziaływanie bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w porównaniu do szczepów z serotypów II i V z genami *bca* i *alp3*.

IV.2.2 Porównanie wrażliwości szczepów GBS izolowanych od kobiet i noworodków na działanie antagonistyczne LAB

Szczepy GBS z grupy K oraz N nie różniły się pod względem wrażliwości na działanie hamujące LAB. Wyniki dalszej analizy wykazały najsilniejszą aktywność szczepów bakterii z gatunku *L. plantarum* spośród wybranych gatunków LAB wobec szczepów GBS ($p=0,019$). Znacznie mniej wrażliwe na działanie hamujące *L. plantarum* były szczepy GBS z grupy K (spadek liczby GBS po 2 godz. trwania eksperymentu o ok. 2 logarytmy). Liczba GBS z grupy N spadła o ok. 3 logarytmy. Najsłabsze właściwości antybakteryjne wobec izolatów GBS z grup K i N wykazywał gatunek *L. fermentum* (Ryc. 11).



Ryc. 11. Porównanie hamującego działania poszczególnych gatunków LAB na szczepy GBS izolowanych od kobiet (grupa K) oraz od noworodków (grupa N) po 2 godz. trwania eksperymentu.

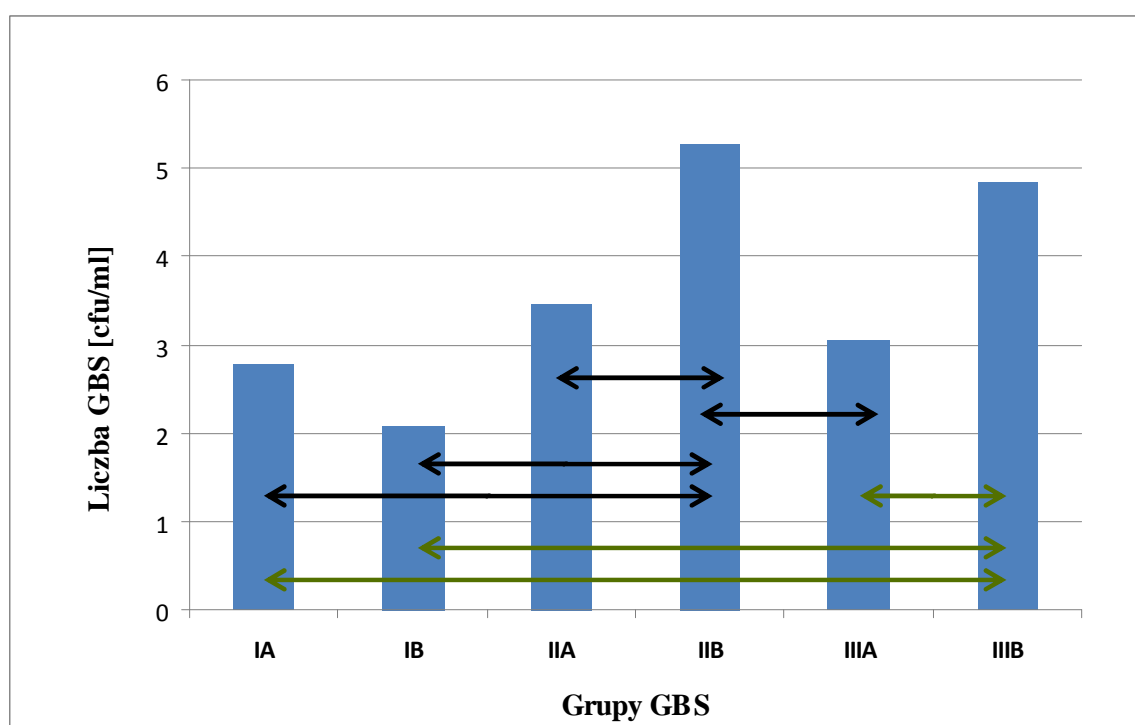
Analizując właściwości antybakteryjne poszczególnych gatunków LAB zaobserwowano istotne różnice w ich działaniu wobec szczepów GBS izolowanych od kobiet ($p=0,0123$). Najsilniejsze działanie hamujące wzrost szczepów GBS z tej grupy wykazywał gatunek *L. plantarum*, natomiast najsłabsze gatunek *L. fermentum*. Różnica w aktywności antybakteryjnej pomiędzy *L. plantarum*, a *L. fermentum* oraz *L. rhamnosus* była istotna statystycznie ($p<0,05$). Działanie antagonistyczne *L. fermentum*, *L. rhamnosus* i *L. gasseri* było porównywalne podobnie jak w przypadku *L. plantarum* i *L. gasseri* ($p>0,05$).

Nie zanotowano podobnych zależności oceniając wpływ LAB na szczepy GBS wyizolowane od noworodków.

IV.2.3 Wrażliwość izolatów GBS z grup IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB na działanie przeciwdrobnoustrojowe LAB

Szczepy GBS z grup wyodrębnionych na podstawie miejsca izolacji (grupy IA, IB, IIA, IIB, IIIA oraz IIIB) wykazywały różną wrażliwość na działanie hamujące bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, przy czym różnice te były istotne statystycznie ($p<0,0001$). Najdłużej w środowisku LAB przeżywały szczepy GBS izolowane od kobiet ciężarnych

z prawidłowym przebiegiem ciąży (grupa IIB), natomiast najkrócej szczepy GBS izolowane od kobiet, u których stwierdzono nosicielstwo GBS w pochwie. Różnice istotne statystycznie zanotowano pomiędzy grupą IIB i grupami IIA, IA, IB i IIIA ($p < 0,05$) oraz pomiędzy grupą IIIB, a grupami IA, IB i IIIA ($p < 0,05$) (Ryc. 12). Wrażliwość szczepów GBS z grup IA i IB na działanie antybakteryjne LAB była podobna ($p = 0,0635$). Różnice we wrażliwości na działanie hamujące LAB pomiędzy szczepami GBS z grup IIA i IIB oraz pomiędzy izolatami GBS z grup IIIA i IIIB były istotne statystycznie, a wartość p wynosiła odpowiednio $p < 0,001$ oraz $p < 0,001$.



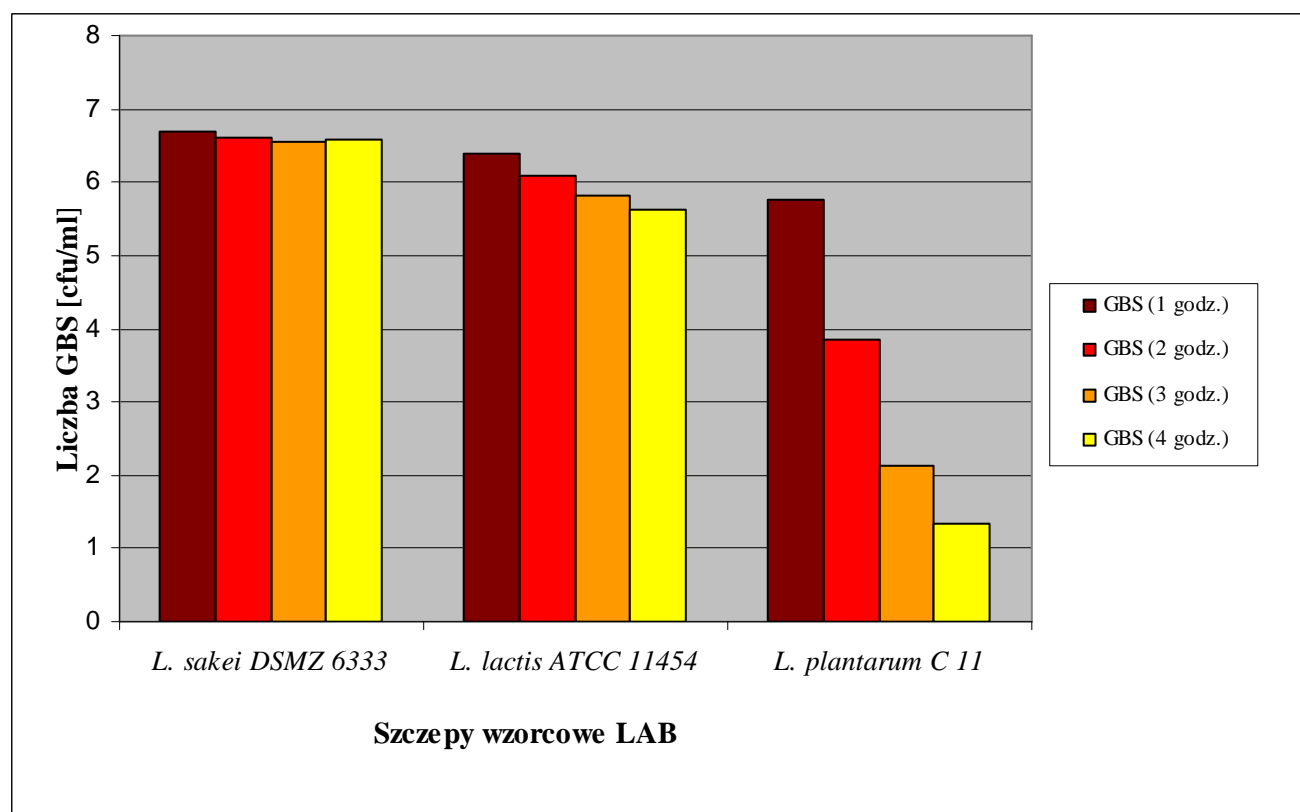
Ryc. 12. Porównanie liczb GBS (cfu/ml) pomiędzy grupami izolatów wyodrębnionych w oparciu o miejsce ich izolacji po 2 godz. w środowisku LAB. Strzałki czarne oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą IIB oraz grupami IIA, IA, IB i IIIA ($p < 0,05$); strzałki zielone oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą IIIB oraz grupami IA, IB i IIIA ($p < 0,05$).

IV.3 Ocena działania antybakteryjnego szczepów wzorcowych LAB wobec wybranych izolatów GBS

IV.3.1 Porównanie właściwości antybakteryjnych szczepów wzorcowych LAB wobec GBS

Wrażliwość na działanie bakterii kwasu mlekowego produkujących bakteriocyny została oceniona dla 26 szczepów GBS oraz szczepu wzorcowego *S. agalactiae* DSMZ 2134. Do analizy statystycznej wybrano wyniki uzyskane po 2 godz. trwania eksperymentu i odniesiono je do liczby początkowej GBS

Szczep *L. plantarum* C 11 wykazywał najsilniejsze właściwości hamujące wzrost GBS w porównaniu do pozostałych dwóch szczepów wzorcowych *L. sakei* DSMZ 6333 oraz *L. lactis* ATCC 11454 (Ryc. 13; Tabela 14).



Ryc. 13. Zależność liczby GBS (cfu/ml) w określonych czterech punktach czasowych eksperymentu (1 godz., 2 godz., 3 godz., 4 godz.) od działania antybakteryjnego szczepów wzorcowych LAB.

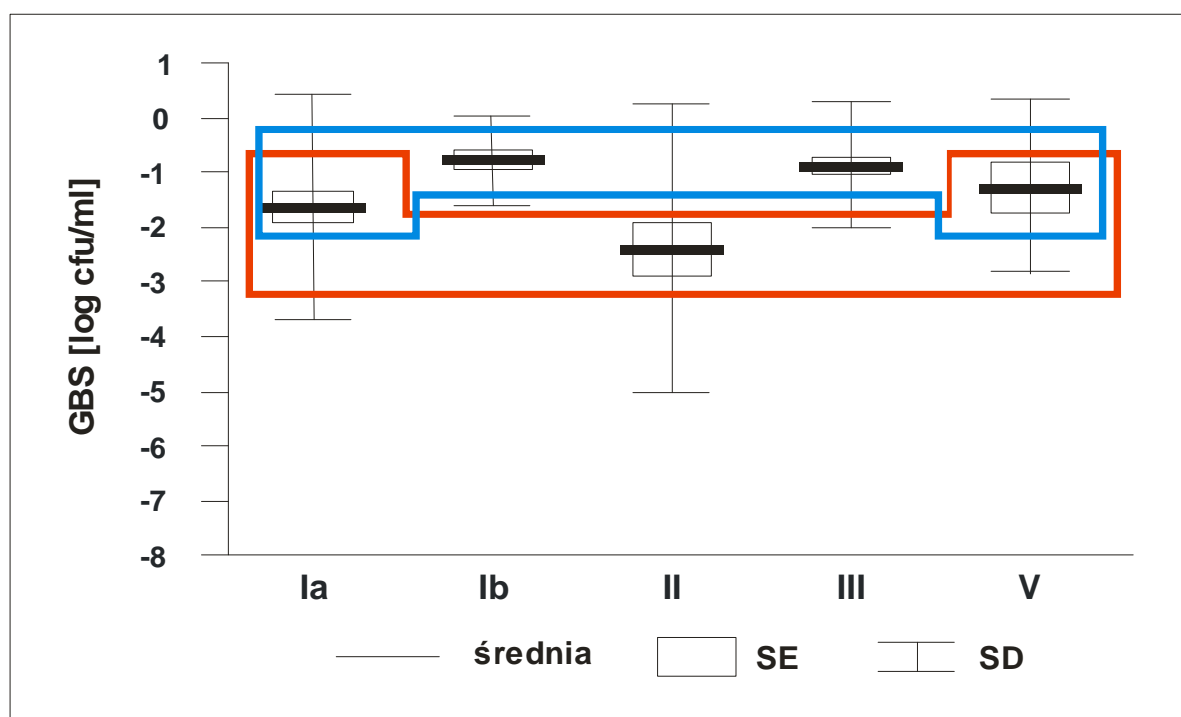
Tab. 14. Porównanie właściwości hamujących bakterii kwasu mlekowego produkujących bakteriocyny jako liczba GBS (cfu/ml) po 1 godz. , po 2 godz., po 3 godz. oraz po 4 godz. trwania eksperymentu (wartości p).

Czas	LAB	<i>L. sakei</i>	<i>L. plantarum C 11</i>
1 godz.	<i>L. lactis</i>	p= 0,0013	p= 0,1051
	<i>L. sakei</i>	-	p= 0,0001
2 godz.	<i>L. lactis</i>	p< 0,0001	p= 0,0003
	<i>L. sakei</i>	-	p< 0,0001
3 godz.	<i>L. lactis</i>	p< 0,0001	p< 0,0001
	<i>L. sakei</i>	-	p< 0,0001
4 godz.	<i>L. lactis</i>	p< 0,0001	p< 0,0001
	<i>L. sakei</i>	-	p< 0,0001

Przebadano wrażliwość wybranych szczepów GBS na działanie szczepu *L. plantarum C 11* w trzech wariantach jego hodowli (1. hodowla bez dodatku PInA; 2. hodowla z dodatkiem PInA do hodowli *L. plantarum C11* w momencie rozpoczęcia eksperymentu; 3. hodowla *L. plantarum C 11* zawierająca wyprodukowane plantarycyny pod wpływem dodanej w 8 godz. hodowli PInA). Liczba GBS niezależnie od zastosowanego wariantu hodowli szczepu *L. plantarum C 11* zmieniała się podobnie w miarę trwania eksperymentu. Liczba GBS po czasie 2 godz. od momentu rozpoczęcia badania spadała o ok. 2-3 logarytmy. Właściwości antybakteryjne szczepu *L. plantarum C 11* oraz szczepów *L. plantarum* izolowanych z dróg rodnych kobiet były porównywalne (p>0,05). Nie zanotowano spadku liczby GBS pod wpływem działania zawiesin bakteryjnych *L. sakei* DSMZ 6333 oraz *L. lactis* ATCC 11454 przez cały czas przebiegu eksperymentu. Jedynie w obecności *L. lactis* ATCC 11454 liczba GBS zmniejszyła się o 1 logarytm przez cały okres trwania eksperymentu.

IV.3.2 Zależność wrażliwości *S. agalactiae* na działanie przeciwbakteryjne szczepów wzorcowych LAB od serotypu GBS

Po dwóch godzinach trwania eksperymentu izolaty GBS z poszczególnych serotypów różniły się we wrażliwości na aktywność antybakteryjną szczepów LAB produkujących bakteriocyny ($p=0,0155$). Najmniej wrażliwe na działanie antagonistyczne LAB okazały się być szczepy z serotypów Ib oraz III, a najbardziej wrażliwe szczepy z serotypu II. Różnica we wrażliwości na działanie antybakteryjne LAB pomiędzy tymi serotypami była istotna statystycznie ($p<0,05$) (Ryc. 14).



Znaczenie symboli:

średnia – średnia dla próby

SE- błąd standardowy (ang. standard estimation, SE)

SD- odchylenie standardowe dla próby (ang. standard deviation, SD)

Ryc. 14. Porównanie zmian liczb GBS z poszczególnych serotypów (log cfu/ml) po 2 godz. trwania eksperymentu. Ten sam kolor grupy serotypów oznacza brak różnic statystycznych pomiędzy nimi.

IV.3.3 Zależność wrażliwości *S. agalactiae* na działanie przeciwbakteryjne szczepów wzorcowych LAB od genów białek z klasy Alp

Po 2 godzinach od momentu rozpoczęcia eksperymentu różnica we wrażliwości szczepów GBS z poszczególnymi genami białek z klasy Alp na działanie antagonistyczne LAB była bliska istotności statystycznej ($p=0,0683$). Najmniejszą wrażliwość na działanie hamujące LAB wykazały szczepy GBS z genem *alp2* (spadek liczby GBS o 1 logarytm), a największą izolaty GBS z genem *alp3* (spadek liczby GBS o 3 logarytmy).

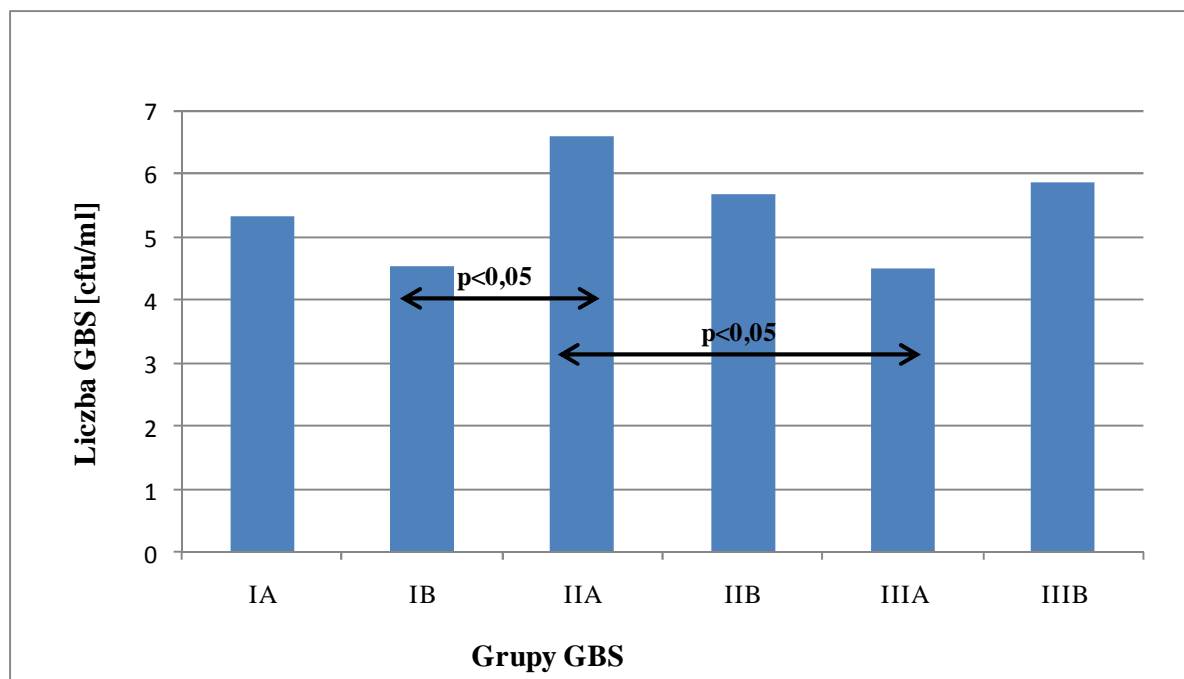
IV.3.4 Wrażliwość izolatów GBS na antagonistyczne działanie szczepów wzorcowych LAB zależna od serotypu oraz genów białek z rodziny alfa-podobnych

Szczepy GBS z serotypu III oraz Ib z genami białek powierzchniowych *alp2*, *bca* oraz *epsilon* wykazywały mniejszą wrażliwość na oddziaływanie bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w porównaniu do szczepów z serotypu II z genami *bca* i *rib*.

IV.3.5 Porównanie wrażliwości szczepów GBS z grup K i N oraz IA, IB, IIA, IIB, IIIA i IIIB na oddziaływanie szczepów wzorcowych LAB

Nie wykazano różnic we wrażliwości szczepów GBS izolowanych od kobiet i noworodków na działanie hamujące LAB po 2 godz. trwania eksperymentu ($p=0,6764$).

Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała istotne różnice we wrażliwości na działanie antagonistyczne LAB pomiędzy grupami IA, IB, IIA, IIB, IIIA oraz IIIB ($p=0,0029$). Najmniejszy spadek liczebności GBS zaobserwowano wśród szczepów izolowanych z pochwy od kobiet w ciąży zagrożonej (grupa IIA) w przeciwieństwie do szczepów GBS izolowanych z nosicielstwa (grupa IB) oraz szczepów izolowanych z zakażeń inwazyjnych noworodków z grupy IIIA (różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą IIA oraz grupami IB i IIIA dla $p<0,05$) (Ryc. 15).



Ryc. 15. Porównanie liczby GBS (log cfu/ml) w poszczególnych grupach wyodrębnionych na podstawie miejsca izolacji szczepów w środowisku LAB po 2 godz. od momentu rozpoczęcia eksperymentu.

Po porównaniu grup IA i IB, IIA i IIB oraz IIIA i IIIB pod względem wrażliwości na oddziaływanie LAB po 2 godz. od rozpoczęcia eksperymentu nie stwierdzono różnic pomiędzy grupami IA oraz IB ($p=0,1109$). Zanotowano natomiast różnicę istotną statystycznie między grupami IIA i IIB ($p=0,005$), przy czym większą wrażliwość na działanie antybakteryjne LAB wykazywały szczepy izolowane od kobiet z prawidłowym przebiegiem ciąży (grupa IIB). Izolaty GBS z grupy IIIA krócej przeżywały w środowisku LAB niż szczepy GBS zaklasyfikowane do grupy IIIB ($p=0,0381$).

Najsilniejsze właściwości antybakteryjne spośród szczepów wzorcowych LAB (*L. plantarum* C 11, *L. sakei* DSMZ 6333, *L. lactis* ATCC 11454) wykazywał *L. plantarum* C11. Nie odnotowano różnic istotnych statystycznie w działaniu hamującym żadnego ze szczepów wzorcowych LAB na szczepy GBS izolowane od kobiet i noworodków.

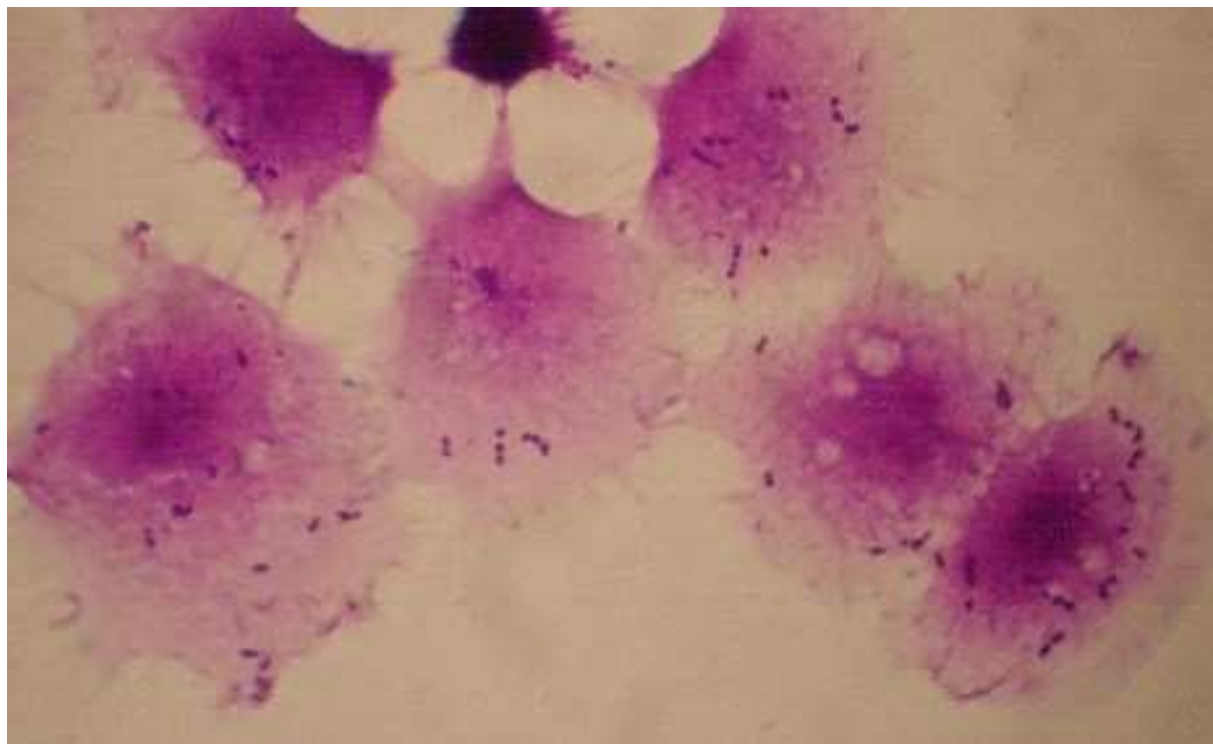
IV.4 Porównanie działania antybakteryjnego nizyny oraz szczepu *L. lactis* ATCC 11454

Nizyna w stężeniach 1µg/ml i 0,5 µg/ml w hodowli GBS nie wykazywała właściwości antybakteryjnych wobec tego drobnoustroju. Jedynie szczep wzorcowy *L. lactis* 11454 hamował wzrost kilku badanych szczepów GBS o 1 logarytm.

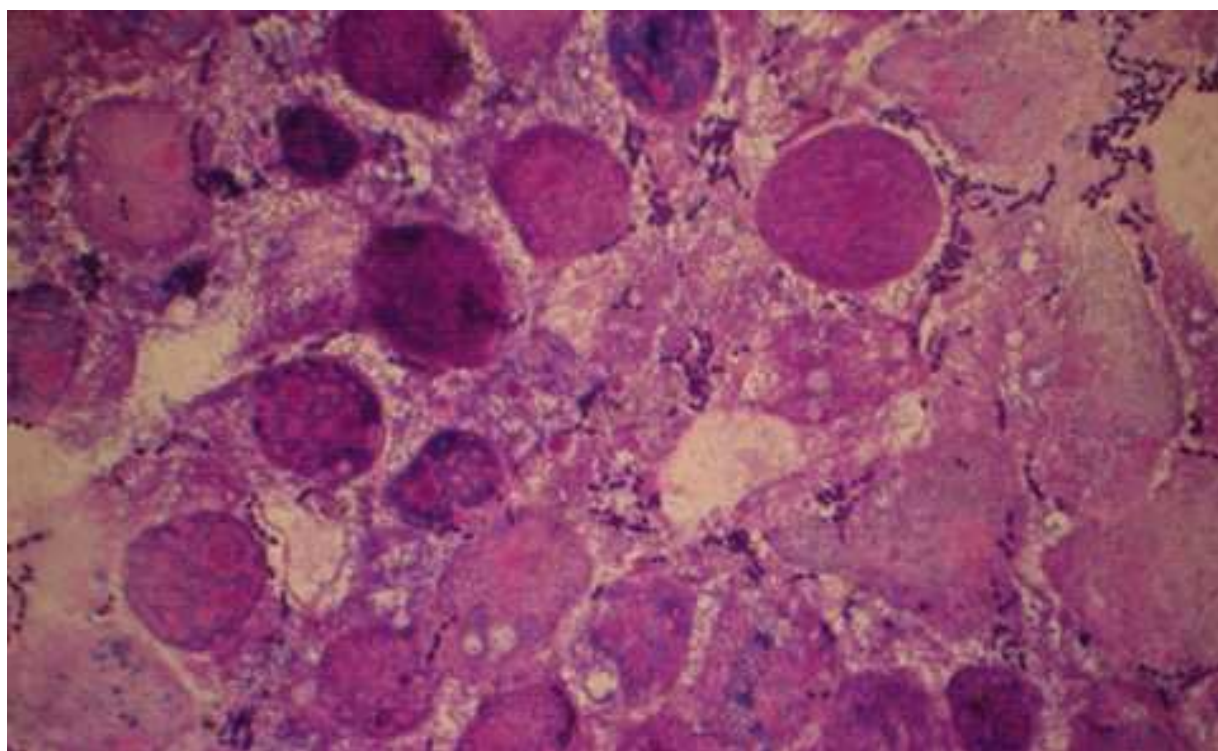
IV.5 Wyniki adherencji wybranych izolatów GBS do komórek linii tkankowych A-431 oraz HT-29

Przebadano adherencję wybranych 26 izolatów GBS, przeanalizowanych pod względem wrażliwości na oddziaływanie antagonistyczne bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz szczepów wzorcowych *S. agalactiae* DSMZ 2134, *S. agalactiae* ATCC 12403, *S. agalactiae* BAA-611 do linii tkankowych A-431 oraz HT-29.

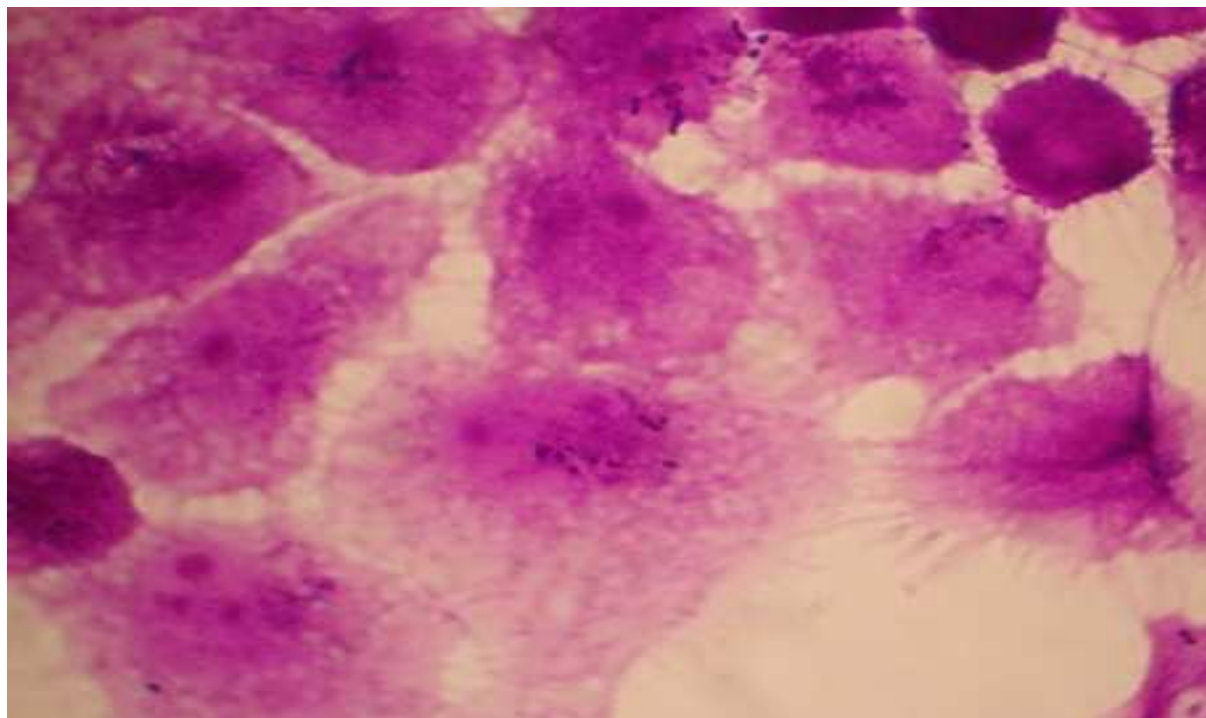
Wykazano silniejszą adherencję paciorkowców grupy B do linii tkankowej HT-29 niż do A-431 ($p=0,0005$) (Ryc. 16-21).



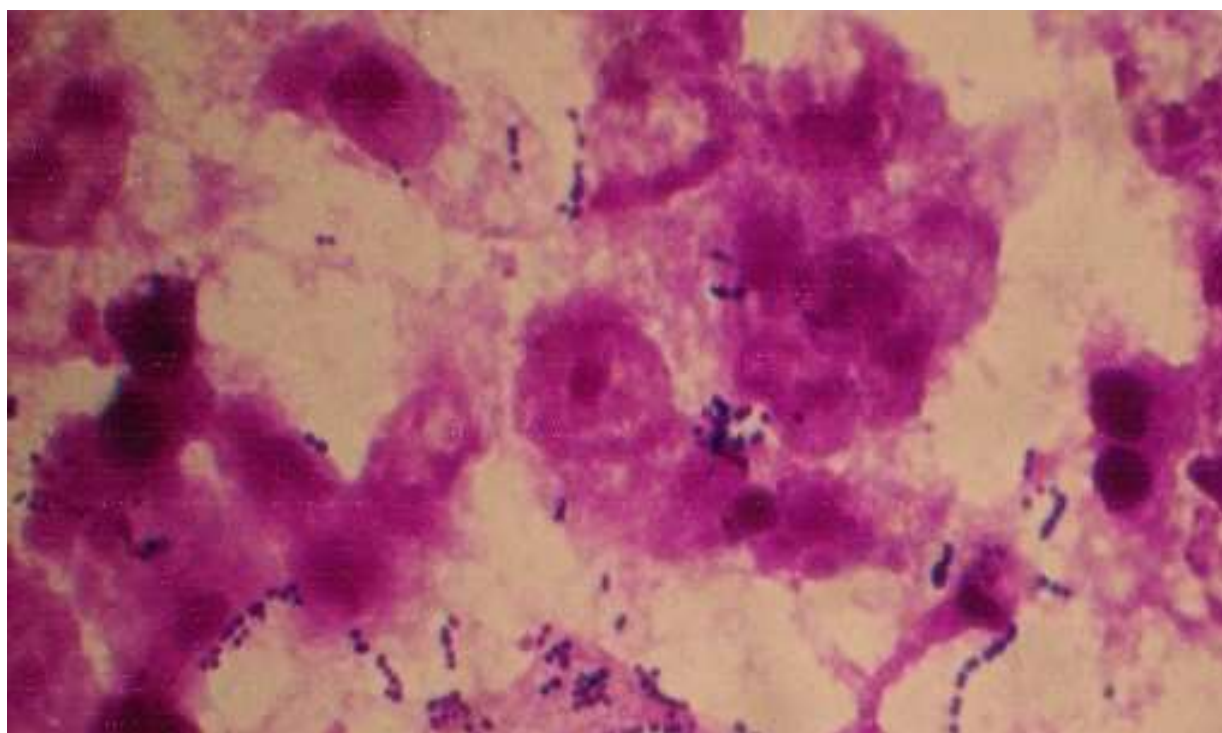
Ryc. 16. Adherencja szczepu *S. agalactiae* o symbolu K-A17 (serotyp V, gen alp2) do komórek linii tkankowej A-431.



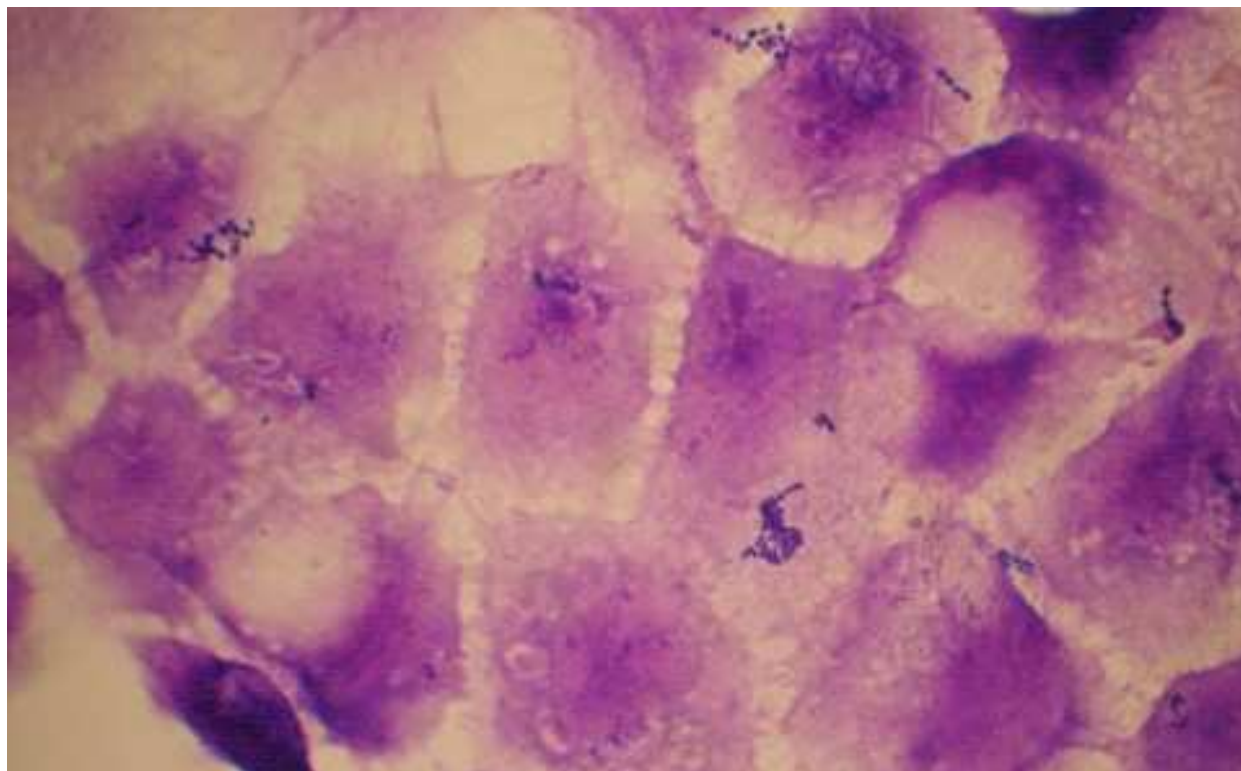
Ryc. 17. Adherencja szczepu *S. agalactiae* o symbolu K-A17 (serotyp V, gen alp2) do komórek linii tkankowej HT-29.



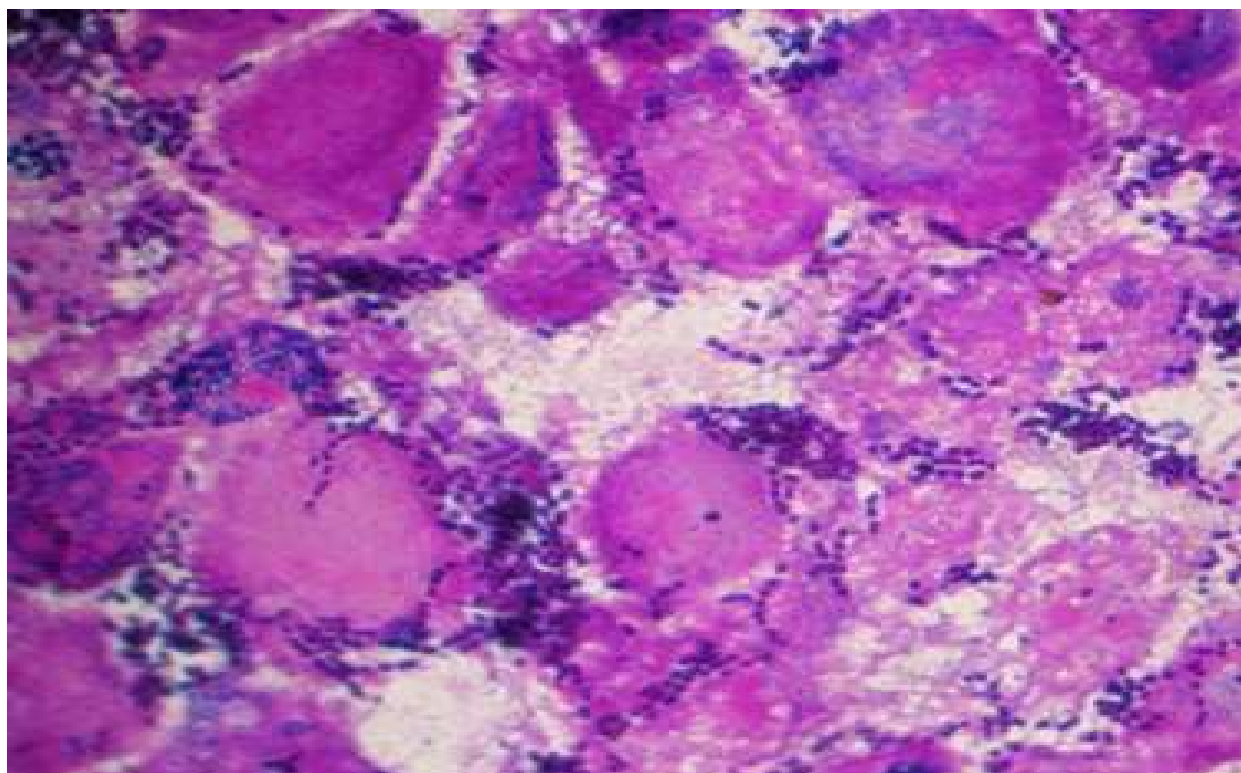
Ryc. 18. Adherencja szczepu *S. agalactiae* o symbolu K-A6 (serotyp Ia, gen *epsilon*) do komórek linii tkankowej A-431.



Ryc. 19. Adherencja szczepu *S. agalactiae* o symbolu K-A6 (serotyp Ia, gen *epsilon*) do komórek linii tkankowej HT-29.



Ryc. 20. Adherencja szczepu wzorcowego *S. agalactiae* BAA-611 (serotyp V, gen *rib*) do komórek linii tkankowej A-431.



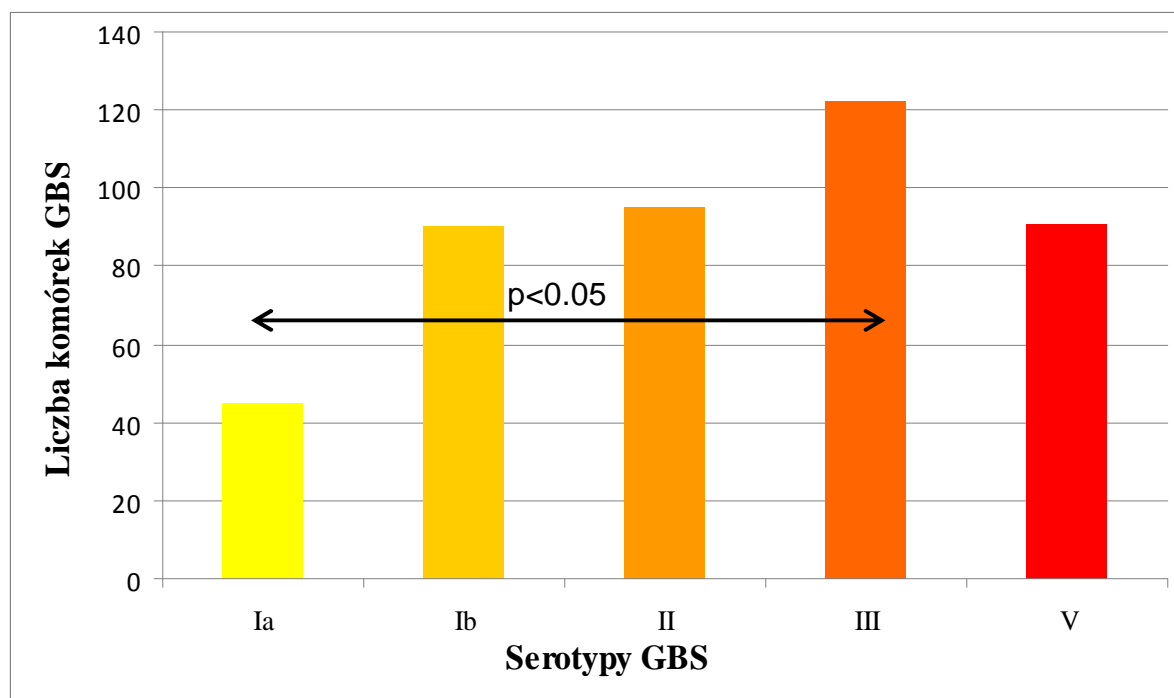
Ryc. 21. Adherencja szczepu wzorcowego *S. agalactiae* BAA-611 (serotyp V, gen *rib*) do komórek linii tkankowej HT-29.

IV.5.1 Zależność adherencji GBS do komórek linii tkankowych A-431 i HT-29 od serotypu

Wykazano istotne statystycznie różnice w adherencji pomiędzy szczepami GBS z serotypów II ($p=0,0462$) oraz III ($p=0,0270$) do linii tkankowych A-431 oraz HT-29.

Adherencja szczepów GBS do komórek linii A-431 była zależna od serotypu ($p=0,0355$). Najsilniej do komórek tej linii tkankowej adherowały szczepy GBS z serotypu III w przeciwieństwie do izolatów GBS należących do serotypu Ia, które adherowały najslabiej. Różnica w adherencji pomiędzy szczepami z tych serotypów była istotna statystycznie ($p<0,05$) (Rycina 22).

Przyleganie bakterii z gatunku *S. agalactiae* do linii tkankowej HT-29 nie było zależne od serotypu szczepów GBS.



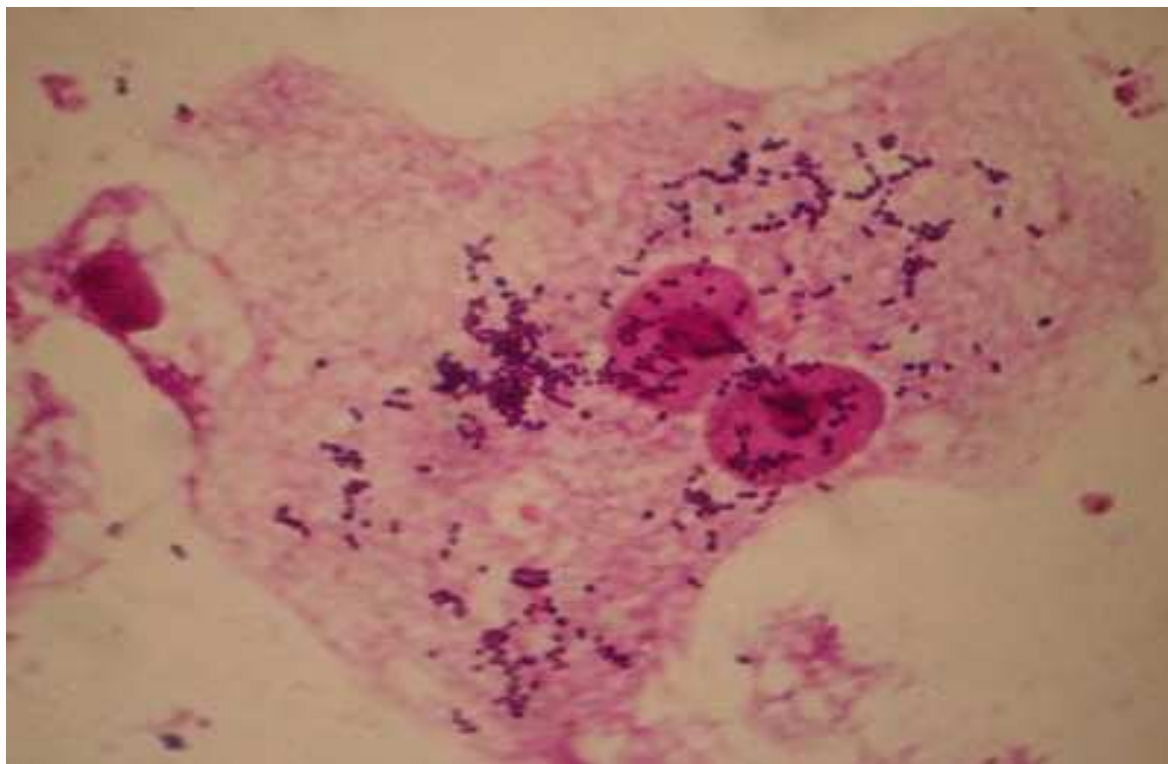
Ryc. 22. Porównanie adherencji GBS z poszczególnych serotypów do komórek linii tkankowej A-431.

IV.5.2 Zależność adherencji GBS do komórek linii tkankowych A-431 oraz HT-29 od genów białek z klasy Alp

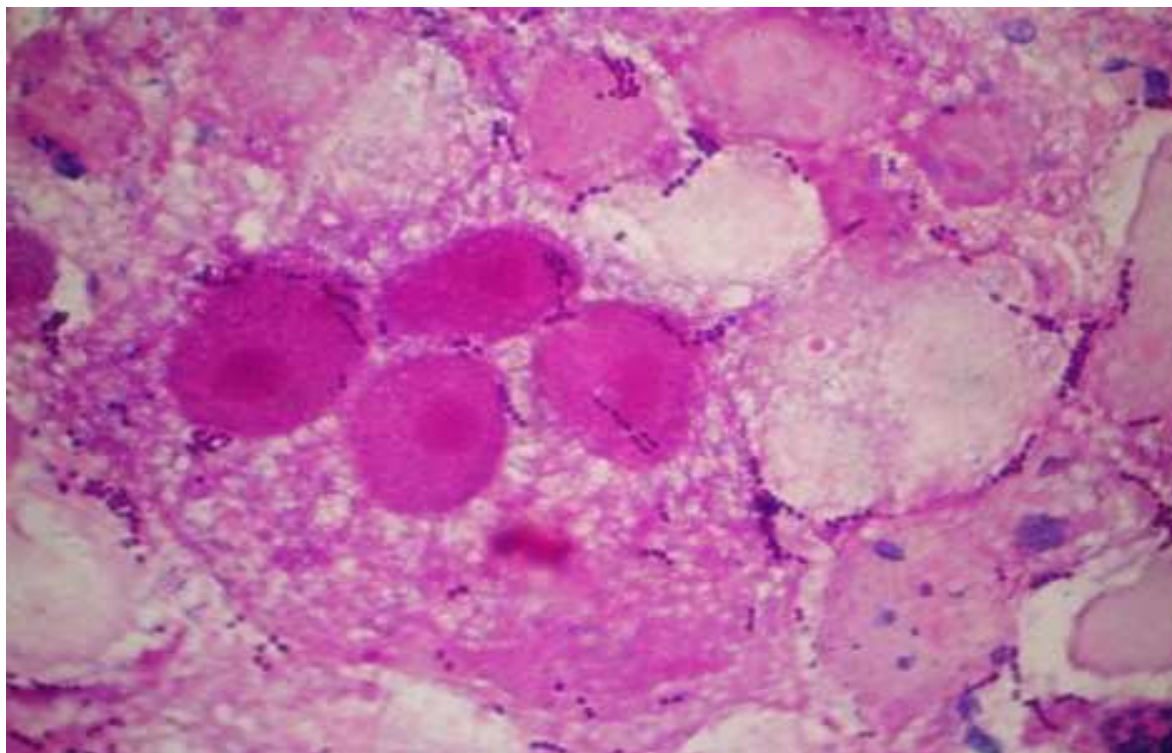
Szczepy GBS z genem *rib* różniły się pod względem zdolności przylegania do komórek linii tkankowych A-431 i HT-29 od szczepów GBS z genami *alp2*, *alp3*, *bca* i *epsilon* ($p=0,0102$) (Ryc. 23; Ryc. 24)

Adherencja bakterii z gatunku *S. agalactiae* do linii komórkowej A-431 była zależna od genów białek z klasy Alp ($p=0,0013$). GBS z genami *alp2* oraz *rib* w większej liczbie adherowały do linii A-431, w przeciwieństwie do szczepów GBS z genem *alp3*.

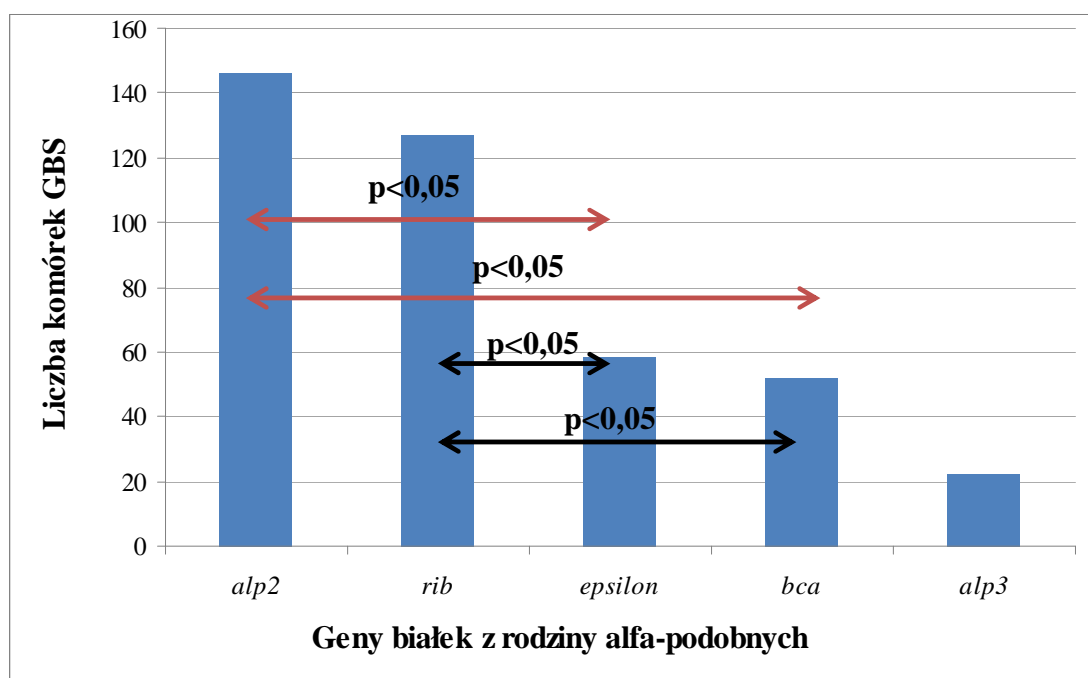
Istotne statystycznie różnice zaobserwowano również w adherencji pomiędzy szczepami GBS z różnymi genami białek z klasy Alp do linii tkankowej HT-29 ($p=0,0373$). Bakterie GBS z genami *alp2* i *rib* w większej liczbie przylegały do komórek linii tkankowej HT-29 niż izolaty GBS z genami *epsilon* oraz *bca* ($p<0,05$) (Ryc. 25).



Ryc. 23. Adherencja szczepu GBS o symbolu K-A2 (serotyp III, gen *rib*) do komórek linii tkankowej HT-29.



Ryc. 24. Adherencja szczepu GBS o symbolu N-B4 (serotyp III, gen *rib*) do komórek linii tkankowej HT-29.



Ryc. 25. Porównanie GBS pod względem adherencji do komórek linii komórkowej HT-29 zależnej od obecności genu białek powierzchniowych z klasy Alp.

IV.5.3 Porównanie adherencji szczepów GBS pomiędzy grupami K i N oraz pomiędzy grupami IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB

GBS z grupy K w większej liczbie adherowały do komórek linii tkankowej HT-29 niż do komórek linii tkankowej A-431 ($p=0,0171$). Nie zaobserwowano podobnej zależności wśród szczepów GBS zaliczanych do grupy N.

Adherencja szczepów GBS izolowanych od kobiet do linii komórkowej A-431 oraz HT-29 była zależna od genów białek powierzchniowych GBS z klasy Alp (wartość p dla linii tkankowych wynosiła odpowiednio 0,0060 oraz 0,0068), ale nie zależała od serotypu GBS. Izolaty GBS z genem *rib* adherowały silniej do komórek obu linii w porównaniu do pozostałych szczepów. Różnicę istotną statystycznie zanotowano pomiędzy szczepami z genem *rib* oraz szczepami z genami *epsilon* i *bca* ($p<0,05$).

Liczba komórek bakteryjnych GBS izolowanych od noworodków adherujących do linii tkankowej A-431 zależała od genu białek z klasy Alp ($p=0,0188$), natomiast nie zależała od ich serotypu. Zupełnie odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku adherencji GBS do linii HT-29. Przyleganie GBS z grupy N do linii HT-29 było zależne od serotypu szczepów ($p=0,0348$) natomiast nie zależało od genów białek z klasy Alp. Spośród izolatów GBS najsilniej do komórek linii A-431 adherowały szczepy z genem *rib*, natomiast do komórek linii HT-29 szczepy z serotypu Ib.

Nie odnotowano różnic w adherencji do linii komórkowych A-431 i HT-29 pomiędzy szczepami GBS z grup IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB.

V. DYSKUSJA

Paciorkowce grupy B z gatunku *Streptococcus agalactiae* są izolowane od kobiet z pochwy oraz odbytu, a częstość kolonizacji może wynosić nawet 40% w zależności od badanej populacji, liczby pobieranych wymazów, miejsca ich pobrania, a także metod hodowli drobnoustroju (Meyn i wsp., 2009). Dane epidemiologiczne wskazują, że u 10-30% zdrowych kobiet w ciąży stwierdza się kolonizację GBS. *S. agalactiae* stanowi zagrożenie przede wszystkim dla płodu i noworodka. Do kolonizacji dziecka może dochodzić głównie podczas porodu. Dane epidemiologiczne uzyskane przez zespół Katedry Mikrobiologii UJ CM wskazują na znaczny odsetek kolonizacji wśród noworodków urodzonych zarówno przez kobiety zdrowe jak i kobiety z ciążą wysokiego ryzyka wynoszący odpowiednio 26,7% i 36% (Brzychczy-Włoch i wsp., 2008). Ze względu na duży problem jaki stanowi narastanie nosicielstwa GBS wśród kobiet ciężarnych, związane z tym ryzyko kolonizacji noworodków i wystąpienia u nich zakażeń paciorkowcowych oraz dodatkowo narastanie lekooporności wśród szczepów GBS na stosowane antybiotyki, zasadnym było scharakteryzowanie wybranych izolatów GBS. W niniejszej pracy podjęto próbę fenotypowej oraz genotypowej charakterystyki izolatów GBS pod względem występowania polisacharydów powierzchniowych, ich genów oraz genów białek powierzchniowych z klasy Alp. Oceniono także wrażliwość wybranych izolatów GBS na działanie antagonistyczne szczepów bakterii kwasu mlekowego izolowanych z pochwy oraz szczepów wzorcowych LAB syntetyzujących i wydzielających bakteriocyny. Ostatni cel pracy stanowiła ocena adherencji badanych szczepów GBS do komórek linii A-431 i HT-29.

Występowanie serotypów GBS jest zależne od czasu, regionu geograficznego, od badanej populacji itd. Serotypem najczęściej występującym, odpowiedzialnym za zakażenia noworodków jest serotyp III a następnie V i Ia (Lin i wsp., 1998).

Przynależność badanych szczepów GBS do serotypów Ia, Ib, II-VIII określono początkowo za pomocą metody lateksowej. Uzyskane wyniki zweryfikowano posługując się metodą multipleks PCR. Metoda multipleks PCR potwierdziła wyniki oznaczenia serotypów metodą lateksową dla 85 szczepów GBS na 99 badanych oraz umożliwiła klasyfikację wszystkich zebranych szczepów do serotypów. Trudności w oznaczeniu serotypów GBS metodą serologiczną oraz ich sprawdzanie metodą multipleks PCR zostały również opisane

przez Poyart i wsp. (2007). W tej pracy 397 szczepów GBS na 426 badanych pod względem przynależności do poszczególnych serotypów zaklasyfikowano za pomocą metody lateksowej. Metoda multipleks PCR potwierdziła uzyskane metodą lateksową wyniki w przypadku 394 szczepów GBS oraz umożliwiła klasyfikację 425 szczepów GBS na 426 badanych. Innymi metodami również skutecznymi w serotypowaniu GBS są zmodyfikowane metody serologiczne oraz metody molekularne (mPCR/RLB, PFGE, MLST) zaproponowane przez Benson i wsp. (2002), Ramaswamy i wsp. (2006) oraz Kong i wsp. (2008).

Wśród badanych 99 izolatów GBS nie stwierdzono obecności szczepów z serotypów IV, VII oraz VIII. Również w pracy Brzychczy-Włoch i wsp. (2009) nie opisano występowania szczepów paciorkowców z gatunku *S. agalactiae* z serotypów od IV do VIII. Prawdopodobnie jest to spowodowane charakterystycznym występowaniem izolatów GBS zależnym od regionu geograficznego (Lachenauer i wsp., 1999). Z kolei Poyart i wsp. (2007) w kolekcji 426 szczepów zebranych na terenie Francji, stwierdzili obecność tylko trzech szczepów GBS z serotypów VI, VII oraz VIII. Może to wynikać ze znacznie liczniejszej grupy badanej szczepów GBS (n=426) w porównaniu do charakteryzowanej w niniejszej rozprawie doktorskiej (n=99). Można również spekulować, że te szczepy zostały wyizolowane od pacjentów z innych ras, czy też osób przybyłych do Francji z innych obszarów geograficznych.

Slotved i wsp. (2007) opisali istnienie serotypu IX GBS. Ten fakt może wyjaśniać brak możliwości oznaczenia serotypów GBS we wcześniej przeprowadzanych przez zespoły naukowców badaniach również przy zastosowaniu metod molekularnych. Imperi i wsp. (2010) zaproponowali udoskonaloną reakcję multipleks PCR w porównaniu do wybranej w pracy doktorskiej, dzięki której możliwa jest detekcja genów *cps* wszystkich obecnie opisywanych polisacharydów powierzchniowych (począwszy od Ia do IX).

Białka GBS z klasy Alp pełnią znaczącą rolę m. in. w adherencji bakterii do nabłonka gospodarza, inwazji, dodatkowo charakteryzują się silną immunogennością. Dlatego podjęto próby detekcji genów białek z klasy Alp wśród badanych izolatów GBS.

Geny białek powierzchniowych 99 zebranych szczepów GBS z klasy Alp zostały oznaczone za pomocą metody multipleks PCR. Nie napotkano na trudności w uzyskaniu wyników oraz ich interpretacji stosując wybraną metodę. W pracy nie zaplanowano oznaczenia białek powierzchniowych z klasy Alp. Decyzja o rezygnacji z tego typu badania była związana z opisywanymi w literaturze problemami napotykanymi przy zastosowaniu serologicznych metod oznaczenia tych białek. Trudności te wynikały z reagowania szczepów GBS posiadających różne białka z klasy Alp z tą samą surowicą diagnostyczną,

a tym samym wysoką częstość reakcji krzyżowych (Maeland i wsp., 2004). Przykład mogą stanowić opisywane przez Peerson i wsp. (2007) zachodzące reakcje krzyżowe pomiędzy szczepami GBS z białkami Rib i Alp3, które wynikały z obecności u obu tych białek tej samej determinanty antygenowej.

Podobnie jak Peerson i wsp. (2007) w niniejszej pracy zaobserwowano powiązanie pomiędzy występowaniem określonych serotypów GBS oraz białkami z klasy Alp i/lub ich genów. Współzależność ta nie jest ostateczna, co oznacza, że w poszczególnych serotypach GBS dane białka i ich geny występują znacznie częściej niż w innych serotypach, ale ich występowanie nie jest charakterystyczne tylko i wyłącznie dla jednego serotypu. Zaobserwowane zależności dotyczyły współwystępowania serotypu Ia oraz genu *epsilon*, serotypów Ia, Ib i II oraz genu *bca*, serotypu III i genów *alp2* i *rib*, serotypu IV i genu *epsilon*. Poza tym jest możliwa współzależność pomiędzy białkiem Alp2 (gen *alp2*) oraz serotypem VIII oraz Alp3 (gen *alp3*) z serotypem VII i VIII (Creti i wsp., 2004).

Metoda multipleks PCR służąca zarówno do detekcji genów polisacharydów powierzchniowych *cps* oraz genów białek powierzchniowych z klasy Alp charakteryzuje się wysoką specyficznością i czułością. Poza tym umożliwia uzyskanie informacji, które mogłyby mieć niebagatelne znaczenie m. in. w dochodzeniu epidemiologicznym.

W przypadku kolonizacji pochwy przez *S. agalactiae* u kobiet ciężarnych istnieje ryzyko transmisji drobnoustroju na noworodka wynoszące 70%. Kolonizacja nowo narodzonych dzieci przez GBS wiąże się z możliwością wystąpienia u nich wczesnych lub późnych zakażeń paciorkowcowych, nierzadko zakończonych zgonem (Słomko i wsp., 2001). Istnieje wiele kontrowersji dotyczących eradykacji nosicielstwa *S. agalactiae* u kobiet ciężarnych, gdyż próby jego eliminacji mogą wiązać się z ponowną kolonizacją pochwy przez GBS po zaprzestaniu podawania antybiotyku. Dlatego zgodnie z rekomendacjami CDC (Centres of Disease Control and Prevention) i Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w ramach okołoporodowej profilaktyki zaleca się podawanie przed i w czasie trwania porodu penicyliny G, a w przypadku nadwrażliwości pacjentek na ten lek erytromycyny i klindamycyny (Heczko i wsp., 2008). Jedną z przyczyn niepowodzeń stosowanej antybiotykoterapii jest fakt, iż w ostatnich latach coraz częściej obserwuje się wzrost częstości oporności szczepów GBS na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B w wyniku nabycia przez nie mechanizmu oporności MLSB oraz fenotypu M (Gherardi i wsp., 2007). Dlatego też istotną częścią zaproponowanych badań było oznaczenie mechanizmów oporności zebranych izolatów GBS oraz określenia, czy istnieje zależność pomiędzy występowaniem mechanizmu oporności na antybiotyki, a serotypem.

W niniejszej pracy oznaczono wrażliwość 99 izolatów GBS na klindamycynę (2 µg) i erytromycynę (15µg). Przeważająca liczba szczepów GBS była wrażliwa na wybrane antybiotyki (90 izolatów GBS). Mechanizm oporności MLSB wykazano u 7 szczepów GBS, w tym mechanizm oporności kMLSB u 2 szczepów GBS, natomiast mechanizm oporności iMLSB typu indukcyjnego u 5 izolatów GBS. Fenotyp M oznaczono u dwóch szczepów. Ze względu na niewielką liczbę szczepów GBS z mechanizmem oporności MLSB i fenotypem M oraz brak danych dotyczących występowania genów oporności, których uzyskanie przekraczało założone cele pracy, nie było możliwości poszukiwania powiązań pomiędzy serotypem, a opornością na antybiotyki oraz warunkującymi ją genami *erm* oraz *mef A/E* (Brzychczy-Włoch i wsp., Uh i wsp. 2004). Warto jednak zauważyć, że szczepy GBS z mechanizmem kMLSB należały do serotypów II i III. Wśród szczepów z mechanizmem iMLSB znalazły się izolaty przynależące do serotypów II, III oraz V. Fenotyp M został oznaczony u izolatów z serotypu Ia i III.

Do oceny właściwości antagonistycznych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wobec *S. agalactiae* zostały wybrane szczepy LAB z gatunków najczęściej izolowanych z pochwy (Strus i wsp., 2005; Strus i wsp., 2006). W grupie tej znalazło się 10 szczepów LAB reprezentujących cztery gatunki takie jak *L. gasseri* (n=2), *L. plantarum* (n=3), *L. fermentum* (n=2) oraz *L. rhamnosus* (n=3). W celu kontynuacji badań przeprowadzono próby oceny wrażliwości GBS na działanie hamujące wybranych szczepów wzorcowych LAB produkujących znane i scharakteryzowane bakteriocyny (*Lactobacillus sakei* DSMZ 6333, *Lactococcus lactis* ATCC 11454 oraz *Lactobacillus plantarum* C 11). Dodatkowo dokonano zestawienia i porównania otrzymanych wyników oceny antagonistycznej LAB izolowanych z pochwy oraz wzorcowych szczepów LAB wydzielających bakteriocyny wobec GBS.

Szczepy LAB izolowane z pochwy wykazywały silne działanie antagonistyczne wobec GBS, większe niż to jakie posiadały szczepy wzorcowe LAB produkujące bakteriocyny. Spośród szczepów wzorcowych LAB produkujących peptydy o właściwościach antybakteryjnych silne właściwości hamujące wobec GBS wykazywał szczep *L. plantarum* C11 wyizolowany z kiszonych ogórków. Nie wykazano wrażliwości badanych szczepów GBS na działanie antybakteryjne szczepu *L. sakei* DSMZ 6333 oraz nieznaczną wrażliwość na działanie hamujące *L. lactis* ATCC 11454 również izolowanych z żywności. Potwierdzają to wyniki badań Awaisheh i wsp. (2009). Autorzy porównując właściwości antybakteryjne szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* izolowanych zarówno od człowieka, z żywności oraz fermentowanych warzyw, zaobserwowali zdolność do hamowania wzrostu bakterii wskaźnikowych przez wszystkie analizowane szczepy LAB.

Najsilniejsze właściwości antagonistyczne posiadały jednak szczepy bakterii kwasu mlekowego izolowane od ludzi.

W eksperymencie oceniającym działanie antagonistyczne LAB wobec GBS nie zanotowano spadku liczby LAB izolowanych z pochwy ani szczepów wzorcowych LAB pod wpływem GBS przez cały czas trwania eksperymentu. Podobnie Ocana i wsp. (1999) nie zaobserwowali wpływu hamującego *E. faecalis* wobec *L. salivarius* subsp. *salivarius* CRL 1328. Istnieją jednak doniesienia o hamowaniu wzrostu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* przez paciorkowce czy też enterokoki, a substancjami o aktywności bakteriobójczej syntetyzowanymi przez te bakterie są przypuszczalnie peptydy o charakterze bakteriocyn (Kelly i wsp., 2003; Wescombe i wsp., 2003; Nigutowa i wsp., 2005; Nes i wsp., 2007; Renye i wsp., 2009).

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu wykazano bardzo silną aktywność antagonistyczną szczepów LAB wobec izolatów GBS. Już po czasie 2 godz. od rozpoczęcia eksperymentu w środowisku kilku szczepów *Lactobacillus* wyizolowanych z pochwy zaobserwowano spadek liczby *S. agalactiae* o kilka logarytmów lub całkowitą redukcję populacji GBS. Wybrane szczepy LAB izolowane z pochwy należące do gatunków *L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus* oraz *L. fermentum* wykazywały zróżnicowaną aktywność antagonistyczną wobec GBS. *S. agalactiae* okazuje się być gatunkiem bakterii wrażliwym również na działanie antagonistyczne szczepów innych gatunków LAB niż wytypowane w niniejszej pracy, a również izolowanych z pochwy m. in. *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. crispatus* (Juarez Tomas i wsp., 2003; Ocana i wsp., 1999; Ruiz i wsp., 2009). Atassi i wsp. (2006) oceniając działanie hamujące szczepów LAB pochodzenia pochwowego m. in. należących do gatunków *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. jensenii* oraz *L. delbrueckii* wobec szczepów *Prevotella bivia* i *Gardnerella vaginalis* wykazali zróżnicowaną aktywność poszczególnych szczepów LAB pochodzenia pochwowego. Działanie to różniło się nie tylko pomiędzy gatunkami LAB, ale również pomiędzy szczepami z tego samego gatunku. Wynika z tego, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa bakterii z rodzaju *Lactobacillus* nie jest cechą gatunkową, ale zależną od szczepu.

Aktywność antybakteryjna poszczególnych szczepów LAB była również zależna od szczepu wskaźnikowego. W niniejszej pracy spośród bakterii z rodzaju *Lactobacillus* izolowanych z pochwy ocenianych pod względem właściwości antagonistycznych wobec GBS najsilniejsze działanie hamujące wykazywały szczepy z gatunku *L. plantarum*. Wyniki badań Heng-Yi i wsp. (2008) oraz Huett i wsp. (2006) potwierdzają działanie gatunku

L. plantarum jako silnego inhibitora wzrostu *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus* oraz *P. aeruginosa*.

Szczepy wzorcowe LAB będące producentami bakteriocyn, takie jak *L. sakei* DSMZ 6333, *L. lactis* ATCC 11454 w odróżnieniu od bakterii z rodzaju *Lactobacillus* pochodzenia pochwowego nie wykazywały aktywności antybakteryjnej wobec GBS lub była ona niewielka. Brak właściwości hamującej *L. sakei* DSMZ 6333 produkującego sakacynę mógł być niewątpliwie spowodowany bardzo wąskim spektrum działania wydzielanego przez ten szczep peptydu, ograniczonym głównie do LAB. Przykładowo badania Schillinger i wsp. (1989) oceniające właściwości antagonistyczne szczepu *L. sakei* Lb 706 wydzielającego sakacynę wykazały hamowanie przez ten szczep wzrostu m. in. *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. paramesenteroides*, *E. faecalis* oraz *Listeria monocytogenes*. Szczep *L. sakei* Lb 706 jednak nie był aktywny wobec innych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych np. wobec *Staphylococcus aureus* czy też *Salmonella typhimurium*.

Z kolei szczep wzorcowy *L. lactis* 11454 wydzielający nizynę redukował populację kilku badanych szczepów GBS o 1 logarytm przez cały czas trwania eksperymentu, przy czym roztwór chemicznie czystej nizyny nie posiadał takich właściwości. Mogło to mieć związek z obecnością w hodowli *L. lactis* ATCC 11454 czynników o działaniu antybakteryjnym wobec GBS innych niż nizyna lub działających synergistycznie w stosunku do nizyny.

Spśród wybranych szczepów wzorcowych LAB najsilniejsze działanie antagonistyczne wobec GBS, porównywalne z działaniem szczepów bakterii z gatunku *L. plantarum* izolowanych z pochwy wykazywał *L. plantarum* C 11. Anderssen i wsp. (1998) wykazali zdolność plantarycyn J i K oraz E i F wydzielanych przez szczep *L. plantarum* C11 do hamowania wzrostu szczepów wskaźnikowych m. in. *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus viridescens*. Również właściwości antagonistyczne wobec drobnoustrojów wykazuje plantarycyna A. Dlatego zarówno oddziaływanie pomiędzy plantarycynami J i K oraz E i F, ale również pomiędzy plantarycynami J, K i plantarycyną A oraz plantarycynami E, F i plantarycyną A ma charakter synergistyczny potęgujący ich działanie antybakteryjne (Anderssen i wsp., 1998; Kristiansen i wsp., 2005; Moll i wsp., 1999). Uzyskane wyniki własne podobnie jak wyniki innych autorów sugerują, że silne właściwości szczepów *L. plantarum* izolowanych z pochwy polegające na hamowaniu wzrostu drobnoustrojów są wypadkowym efektem działania różnych mechanizmów, wśród których decydujące znaczenie może mieć zdolność produkcji bakteriocyn lub substancji

o charakterze bakteriocyn (BLIS).

Silna aktywność antybakteryjna szczepów *Lactobacillus* przypisywana jest również innym substancjom np. nadtlenu wodoru, kwasowi mlekowemu, kwasowi octowemu, czy też niskiemu pH środowiska (Niku-Paavola i wsp., 1999; Kaushik i wsp., 2009). Matu i wsp. (2009) oceniali działanie antagonistyczne szczepów LAB izolowanych z pochwy wobec bakterii będących czynnikami etiologicznymi bakteryjnej waginozy. Za aktywność LAB w przeprowadzonych eksperymentach odpowiedzialne były kwas mlekowy, nadtlenek wodoru, a także bakteriocyny. Atassi i wsp. (2010) wykazali silniejszą aktywność czystego chemicznie kwasu mlekowego wobec patogenów przewodu pokarmowego oraz układu moczowo-płciowego w stężeniach wyższych niż te, które są oznaczane w 24 godzinnych płynnych hodowlach LAB. Za najbardziej znaczące metabolity LAB o aktywności bójczej w eksperymencie uznano nadtlenek wodoru oraz termostabilne peptydy. Kaewsrichan i wsp. (2006) działanie antagonistyczne szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wobec szczepów *G. vaginalis*, *E. coli* oraz *C. albicans* przypisali związkowi o charakterze bakteriocyn oraz nadtlenu wodoru, przy czym nadtlenek wodoru nie był aktywny wobec *C. albicans*. Z kolei w eksperymentach przeprowadzonych w Katedrze Mikrobiologii UJ CM przez Strus i wsp. (2005), w których porównywano zdolność zahamowania wzrostu grzybów z rodzaju *Candida* przez wybrane gatunki LAB (m. in. *L. plantarum*) oraz roztwory czystych chemicznie produktów metabolizmu tych bakterii (nadtlenek wodoru, kwas mlekowy), wykazano słabą aktywność kwasu mlekowego i nadtlenu wodoru wobec grzybów w stosunku do silnej aktywności hamującej płynnych hodowli LAB.

W opisanym w niniejszej pracy doktorskiej eksperymencie w 24-godzinnych hodowlach wybranych szczepów LAB były nagromadzone przez okres inkubacji produkty metabolizmu bakterii. Dodatkowo przez cały czas trwania eksperymentu syntezowane i wydzielane były związki o charakterze antybakteryjnym. Obecnością metabolitów, w tym również bakteriocyn oraz związków bakteriocyno-podobnych w hodowlach 24-godzinnych szczepów LAB izolowanych z pochwy (głównie *L. plantarum*) oraz *L. plantarum* C 11 można tłumaczyć silne właściwości hamujące wzrost GBS już po 2 godz. trwania eksperymentu. Zachowanie beztlenowych warunków hodowli wpływało niewątpliwie na ograniczenie produkcji przez szczepy LAB nadtlenu wodoru oraz kwasu mlekowego (Schillinger i wsp., 1989).

Wrażliwość GBS z poszczególnych serotypów na działanie hamujące LAB była niewątpliwie związana z różnicami w budowie ściany komórkowej GBS

charakterystycznymi dla danego serotypu. Szczepy GBS należące do serotypu III są najczęściej izolowanymi oraz wywołującymi zakażenia noworodków. Może to wiązać się także z istnieniem specyficznych mechanizmów ewazji oraz odpornością na oddziaływanie antybakteryjne szczepów m. in. LAB kolonizujących te same nisze ekologiczne organizmu człowieka. Z kolei obiecujące są wyniki wskazujące na znaczną wrażliwość szczepów GBS z serotypu V opisywanego coraz częściej jako czynnik zakażeń zwłaszcza w grupie dorosłych pacjentów na działanie antagonistyczne LAB pochodzenia pochwowego.

Przebadano adherencję wybranych 26 izolatów GBS do linii tkankowych A-431 oraz HT-29, które przeanalizowano pod względem wrażliwości na działanie hamujące wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Do badania włączono również szczepy wzorcowe *S. agalactiae* DSMZ 2134, *S. agalactiae* ATCC 12403 oraz *S. agalactiae* BAA-611.

Większa zdolność adherencji badanych szczepów *S. agalactiae* do linii tkankowej HT-29 w porównaniu do A-431, może wynikać z różnic w budowie oraz w obecności adhezyn pomiędzy tymi dwoma liniami tkankowymi. Silniejszą adherencję GBS do linii tkankowej HT-29 można również tłumaczyć tym, że GBS kolonizuje głównie dolny odcinek przewodu pokarmowego, a kolonizacja pochwy jest następstwem tego procesu.

Różnice w przyleganiu GBS do linii tkankowych A-431 i HT-29 były również zależne od serotypu. Najsilniej do komórek linii tkankowych przylegały szczepy GBS z serotypów III oraz II. Szczepy GBS z serotypu III, zwłaszcza należące do RDP (ang. restriction digested pattern, RDP) typu III-3, który jest najczęściej izolowany z zakażeń noworodków może posiadać dodatkowe glikozylowane białka o funkcji adhezyn, co tłumaczyłoby większą zdolność do adherencji tego serotypu GBS (Seifert i wsp., 2006). Mikamo i wsp. (2001) porównując izolaty GBS serotypów III i VIII pochodzenia pochwowego oraz z zakażeń noworodków, wykazali różnice zależne od serotypu w zdolności do adherowania do komórek linii raka płuca A-549. Szczepy GBS należące do serotypu VIII adherowały silniej do ludzkich komórek linii raka płuca A 549 niż izolaty GBS z serotypu III. Zawaneh i wsp. (1979) badając adherencję izolatów GBS należących do serotypów Ia, Ib, II, III do komórek nabłonka pochwy uzyskanego od pacjentek, od których wyizolowano szczepy GBS, nie uzyskali statystycznie znamiennej różnicy w przyleganiu GBS z poszczególnych serotypów. W związku z tym za adherencję GBS do komórek nabłonka odpowiadają z pewnością receptory białkowe, a nie polisacharydy CPS. Duże znaczenie w tym procesie może mieć również znaczenie miejsce izolacji szczepu. Mikamo i wsp. (2004) wykazali istotne różnice w przyleganiu do linii tkankowej A 549 pomiędzy szczepami GBS z serotypu VIII izolowanymi z pochwy, a szczepami

izolowanymi z zakażeń noworodków. Nie zanotowano takiej zależności pomiędzy szczepami GBS z serotypu III izolowanymi zarówno z pochwy jak i z zakażeń noworodków.

VI. WNIOSKI

1. W analizowanej kolekcji 99 izolatów GBS dominował serotyp III. W kolejności malejącej oznaczono obecność następujących serotypów: Ia, II, V, Ib i IV.
2. Najczęściej oznaczanym genem spośród genów białek z klasy Alp był gen *alp2*, a następnie geny *epsilon*, *bca*, *rib* oraz *alp3*.
3. Zaobserwowano zależność pomiędzy serotypem GBS, a genami białek z klasy Alp. Zależność ta występowała pomiędzy serotypem Ia, a genem *epsilon*, serotypami Ib oraz II i genem *bca*, serotypem III, a genami *alp2* i *rib* oraz serotypem IV i genem *epsilon*.
4. Wszystkie szczepy LAB należące do gatunków *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* oraz *L. fermentum* izolowane z pochwy wykazywały działanie hamujące wzrost GBS, a najsilniejsze właściwości antagonistyczne wykazywały szczepy LAB z gatunku *L. plantarum*. Spośród trzech szczepów wzorcowych wyizolowanych z żywności, produkujących bakteriocyny wybranych do eksperymentu, jedynie *L. plantarum* C 11 hamował wzrost GBS, przy czym było to słabsze działanie hamujące w porównaniu do szczepów *L. plantarum* izolowanych z pochwy.
5. Wrażliwość paciorkowców z grupy B na działanie antagonistyczne LAB zależała od serotypu. Najmniej wrażliwe na działanie antagonistyczne LAB izolowanych z pochwy były szczepy GBS z serotypów Ia i III. Z kolei najmniejszą wrażliwość na działanie antybakteryjne szczepów wzorcowych LAB wykazywały izolaty GBS z serotypu Ib oraz III.
6. Wrażliwość szczepów GBS na działanie antagonistyczne LAB izolowanych z pochwy zależała od genów białek z klasy Alp, natomiast wrażliwość GBS na działanie antagonistyczne szczepów wzorcowych LAB nie była zależna od genów tych białek. Najmniejszy spadek liczebności GBS pod wpływem działania antagonistycznego szczepów LAB został zaobserwowany u izolatów GBS z genem *alp2*.
7. Nie stwierdzono różnic we wrażliwości na działanie hamujące LAB pomiędzy szczepami GBS izolowanymi od kobiet (grupa K) i izolowanymi od noworodków (grupa N). Różnice we wrażliwości GBS na działanie antagonistyczne zanotowano

pomiędzy mniejszymi liczebnie grupami GBS wyodrębnionymi na podstawie miejsca ich izolacji (grupy IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB).

8. Wśród przebadanych izolatów GBS nie było szczepów opornych na działanie LAB.
9. Szczepy GBS silniej adherowały do komórek linii tkankowej HT-29 niż do komórek linii tkankowej A-431. Adherencja szczepów GBS do komórek linii tkankowej A-431 była zależna zarówno od serotypu GBS jak i genów białek z klasy Alp. Najsilniej do linii komórkowej A-431 przylegały szczepy GBS z serotypu III. Adherencja GBS do komórek linii tkankowej HT-29 zależała jedynie od genów białek z klasy Alp. Najsilniej do komórek obu linii tkankowych przylegały szczepy GBS z genami *rib* i *alp2*. Adherencja szczepów GBS z genem *rib* różniła się istotnie statystycznie od przylegania szczepów GBS z innymi genami białek z klasy Alp.

VII. STRESZCZENIE

Na początku lat sześćdziesiątych XX w. zaczęto notować narastanie liczby zakażeń noworodków spowodowanych przez *Streptococcus agalactiae* (ang. Group B Streptococcus GBS). Liczne działania zapobiegawcze polegające m. in. na wprowadzeniu w latach dziewięćdziesiątych XX w. zaleceń CDC (Center for Disease Control and Prevention) w Stanach Zjednoczonych, a następnie w innych krajach, również w Polsce, znacznie obniżyły częstość zakażeń noworodków o etiologii *S. agalactiae*. W związku ze stosowaną antybiotykoprofilaktyką zgodnie z obowiązującymi rekomendacjami CDC pojawił się problem narastającej oporności szczepów GBS na stosowane antybiotyki. Niniejsza praca miała na celu szczegółową charakterystykę szczepów GBS, dzięki której zostały zebrane informacje o budowie antygenowej *S. agalactiae*, a także o interakcjach z komórkami organizmu gospodarza oraz z bakteriami kwasu mlekowego, z którymi GBS wchodzi w skład flory pochwy.

Charakterystyce poddano szczepy GBS (n=99) izolowane zarówno od kobiet skolonizowanych, od kobiet z klinicznymi objawami stanu zapalnego pochwy, jak i od kobiet ciężarnych rutynowo badanych w kierunku nosicielstwa GBS. Pozostałe izolaty pochodziły od noworodków, które z różnych przyczyn zostały przyjęte na oddział noworodkowy, a także od noworodków skolonizowanych GBS bez objawów zakażenia.

Charakterystyka fenotypowa oraz genotypowa *S. agalactiae* polegała na oznaczeniu serotypów GBS metodą serologiczną, detekcji genów kodujących poszczególne polisacharydy powierzchniowe (*cps*) oraz detekcji genów kodujących białka z klasy Alp (geny *bca*, *epsilon*, *alp2*, *alp3*, *alp4*, oraz *rib*) przy użyciu reakcji multipleks PCR. Przeprowadzono również ocenę lekooporności szczepów GBS na erytromycynę i klindamycynę w celu określenia mechanizmów oporności MLSB typu konstytutywnego lub indukcyjnego, czy też fenotypu M. Kolejną część pracy doktorskiej dotyczyła oceny wrażliwości badanych izolatów GBS na działanie wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego (ang. lactic acid bacteria, LAB) produkujących bakteriocyny (*Lactococcus lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus plantarum* C11, *Lactobacillus sakei* DSMZ 6333) oraz stanowiących podstawowy składnik flory fizjologicznej dróg rodnych (*L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*). Eksperyment został wykonany w mieszaninach płynnych, 24-godzinnych hodowli LAB oraz GBS i oznaczony ilościową metodą seryjnych

rozcieńczeń. Dodatkowo w ramach niniejszej pracy została oceniona adherencja wybranych izolatów GBS do komórek linii raka nabłonkowego pochwy A-431 oraz komórek linii gruczolakoraka okrężnicy HT-29.

W zebranej kolekcji izolatów GBS większość szczepów należała do serotypu III oraz posiadała gen *alp2*. W obrębie badanych 99 szczepów GBS, 90 było wrażliwych na zastosowane antybiotyki. Stwierdzono 7 szczepów GBS z mechanizmem MLSB oraz dwa szczepy z fenotypem M.

Uzyskane wyniki oceny antagonizmu LAB wobec GBS wskazują na silne antagonistyczne oddziaływanie bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy gatunkami bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w działaniu hamującym wobec wybranych izolatów GBS. Najsilniejsze właściwości hamujące wobec GBS wykazywały szczepy bakterii z gatunku *L. plantarum*. Spośród szczepów wzorcowych LAB produkujących bakteriocyny najsilniejsze właściwości hamujące wzrost GBS wykazywał szczep *L. plantarum* C 11. Z kolei szczepy wzorcowe *L. sakei* DSMZ 6333 oraz *L. lactis* ATCC 11454 nie wykazywały zdolności do redukcji populacji GBS, lub była ona niewielka. Analiza wyników eksperymentu wykazała zależność wrażliwości GBS na działanie antagonistyczne LAB od serotypów GBS oraz genów białek powierzchniowych z klasy Alp.

Adherencja izolatów GBS do linii komórkowej HT-29 i do linii A-431 różniła się istotnie statystycznie. Adherencja GBS do komórek obu linii tkankowych była zależna od genów białek z klasy Alp, ale tylko w przypadku linii komórkowej A-431 również od serotypu. Szczepy GBS z serotypu III adherowały najsilniej do komórek linii tkankowej A-431. Najsilniej do komórek obu linii tkankowych przylegały szczepy GBS z genami *rib* i *alp2*. Adherencja szczepów GBS z genem *rib* różniła się istotnie statystycznie od przylegania szczepów GBS z innymi genami białek z klasy Alp.

Podsumowując, uzyskane wyniki w przyszłości mogłyby być pomocne w poszukiwaniu alternatywnych sposobów eliminacji nosicielstwa GBS u kobiet ciężarnych.

VIII. SUMMARY

Since the early 1960s, infections caused by *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus, GBS) are recorded more often. Numerous precautions are undertaken to prevent infections caused by GBS in newborns. The introduction of CDC recommendations in the United States in the 1990s and then in other countries, also in Poland, successfully decreased infections in newborns. Unfortunately, the prevalence of GBS resistance to erythromycin and clindamycin used in intrapartum antibiotic prophylaxis is still increasing. The aim of the present Ph.D. dissertation was to characterize GBS isolates. The information about GBS capsular antigens, interactions with host cells and interactions with LAB (Lactic Acid Bacteria) that was gathered may be useful in the future to research alternative methods of eliminating vaginal GBS colonization in pregnant women.

Tested GBS strains (n=99) from colonized women, women with clinical symptoms of vaginitis, pregnant women screened according to the CDC recommendations as well as infected and colonized newborns were isolated.

The phenotypic and genotypic characteristic of GBS involved marking serotypes with the use of GBS serotyping kit, and also detecting capsular polysaccharides genes *cps* and alpha-like protein genes (*bca*, *alp1*, *alp2*, *alp3*, *alp4* and *rib*) by employing multiplex PCR reactions. The disc diffusion method was used to analyze incidences of erythromycin and clindamycin resistance among GBS strains. The next aim of the doctoral dissertation was to assess the sensitivity of GBS strains to the antagonistic activity of chosen LAB strains originating from the vagina of healthy women (*L. plantarum* (n=3), *L. fermentum* (n=2), *L. gasseri* (n=2), *L. rhamnosus* (n=2)) and producing bacteriocins such as *L. plantarum* C11, *L. sakei* DSMZ 6333, *L. lactis* ATCC 11454. Antagonism between LAB and GBS was tested in a mixture of fluid 24h cultures and the results were determined quantitatively by the method of serial dilutions. An assessment of the adhesion of chosen GBS strains to the human colon adenocarcinoma cell line (HT-29) and human epidermoid vulvo-vaginal cells (A-431) in relation to capsular polysaccharides of GBS and alpha-like protein genes in the conventional adherence assay was determined.

In the collection of GBS isolates, the majority of strains belonged to serotype III and possessed *alp2* gene. Most of GBS strains (n=90) were susceptible to the antibiotics used. 7 GBS strains possessed MLSB mechanism and 2 GBS isolates possessed M phenotype.

Most of the investigated LAB strains had an ability to inhibit the growth of GBS. Statistically significant relationship was confirmed for LAB strains originating from the vagina. *L. plantarum* strains were the most effective LAB strains isolated from vagina inhibiting GBS. *L. plantarum* C 11 standard strain showed the strongest antagonistic property against GBS out of the other standard strains of LAB. The standard strains isolated from food, such as *L. sakei* DSMZ 6333 and *L. lactis* ATCC 11454 did not show any antimicrobial activity against GBS strains. Statistically significant dependence was confirmed for sensitivity of GBS serotypes and GBS alpha-like protein genes to the antagonistic activity of LAB.

The adherence of GBS strains to HT-29 cell line was significantly higher than to A-431 cell line. The adherence of GBS strains to A-431 depended on both their serotype and alpha-like protein genes. Serotype III adhered to A-431 cells the strongest, especially the strains containing *rib* and *alp2* genes. Adhesion of GBS strains to HT-29 depended on alpha-like protein genes only. The GBS strains containing *rib* and *alp2* genes were the most adhesive. GBS strains containing the *rib* gene adhered to HT-29 and A-431 cell lines more strongly than GBS strains possessing other alpha-like protein genes.

IX. WYKAZ ZAŁĄCZNIKÓW

IX.1 Wykaz rycin

- Rycina 1** Pozytywny wynik testu CAMP.
- Rycina 2** Drzewo filogenetyczne bakterii kwasu mlekowego LAB uwzględniające bakterie tlenowe oraz względnie beztlenowe bakterie Gram-dodatnie z typu *Clostridium* (zawartość par G-C < 50 mol%) (Salminen i wsp., 1998).
- Rycina 3** Warianty hodowli szczepów wzorcowych LAB zastosowane we wstępnej ocenie ich właściwości antagonistycznych wobec szczepów GBS.
- Rycina 4** Produkty amplifikacji PCR otrzymane z wykorzystaniem starterów dla poszczególnych serotypów GBS (IaF, IaR, IbF, IbR, IIF, IIR, IIIF, IIIR, IVF, IVR). Ścieżki od lewej: I-X szczepy GBS z poszczególnych serotypów Ia, Ib-IV, XI-próba negatywna, XII-próba pozytywna, M- marker wielkości 100-2500 pz).
- Rycina 5** Produkty amplifikacji PCR otrzymane z wykorzystaniem starterów dla poszczególnych białek powierzchniowych GBS z klasy Alp (Universal forward, Alpha C reverse, Rib reverse, Epsilon/Alp1 reverse, Alp2/3 reverse, Alp4 reverse). Ścieżki od lewej: M- marker 100-2500 pz., N- próba negatywna, K-próba pozytywna, pozostałe ścieżki przedstawiają produkty amplifikacji genów *rib*, *bca*, *alp2/3*, *epsilon*.
- Rycina 6** Podział procentowy badanych izolatów GBS na podstawie lekooporności na klindamycynę.
- Rycina 7** Podział procentowy badanych izolatów GBS na podstawie lekooporności na erytromycynę.
- Rycina 8** Wzrost szczepu GBS o symbolu N-A9 oraz *L. gasseri* na podłożu Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej.
- Rycina 9** Porównanie działania hamującego gatunków LAB wobec GBS jako spadek liczby GBS (cfu/ml) w czasie 2 godz. od rozpoczęcia eksperymentu.
- Rycina 10** Porównanie zmian liczb GBS z poszczególnych serotypów (log cfu/ml) po 2 godz. trwania eksperymentu. Ten sam kolor grupy serotypów oznacza brak różnic statystycznych pomiędzy nimi.

- Rycina 11** Porównanie hamującego działania poszczególnych gatunków LAB na szczepy GBS izolowanych od kobiet (grupa K) oraz od noworodków (grupa N) po 2 godz. trwania eksperymentu.
- Rycina 12** Porównanie liczb GBS (cfu/ml) pomiędzy grupami izolatów wyodrębnionych w oparciu o miejsce ich izolacji po 2 godz. w środowisku LAB. Strzałki czarne oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą IIB oraz grupami IIA, IA, IB i IIIA ($p < 0,05$); strzałki zielone oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą IIIB oraz grupami IA, IB i IIIA ($p < 0,05$).
- Rycina 13** Zależność liczby GBS (cfu/ml) w określonych czterech punktach czasowych eksperymentu (1 godz., 2 godz., 3 godz., 4 godz.) od działania antybakteryjnego szczepów wzorcowych LAB.
- Rycina 14** Porównanie zmian liczb GBS z poszczególnych serotypów (log cfu/ml) po 2 godz. trwania eksperymentu. Ten sam kolor grupy serotypów oznacza brak różnic statystycznych pomiędzy nimi.
- Rycina 15** Porównanie liczby GBS (log cfu/ml) w poszczególnych grupach wyodrębnionych na podstawie miejsca izolacji szczepów w środowisku LAB po 2 godz. od momentu rozpoczęcia eksperymentu.
- Rycina 16** Adherencja szczepu *S. agalactiae* o symbolu K-A17 (serotyp V, gen *alp2*) do komórek linii tkankowej A-431.
- Rycina 17** Adherencja szczepu *S. agalactiae* o symbolu K-A17 (serotyp V, gen *alp2*) do komórek linii tkankowej HT-29.
- Rycina 18** Adherencja szczepu *S. agalactiae* o symbolu K-A6 (serotyp Ia, gen *epsilon*) do komórek linii tkankowej A-431.
- Rycina 19** Adherencja szczepu *S. agalactiae* o symbolu K-A6 (serotyp Ia, gen *epsilon*) do komórek linii tkankowej HT-29.
- Rycina 20** Adherencja szczepu wzorcowego *S. agalactiae* BAA-611 (serotyp V, gen *rib*) do komórek linii tkankowej A-431.
- Rycina 21** Adherencja szczepu wzorcowego *S. agalactiae* BAA-611 (serotyp V, gen *rib*) do komórek linii tkankowej HT-29.
- Rycina 22** Porównanie adherencji GBS z poszczególnych serotypów do komórek linii tkankowej A-431.
- Rycina 23** Adherencja szczepu GBS o symbolu K-A2 (serotyp III, gen *rib*) do komórek linii tkankowej HT-29.

- Rycina 24** Adherencja szczepu GBS o symbolu N-B4 (serotyp III, gen *rib*) do komórek linii tkankowej HT-29.
- Rycina 25** Porównanie GBS pod względem adherencji do komórek linii komórkowej HT-29 zależnej od obecności genu białek powierzchniowych z klasy Alp.

IX.2 Wykaz tabel

- Tabela 1** Klasyfikacja i ogólna charakterystyka bakteriocyn.
- Tabela 2** Przykłady bakteriocyn z poszczególnych klas produkowane przez LAB, miejsce izolacji szczepu LAB oraz zakres aktywności drobnoustrojowej.
- Tabela 3** Startery specyficzne dla poszczególnych polisacharydów powierzchniowych GBS oraz wielkość produktów reakcji multipleks PCR (pz) (Poyart i wsp., 2007).
- Tabela 4** Startery specyficzne dla poszczególnych białek powierzchniowych GBS z klasy Alp oraz wielkość produktów reakcji multipleks PCR (pz).
- Tabela 5** Warunki hodowli poszczególnych szczepów bakterii kwasu mlekowego.
- Tabela 6** Tabela zbiorcza izolatów GBS (n=99) oraz wyników oznaczenia serotypów metodą lateksową, detekcji genów polisacharydów powierzchniowych i białek z klasy Alp oraz oceny lekooporności szczepów GBS.
- Tabela 7** Porównanie wyników oznaczenia serotypów GBS za pomocą metody serologicznej i multipleks PCR (n=99).
- Tabela 8** Występowanie serotypów badanych izolatów GBS w grupach K oraz N.
- Tabela 9** Występowanie serotypów badanych izolatów GBS w grupach wyodrębnionych na podstawie miejsca izolacji szczepów.
- Tabela 10** Występowanie genów białek z rodziny alfa-podobnych w grupach K i N.
- Tabela 11** Występowanie genów białek z rodziny alfa-podobnych w badanych grupach GBS wyodrębnionych na podstawie miejsca ich izolacji.
- Tabela 12** Występowanie serotypów badanych szczepów GBS wraz z genami białek powierzchniowych GBS z klasy Alp.
- Tabela 13** Charakterystyka wybranych izolatów GBS w oparciu o serotypy i geny białek powierzchniowych z klasy Alp.

Tabela 14 Porównanie właściwości hamujących bakterii kwasu mlekowego produkujących bakteriocyny jako liczba GBS (cfu/ml) po 1 godz. , po 2 godz., po 3 godz. oraz po 4 godz. trwania eksperymentu (wartości p).

X. PIŚMIENNICTWO

Aasen IM, Moretro T, Katla T, Axelsson L, Storro I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 53: 159-166.

Anderssen EL, Diep DB, Nes IF, Eijsink VG, Nissen-Meyer J. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 2269-2272.

Andrews JJ, Diekema DJ, Hunter SK, Rhomberg PR, Pfaller MA, Jones RN, Doern GV. Group B streptococci causing neonatal bloodstream infection antimicrobial susceptibility and serotyping results from SENTRY centers in the Western Hemisphere. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 859-862.

Antonio D, Hawes ES, Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis* 1999; 180:1950-1956.

Amin A, Abdulrazzaq YM, Uduman S. Group B streptococcal serotype distribution of isolates from colonized pregnant woman at the time of delivery United Arab Emirates. *J Infect* 2002; 45: 42-46.

Areschoug T, Stalhammar-Carlemalm M, Larsson C, Lindhal G. Group B streptococcal surface proteins as targets for protective antibodies: identification of two novel proteins in strains of serotype V. *Infect Immun* 1999. 67: 6350-6357.

Awaisheh SS, Ibrahim SA. Screening of Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria Against Different Pathogens Found in Vacuum-Packaged Meat Products. *Foodborn Pathog Dis* 2009; 6: 1125-1132.

Baron MJ, Bolduc GR, Goldberg MB, Auperin TC, Madoff LC. Alpha C protein of Group B streptococcus binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cell by an actin-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2004. 279: 24714-24723.

Benson JA, Flores AE, Baker CJ, Hillier SL, Ferrieri P. Improved methods for typing nontypable isolates of group B streptococci. *Int J Med Mikrobiol* 2002; 292: 37-42.

Brimil N, Barthell E, Heindrichs U, Kuhn M, Luetticken R, Spellerberg R. Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. *Int J Med Mikrobiol* 2006. 296: 39-44.

Brzychczy-Włoch M, Gosiewski T, Bodaszewska M, Pabian W, Bulanda M, Kochan P, Strus M, Heczko PB. Characterization and diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates with macrolide resistance. *J Med Mikrobiol* 2010; 69: 780-786.

Brzychczy-Włoch M, Gosiewski T, Bodaszewska M, Pabian W, Bulanda M, Heczko PB. Rozkład serotypów paciorkowców grupy B, izolowanych z przypadków nosicielstwa, oznaczonych metodą multipleks PCR. *Med Dośw Mikrobiol* 2009; 61: 293-299.

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

Buchman GW, Banerjee S, Hansen JN. Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *Journal Biol Chem* 1988; 31: 16260-16266.

Chaffin DO, Mentele LM, Rubens CE. Sialylation of group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J Bacteriol* 2005; 187: 4615-1626.

Chaisilwattana P, Monif GRG. In vitro ability of the group B streptococci to inhibit Gram-positive and gram-variable constituents of the bacterial flora of the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1995; 3:91-97.

Cheng Q, Stafslie D, Purushothaman SS, Cleary P. The Group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasion. *Infect Immun* 2002; 70: 2408-2413.

Colas JC, Shi W, Malleswara Rao VSN, Omri A, Reza Mozafari M, Singh H. Microscopic investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron* 2007;38: 841-7.

Cornachione P, Scaringi L, Fettucciari K, Rosati E, Sabatini R, Orefici G, von Hunolstein C, Modesti A, Modica A, Minelli F, Marconi P. Group B streptococci persist inside macrophages. *Immunology* 1998; 93: 86-95.

Creti R, Fabretti F, Orefici G, von Hunolstein C. Multiplex PCR assay for direct identification of group B streptococcal alpha-protein-like protein genes. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1326-1329.

Creti R, Baldassarri L, Montanaro L, Arciola CL. The Alpha-like surface proteins: an example of an expanding family of adhesins. *Int J Artif Organs* 2008. 31: 834-840.

De Mouy D, Cavallo JD, Leclercq R, Fabre R. Antibiotic susceptibility and mechanisms resistance in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae*. French multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2400-2402.

Devi AS, Ponnuraj K. Cloning, expression, purification and ligand binding studies of novel fibrinogen-binding protein FbsB of *Streptococcus agalactiae*. *Protein Expr Purif* 2010; 74: 148-155.

Dicks LMT, Botes M. Probiotic Lactic Acid Bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Benef Microbes* 2010; 1:11-29.

Driesen AMJ, van den Hooven HW, Kuiper W, van de Kamp M, Sahl HG, Konings RN, Konings WN. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permabilisation of phospholipid vesicles. *Biochemistry* 1995; 34: 1606-1614.

Edwards MS. Group B streptococcal conjugate vaccine. *Human Vaccines* 2008. 4: 444-448.

El Alia NA, Tency I, Claeys G, Saerens B, de Backer E, Temmerman M, Verhelst R, Vaneechoutte M. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) isolated from vaginal and rectal swabs of women at 35-37 weeks of pregnancy. *BMC Infectious Diseases* 2009; 9: 153.

Ferguson R, Takane Y. *Analiza statystyczna w psychologii i pedagogice*. Wydawnictwo naukowe PWN 2009.

Fernandez L, Delgado S, Herrero H, Maldonado A, Rodriguez JM. The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. *J Hum Lact* 2008; 24: 311-6.

Ferrieri P, Hillier SL, Krohn MA, Moore D, Paoletti LC, Flores AE. Characterization of vaginal & rectal colonization with multiple serotypes of group B streptococci using multiple colony pics. *Indian J Med Res* 2004; 119: 208-212.

Fettucciari K, Rosati E, Scaringi L, Cornacchione P, Migliorati G, Sabatini R, Fettriconi I, Rossi R, Marconi P. Group B streptococcus induces apoptosis in macrophages. *J Immunol* 2000; 165: 3923-3933.

Geisen R, Becker B, Holzapfel WH. Bacteriocin production of *Leuconostoc carnosum* LA54A at different combinations of pH and temperature. *J Ind Microbiol* 1993; 12: 337-340.

Gherardi G, Imperi M, Baldassarri L, Pataracchia M, Alfarone G, Recchia S, Orefici G, Dicuonzo G, Creti R. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among Group B streptococci in Italy. *J Clin Microbiol* 2007. 45: 2909-2916.

Gillespie SH, Hawkey PM. Principles and practice of clinical bacteriology. Section one: gram-positive cocci. β -hemolytic streptococci. 2^d edition. John Wiley & Sons Ltd. 2005. 3-16.

Gutekunst H, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ. Analysis of RogB-controlled virulence mechanisms and gene repression in *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* 2003. 71: 5056-5064.

Gutekunst H, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ. The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. *Infect Immun* 2004. 72: 3495-3504.

Gwiazdowska D, Trojanowska K. Bakteriocyyny-właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia* 2005; 1: 114-130.

Harrisom LH, Elliott JA, Wyder DM, Libonati JP, Ferrieri P, Billmann L, Schuhat A and the Maryland Emerging Infections Program. Serotype distribution of invasive group B

streptococcal isolates In Maryland: implications for vaccine formulation. *J Infect Dis* 1998; 177: 998-1002.

Hauge HH, Mantzilas D, Moll GH, Konings WN, Driessen AJ, Eijsink VG, Nissen-Meyer J. Plantaricin A is an amphiphilic α -helical bacteriocin like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. *Biochemistry* 1998; 37: 16026-16032.

Hechard Y, Sahl HG. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 2002; 84: 545-557.

Heczko PB, Niemiec T, Lauterbach R, Przondo-Mordarska H, Strus M, Drzewiecki A, Brzychczy-Włoch M. Zalecenia dotyczące wykrywania nosicielstwa paciorkowców grupy B (GBS) u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom u noworodków spowodowanym przez ten drobnoustrój. *Zakażenia* 2008; 2: 87-96.

Heng NC, Ragland NL, Swe PM, Baird HJ, Inglis MA, Tagg JR, Jack RW. Dysgalactin: a novel, plasmid-encoded antimicrobial protein (bacteriocin) produced by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiology* 2006; 152: 1991–2001.

Hickman ME, Rench MA, Ferrieri P, Baker CJ. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics* 1999. 104: 203-209.

Hill MJ, Drasar BS. The normal colonic bacterial flora. *Gut* 1975. 16:318-323.

Van Den Hooven HW, Spronk CA, Van De Kamp M, Konings RN, Hilbers CW, Van De Van FJ. Surface location and orientation of the lantibiotic nisin bond to

membrane-mimicking micells of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulfate. Eur J Biochem 1996; 235: 394-403.

Hsueh PR, Teng LJ, Lee LN, Ho SW, Yang PC, Luh KT. High incidence of erythromycin resistance among clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2001. 45:3205–3208.

Hull J, Tamura GS, Castner DG. Interaction of the streptococcal C5a peptidase with human fibronectin. Acta Biomater 2008. 4: 504-513.

Jones RJ, Zagorec M, Brightwell G, Tagg JR. Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during prolonged storage. Food Microbiol 2009; 26: 876-81.

Imperi M, Pataracchia M, Alfarone 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: 212-4.

Juarez Tomas MS, Bru E, Wiese B, de Ruiz Holgado AAP, Nader-Macias ME. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. J Appl Microbiol 2002; 93: 714-724.

Juarez Tomas MS, Ocana VS, Wiese B, Nader-Macias ME. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. J Med Microbiol 2003; 52: 1117-1124.

Kaewsrichan J, Peeyananjarassri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 48: 75-83.

Kaushik JK, Kumar A, Duary RK, Mohanty AK, Grover S, Batish VK. Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. PLoS ONE | www.plosone.org 2009; 4: e8099.

Kawai Y, Kemperman R, Kok J, Saito T. The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. Curr Prot Pept Sci 2004; 5:393–398.

Kawai Y, Saito T, Toba T, Samant SK, Itoh T. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. Biosci Biotechnol Biochem 1994; 58: 1218–1221.

Kelly MC, Mequio MJ, Pybus V. Inhibition of vaginal lactobacilli by a bacteriocin-like inhibitor produced by *Enterococcus faecium* 62-6: potential significance for bacterial vaginosis. Infect Dis Obstet Gynecol 2003; 11:147-56.

Kristensen PE, Fimland G, Mantzilas D, Nissen-Meyer J. Structure and mode of action of the membrane-permabilizing antimicrobial peptide pheromone plantaricin A. J Biol Chem 2005. 24: 22945-22950.

Krohn MA, Hillier SL, Bacer CJ. Maternal peripartum complications associated with vaginal group B streptococci colonization. J Infect Dis 1999; 179: 1410-1415.

Kruszewska D, Sahl HG, Bierbaum G, Pag U, Hynes SO, Ljungh A. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 648- 653.

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

Kubin V, Jiraskova Z, Franek J. The effect of pH on the adherence of Group B streptococci to epithelial cells. *Folia Microbiol* 1983; 28: 62-64.

Kong F, Lambersten LM, Slotved HC, Ko D, Wang H, Gilbert GL. Use of fenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypable group B streptococci. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2745-2750.

Lachenauer CS, Creti R, Michel JL, Madoff LC. Mosaicism in the alpha-like protein genes of group B streptococci. *Proc Natl Acad Sci* 2000. 97:9630-9635.

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: 1030-1033.

Lee BK, Song YR, Kim MY, Yang JH, Shin JH, Seo YS, Oh KY, Yoon HR, Pai SY, Foxman B, Ki M. Epidemiology of Group B streptococcus in Korean pregnant women. *Epidemiol Infect* 2010; 138: 292-298.

Leer RJ, Van der Vossen JM, Van Giezen M, Van Noort JM, Pouwels PH. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* 1995; 141: 1629-1635.

Leroy F, de Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol* 2004; 15: 67-78.

Leroy F, de Vuyst L. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sousages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 974-981.

Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124:837-848.

Linnet PE, Strominger JL. Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 1973; 4: 231-236.

Liu GY, Doran KS, Lawrence T, Turkson N, Puliti M, Tissi L, Nizet V. Sword and shield: linked group B streptococcal β -hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 14491-14496.

Lin FY, Azimi PH, Weisman LE, Philips JB 3rd, Regan J, Clark P, Rhoads GG, Clemens J, Troendle J, Pratt E, Brenner RA, Gill V. Antibiotic susceptibility profiles for Group B streptococci isolated from neonates, 1995-1998. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 76-79.

Lin FY, Clemens JD, Azimi PH, Regan JA, Weisman LE, Philips JB 3rd, Rhoads GG, Clark P, Brenner RA, Ferrieri P. Capsular polysaccharide types of group B streptococcal isolates from neonates with early-onset systemic infection. *J Infect Dis* 1998; 177: 790-792.

Maeland JA, Bevanger L, Lyng VR. Antigenic determinants of alpha-like proteins of *Streptococcus agalactiae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 1035-1039.

Maisey HC, Hensler M, Nizet V, Doran KS. Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to an invasion of brain microvascular endothelial cells. *J Bacteriol* 2007; 189: 1464-7.

Matu MN, Orinda GO, Njagi ENM, Cohen CR, Bukusi EA. In vitro inhibitory activity of human vaginal lactobacilli against pathogenic bacteria associated with bacterial vaginosis in Kenyan women. *Clin Microbiol* 2009; 16: 210-215.

Margarit I, Rinaudo CD, Galeotti CL. Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the group B streptococcus paradigm. *J Infect Dis* 2009; 199:108-115.

Martirosian G, Romanik M, Friedek D. Antagonizm *Lactobacillus* spp. wobec drobnoustrojów związanych ze zmianami patologicznymi w drogach moczowo-płciowych. *Zakażenia* 2003; 1: 43-46.

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: 3986-3993.

Maqueda M, Sanchez-Hidalgo M, Fernandez M, Montalban-Lopez M, Valdivia E, Martinez-Bueno M. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32 2–22.

Meyn LA, Krohn MA, Hillier SL. Rectal colonization by group B *Streptococcus* as a predictor of vaginal colonization. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 2: 76e1-76e7.

Mikamo H, Johri AK, Paoletti LC, Madoff LC, Onderdonk AB. Adherence to, invasion by, and cytokine production in response to serotype VIII group B streptococci. *Infect Immun* 2004; 72: 4716-4722.

Moll GN, van der Akker E, Hauge HH, Nissen-Meyer J, Nes IF, Konings WN, Driessen AJM. Complementary and Overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *J Bacteriol* 1999; 181: 4848-4852.

Moll G, Roberts GCK, Konings WN, Driessen AJ. Mechanism of lantibiotic-induced pore-formation. *Antoine von Leeuwenhoek* 1996; 69: 185-191.

Moretro T, Aasen IM, Storro I, Axelsson L. Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. J Appl Microbiol 2000; 88: 536-545.

Motlova J, Strakova L, Urbaskova P, Sak P, Sever T. Vaginal & rectal *Streptococcus agalactiae* in Czech Republic: incidence, serotypes distribution & susceptibility to antibiotics. Indian J Med Res 2004; 119: 84-87.

Nes IF, Diep DB, Holo H. Bacteriocin diversity in Streptococcus and Enterococcus. J Bacteriol 2007; 189: 1189-1198.

Nigutowa K, Pristas P, Javorski P. Bacteriocin-like activity production and resistance in selekt enterococci and streptococci of animal origin. Arch Anim Nutr 2005; 59:205-211.

Niku-Paavola ML, Laitila A, Matilla-Sandholm T, Haikara A. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. J Appl Microbiol 1999; 86: 29-35.

Nissen-Meyer J, Oppegard C, Rogne P, Haugen HS, Kristiansen PE. Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. Probiotics Antimicrob Proteins 2010; 2: 52-60.

Nissen-Meyer J, Rogne P, Oppegard C, Haugen HS, Kristiansen PE. Structure-function relationships of the non-lantoline -containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. Curr Pharm Biotechnol 2009; 10:19-37.

Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. J Clin Microbiol 1991; 29: 297-301.

Ocana V, de Ruiz Holgado AAP, Nader-Macias ME. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 5631-5635.

Oppegard C, Rogne P, Emanuelsen L, Kristensen PE, Fimland G, Nissen-Meyer J. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production and mode of action. *J Mol Microbiol* 2007; 13: 210-219.

Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 1998; 47: 451-463.

Parente E, Ricciardi A, Addario G. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during bath fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994; 19: 12-15.

Palfy R, Gardlik R, Behuliak M, Kadasi L, Turna J, Celec P. On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides. *Mol Med* 2009; 15: 51-59.

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

Pilarczyk M. Klasyfikacja, mechanizmy działania i zastosowanie bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie kwasu mlekowego. *Zakażenia* 2008; 4: 2-6.

Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K, Stefonek KR, Albanese BA, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ. Epidemiology of invasive Group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA* 2008; 299: 2056-2065.

Phillips EA, Tapsall JW, Smith DD. Rapid tube CAMP test for identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B). *J Clin Microbiol* 1980. 12: 135-137.

Poyart C, Tazi A, Reglier-Poupet H, Billoet A, Tavares N, Raymond J, Trieu-Cuot P. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1985-1988.

Rajagopal L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiol* 2009. 4: 201-221.

Raju TN. Ignac Semmelweis and the etiology of fetal and neonatal sepsis. *J Perinatol* 1999. 19: 307-310.

Ramaswamy SV, Ferrieri P, Flores AE, Paoletti LC. Molecular characterization of nonserotypable group B streptococcus. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2398-2403.

Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Synergistic antimicrobial effect of nisin and p-cymene on *Salmonella enterica* serovar Typhi in vitro and ready-to-eat food. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74: 520-524.

Renye Jr JA, Somkuti GA, Moushumi P, Van Hekken DL. Characterization of antilisterial bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolates from Hispanic-style cheeses. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2009; 36: 261-268.

Ruiz FO, Gerbaldo G, Asurmendii P, Pascual LM, Giordano W, Barberis IL. Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol* 2009; 59: 497-501.

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

Salmien S, von Wright A. Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects. Second edition. Marcell Dekker INC. New York 1998.

Santi I, Grifantini R, Jiang SM, Brettoni C, Grandi G, Wessels MR, Soriani M. CsrRS regulates Group B *Streptococcus* virulence gene expression in response to environmental pH: a new perspective on vaccine development. *J Bacteriol* 2009; 191: 5387-5397.

Savoia D, Gottimer C, Crocilla C, Zucca M. *Streptococcus agalactiae* in pregnant women: Phenotypic and genotyping characters. *J Infect* 2008; 56: 120-125.

Schrag SJ, 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.

Schillinger U, Luecke FK. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* 1989; 8: 1901-1906.

Seifert KN, Adderson EE, Whiting AA, Bohnsack JF, Crowley PJ, Brady LJ. A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen (ϵ) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae*. *Microbiol* 2006; 152: 1029-1040.

Sendi P, Johansson A, Norrby-Teglund A. Invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Infection* 2008; 36: 100-111.

Skoff TH, Farley MM, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Gershman K, Harrison LH, Lynfield R, Mohle-Boetani J, Zansky S, Albanese BA, Stefonek K, Zell ER, Jackson D, Thompson T, Schrag SJ. Increasing burden of invasive Group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *CID* 2009; 49: 85-92.

Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J Clin Microbiol* 2007. 45: 2929-2936.

Słomko Z., Drevis K. Zakażenia perinatalne. *PTMP*, 2001, Tom I, 319-324

Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd edition. 1995; W. H. Freeman and Co.: New York. 887 pp. ISBN: 0-7167-2411-1.

Stalhammar-Carlemalm M, Stenberg L, Lindhal G. Protein Rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *J Exp Med* 1993. 177: 1593-1603.

Steinka I. Innowacje technologiczne a bezpieczeństwo żywności. *Ann Acad Med Gedan* 2009, 39, 123–132.

Stevens G. A nonparametric multiple comparison test for differences in scale parameters. *Metrika* 1989; 36: 91-106.

Strus M, Brzywczy-Włoch M, Gosiewski T, Kochan P, Heczko PB. The *in vitro* effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. *Immun Med Microbiol* 2006; 48: 56-63.

Strus M, Brzychczy-Włoch M, Kucharska, Gosiewski T, Heczko PB. Działanie *in vitro* bakterii z rodzaju *Lactobacillus* izolowanych z pochwy na grzyby wywołujące kandydozę sromu i pochwy. Med Mikrobiol Dośw 2005; 57: 7-17.

Strus M, Kukla G, Rurańska-Smutnicka D, Przondo-Mordarska A, Heczko PB. Właściwości powierzchniowe bakterii z rodzaju *Lactobacillus* II. Adherencja do linii komórkowych. Med. Dośw Mikrobiol 2001; 253-258.

Strus M, Pawlik D, Brzychczy-Włoch M, Gosiewski T, Rytlewski K, Lauterbach R, Heczko PB. Group B streptococcus colonization of pregnant women and their children observed on obstetric and neonatal wards of the University Hospital In Krakow, Poland. J Med Microbiol 2009; 58: 228-233.

Suvorov AN, Grabovskaia KB, Leont'eva GF, Meringova LF, Koroleva IN, Duplik NV, Totolian AA. Recombinant fragments of conservative proteins of group B streptococci as a basis of specific vaccine. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.2010;2:44-50.

Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, Wessels MR, Paulsen IT, Nelson KE, Margarit I, Read TD, Madoff LC, Wolf AM, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, DeBoy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Lewis MR, Radune D, Fedorova NB, Scanlan D, Khouri H, Mulligan S, Carty HA, Cline RT, Van Aken SE, Gill J, Scarselli M, Mora M, Iacobini ET, Brettoni C, Galli G, Mariani M, Vegni F, Maione D, Rinaudo D, Rappuoli R, Telford JL, Kasper DL, Grandi G, Fraser CM. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen serotype V *Streptococcus agalactiae*. Proc Natl Acad Sci USA 2003. 99: 12391-12396.

Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, Deboy RT, Davidsen TM, Mora M, Scarselli M, Margarit Y, Ros I, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, Brinkac

LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Daugherty SC, Haft DH, Selengut J, Gwinn ML, Zhou L, Zafar N, Khouri H, Radune D, Dimitrov G, Watkins K, O'Connor KJ, Smith S, Utterback TR, White O, Rubens CE, Grandi G, Madoff LC, Kasper DL, Telford JL, Wessels MR, Rappuoli R, Fraser CM. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial 'pan-genome'. Proc Natl Acad Sci USA 2005. 102: 13950-13955.

Thinkhamrop J, Limpongsanurak S, Festin MR, Daly S, Schuchat A, Lumbiganon P, Zell E, Chipato T, Win AA, Perilla MJ, Tolosa JE, Whitney CG. Infections in international pregnancy study: performance of the optical immunoassay test for detection of group B streptococcus. J Clin Microbiol 2003; 41: 5288-5290.

Thomas KK, Sanchez S, Garcia PJ, Holmes KK. Why do different criteria for 'cure' yield different conclusions in comparing two treatments for bacterial vaginosis? Sex Transm Dis 2005; 32: 526-530 .

Tsolia M, Psoma M, Gavrili S, Petrochilou V, Michalas S, Legakis N, Karpathios T. Group B streptococcus colonization of Greek pregnant women and neonates: prevalence, risk factors and serotypes. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 832-838.

Twomey D, Ross RP, Ryan M, Meaney B, Hill C. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. Antoine von Leeuwenhoek 2002; 82: 165-185.

Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, Alatossava T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. Appl Environ Microbiol 2000; 66:297-303.

Wescombe PA, Tagg JR. Purification and characterization of streptin, a type A1 lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 2737-2747.

Wilkinson HW, Eagon RG. Type-specific antigens of group B type Ic streptococci. *Infect Immune* 1971; 4: 596-604.

De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2007; 13: 194-199.

Xie L, van der Donk WA. Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 2004; 8: 498-507

Xu HY, Tian WH, Wan CX, Jia LJ, Wang LY, Yuan J, Liu CM, Zeng M, Wei H. Antagonistic potential against pathogenic microorganisms and hydrogen peroxide production of indigenous lactobacilli isolated from vagina of Chinese pregnant woman. *Biomed Environ Sci* 2008; 21:365-371.

Yang HH, Madoff LC, Guttormsen HK, Liu YD, Paoletti JC. Recombinant group B streptococcus Beta C protein and a variant with the deletion of its immunoglobulin A-binding site are protective mouse maternal vaccines and effective carriers in conjugate vaccines. *Infect Immun* 2007; 75:3455-3461.

Zaleznik DF, Rench MA, Hillier S, Krohn MA, Platt R, Lee ML, Flores AE, Ferrieri P, Baker CJ. Invasive disease due to Group B streptococcus in pregnant women and neonates from diverse population groups. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 276-281.

Zangwill KM, Schuchat A, Wenger JD. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. *MMWR* 1992; 41: 25-32.

Zawaneh SM, Ayoub EM, Baer H, Cruz AC, Spellacy WN. Factors influencing adherence of Group B streptococci to human vaginal epithelial cells. *Infect Immun* 1979; 26: 441-447.

Zhao H, Sood R, Jutila A, Bose S, Fimland G, Nissen-Meyer J, Kinnungen PK. Interaction of the antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A with model membranes: implications for a novel mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 2006; 9: 1461-74.

Zouhir A, Hammami R, Fliss I, Hamida JB. A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins. *Protein J.* 2010;29: 432-9.