

Isolamento e caratterizzazione di *Streptococcus agalactiae* in donne gravide

L.S. ROCCASALVA, V. GIUMMARRA, O. VALENTI, M.C. SCUDERI, P.M. FURNERI

RIASSUNTO: Isolamento e caratterizzazione di *Streptococcus agalactiae* in donne gravide.

L. S. ROCCASALVA, V. GIUMMARRA, O. VALENTI, M. C. SCUDERI, P. M. FURNERI

Negli ultimi decenni lo Streptococcus agalactiae (GBS) ha assunto un ruolo prioritario nel determinismo delle infezioni neonatali, con un alto tasso di mortalità.

Nel presente studio è stata valutata la frequenza della colonizzazione materna, la distribuzione sierotipica, l'efficacia della chemioprolifassi intrapartum e l'epidemiologia molecolare di alcuni fattori di virulenza di GBS. In particolare, sui ceppi è stato svolto uno studio per identificare i geni codificanti per le proteine di superficie alp, la produzione di biofilm, la valutazione della sensibilità ad alcuni antibiotici e i geni di resistenza ai macrolidi.

Sono state studiate 60 donne gravide tra la 35^a-37^a settimana alle quali in corso di screening per la prevenzione della malattia perinatale da GBS, è stato effettuato un doppio tampone, vaginale e rettale.

Il 12% delle gravide arruolate è risultato colonizzato da GBS ed i sierotipi identificati sono stati Ia, III e V. Le proteine "alp" sono espresse nel 72% dei ceppi isolati. La maggiore produzione di biofilm si è ottenuta su terreno di coltura THB addizionato all'1% di glucosio in condizioni di 5% di CO₂. Tutti i ceppi isolati si sono dimostrati sensibili all'ampicillina, ma il 28,5% si è dimostrato resistente alle altre classi di antibiotici saggiati (macrolidi e lincosamidi).

Tutte le donne colonizzate sono state sottoposte alla chemioprolifassi intrapartum; il decorso fisiologico ed febbrile del puerperio e, soprattutto, la mancanza di manifestazioni nei neonati delle donne sottoposte a trattamento dimostra l'efficacia della procedura.

SUMMARY: Isolation and characterization of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women.

L. S. ROCCASALVA, V. GIUMMARRA, O. VALENTI, M. C. SCUDERI, P. M. FURNERI

During the past several decades Streptococcus agalactiae has emerged as the major cause of bacterial infection in newborns with a high rate of mortality.

In the present study the maternal colonisation, the distribution of serotypes, the efficacy of intrapartum antibiotic-prophylaxis and the prevalence of same factor of virulence have been estimated. Particularly on GBS isolates a study has been made to identify the genes of surface proteins "alp", biofilm formation, antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genotypes.

A total of 60 women at 35th-37th week of gestation were enrolled, to these, during the screening for prevention of perinatal GBS disease, double samples have been made, from the vagina and the rectum. About 12% of the pregnant women was colonised by GBS and the characterized serotypes were: Ia, III and V.

About 72% of the isolated GBS express "alp" proteins. The greater biofilm formation is obtained in THB with 1% of glucose and in atmosphere containing 5% CO₂. All isolated GBS have been susceptible to ampicillin but about 28,5% have been resistant to the other tested antibiotics (macrolide and lincosamides).

All colonised women were undergone to intrapartum antibiotic-prophylaxis and physiological course of puerperium and especially the lack of events in children of women undergoing treatment demonstrates the effectiveness of prophylaxis.

KEY WORDS: GBS - Colonizzazione materna - Screening culturale - Chemioprolifassi - Patogenesi - Antibiotico-resistenza.

GBS - Maternal colonisation - Culture-based screening - Antibiotic-prophylaxis - Pathogenesis - Antibiotic-resistance.

Introduzione

Le infezioni rimangono un'importante causa di morbosità e mortalità neonatale e lo *Streptococcus agalactiae* (GBS) è uno dei principali microrganismi responsabili della sepsi neonatale (1-4).

I polisaccaridi capsulari, le proteine di superficie,

altre proteine e la capacità di formare biofilm sono i fattori coinvolti nella patogenesi. Tra i polisaccaridi capsulari, l'acido sialico ha proprietà di "mimetismo molecolare" e svolge un'azione antifagocitaria (5). Tra le proteine di superficie la componente β svolge un ruolo di elusione immunitaria mentre la componente α ed il complesso R, noti come l'*alpha-like protein (alp) family*, facilitano l'ingresso del batterio nelle cellule epiteliali e attraverso gli strati della cervice umana, legandosi ai glicosaminoglicani (5-6). Le altre proteine di superficie promuovono l'adesione alle cellule endoteliali ed epiteliali ed inattivano la cascata complementare (7).

Infine il biofilm microbico, che costituisce una crescita protetta, permette ai batteri di sopravvivere anche in ambienti ostili e pare che il 65% delle infezioni umane sia ad esso connesso (8-9).

L'infezione da GBS nel neonato è acquisita, nella maggior parte dei casi, per trasmissione verticale quindi o per diffusione ascendente del batterio dalla vagina della donna colonizzata o al momento del passaggio del canale del parto (10-12).

GBS può colonizzare, sia la donna che l'uomo, a livello del tratto gastrointestinale che funge da serbatoio naturale per il microorganismo ed è la probabile fonte di colonizzazione vaginale (13).

La constatazione del forte impatto epidemiologico della sepsi neonatale da GBS e della stretta associazione tra colonizzazione materna ed infezione ad esordio precoce giustifica l'interesse della ricerca internazionale per la prevenzione della malattia perinatale mediante la chemioprolifassi *intrapartum* alle gravide colonizzate (14, 15).

Lo screening colturale, con doppio tampone (vaginale e rettale), eseguito tra la 35^a-37^a settimana è il metodo migliore per individuare le donne colonizzate da GBS (16, 17).

La profilassi antibiotica *intrapartum* deve cominciare dopo l'inizio del travaglio e per almeno quattro ore prima della nascita del bambino (17, 18).

Le β -lattamine sono gli antibiotici raccomandati dalle linee guida data la dimostrata efficacia (17, 19, 20); tuttavia nell'eventualità di fenomeni allergici sono da preferire i macrolidi ed in caso di resistenza a questi ultimi la vancomina è il farmaco d'elezione.

Nel presente studio è stata valutata la frequenza della colonizzazione materna, la distribuzione sierotipica, l'efficacia della chemioprolifassi *intrapartum* e l'epidemiologia molecolare di alcuni fattori di virulenza di GBS. In particolare sui ceppi è stato svolto uno studio per identificare i geni codificanti per le proteine di superficie *alp*, la produzione di biofilm, la valutazione della sensibilità ad alcuni antibiotici e i geni di resistenza ai macrolidi.

Materiali e metodi

Pazienti e prelievo del campione biologico

Lo studio è stato svolto presso il Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Ginecologiche dell'Università di Catania. Sono state arruolate 60 donne gravide, tra la 35^a e 37^a settimana di amenorrea, tra febbraio 2007 e maggio 2008. Queste donne, dopo essere state informate sullo scopo del lavoro e dopo aver dato il consenso alla partecipazione e all'uso dei dati, sono state sottoposte, in corso di screening colturale per la prevenzione della malattia perinatale da GBS, ad un doppio tampone: uno vaginale (con prelievo nel terzo inferiore della vagina senza utilizzo dello speculum) ed uno rettale (con prelievo a circa 1 cm dall'orificio anale).

Indagini microbiologiche

I tamponi sono stati seminati, previo arricchimento in THBCN (Todd-Hewitt Broth-Colistina-Nalidixico), su terreno solido cromogeno per GBS (strepto B-Biomerieux), su cui hanno dato luogo a colonie pigmentate da rosa pallido a rosso. Queste colonie sono state confermate come appartenenti ai GBS mediante test di agglutinazione al lattice (Strepto-kit-Biomerieux).

È stata valutata la chemiosensibilità dei ceppi isolati per i seguenti antibiotici: ampicillina, eritromicina, josamicina e clindamicina. In accordo con CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) è stata determinata la MIC (minima concentrazione inibente), con il metodo della microdiluizione in piastra, ed a ciascun ceppo è stata assegnata la categoria "sensibile" e "resistente" (21, 22).

Per l'estrazione del DNA i microrganismi sono stati fatti crescere in piastre di agar-sangue e una singola colonia è stata inoculata in 50 ml di Todd-Hewitt Broth. Dopo incubazione a 37°C "overnight" sono stati effettuati dei lavaggi con PBS (*Phosphate-Buffer Saline*) e trattamenti con lisozima, SDS (sodio dodecil solfato) e proteinasi K. Il DNA è stato fatto precipitare in etanolo al 70% (23).

Per ricercare i genotipi di resistenza sono stati utilizzati primers specifici e le condizioni di amplificazione e le modalità di rivelazione della presenza dei geni di resistenza sono state quelle standard (24, 25).

Per la ricerca di proteine della "famiglia *alpha-like*" è stato utilizzato "PCR multiplex" così come per la determinazione del sierotipo per la quale sono state preparate due mix in modo da ottenere un controllo in-terno (27-30).

I prodotti della PCR, sia delle proteine *alp* che dei

polisaccaridi capsulari, sono stati analizzati in un gel di agarosio al 2% in 100 ml di tampone TBE (Tris-acido Borico-EDTA), a cui è stato aggiunto bromuro di etidio. I campioni sono stati caricati nei pozzetti insieme a "loading buffer". Per entrambe le ricerche, il marker utilizzato è stato il 100bp. Il gel è stato fatto correre a 70 Volt per circa 40 minuti e, dopo essere stato visualizzato al transilluminatore a raggi UV, dall'altezza delle bande è stato possibile ricavare le dimensioni degli ampliconi identificando così in un caso le proteine di superficie possedute e nell'altro i polisaccaridi capsulari e quindi il sierotipo.

Per la formazione del biofilm è stato utilizzato il protocollo usato per *S. pyogenes* (34). I batteri sono stati seminati in piastre da microtitolazione in polistirene a 96 pozzetti in tre terreni diversi: THB (Todd-Hewitt Broth), THB+glucosio 1%, THB+destrano 1%, ed in ognuna di esse è stata inoculata una diluizione 1:10 della coltura "overnight". Sono state saggiate tre condizioni diverse (aria, 5% CO₂, anaerobiosi), per valutare in quale GBS era maggiormente capace di formare biofilm. Dopo incubazione a 37°C per 18 ore, si sono effettuati tre lavaggi con PBS (*Phosphate-buffered saline*) e fissazione per un'ora a 60°C, successivamente sono stati colorati con cristal violetto, e il colore in eccesso è stato lavato via con acqua. Infine, si è misurata la densità ottica del biofilm a 570 nm (OD570) con uno spettrofotometro. Per valutare la capacità di formare biofilm è stata utilizzata la seguente formula contenente un fattore di correzione: *Biofilm Index* = Densità media del biofilm (OD570) * 0,5/crescita media (OD600) ed i ceppi che hanno ottenuto *Biofilm Index* <0,061 sono stati considerati non formanti biofilm (34).

Trattamento

Le donne colonizzate sono state sottoposte, come da protocollo delle linee guida (11), alla profilassi *intrapartum* con la somministrazione e.v. dell'ampicillina, data la negatività anamnesticca per fenomeni allergici, alla posologia di 2 g e.v. e poi 1 g e.v. ogni 4 ore, cominciando la profilassi dopo l'inizio del travaglio.

Risultati

Il 12% (n = 7) delle donne arruolate è risultato colonizzato da GBS, 3 delle quali erano alla prima gravidanza. Dalla sierotipizzazione dei ceppi isolati è emerso che i sierotipi identificati sono stati: Ia (28,5%, n = 2), III (43%, n = 3) e V (28,5%, n = 2).

Dall'identificazione delle proteine di membrana è emerso che: 3 GBS esprimevano la proteina *eps*

lon=200 bp; 2 GBS esprimevano la proteina *rib*=298 bp; 2 GBS non esprimevano alcuna proteina di superficie.

Le tabelle 1-3 mostrano i risultati della formazione di biofilm in diverse condizioni ed appare evidente che la maggiore produzione di biofilm si è avuta nel terreno THB addizionato all'1% di glucosio e in condizioni di 5% CO₂. Due dei ceppi isolati, uno appartenente al sierotipo III e l'altro al sierotipo V, sono stati i maggiori produttori di biofilm nelle diverse condizioni saggiate.

Nella Tabella 4 sono riportati i risultati delle minime concentrazioni inibenti per i vari antibiotici saggiati. Tutti i sette ceppi erano sensibili all'ampicillina, mentre due dei microrganismi, appartenenti al sierotipo V, erano resistenti alle altre classi di antibiotici.

Per questi due ceppi di GBS è stato, dunque, effettuato lo studio dei geni che ha mostrato la presenza in particolare del gene *erm* (B) associato con *mef*(A), noti per determinare resistenza batterica.

Discussione

Il tasso di colonizzazione riscontrato (12%) è stato più basso di quello riportato dagli studi epidemiologici statunitensi (10-40%) ma entro il range d'incidenza europea (1,5-30%), ed è paragonabile ai pochi dati ita-

TABELLA 1 - FORMAZIONE DEL BIOFILM IN ARIA.

ARIA				
N.	Sierotipo	THB	THB + destrano	THB + glucosio
1	Ia	0,069	0,058	0,060
2	V	0,049	0,104	0,063
3	III	0,064	0,050	0,081
4	V	0,047	0,050	0,085
5	III	0,077	0,046	0,058
6	III	0,070	0,044	0,179
7	Ia	0,077	0,060	0,107

TABELLA 2 - FORMAZIONE DEL BIOFILM IN 5% CO₂ (MICROAEROFILIA)

5% CO ₂ (microaerofilia)				
N.	Sierotipo	THB	THB + destrano	THB + glucosio
1	Ia	0,157	0,134	0,212
2	V	0,518	0,417	3,645
3	III	0,552	0,281	3,000
4	V	0,101	0,089	0,269
5	III	0,125	0,063	0,225
6	III	0,104	0,066	0,267
7	Ia	0,324	0,122	0,570

TABELLA 3 - FORMAZIONE DEL BIOFILM IN ANAEROBIOSI.

ANAEROBIOSI				
N.	Sierotipo	THB	THB + destrano	THB + glucosio
1	Ia	0,101	0,068	0,156
2	V	0,437	0,418	2,562
3	III	0,496	0,453	2,923
4	V	0,142	0,097	0,165
5	III	0,181	0,068	0,161
6	III	0,269	0,090	0,276
7	Ia	0,278	0,169	0,565

TABELLA 4 - MIC(μ g/ml) GBS.

N. Sierotipo	Eritromicina	Josamicina	Clindamicina	Ampicillina
1 Ia	<0,125	0,25	<0,125	0,06
2 V	>64	>64	>64	0,03
3 III	0,125	0,25	0,125	/
4 V	>64	>64	>64	0,12
5 III	<0,125	0,25	<0,125	0,06
6 III	<0,125	0,25	<0,125	0,06
7 Ia	<0,125	0,25	<0,125	0,03

TABELLA 5 - CARATTERISTICHE MATERNE E CARATTERISTICHE GBS.

N.	età	Parità	Settimana	Sierotipo	Prot. superf.
1	22	primigravida	35a	Ia	epsilon
2	25	primigravida	35a	III	/
3	27	pluripara	35a	V	epsilon
4	30	pluripara	36a	Ia	epsilon
5	28	pluripara	35a	III	rib
6	31	primigravida	36a	V	/
7	30	pluripara	35a	III	rib

liani (Modena 14%) (31, 5).

Il campione è risultato piuttosto omogeneo per età (range 22-31), razza (bianca), etnia (caucasica) e provenienza geografica, pertanto non è stato possibile né confermare né confutare i dati riportati da alcuni lavori presenti in letteratura, i quali sostengono che l'età materna (< 20 anni), la razza (nera) e l'etnia (ispanica, caraibica e afro-americana) siano in grado di influenzare la colonizzazione (32, 33) (Tab. 5).

Il campione è stato equamente rappresentato da primigravide (n=30) e pluripare (n=30), e nel gruppo di donne positive allo screening il numero delle primigravide (n=3) e quello delle pluripare (n=4) è risultato sovrapponibile; tuttavia, questo non ci permette di af-

fermare che la parità non sia in grado di influenzare la colonizzazione perché il risultato ottenuto potrebbe derivare dal numero non eccessivamente ampio del campione esaminato.

I sierotipi isolati (2 Ia, 2 V e 3 III) sono quelli che hanno la maggiore diffusione in America ed in Europa e sono noti come i maggiori responsabili delle infezioni nei neonati e nelle donne gravide.

In accordo con i dati riportati in letteratura, si è evidenziata l'associazione per entrambi i sierotipi Ia con la proteina *epsilon*, l'associazione per uno solo dei due sierotipi V con la proteina di membrana *ipsilon*, mentre due dei tre sierotipi III esprimono la proteina di superficie *rib*; per i rimanenti due ceppi non è stata identificata alcuna proteina di membrana.

Non è possibile associare la produzione-non produzione di biofilm con la presenza-assenza dei geni di resistenza (34) poiché dei due ceppi eritromicina-resistenti solo uno è iperproduttore di biofilm. Fra i sierotipi III (cosiddetti ceppi invasivi), la produzione di biofilm sembra essere più dipendente dal mezzo di coltura che dall'appartenenza sierotipica. Infine non è stata individuata una correlazione tra produzione di biofilm e proteine *alp*, probabilmente perché queste, sebbene siano in grado di evocare un'elevata risposta immunitaria non parteciperebbero in maniera determinante alla virulenza (adesività alle cellule, fibronectina, ecc.). Possiamo quindi concludere che la produzione di biofilm sembra essere una caratteristica ceppo-dipendente nel cui determinismo sembrano essere coinvolti fattori che noi non abbiamo evidenziato. Tuttavia, va comunque segnalato che il passaggio dall'aerofilia alla microaerofilia-anaerobiosi sembra essere l'unico comune denominatore nella produzione di biofilm.

In accordo ai dati presenti in letteratura tutti i ceppi isolati si sono mostrati sensibili alle penicilline, mentre due dei GBS (28,5%), entrambi appartenenti al sierotipo V, hanno mostrato un elevato grado di resistenza per i tre antibiotici saggiati. Per questi due ultimi ceppi di GBS è stato effettuato lo studio dei geni che ha segnalato, come prevedibile basandoci sul fenotipo costitutivo (resistenza sia ai macrolidi che ai lincosamidi), la presenza in particolare del gene *erm* (B) associato con *mef* (A), noti per determinare resistenza batterica.

Le sette donne del nostro studio, risultate positive allo screening colturale, hanno partorito spontaneamente, per via vaginale, a termine di gravidanza (39^a-41^a settimana). Tutte sono state sottoposte, come da protocollo, alla chemioprophilassi *intrapartum*.

Il decorso fisiologico ed afebrile del puerperio e, soprattutto, la mancanza di manifestazioni da infezione da GBS, sia ad esordio precoce che tardivo dei neonati delle donne sottoposte a trattamento, dimostra e conferma l'efficacia della profilassi antibiotica *intrapartum*.

In conclusione, nonostante siano in fase di studio nuove metodiche di prevenzione delle infezioni da GBS, come il vaccino, è auspicabile che, nell'immediato futuro, vengano adottate le linee guida su tutto il territorio nazionale per eseguire correttamente sia lo screening colturale sia la chemioprophilassi *intrapartum*

per le gravide colonizzate, data l'evidenza della sua efficacia.

Il presente lavoro è stato realizzato con fondi provenienti dai Progetti di Ricerca d'Ateneo 2006 e 2007 dell'Università degli Studi di Catania.

Bibliografia

1. BAKER CJ, BARRETT FF, GORDON RC, YOW MD. Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants. *J Pediatr* 1973; 82: 724-9.
2. BARTON LL, FEIGIN RD, LINS R. Group B beta hemolytic streptococcal meningitis in infants. *J Pediatr* 1973; 82: 719-23.
3. FRANCIOSI RA, KNOTSMAN JD, ZIMMERMAN RA. Group B streptococcal neonatal and infant infections. *J Pediatr* 1973; 82: 707-18.
4. MCCracken GH. Group B streptococci: the new challenge in neonatal infections. *J Pediatr* 1973;82:703-6.
5. BALDASSARI L. Infezioni da streptococco di gruppo B. Roma: Istituto Superiore di Sanità (2007). (Rapporti ISTISAN 07/28).
6. GHERARDI G, IMPERI M., BALDASSARRI L, PATARACCHIA M, ALFARONE G, RECCHIA, OREFICI G, DICUONZO G, CRETI R. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface protein, and antibiotic resistance among Group B streptococci in Italy. *J Clin Microbiol* Sept 2007; 45: 2909-16.
7. ROSENAU A, MARTINS K, AMOR S, GANNIER F, LANOTTE P, VAN DER MEE-MARQUET N, MEREGHETTI L, QUENTIN R.. Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the *fb*sA and *fb*sB genes. *Infect Immun* 2007; 75: 1310-17.
8. PRAKASH B, VEEREGOWDA BM, KRISHNAPPA G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Curr. Sci.* 2003; 85: 1299-307.
9. CVITKOVITCH G, YUNG-HUA LI Y-H, ELLEN RP. Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal Infections. *J Clin Invest* 2003; 112: 1626-32.
10. BALDASSARRI L, CRETI R, OREFICI G. Le infezioni da streptococco di gruppo B in Italia. Un problema importante per la salute della donna e del bambino. *Not. Ist. Sup. Sanità* 2007; 20: 8-11
11. PATTERSON MJ, EL BATOOL HAFEEZ A. Group B streptococci in human disease. *Bacteriol Rev.* 1976; 40: 774-92
12. PETTERSSON K. Perinatal infection with Group B streptococci. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12: 193-7.
13. HAMMERSCHLAG MR, BAKER CJ, ALPERT S, KASPER DL, ROSNER I, THURSTON P, WEBB BJ, MCCORMACK WM. Colonization with group B streptococci in girls under 16 years of age. *Pediatrics* 1977; 60: 473-6.
14. 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.
15. 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
16. REGAN JA, KLEBANOFF MA, NUGENT RP, ESCHENBACH DA, BLACKWELDER WC, LOU Y, GIBBS RS, RETTIG PJ, MARTIN DH, EDELMAN R. Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1354-60.
17. SCHRAG S, GORWITZ R, FULTZ-BUTTS K, SCHUCHAT A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep* 2002; 51: 1-22.
18. LIJOI D, DI CAPUA E, FERRERO S, MISTRANGELO E, GIANNATTASIO A, MORANO S, RAGNI N. The efficacy of 2002 CDC guidelines in preventing perinatal group B Streptococcal vertical transmission: a prospective study. *Arch Gynecol Obstet* 2007; 275: 373-79.
19. GARLAND SM, FLIEGNER JR. Group B streptococcus (GBS) and neonatal infections: the case for intrapartum chemoprophylaxis. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 1991; 31: 119-22
20. BOYER KM, GOTOFF SP. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. *N Engl J Med* 1986; 314: 1665-9.
21. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement*. CLSI document M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.
22. COMITE DE ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE. Statement 1996 CAMSF. Zone sizes and breakpoints for nonfastidious organism. *Clin Microbiol Infect* 1996; 2: S46-9.
23. PRUKSAKORN S, SITTISOMBUT N, PHORNPHUTKUL C, PRUKSACHATKUNAKORN C, GOOD MF, BRANDT E. Epidemiological Analysis of Non-M-Typeable Group A Streptococcus isolates from a Thai population in northern Thailand. *J. Clin. Microbiol* 2000; 38:1250-1254
24. SUTCLIFFE J, GREBE T, TAIT-KAMRADT A, WONDRACK L. Detection of Eritromycin-Resistant Determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2562-66.
25. SEPPALA H, SKURNIK M, SOINI H., ROBERTS MC, HUOVINEN P. A novel Erythromycin resistance methylase Gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents and Chemother* 1998; 42: 257-62.
26. ROBERTS MC, SUTCLIFFE J, COURVALIN P, JENSEN LB, ROOD J, SEPPALA H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1999; 43: 2823-30.
27. GHERARDI G, IMPERI M, BALDASSARRI L, PATARACCHIA M, ALFARONE G, RECCHIA S, OREFICI G, DICUONZO G, CRETI R. Molecular epidemiology and distri-

- bution of serotypes, surface protein, and antibiotic resistance among Group B Streptococci in Italy. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2909-16.
28. 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. *Journal of Clinical Microbiology*, June 2007, 45:1985-88.
 29. CRETÌ 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: 1326-29.
 30. RAMASWAMY SV, FERRIERI P, MADOFF LC, FLORES AE, KUMAR N, TETTELIN H, PAOLETTI LC. Molecular characterization of nontypeable Group B Streptococcus. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2398-403.
 31. TRIJBELS-SMEULDERS MA, KOLLÉE LA, ADRIAANSE AH, KIMPEN JL, GERARDS LJ. Neonatal group B streptococcal infection: incidence and strategies for prevention in Europe. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 172-3.
 32. KADANALI A, ALTOPARLAK U, KADANALI S. Maternal carriage and neonatal colonisation of group B streptococcus in eastern Turkey: prevalence, risk factor and antimicrobial resistance. *Int J Clin Pract* 2005; 59: 437-40.
 33. CAMPBELL JR, HILLIER SL, KROHN MA, FERRIERI P, ZALEZNIK DE, BAKER CJ. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at welivery. *Obstet Gynecol.* 2000; 96: 498-503.
 34. BALDASSARRI L, CRETÌ R, RECCHIA S, IMPERI M, FACINELLI B, GIOVANETTI E, PATARACCHIA M, ALFARONE G, OREFICI G. Therapeutic failures of antibiotics used to treat macrolide-susceptible *Streptococcus pyogenes* infections may be due to biofilm formation. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2721-27.