



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Α. ΣΥΡΟΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΣ

---

*Διδακτορική Διατριβή*

**« ΦΟΡΕΙΑ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE***  
**ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΑΙΔΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ**  
**ΤΟΥ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟΥ:**  
**ΟΡΟΤΥΠΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ»**

υπό

**ΝΤΕΝΙΖ Χ. ΧΡΥΣΑΝΘΟΠΟΥΛΟΥ**

ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΥ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2012

© 2012 Ντενίζ Χρυσανθοπούλου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής  
Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή  
των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (9<sup>η</sup>/05-10-2011 ΓΣΕΣ):

- 1<sup>ος</sup> εξεταστής**  
(επιβλέπων) **Δρ. Συρογιαννόπουλος Γεώργιος**  
Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 2<sup>ος</sup> εξεταστής** **Δρ. Πετεινάκη Ευθυμία**  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 3<sup>ος</sup> εξεταστής** **Δρ. Σκεντέρης Νικόλαος**  
Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 4<sup>ος</sup> εξεταστής** **Δρ. Ροηλίδης Εμμανουήλ**  
Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής,  
Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσ/νίκης
- 5<sup>ος</sup> εξεταστής** **Δρ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστος**  
Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και  
Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας
- 6<sup>ος</sup> εξεταστής** **Δρ. Ρηγοπούλου Ειρήνη**  
Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 7<sup>ος</sup> εξεταστής** **Δρ. Γριβέα Ιωάννα**  
Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ξεκινώντας την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες σε όλους εκείνους που με βοήθησαν να πραγματοποιήσω και να ολοκληρώσω την εργασία αυτή.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και Διευθυντή της Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γεώργιο Συρογιαννόπουλο. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την επιλογή και ανάθεση σε μένα του θέματος, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ σε ένα τόσο υψηλό επίπεδο. Η συμβολή του υπήρξε καθοριστική, καθώς μου προσέφερε πολύτιμες γνώσεις στον τομέα των παιδιατρικών λοιμώξεων και συνέβαλε σημαντικά στην εκπαίδευσή μου ως παιδίατρο. Η καθοδήγηση και η συνεχής υποστήριξη που μου προσέφερε, τόσο κατά την πορεία όσο και κατά την συγγραφή της εργασίας αυτής, υπήρξε ανεκτίμητη. Για όλα τα παραπάνω, τον ευχαριστώ και νιώθω μεγάλη τύχη, τιμή και ευγνωμοσύνη που με επέλεξε για συνεργάτη του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής κ. Ιωάννα Γριβέα, της οποίας ο ρόλος υπήρξε καθοριστικός για την ολοκλήρωση της εργασίας. Σε αυτήν οφείλω την εκπαίδευσή μου στο εργαστήριο και το γεγονός, ότι μέσα από τη συνεργασία μας μπόρεσα να αποκομίσω πολύτιμες γνώσεις σε ότι αφορά την απομόνωση, την ταυτοποίηση και την οροτυπία του πνευμονιόκοκκου. Νιώθω βαθιά υποχρέωση και την ευχαριστώ θερμά για την συνεργασία και την υποστήριξή της σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Παιδιατρικής κ. Νικόλαο Σκεντέρη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Έφη

Πετεινάκη για την επίβλεψη, τις πολύτιμες υποδείξεις τους και τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κ. Ροηλίδη Εμμανουήλ, Καθηγητή Παιδιατρικής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσ/νίκης, κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο, Αναπληρωτή Καθηγητή Επιδημιολογίας και Υγιεινής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την κ. Ρηγοπούλου Ειρήνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την συμμετοχή τους στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή.

*Στους γονείς και στο σύζυγό μου*

## **ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

### **ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Όνοματεπώνυμο : Χρυσανθοπούλου Ντενίζ  
Ημερομηνία γέννησης : 8 Φεβρουαρίου 1973  
Τόπος γέννησης : Λουΐσβιλ Κεντάκυ, ΗΠΑ  
Οικογενειακή κατάσταση : Έγγαμος με δύο παιδιά  
Διεύθυνση κατοικίας : Α.Παπαναστασίου 73, 41222 Λάρισα  
Διεύθυνση ιατρείου : Ηπείρου 65, 41222 Λάρισα  
Τηλέφωνο : 2410-611212, 6974863228  
e-mail: [denisec@otenet.gr](mailto:denisec@otenet.gr)

### **ΣΠΟΥΔΕΣ**

1990:

Απολυτήριο Λυκείου, Αμερικάνικο Κολλέγιο Ανατόλια Θεσ/νίκης

Μάρτιος 1999:

Πτυχίο Ιατρικού Τμήματος Παν/μίου Θεσ/νίκης, βαθμός «λίαν καλώς»

Μαΐος 2005:

Υποψήφια διδάκτορας του Παν/μίου Θεσσαλίας

### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

Αγγλικά: Κάτοχος Certificate of Proficiency (University of Cambridge, University of Michigan)

Γαλλικά: Κάτοχος Certificat de Langue Francaise

### **ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

1999-2000

Αγροτικός ιατρός στο Π.Ι Γεωργιανών Ημαθίας

Ιανουάριος 2001-Νοέμβριος 2002

Ειδικεύομενη Ιατρός στην Παιδιατρική κλινική του Π.Γ.Ν. Λάρισας

Νοέμβριος 2002-Απρίλιος 2003

Ειδικεύομενη Ιατρός στην Νεογνολογική κλινική του Π.Π.Γ.Ν. Λάρισας

Απρίλιος 2007- Νοέμβριος 2009

Ειδικεύομενη Ιατρός στην Παιδιατρική κλινική του Π.Π.Γ.Ν. Λάρισας

Απρίλιος 2010

Απόκτηση τίτλου ειδικότητας παιδιατρικής

Οκτώβριος 2010

Έναρξη ιατρείου ως ελεύθερος επαγγελματίας παιδίατρος

## **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ.**

- Grivea IN, Tsantouli AG, Chryssanthopoulou DC, Syrogiannopoulos GA. Interaction of the heptavalent pneumococcal vaccine and the use of individual antibiotics among children on nasopharyngeal colonization with erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010; 29:97-105.
- Eboriadou M, Chryssanthopoulou D, Stamoulis P, Damianidou L, Haidopoulou K. The effectiveness of local corticosteroids therapy in the management of mild to moderate viral croup. Minerva Pediatr. 2010; 62(1):23-8.
- Syrogiannopoulos Grivea IN, Sourla A, Ntokou E, Chryssanthopoulou DC, Tsantouli AG, Syrogiannopoulos GA. Macrolide resistance determinants among *Streptococcus pneumoniae* isolates from carriers in Central Greece. BMC Infect Dis under final revision.
- GA, Grivea IN, Chryssanthopoulou DC, The Hellenic Antibiotic-Resistant Respiratory Pathogens (HARP) Study Group. The 2005 Study of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal colonization in day-care centers of Central Greece. 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington DC, USA, 2005.
- Grivea IN, Chryssanthopoulou DC, The Hellenic Antibiotic-Resistant Respiratory Pathogens (HARP) Study Group, Syrogiannopoulos GA. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal colonization in day-care centers of Central Greece. 5th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, Alice Springs, Australia 2006.
- Syrogiannopoulos GA, Bogdanovich T, Grivea IN, Bozdogan B, Katopodis GD, Chryssanthopoulou DC, Ednie L, Appelbaum PC. *Streptococcus pyogenes* isolates with reduced susceptibility to levofloxacin from children with tonsillopharyngitis in Greece. 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, California, USA, 2006.



- Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, Chryssanthopoulou DC, Katopodis GD, the Hellenic Antibiotic-Resistant Respiratory Pathogens (HARP) Study Group. The in vitro susceptibility of *Streptococcus pyogenes* correlates with the bacteriological outcome of the 7- or 10-day clarithromycin treatment in children with tonsillopharyngitis. 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, California, USA, 2006.
- Χ.Χρυσανθόπουλος, Μ. Εμποριάδου, Α. Χαϊδοπούλου, Ν. Χρυσανθοπούλου, Γ. Μπίτσιου, Ε.Γεωργιάδου, Ν.Μαγκλαβέρας. Διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση της ιγμορίτιδας από τον παιδίατρο στην καθημερινή κλινική πράξη. 39<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κρήτη, 2001.
- Γ.Βανιώτη-Παπασάββα, Ι.Αγορογιάννη-Τσάμη, Σ.Αλευρά-Κόκκαλη, Ν.Χρυσανθοπούλου, Α.Κατσιάνη, Ε.Πηλιτσίδου. Δηλητηριάσεις στο νομό Λάρισας - Αναδρομική μελέτη. 40<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, 2002.
- Χρυσανθοπούλου Διώνη, Γριβέα Ιωάννα, Καραδόντα Άννη, Συρογιαννόπουλος Γ.  
Μελέτη του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με πνευμονιόκοκκο σε παιδιά που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς στη Θεσσαλία το 2005.  
44ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ρόδος, 2006.

**« ΦΟΡΕΙΑ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*  
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΑΙΔΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ  
ΤΟΥ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟΥ:  
ΟΡΟΤΥΠΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ»**

**ΝΤΕΝΙΖ Χ. ΧΡΥΣΑΝΘΟΠΟΥΛΟΥ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2012

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Δρ. Συρογιαννόπουλος Γεώργιος**, Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- **(Επιβλέπων)**
2. **Δρ. Πετεινάκη Ευθυμία**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. **Δρ. Σκεντέρης Νικόλαος**, Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>ΣΕΛΙΔΑ</b>
<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	13
1.Ιστορική αναδρομή.....	14
2.Μικροβιολογία.....	18
2.1 Εισαγωγή.....	18
2.2 Αντιγονική δομή.....	20
2.3 Πολυσακχαριδικό έλυτρο.....	21
2.4 Κυτταρικό τοίχωμα-κυτταροπλασματική μεμβράνη.....	24
2.5 Ορότυποι πολυσακχαριδικού ελύτρου.....	27
3.Επιδημιολογία.....	34
3.1 Φορεία.....	34
3.2 Παράγοντες που επιδρούν στη φορεία.....	35
3.3 Μηχανισμοί αποικισμού.....	36
4.Παθογένεση πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης.....	39
4.1 Προσκόλληση.....	39
4.2 Έλυτρο και φαγοκυττάρωση.....	44
4.3 Λοιμογόνοι παράγοντες που δε σχετίζονται με το έλυτρο.....	44
4.4 Ενεργοποίηση συμπληρώματος.....	48
5. Μηχανισμοί άμυνας ξενιστή.....	49
5.1 Μη ανοσολογικοί μηχανισμοί.....	49
5.2 Ανοσολογικοί μηχανισμοί.....	49
6.Κλινικά σύνδρομα.....	53
6.1 Οξεία μέση ωτίτιδα.....	55
6.2 Ρινοκολπίτιδα.....	57
6.3 Έξαρση χρόνιας βρογχίτιδας.....	57

6.4 Πνευμονία.....	57
6.5 Βακτηριαμία.....	61
6.6 Μηνιγγίτιδα.....	61
6.7 Άλλες λοιμώξεις.....	63
7.Ανοσοπροφύλαξη-Ενεργητική ανοσοποίηση.....	64
7.1 Απλό πολυσακχαριδικό εμβόλιο.....	65
7.2 Συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια.....	69
7.3 Πρωτεΐνικά εμβόλια.....	74
8.Αντοχή του πνευμονιόκοκκου στα αντιβιοτικά.....	77
8.1 Αντοχή στην πενικιλίνη.....	77
8.2 Αντοχή στις μακρολίδες.....	80
8.3 Μηχανισμοί αντοχής σε άλλα αντιβιοτικά.....	82
8.4 Συχνότητα ανθεκτικών στελεχών.....	84
8.5 Ορότυποι με αντοχή στα αντιβιοτικά.....	85
<b>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>86</b>
1.Εισαγωγή.....	87
2.Υλικό και μέθοδοι.....	89
3.Αποτελέσματα.....	94
4.Συζήτηση.....	119
<b>Γ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>128</b>
<b>Δ. SUMMARY.....</b>	<b>130</b>
<b>E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>132</b>

# Γ Ε Ν Ι Κ Ο Μ Ε Ρ Ο Σ

## 1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Ο πνευμονιόκοκκος αναγνωρίζεται ως ένας από τους σημαντικότερους παθογόνους μικροοργανισμούς για τον άνθρωπο. Θεωρείται σημαντικό αίτιο πνευμονίας, μηνιγγίτιδας, μικροβιαμίας, ρινοκολπίτιδας καθώς και οξείας μέσης ωτίτιδας. Επιπλέον, λιγότερο συχνά, αποτελεί αιτία άλλων διεισδυτικών λοιμώξεων όπως ενδοκαρδίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα και περιτονίτιδα. Κάθε χρόνο ένα εκατομμύριο παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών πεθαίνουν από πνευμονία και άλλες πνευμονιοκοκκικές συστηματικές λοιμώξεις [1]. Επίσης, σημαντική είναι η νοσηρότητα και η θνητότητα από πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις σε παιδιά και ενήλικες με ανοσοανεπάρκεια ή σπληνεκτομή [2]. Η πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα είναι μία από τις σοβαρότερες διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις με υψηλή θνητότητα και μεγάλη συχνότητα νευρολογικών υπολειμμάτων. Ανάλογα με την ηλικία, 30%-60% των επιζώντων αναπτύσσουν επιπλοκές όπως απώλεια ακοής, νευρολογικά επακόλουθα και νευροψυχολογικές διαταραχές. Η μελέτη του πνευμονιόκοκκου ταυτίζεται με την ιστορία της μικροβιολογίας [3-5].

### Ονοματολογία

Ο πνευμονιόκοκκος αναγνωρίστηκε από τον Klebs το 1875 σε βρογχικές εκκρίσεις ασθενών, οπότε και συσχετίστηκε με τη λοβώδη πνευμονία. Το 1881 δύο ερευνητές σχεδόν ταυτόχρονα, ταυτοποίησαν τον πνευμονιόκοκκο. Ο Pasteur, στη Γαλλία, τον απομόνωσε σε κουνέλι, στο οποίο είχε ενεθεί σίελος από ασθενή με λύσσα. Τον ονόμασε *Microbe Septicemique du saliva*. Ο Sternberg, στις ΗΠΑ, τον ανακάλυψε σε κουνέλι που είχε ενεθεί δική του σίελος. Τον ονόμασε *Micrococcus pasteurii*. Η ονομασία πνευμονιόκοκκος

(*pneumococcus*) δόθηκε αργότερα όταν αναγνωρίστηκε ως το συχνότερο αίτιο της λοβώδους πνευμονίας.

Η αναγνώριση του μικροοργανισμού διευκολύνθηκε σημαντικά με την ανάπτυξη της χρώσης Gram το 1884. Το 1926 χρησιμοποιήθηκε ο όρος *diplococcus* με βάση τη μορφή που εμφάνιζε στα πτύελα με τη συγκεκριμένη χρώση (Gram). Το 1974 μετονομάστηκε σε *Streptococcus pneumoniae*, με βάση τη μορφή που είχε μετά από ανάπτυξη σε υγρό θρεπτικό υλικό.

Ο πνευμονιόκοκκος αποτελεί το πρότυπο ελυτροφόρου εξωκυτταρίου παθογόνου μικροοργανισμού. Όταν προσβάλλει έναν οργανισμό ο οποίος δεν διαθέτει αντισώματα ειδικά για αυτόν (IgG, IgM, IgA), ο πνευμονιόκοκκος ανθίσταται στην φαγοκυττάρωσή του από τα λευκά αιμοσφαίρια του οργανισμού και στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται στους ανθρώπινους ιστούς, τους οποίους διηθεί με τους μηχανισμούς που θα αναπτυχθούν παρακάτω .

### **Ανάπτυξη χυμικής ανοσίας**

Στις αρχές του 1890 οι Felix και George Klempner διαπίστωσαν, ότι εάν εμβολιασθούν πειραματόζωα με νεκρούς πνευμονιόκοκκους, διαθέτουν ανοσία έναντι του συγκεκριμένου μικροβίου. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση, ότι αυτή η προστασία (ανοσία) μπορούσε να μεταφερθεί και από νοσούντες μύες σε υγιείς. Η μεταφορά της ανοσίας αποδόθηκε σε κάποιους χυμικούς παράγοντες που μεταφέρθηκαν από το άρρωστο στο υγιές ζώο. Σήμερα γνωρίζουμε ότι αυτοί οι χυμικοί παράγοντες είναι τα αντισώματα (ανοσοσφαιρίνες IgG, IgM, IgA) που είναι ειδικά για κάθε αντιγόνο. Η ίδια παρατήρηση, δηλαδή μεταφορά ανοσίας, επιβεβαιώθηκε και στον άνθρωπο. Τα αντισώματα καθιστούν το μικροοργανισμό «εύπεπτο» από τα λευκά αιμοσφαίρια. Η ανοσολογική αυτή διεργασία ονομάζεται

οψωνινοποίηση, όρος που προέρχεται από την ελληνική λέξη «όψων» που σημαίνει «παρασκευή εδέσματος». Στις αρχές του 20ου αιώνα η θεωρία της οψωνινοποίησης θεμελιώθηκε και αποδόθηκε στο πολυσακχαριδικό έλυτρο, το οποίο δρα ως αντιγόνο οπότε και επάγει την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων εναντίον του. Οι παραπάνω παρατηρήσεις αποτέλεσαν τη βάση για την ανάπτυξη της θεωρίας που σήμερα ονομάζεται χυμική ανοσία.

### **Αναγνώριση οροτύπων**

Η ταυτοποίηση των οροτύπων (στελεχών) βασίσθηκε στην παραπάνω παρατήρηση, δηλαδή στην παραγωγή διαφορετικών ειδικών αντισωμάτων για κάθε στέλεχος που ενοφθαλμιζόταν σε πειραματόζωα. Στις αρχές του 20ου αιώνα είχαν ταυτοποιηθεί τρεις ορότυποι, οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν με τους αριθμούς 1, 2 και 3. Η οροομάδα 4 περιελάμβανε τα μη τυποποιήσιμα κατά την περίοδο αυτή στελέχη πνευμονιόκοκκου.

### **Έναρξη εφαρμογής εμβολιασμών**

Οι παραπάνω διαπιστώσεις βρήκαν πρακτική εφαρμογή στην αντιμετώπιση επιδημιών λοβώδους πνευμονίας που προσέβαλε μεγάλους πληθυσμούς, όπως στην Αφρική [3-6]. Αρχικά, για εμβολιασμό, χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία νεκρά στελέχη. Πολύ σύντομα οι Heidelberg και Avery [7] απέδειξαν, ότι το προστατευτικό αντίσωμα αντιδρούσε μόνο με τον πολυσακχαρίτη του ελύτρου του νεκρού στελέχους που είχε χρησιμοποιηθεί. Σε ευρεία κλίμακα ο εμβολιασμός εφαρμόσθηκε σε κρατικά νοσοκομεία της πολιτείας της Μασαχουσέτης των ΗΠΑ [8, 9]. Μετά τον Felton [8, 9] οι McLeod, Hodges και Heidelberg [10] διαπίστωσαν, ότι ο εμβολιασμός στρατιωτών στο 2ο παγκόσμιο πόλεμο με πολυσακχαριδικό εμβόλιο από κεκαθαμένους πολυσακχαρίτες του ελύτρου για 4 ορότυπους,



ελάττωσε σημαντικά τον επιπολασμό της πνευμονίας μόνο για τους 4 αυτούς ορότυπους και όχι για τα υπόλοιπα στελέχη του. Μετά τον 2ο Παγκόσμιο πόλεμο ένα εξαδύναμο εμβόλιο πήρε άδεια στις Ηνωμένες Πολιτείες αλλά η χρήση του ήταν περιορισμένη και σύντομα αποσύρθηκε. Το 1977 δημιουργήθηκε 14-δύναμο πολυσακχαριδικό εμβόλιο και ακολούθησε το 1983 το 23-δύναμο που κυκλοφορεί έως σήμερα.

### **Γενετικές παρατηρήσεις**

Το 1920 πειράματα έδειξαν ότι όταν ενεθούν ενδοπεριτοναϊκά σε μύες, ζώντα χωρίς κυτταρικό έλυτρο στελέχη πνευμονιόκοκκου μαζί με νεκρά αλλά ελυτροφόρα στελέχη, τότε αναπτύσσονται ζώντα στελέχη με έλυτρο [11]. Δηλαδή μια γενετική πληροφορία, στη συγκεκριμένη περίπτωση το κυτταρικό έλυτρο, «μεταβιβάζεται» σε μη ελυτροφόρα στελέχη. Χρειάστηκε να περάσουν πολλά χρόνια για την εξήγηση αυτής της παρατήρησης. Ο μετασχηματισμός (transformation) του πνευμονιόκοκκου, αποδείχθηκε οριστικά, όταν οι πρώτοι πνευμονιόκοκκοι απέκτησαν την ικανότητα να μεταβάλλονται σε ελυτροφόρα στελέχη με την απόκτηση DNA από τους νεκρούς πνευμονιόκοκκους [12]. Δηλαδή το DNA είναι το υπεύθυνο γενετικό υλικό για το μετασχηματισμό και την αλλαγή του φαινότυπου του μικροβίου από μη ελυτροφόρο σε ελυτροφόρο στέλεχος.

## 2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

### 2.1. Εισαγωγή

Ο πνευμονιόκοκκος είναι Gram θετικός κόκκος που περιγράφεται ως διπλόκοκκος με σχήμα λόγχης. Διατάσσεται κατά ζεύγη με τις αμβλείες πλευρές του αντικρουστές καμιά φορά και σε κοντές αλυσίδες. Ο πνευμονιόκοκκος είναι διπλόκοκκος ακίνητος, ασπορογόνος, αερόβιος και εκλεκτικά αναερόβιος και περιβάλλεται από παχύ έλυτρο [13].

### Καλλιέργεια

Αναπτύσσεται εύκολα σε αιματούχο άγαρ, όχι όμως και στο σκέτο θρεπτικό άγαρ. Οι αποικίες του μετά από 24ωρη ανάπτυξη είναι κυκλικές, γυαλιστερές, ημιδιαφανείς με φουσκωτή περιφέρεια και ελαφρώς χαμηλότερο κέντρο. Αν το καλλιέργημα παραμείνει στον κλίβανο για ακόμη μία ημέρα, η κοίλανση γίνεται εντονότερη και οι αποικίες παίρνουν τη χαρακτηριστική μορφή σαν «πιατάκια». Ο πνευμονιόκοκκος παράγει μια αιμολυσίνη γνωστή ως πνευμονολυσίνη, που διασπά ατελώς την αιμοσφαιρίνη. Έτσι όταν καλλιεργείται σε τρυβλία με αιματούχο άγαρ, οι αποικίες πνευμονιόκοκκου που σχηματίζονται περιβάλλονται από μία πράσινη άλω, τη ζώνη ατελούς αιμόλυσης (α-αιμόλυση). Οι αποικίες του γρήγορα αυτολύονται από τα αυτολυτικά ένζυμα του μικροβίου και στη θέση τους παραμένουν τα ίχνη της αποικίας ως αποικία - φάντασμα (phantom colonies) [13].

Οι πνευμονιόκοκκοι ποικίλλουν ανάλογα με την μορφολογία των αποικιών τους. Αποικίες που ανήκουν στον ορότυπο 3 είναι χαρακτηριστικά πολύ μεγάλες (>3 mm) και βλεννώδεις, κάποιες του ορότυπου 19 είναι επίσης βλεννώδεις αλλά μικρότερου μεγέθους, ενώ αποικίες των οροτύπων 1 και 14 συνήθως είναι πολύ μικρότερες (<1 mm). Οι αποικίες του ίδιου στελέχους

μπορεί να διαχωριστούν σε διαφανείς και αδιαφανείς, όταν αναπτυχθούν σε διαφανές θρεπτικό υλικό και διέλθει φως μέσα από αυτές [14]. Μελέτες έδειξαν ότι οι διαφανείς αποικίες έχουν μεγαλύτερη ικανότητα να αποικίζουν τον ρινοφάρυγγα σε σύγκριση με τις αδιαφανείς [15].

### **Βιοχημικές ιδιότητες**

Ο πνευμονιόκοκκος διασπά διάφορα σάκχαρα με παραγωγή οξέος όπως τη γλυκόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη, λακτόζη, μαλτόζη, ραφινόζη και ινουλίνη όχι όμως τη δουλσιτόλη και τη σορβιτόλη. Ειδικές διαχωριστικές ιδιότητες είναι οι εξής: οπτοχίνη (+), διαλυτότητα χολής(+), εσκουλίνη (-), NaCl 6,5% (-), πυρρολινοδάση (-), δορυφορισμός(-), CAMP δοκιμή (+), Lancefield αντιγόνο (-).

### **Ανθεκτικότητα**

Ο πνευμονιόκοκκος είναι από τα πιο ευαίσθητα μικρόβια. Σκοτώνεται στους 52°C σε 15 min και στα καλλιεργήματα με αυτόλυση. Στα πύελα πασχόντων διατηρείται ζωντανός για μερικές ημέρες όταν φυλαχθούν αυτά στο ψυγείο.

Οι πνευμονιόκοκκοι απομονώνονται στο εργαστήριο με βάση τα εξής χαρακτηριστικά: α) τη ζώνη α-αιμόλυσης σε αιματούχο άγαρ, β) την αρνητική δοκιμασία καταλάσης, γ) την ευαισθησία στην οπτοχίνη και δ) τη διαλυτότητα στα χολικά άλατα. Περιστασιακά μπορεί κάποιοι άλλοι στρεπτόκοκκοι να έχουν ευαισθησία στην οπτοχίνη ή και κάποιοι πνευμονιόκοκκοι να παρουσιάζουν αντοχή στην οπτοχίνη [16]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, προκειμένου να αναγνωριστούν τα στελέχη πνευμονιόκοκκου, ελέγχεται και η διαλυτότητα στα χολικά άλατα [17]. Σπανίως, έχουν αναφερθεί στελέχη αδιάλυτα στα χολικά άλατα [18].

## 2.2. Αντιγονική δομή

Η αντιγονική δομή του πνευμονιόκοκκου είναι παρόμοια με αυτή των άλλων στρεπτοκόκκων με τη διαφορά ότι περιβάλλεται από παχύ έλυτρο. Αντιγονικές ιδιότητες έχουν όλες οι ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης αλλά ισχυρότερο αντιγόνο είναι αυτό του ελύτρου [13]. Συνοπτικά τα αντιγόνα του πνευμονιόκοκκου είναι τα εξής:

1. Αντιγόνο ελύτρου ή SSS-ουσία (species specific substance). Είναι ένα πολυσακχαριδικό αντιγόνο και αποτελείται από γλυκουρονικό οξύ ενωμένο με διάφορα αμινοσάκχαρα που προσδίδουν την αντιγονική ειδικότητα. Βάσει της αντιγονικής αυτή διαφοράς του ελύτρου των πνευμονιόκοκκων διαχωρίζονται σε ορότυπους. Η SSS ουσία ανθίσταται στην φαγοκυττάρωση γιατί παρεμβαίνει στον οψωνισμό (οψωνινοποίηση): αντέχει στα λυτικά ένζυμα των φαγοκυττάρων και έτσι προστατεύει ή επιβραδύνει το θάνατο του φαγοκυτταρωμένου πνευμονιόκοκκου. Τα αντισώματα κατά του ελύτρου αντιδρούν με πολυσακχαριδικά αντιγόνα και άλλων μικροβίων όπως κλεμπσιελλών ή ομάδων αίματος.

2. Αντιγόνο M. Είναι λεύκωμα του κυτταρικού τοιχώματος και μοιάζει με την M-ουσία των στρεπτοκόκκων A-ομάδας αλλά δε σχετίζεται με την παθογόνο δράση του μικροβίου. Τα αντισώματα έναντι αυτού δεν προστατεύουν από τη νόσο. Παρουσιάζει αντιγονική ειδικότητα αλλά αυτή συμβαδίζει με την ειδικότητα του αντιγόνου του ελύτρου και δεν έχει αντιγονική ομοιότητα με την M-ουσία ή τα άλλα πρωτεϊνικά αντιγόνα των άλλων στρεπτοκόκκων.

3. Αντιγόνο C. Είναι το υδατανθρακικό πολυσακχαριδικό αντιγόνο του κυτταρικού τοιχώματος και είναι το ίδιο για όλους τους πνευμονιόκοκκους με μικρές χημικές διαφορές. Αποτελεί δηλαδή το αντιγόνο του είδους και είναι

μέρος του Forssman αντιγόνου των πνευμονιόκοκκων (λιποτειχοϊκό οξύ). Δεν πρόκειται για το C-σακχαριδικό κατά Lancefield αντιγόνο, το οποίο και δε διαθέτει ο πνευμονιόκοκκος. Το C-αντιγόνο εδράζεται στην έσω και έξω επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος.

4. Τειχοϊκό οξύ. Είναι συνδεδεμένο με το κυτταρικό τοίχωμα και είναι το πιο ανοσογόνο αντιγόνο. Προκαλεί παραγωγή αντισωμάτων προς το κυτταρικό τοίχωμα.

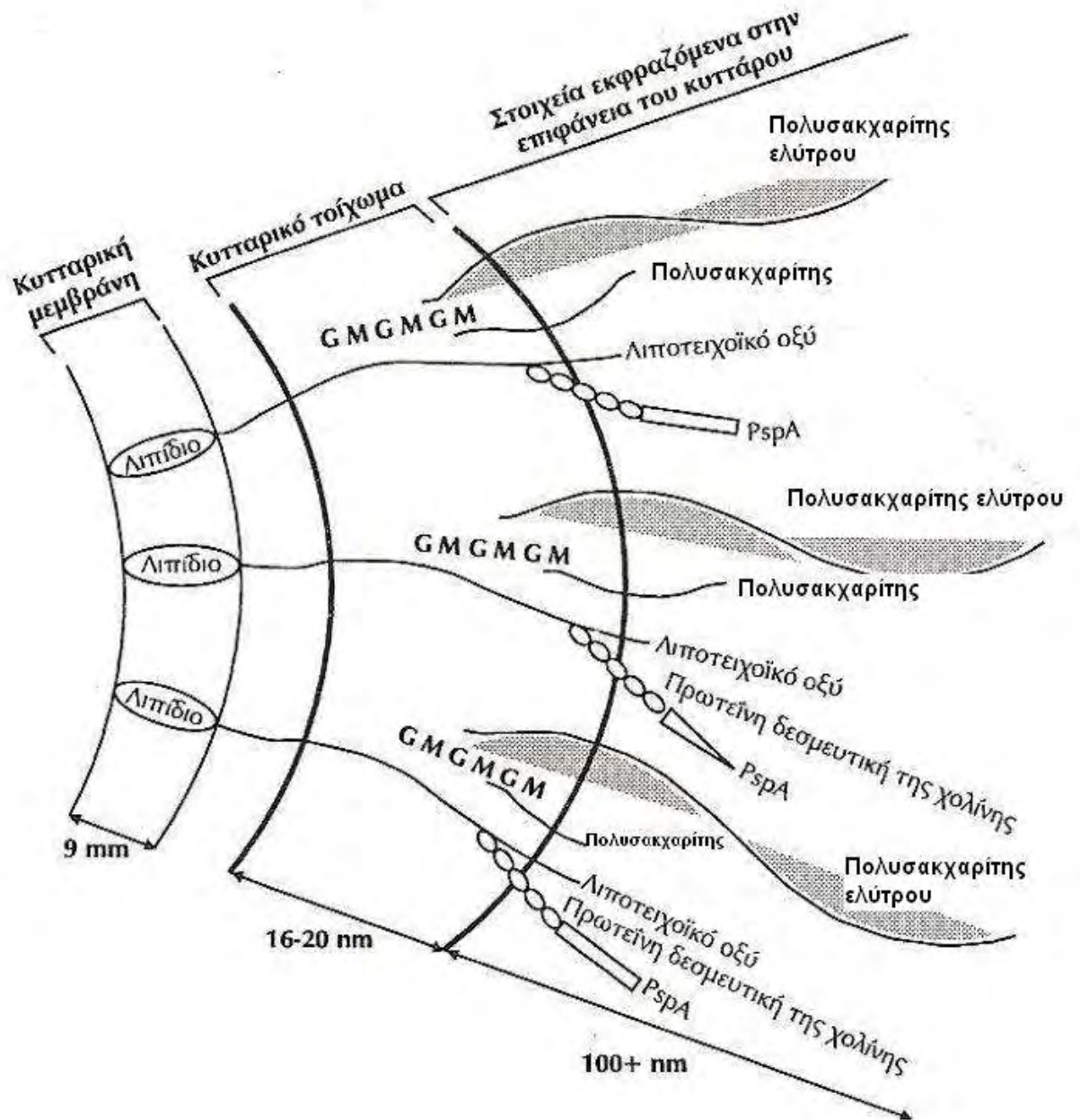
5. Το Forssman αντιγόνο, κοινό σε όλους τους πνευμονιοκόκκους, αναστέλλει τη δράση των αυτολυτικών ενζύμων, το κυριότερο των οποίων είναι μία αμιδάση.

### **2.3. Πολυσακχαριδικό έλυτρο**

Το πολυσακχαριδικό έλυτρο αποτελεί τον κύριο παράγοντα παθογονικότητας του πνευμονιόκοκκου και είναι το βασικό δομικό και αντιγονικό χαρακτηριστικό του. Αποτελείται από πολυμερή πολυσακχαριτών που συνδέονται σταθερά με δύο συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, τη πεπτιδογλυκάνη και το C-πολυσαχαρίτη. Εξαίρεση αποτελεί ο ορότυπος 3 που φέρει άφθονο πολυσακχαρίτη που συνδέεται ελάχιστα ή καθόλου με το κυτταρικό τοίχωμα [19]. Το έλυτρο αποτελείται από επαναλαμβανόμενους ολιγοσακχαρίτες, που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα από 2 ως 7 μονοσακχαρίτες [18, 19]. Οι πιο συχνοί μονοσακχαρίτες που παρουσιάζονται σε διάφορους συνδυασμούς είναι οι  $\alpha/\beta$ -D-γλυκόζη,  $\alpha/\beta$ -D-γαλακτόζη,  $\alpha/\beta$ -L-ραμνόζη, N-ακετυλ- $\alpha/\beta$ -D-γλυκοζαμίνη, N-ακετυλ- $\alpha/\beta$ -D-γαλακτοζαμίνη, N-ακετυλ- $\beta$ -D-μανοζαμίνη, N-ακέτυλ- $\alpha$ -L-φουκοζαμίνη και  $\alpha/\beta$ -D-γλυκουρονικό οξύ. Οι ολιγοσακχαρίτες πολυμερίζονται και μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω τρανφερασών.

Βάσει της αντιγονικής δομής του πολυσακχαριδικού αντιγόνου, οι πνευμονιόκοκκοι διαχωρίζονται σε διάφορους τύπους. Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση του ελύτρου μιας συγκεκριμένης ορομάδας λειτουργούν ως μεταγραφική μονάδα και αναφέρονται με τον όρο «κασσέτα» [20-23]. Μερικές αλληλουχίες DNA είναι κοινές σε όλους τους πνευμονιόκοκκους, παράλληλα όμως υπάρχουν κάποιες που είναι μοναδικές για τον κάθε συγκεκριμένο ορότυπο.

Οι πνευμονιόκοκκοι χαρακτηρίζονται από επιδεκτικότητα (competence) [24] και εμφανίζουν αξιοσημείωτη ικανότητα ανταλλαγής γενετικού υλικού τόσο με στελέχη στρεπτοκόκκων του ίδιου είδους, όσο και με στελέχη στρεπτοκόκκων άλλων ειδών. Η μεταφορά ρυθμίζεται από τη δράση πεπτιδίων, των φερομονών ή φερομονών [24-26]. Η διεργασία ενσωμάτωσης ξένου γενετικού υλικού ονομάζεται μετασχηματισμός και οι πνευμονιόκοκκοι που προκύπτουν έχουν νέα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (traits). Ο μετασχηματισμός του ελύτρου λαμβάνει χώρα σε πειραματικές συνθήκες αλλά έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει και στη φύση [27]. Με τεχνικές αποτύπωσης του γενετικού υλικού έχει αποδειχθεί ότι οι πνευμονιόκοκκοι μπορούν να αποκτήσουν μια σειρά γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή ελύτρου διαφορετικού ορότυπου. Το συγκεκριμένο γεγονός περιγράφεται ως αλλαγή (switch) του τύπου του ελύτρου.



Σχήμα 1. Απεικόνιση των συστατικών επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου

#### 2.4. Κυτταρικό τοίχωμα και κυτταροπλασματική μεμβράνη

Το κυτταρικό τοίχωμα του πνευμονιόκοκκου αποτελείται από διασταυρούμενες αλύσους πεπτιδογλυκάνης, ανάμεσα στις οποίες, διασπείρεται το τειχοϊκό οξύ [28]. Πρόκειται για ένα υδατανθρακικό πολυμερές που περιέχει φωσφορυλχολίνη και προβάλλει μέσα στο πολυσακχαριδικό έλυτρο. Το τειχοϊκό οξύ συνδέεται ομοιοπολικά με την πεπτιδογλυκάνη στην εξωτερική επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος. Το τειχοϊκό οξύ μαζί με τα στενά προσκολλημένα τμήματα πεπτιδογλυκάνης σχηματίζει το C-πολυσακχαρίτη.

Ο C-πολυσακχαρίτης αποτελεί χαρακτηριστικό συστατικό του πνευμονιόκοκκου και υπάρχει σε όλα τα στελέχη αλλά και σε ορισμένα άλλα είδη α-αιμολυτικών στρεπτόκοκκων [28]. Περιέχει φωσφορυλχολίνη και περιλαμβάνεται στο τειχοϊκό οξύ ενώ βρίσκεται συνδεδεμένος με την πεπτιδογλυκάνη στην εξωτερική επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος. Η περιοχή της φωσφορυλχολίνης είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του πνευμονιόκοκκου με τις πρωτεΐνες που εμφανίζονται στην κυκλοφορία στην οξεία φάση της λοίμωξης, τις C-αντιδρώσες πρωτεΐνες.

Η πεπτιδογλυκάνη συντίθεται ενδοκυττάρια από πρόδρομους δισακχαρίτες, τη N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη και το N-ακετυλο-μουραμικό οξύ. Στη συνέχεια, με σύνδεση αμινοξέων στο μουραμικό οξύ δημιουργούνται στελεχιαία πεπτιδίδια που διασταυρώνονται και συνδέονται με τη σειρά τους με γέφυρες πενταγλυκίνης που προσδίδουν ισχύ στο κυτταρικό τοίχωμα.

Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνδεση των πεπτιδικών αλύσων περιλαμβάνουν έξι trans- και καρβοξυ-πεπτιδάσες που είναι γνωστές ως πενικιλίνο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (penicillin-binding proteins, PBPs) 1a, 1b,

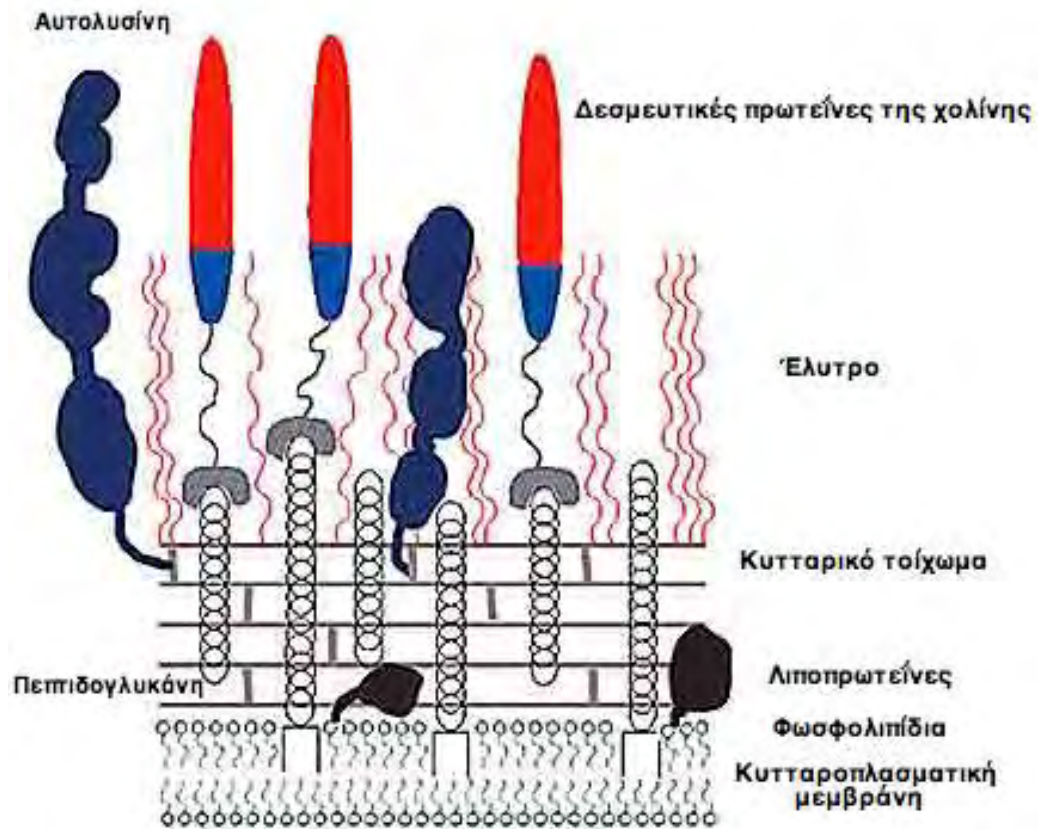


2a, 2b, 2x, και 3 [29]. Οι PBP's 1a και 1b καταλύουν τη σύνδεση δισακχαριτών και στελεχιαίων πεπτιδίων ενώ οι PBP's 2b και 2x είναι σημαντικές για την αύξηση και για τα ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη. Η PBP 3 είναι ένα χαμηλού μοριακού βάρους ένζυμο που συμμετέχει κυρίως στην κυτταρική διαίρεση.

Το πρωτότυπο στελεχιαίο πεπτίδιο αποτελείται από το πενταπεπτίδιο L-αλανίνη – D-ισογλουταμίνη – L-λυσίνη – D-αλανίνη – D-αλανίνη. Στον πνευμονιόκοκκο συναντώνται μία σειρά από στελεχιαία πεπτίδια τα οποία θεωρούνται σημαντικά για την αντοχή του στις β-λακτάμες [30]. Το κυτταρικό τοίχωμα ανασκευάζεται κατά τη διάρκεια της αύξησης καθώς και της κυτταρικής διαίρεσης. Η διάσπασή του ελέγχεται από τα αυτολυτικά ένζυμα. Το διπεπτίδιο N-ακετυλμουραμικό-D-αλανυλ-D-ισογλουταμίνη είναι η μικρότερη ενεργής μονάδα των προϊόντων διάσπασης του κυτταρικού τοιχώματος. Πολλά από τα προϊόντα διάσπασης έχουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση και ευθύνονται για τα περισσότερα από τα τοξικά φαινόμενα που χαρακτηρίζουν τις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις [31, 32].

Στην επιφάνεια του κυττάρου βρίσκονται πρωτεΐνες που θεωρείται ότι παίζουν ρόλο στην παθογένεση της πνευμονιοκοκκικής νόσου. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες αυτές είναι: 1) οι πρωτεΐνες A και C της επιφανείας του πνευμονιόκοκκου (pneumococcal surface protein A - PspA και pneumococcal surface protein C - PspC), 2) η προσκολλητίνη A της επιφανείας του πνευμονιόκοκκου (pneumococcal surface adhesin A - PsaA), 3) οι δεσμευτικές της χολίνης πρωτεΐνες (choline binding proteins - Cbp) και 4) οι φερομόνες, πεπτίδια που παίζουν ρόλο στην επιδεκτικότητα (competence) του πνευμονιοκοκκικού κυττάρου [24, 25, 33, 34].

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελεί μία τριπλή στοιβάδα λιπιδίων και τειχοϊκού οξέος και ονομάζεται αντιγόνο F διότι έχει διασταυρούμενη αντίδραση με τα αντιγόνα Forssman.



**Σχήμα 2. Απεικόνιση του συμπλέγματος κυτταρικού τοιχώματος και κυτταροπλασματικής μεμβράνης του πνευμονιόκοκκου.**

## 2.5. Ορότυποι του πολυσακχαριδικού ελύτρου

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 93 ορότυποι, συμπεριλαμβανομένων των 6D και 11E [35, 36], που ανήκουν σε 46 οροομάδες [37, 38]. Διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη βιοχημική σύνθεση του πολυσακχαριδικού ελύτρου τους και διαχωρίζονται με βάση τη δυνατότητα του ανοσοποιητικού συστήματος του κουνελιού να αναγνωρίζει αυτές τις διαφορές και να παράγει ειδικά αντισώματα έναντι καθενός από αυτούς.

Το σύστημα ταξινόμησης του Κρατικού Ορολογικού Ινστιτούτου της Δανίας (Statens Serum Institute) βασίζεται στις διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών οροτύπων. Έτσι, ορότυποι που εμφανίζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις κατατάσσονται σε μία κοινή οροομάδα.

Οι ορότυποι του πνευμονιόκοκκου ανήκουν σε 46 οροομάδες που αριθμούνται από 1 μέχρι 48 (οι αριθμοί 26 και 30 δεν χρησιμοποιούνται) [37]. Οι διαφορετικοί ορότυποι μέσα σε μία οροομάδα διαχωρίζονται με ένα γράμμα. Για παράδειγμα στην οροομάδα 6 περιέχονται οι ορότυποι 6A, 6B και οι πιο πρόσφατοι 6C και 6D, ενώ στην οροομάδα 9 περιέχονται οι 9N και 9V καθώς και οι σπανιότεροι 9A και 9L.

Η τυποποίηση του πνευμονιόκοκκου γίνεται με την μέθοδο εξοιδήσεως του ελύτρου που παρατηρείται στο μικροσκόπιο (αντίδραση Neufeld ή Quellung) [39]. Ουσιαστικά, στη μέθοδο αυτή καταγράφονται οι αλλαγές στην περιεκτικότητα του ελύτρου σε νερό καθώς τα μονοκλωνικά αντισώματα συνδέονται στην επιφάνεια των πολυσακχαριτών και μεταβάλλουν την διάθλαση του φωτός που καθιστά το έλυτρο ορατό στο μικροσκόπιο. Η αλλαγή αυτή είναι το αποτέλεσμα μίας *in situ* ανοσοκαθίζησης που προκαλείται από την αντίδραση του ελύτρου με τον ειδικό αντιορό (type sera).

Οι ορότυποι που ανήκουν σε μία συγκεκριμένη οροομάδα τυποποιούνται με τη χρήση ειδικών αντιορών έναντι ενός οροτύπου (πχ 6A ) που προκύπτουν μετά τη διασταυρούμενη απορρόφηση με τους άλλους ορότυπους (πχ 6B) της ίδιας οροομάδας [39].

Παρόλο που η αντίδραση Quellung παραμένει μέθοδος εκλογής για την τυποποίηση του πνευμονιόκοκκου, παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα όπως το υψηλό κόστος των αντιορών, την ειδική τεχνική υποστήριξη και την έλλειψη αντικειμενικότητας σε ότι αφορά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων [40]. Αυτές οι προϋποθέσεις περιορίζουν την τυποποίηση του πνευμονιόκοκκου σε μικρό μόνο αριθμό ερευνητικών κέντρων αναφοράς.

Σε αναζήτηση άλλων μεθόδων τυποποίησης, με την καταγραφή της αλληλουχίας του cps locus (capsular polysaccharide synthesis locus) των 93 οροτύπων του πνευμονιόκοκκου τέθηκε η βάση για την ανάπτυξη μοριακών μεθόδων (PCR) [41,42]. Οι περισσότερες PCR multiplex μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί μέχρι στιγμής έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση οροτύπων σε διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις (invasive pneumococcal diseases, IPD). Μόνο σε δύο μελέτες (ΗΠΑ, Gambia) έχουν χρησιμοποιηθεί για ορότυπους που αφορούν την φορεία [28, 29]. Πρόσφατα ανακοινώθηκε μελέτη από το Βέλγιο όπου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος πειραματικά σε ορότυπους που συνδέονται με τη φορεία [42]. Στη μελέτη αυτή 300 στελέχη πνευμονιόκοκκου απομονώθηκαν από υγιή παιδιά. Η μέθοδος αυτή αναγνώρισε με επιτυχία το 95% των στελεχών. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η αδυναμία διαφοροποίησης οροτύπων με υψηλή συγγένεια όπως του 6A από τον 6B, του 7F από τον 7A, του 33F από τους 33A, 37, 35A, 35C

και 42. Ωστόσο ορότυποι με υψηλή συγγένεια αποτελούν μικρό ποσοστό του συνόλου των οροτύπων του πνευμονιόκοκκου.

Το πολυσακχαριδικό έλυτρο του πνευμονιόκοκκου αποτελεί έναν σημαντικό λοιμογόνο παράγοντα διότι παρεμποδίζει την φαγοκυττάρωση [3]. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έγινε σαφές ότι σχετίζεται και με το βαθμό διεισδυτικότητας (invasiveness) του κάθε ορότυπου ξεχωριστά. Ως διεισδυτικότητα ορίζεται η συχνότητα με την οποία ένα στέλεχος αποικίζει το ρινοφάρυγγα σε σχέση με την συχνότητα που το ίδιο στέλεχος απομονώνεται από στείρα περιοχή. Οι ορότυποι που χαρακτηρίζονται από μεγάλη διεισδυτικότητα είναι οι 1, 4 και 7F. Η διαφορά αυτή στο βαθμό διεισδυτικότητας, ανάμεσα στα στελέχη, έχει βρεθεί ότι σχετίζεται περισσότερο με την ταυτότητα του ορότυπου (capsular serotype) παρά με τον συγκεκριμένο γονότυπο [45, 46].

### **Διαφορές οροτύπων ως προς την αντοχή στα αντιβιοτικά**

Η επιλογή των ανθεκτικών στελεχών είναι πιθανότερο να συμβαίνει στο ρινοφάρυγγα παρά στις στείρες περιοχές. Λόγω της παρατεταμένης φορείας, σε αντίθεση με τον παροδικό χαρακτήρα που έχουν οι διεισδυτικές λοιμώξεις [47], τα στελέχη στο ρινοφάρυγγα είναι εκτεθειμένα περισσότερο στην πίεση επιλογής από τα αντιβιοτικά (antibiotic pressure). Επίσης στο ρινοφάρυγγα υπάρχει η πιθανότητα να μεταφερθούν και ανθεκτικά γονίδια από άλλους μικροοργανισμούς που συμβιώνουν εκεί μαζί με τον πνευμονιόκοκκο.

Τέτοιοι, ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά, ορότυποι είναι αυτοί που περιλαμβάνονται στο επταδύναμο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (PCV7) και συγκεκριμένα οι 6B, 9V, 14, 19F και 23F καθώς επίσης και οι σχετιζόμενοι με

το εμβόλιο αυτό ορότυποι 6A και 19A [48-52]. Αντίθετα, ο ορότυπος 1 παραμένει ευαίσθητος στα αντιβιοτικά.

Επίσης κάποιοι ορότυποι που βρέθηκαν σε μελέτες για την φορεία όπως οι 3, 18C, 15A και μέλη της ομάδας 35 παραμένουν ευαίσθητοι στα αντιβιοτικά [53-56]. Αυτό το εύρημα αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι κάποιοι ορότυποι όπως οι 6, 14, 19, 23 παραμένουν στο ρινοφάρυγγα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από άλλους, όπως οι 3, 12, 33 [51].

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι κάποιοι κλώνοι συχνών οροτύπων όπως ο Ισπανικός κλώνος 23F, σχετίζονται με πολυανθεκτικότητα, γεγονός που επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι και ο γονότυπος παίζει σημαντικό ρόλο στην αντοχή του στελέχους στα αντιβιοτικά. Σε μελέτες στις ΗΠΑ που αφορούν πνευμονιόκοκκους ανθεκτικούς στην πενικιλίνη, ανευρίσκεται περιορισμένος αριθμός συγκεκριμένων κλώνων που αποτελούν και το 80% των ανθεκτικών αυτών στελεχών [57-59].

### **Διαφορές οροτύπων σε συγκεκριμένες λοιμώξεις**

Έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένοι ορότυποι ανευρίσκονται συχνότερα σε συγκεκριμένες λοιμώξεις. Για παράδειγμα μέλη των οροομάδων 6, 10 και 23 απομονώνονται συχνότερα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό παρά στο αίμα, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τους ορότυπους 1, 4 και 14 [60].

Υπάρχουν βέβαια και άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με την συχνότητα απομόνωσης συγκεκριμένων οροτύπων όπως η ηλικία, η συχνότητα νοσηλείων καθώς και η αντοχή στα αντιβιοτικά. Έτσι, για παράδειγμα, μικρότερα σε ηλικία παιδιά είναι πιθανότερο να εμφανίσουν πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα συγκριτικά με τα μεγαλύτερα σε ηλικία. Επιπλέον, μικρότερης ηλικίας παιδιά εμφανίζουν υψηλότερη συχνότητα

νοσηλειών για βακτηριαίμια ή πνευμονία και υψηλά επίπεδα αντοχής στα αντιβιοτικά [61-63].

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι σε πολλές μελέτες έχει διαπιστωθεί υψηλό ποσοστό πνευμονιών που οφείλονται στον ορότυπο 1 και μερικές φορές στον ορότυπο 3. Επίσης, έχει περιγραφεί ότι οι ορότυποι 1 και 5 σχετίζονται με σοβαρότερη κλινική και ακτινολογική εικόνα πνευμονίας στα παιδιά [64].

### **Διαφορές οροτύπων ως προς την ηλικία**

Αρκετές παιδιατρικές μελέτες υποστηρίζουν ότι συγκεκριμένοι ορότυποι κυριαρχούν σε πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις ανάλογα με την ηλικία. Φαίνεται ότι η συχνότητα διεισδυτικών λοιμώξεων που οφείλονται σε ορότυπους που καλύπτονται από το PCV7, είναι υψηλότερη στα 2 πρώτα έτη της ζωής και μειώνεται κατά τουλάχιστον 70% στα αμέσως επόμενα χρόνια, έτσι ώστε στα μεγαλύτερα παιδιά να αντιπροσωπεύει το 2-3% του ποσοστού που συναντάμε στην πρώτη βρεφική ηλικία [65-68]. Αυτά τα αποτελέσματα συνάδουν με την υπόθεση ότι η ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος, που πιθανά επέρχεται με την φυσική έκθεση μέσω του αποικισμού του ρινοφάρυγγα, καθιστά σταδιακά τα περισσότερα παιδιά άνοσα στους συχνότερους ορότυπους. Από τη στιγμή που τα περισσότερα παιδιά θα έχουν εκτεθεί σε πολύ περιορισμένο αριθμό των, έως τώρα γνωστών, οροτύπων έως τα 2 έτη, είναι πιθανό ότι συμμετέχουν σε αυτή την προστασία ανοσολογικοί μηχανισμοί συμπεριλαμβανομένου και της παραγωγής αντισωμάτων για το πολυσακχαριδικό έλυτρο.

Η συχνότητα των λοιμώξεων που οφείλονται στους ορότυπους 1 και 5 προσεγγίζει στο μέγιστο στο πρώτο έτος της ζωής και μειώνεται σημαντικά

έως το 2<sup>ο</sup> έτος. Στη συνέχεια, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στους ορότυπους του εμβολίου, η συχνότητα τους παραμένει σταθερή και ίσως ελαφρώς αυξημένη στα επόμενα χρόνια. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στην υπόθεση ότι υπάρχει σταδιακή μόνο ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος σε ότι αφορά τους συγκεκριμένους ορότυπους, ίσως λόγω της έλλειψης παρατεταμένου αποικισμού του ρινοφάρυγγα με αυτούς [66-68]. Σε μελέτη που έγινε στην Δανία αναφέρεται πως σε παιδιά κάτω των 7 ετών με διεισδυτικές λοιμώξεις, το 15% αφορούσε βρέφη < 6 μηνών και το 28% παιδιά 2-6 ετών [66]. Μελέτες που έχουν γίνει στη Μεγάλη Βρετανία και στις ΗΠΑ υποστηρίζουν ότι υπάρχει σημαντική αποτελεσματικότητα του εμβολίου ακόμη και στα παιδιά που έλαβαν 1 ή 2 δόσεις του εμβολίου και το γεγονός αυτό εξηγεί και την σημαντική μείωση των περιστατικών με διεισδυτική λοίμωξη μετά την εφαρμογή του επταδύναμου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου [69, 70].

Πολλές κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η εισαγωγή του συζευγμένου εμβολίου συνοδεύτηκε από μία ταχεία και πλήρη αντικατάσταση των οροτύπων που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα (ορότυποι που περιλαμβάνονταν στο εμβόλιο) από άλλους που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό [71]. Παρόλο αυτά καμία από τις μεγάλες κλινικές μελέτες που αφορούν στις διεισδυτικές λοιμώξεις μετά την εφαρμογή του PCV7 δεν έχουν δείξει στοιχεία με ανάλογη μεγάλη αύξηση των διεισδυτικών λοιμώξεων από ορότυπους που δεν περιλαμβάνονται στο εμβόλιο [72-74].

### **Ορότυποι που προκαλούν πνευμονιοκοκκικές επιδημίες**

Ιστορικά ο πνευμονιόκοκκος ευθύνεται για μεγάλες και θανατηφόρες επιδημίες πνευμονίας. Στην αρχή του 20ου αιώνα περιγράφηκαν πολλές



επιδημίες από πνευμονιόκοκκο σε κλειστούς πληθυσμούς όπως στρατιώτες, φυλακισμένους ή νοσηλευόμενους ιδρυμάτων. Ο Heffron είχε αναφερθεί το 1939 σε επιδημίες, πολλές από τις οποίες οφείλονταν στους ορότυπους 1, 2 και 5 [3]. Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα σε υγιή άτομα από τους συγκεκριμένους ορότυπους ήταν σπάνιο φαινόμενο.

Στη σημερινή εποχή οι επιδημικές καταστάσεις αποτελούν σπάνιο φαινόμενο, γεγονός που σχετίζεται ίσως με τη διαθεσιμότητα των αντιβιοτικών και τις βελτιωμένες κοινωνικοοικονομικές συνθήκες, καθώς και την τάση που παρατηρείται να έχουμε ορότυπους που σχετίζονται με το PCV [47]. Οι λίγες εξάρσεις που έχουν παρατηρηθεί στη σύγχρονη εποχή χαρακτηρίζονται από ευρύτερη κατανομή των οροτύπων και αφορούν επιδημιολογικά 2 ηλικιακές ομάδες: τα πολύ μικρά παιδιά και τους ηλικιωμένους. Συνήθως οφείλονται σε ορότυπους που αποικίζουν συχνότερα το ρινοφάρυγγα και που περιλαμβάνονται στο εμβόλιο καθώς και στον ορότυπο 3. Δεν έχει εξηγηθεί επαρκώς το γεγονός ότι ορότυποι που αποικίζουν συχνότερα το ρινοφάρυγγα και ευθύνονται για νόσο μόνο σποραδικά, μπορούν να προκαλέσουν επιδημίες πνευμονιοκοκκικής διεισδυτικής λοίμωξης. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού σε ένα πληθυσμό μπορεί να τον προδιαθέτουν για την ανάπτυξη πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας από τους συχνότερους ορότυπους που αποικίζουν το συγκεκριμένο πληθυσμό [75].

Σε αντίθεση με τα παιδιά, οι επιδημίες που εμφανίζονται σε μεγαλύτερες ηλικίες σε κλειστούς πληθυσμούς με συγχρωτισμό οφείλονται κυρίως στον ορότυπο 1 [76]. Τόσο ο ορότυπος 1, όσο και οι 5, 12F και 8 σπάνια αποικίζουν τα παιδιά.

### 3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

#### 3.1. Φορεία

Ο πνευμονιόκοκκος αποικίζει το ανώτερο αναπνευστικό και συγκεκριμένα το ρινοφάρυγγα παιδιών προσχολικής ηλικίας και αποτελεί σημαντική πηγή οριζόντιας μετάδοσης στην κοινότητα ειδικά σε συνθήκες έντονου συγχρωτισμού. Η μέγιστη συχνότητα αποικισμού παρατηρείται στην ηλικία των 3 ετών (55%) με βαθμιαία ελάττωση της συχνότητας έως την ηλικία των 10 ετών οπότε διαπιστώνεται ποσοστό φορείας 8% [77].

#### Επιδημιολογία φορείας

Ο πνευμονιόκοκκος αποικίζει το ρινοφάρυγγα πολλών ατόμων. Ωστόσο μικρό μόνο ποσοστό αυτών αναπτύσσουν τελικά πνευμονιοκοκκική λοίμωξη. Έχουν περιγραφεί >90 ορότυποι πνευμονιόκοκκου.

Σε μελέτη που έγινε σε παιδιά στις ΗΠΑ από τους Gray και συν. [15] διαπιστώθηκε ότι ο μέσος όρος ηλικίας αποικισμού ήταν οι 6 μήνες ζωής (όρια 1-17 μήνες). Τους πρώτους 24 μήνες το 95% των παιδιών είχαν ήδη αποικισθεί και μάλιστα το 73% με τουλάχιστον 2 ορότυπους (συνήθως σε διαφορετική χρονική στιγμή). Αποικισμός ταυτόχρονα με στελέχη που ανήκαν σε 2 ή 3 διαφορετικούς ορότυπους παρουσιάστηκε σε 4% και 0,3% των δειγμάτων, αντίστοιχα. Η διάρκεια αποικισμού εξαρτάται από τον ορότυπο και συνήθως είναι 2,5 - 4,5 μήνες και είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ηλικία.

Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο βαθμός αποικισμού εξαρτάται από την ηλικία. Υπάρχει η τάση ορότυποι που είναι λιγότερο ανοσογονικοί να αποικίζουν το ρινοφάρυγγα μικρών παιδιών για μεγαλύτερο διάστημα σε σχέση με ορότυπους που χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερου βαθμού ανοσογονικότητα.

Επίσης η τοπική παραγωγή αντισωμάτων μπορεί να είναι σημαντικός παράγοντας περιορισμού της διάρκειας φορείας. Ο αποικισμός στους ενήλικες και στα μεγαλύτερα παιδιά έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ειδικού για τον συγκεκριμένο ορότυπο IgG αντισώματος και αυτό στις περισσότερες περιπτώσεις, συμβαίνει χωρίς να υπάρχει εμφανής νόσος.

Ο διαδοχικός αποικισμός από δύο ή περισσότερα στελέχη με διαφορετικό ορότυπο είναι συχνός και η διάρκεια της φορείας ελαττώνεται, αλλά λοίμωξη που οφείλεται σε περισσότερους από 1 ορότυπο είναι σπάνια [15]. Επιπλέον, ορισμένες φορές υπάρχει παρατεταμένη φορεία ενός συγκεκριμένου στελέχους, αλλά σπάνια αυτό προκαλεί λοίμωξη. Συνήθως λοίμωξη προκαλούν τα στελέχη που έχουν αποκτηθεί πρόσφατα. Παιδιά που δεν έχουν αδέρφια έχουν την τάση να αποικίζονται αργότερα και από λιγότερα στελέχη [54].

Είναι γνωστό ότι τα παιδιά στις αναπτυσσόμενες χώρες αποικίζονται με πνευμονιόκοκκο νωρίτερα στη ζωή και 2-3 φορές συχνότερα απ'ότι στις αναπτυγμένες χώρες [78-80]. Συχνά υπάρχει αποικισμός από πολλαπλούς ορότυπους [81]. Η φορεία πολλαπλών οροτύπων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον κατά την αξιολόγηση της επίδρασης σ'αυτήν του εμβολιασμού με συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο.

### **3.2. Παράγοντες που επιδρούν στη φορεία**

Πολλοί παράγοντες επιδρούν στη φορεία όπως η ηλικία, η εποχή, η παρακολούθηση παιδικού σταθμού ή σχολείου, ο αριθμός των αδερφών στην οικογένεια, η οξεία λοίμωξη του αναπνευστικού, η διατροφή (θηλασμός), η προηγούμενη χρήση αντιβιοτικής αγωγής και ο εμβολιασμός [77].

Ο ρινοφάρυγγας αποικίζεται κατά τη διάρκεια του 1ου έτους ζωής και υπάρχει αυξημένη συχνότητα φορέας πριν την ηλικία των 2 ετών [82]. Από φιλανδική μελέτη αναφέρεται ότι η συχνότητα αποικισμού σε παιδιά ηλικίας 2-24 μηνών αυξήθηκε από 13% στα παιδιά μικρότερα των 6 μηνών σε 43% σε παιδιά μεγαλύτερα των 19 μηνών [83]. Το ποσοστό της φορέας αυξάνεται σε 22%-45% κατά τη διάρκεια λοιμώξεων του αναπνευστικού, γεγονός που επιβεβαιώνει τη θεωρία ότι σε ιογενείς λοιμώξεις υπάρχει μεγαλύτερη ικανότητα προσκόλλησης του μικροβίου στο επιθήλιο.

Στον υγιή πληθυσμό η συχνότητα της φορέας καθορίζεται από παράγοντες κινδύνου όπως η φυλή, ο συγχρωτισμός, οι κοινωνικοοικονομικοί και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες. Τέτοιους παράγοντες αποτελούν το μέγεθος της οικογένειας (αριθμός αδερφιών), το εισόδημα, το κάπνισμα (ενεργητικό και παθητικό) και η πρόσφατη χρήση αντιβιοτικών [84,85]. Σημαντικό παράγοντα που ευνοεί την φορεία και τη διασπορά στελεχών πνευμονιόκοκκου στην κοινότητα αποτελεί ο συγχρωτισμός. Στα παιδιά που παρακολουθούν παιδικούς σταθμούς διαπιστώνονται υψηλά ποσοστά φορέας [77, 86]. Σε μελέτη που έγινε στην Ολλανδία ο σχετικός κίνδυνος αποικισμού με πνευμονιόκοκκο στα παιδιά που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς και σε αυτά που παρέμεναν στο σπίτι ήταν 6:1 [86]. Η παρακολούθηση του παιδικού σταθμού συμβάλλει στην διασπορά συγκεκριμένων κλώνων ανάμεσα στα παιδιά [86].

### **3.3. Μηχανισμός αποικισμού**

Η εξωτερική επιφάνεια του πνευμονιόκοκκου καλύπτεται από το πολυσακχαριδικό έλυτρο. Υπάρχει σημαντική ετερογένεια ανάμεσα στον πολυσακχαρίτη που καλύπτει τα διαφορετικά στελέχη του πνευμονιόκοκκου.

Με βάση τη χημική σύσταση του πολυσακχαρίτη ταξινομούνται σε διαφορετικούς ορότυπους και έχουν περιγραφεί σχεδόν 100 διαφορετικοί τύποι έως τώρα [87].

Το πολυσακχαριδικό έλυτρο αποτελεί τον πιο σημαντικό λοιμογόνο παράγοντα του πνευμονιόκοκκου γιατί προστατεύει το μικροοργανισμό από τη φαγοκυττάρωση [88]. Ο πολυσακχαρίτης του ελύτρου χαρακτηρίζεται από υψηλού βαθμού ανοσογονικότητα. Τα αντισώματα που αναπτύσσονται έναντι αυτού προστατεύουν από τη λοίμωξη με τον αντίστοιχο ορότυπο.

Το κυτταρικό τοίχωμα που βρίσκεται κάτω από το έλυτρο αποτελείται από πολυσακχαρίτες και τειχοϊκό οξύ και αυτά λειτουργούν ως «άγκυρα» για τις, σχετιζόμενες με το κυτταρικό τοίχωμα, επιφανειακές πρωτεΐνες.

Το κυτταρικό τοίχωμα ευθύνεται για την ισχυρή φλεγμονώδη αντίδραση που συνοδεύει την πνευμονιοκοκκική λοίμωξη λόγω του ότι διεγείρει την είσοδο φλεγμονωδών κυττάρων και ενεργοποιεί μέσω του συμπληρώματος την παραγωγή κυτοκινών [89].

Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα προϋποθέτει την προσκόλληση του μικροβίου στο αναπνευστικό επιθήλιο. Ο ασυμπτωματικός αποικισμός περιλαμβάνει την προσκόλληση του μικροβίου στους υδατάνθρακες του κυτταρικού τοιχώματος. Η προσκόλληση αυτή γίνεται μέσω των επιφανειακών πρωτεϊνών όπως για παράδειγμα της προσκολλητίνης A της επιφανείας του πνευμονιόκοκκου (pneumococcal surface adhesin A, PsaA ).

Γενικά ο αποικισμός δε συνοδεύεται από συμπτωματική νόσο. Η μετάβαση της ασυμπτωματικής φορέας σε διεισδυτική νόσο προϋποθέτει την τοπική ανάπτυξη φλεγμονωδών παραγόντων, ιντερλευκίνης 1 (interleukin-1, IL-1) και του παράγοντα νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor, TNF), όπως

συμβαίνει σε ιογενείς λοιμώξεις [90] . Μέσω αυτής της οδού μεταβάλλεται ο τύπος και ο αριθμός των υποδοχέων στα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα-στόχους. Οι δεσμευτικές πρωτεΐνες της χολίνης στο κυτταρικό τοίχωμα συμβάλλουν στη δυνατότητα προσκόλλησης στα κύτταρα του ξενιστή, πιθανόν μέσω του υποδοχέα για τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor, PAF) [91, 92]. Επιπλέον μία από τις επιφανειακές πρωτεΐνες, η δεσμευτική της χολίνης πρωτεΐνη A (choline binding protein A, CbrA), έχει υψηλή συγγένεια με το σιαλικό οξύ και τη λακτο N- νεοτετραόζη [93].

#### 4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ

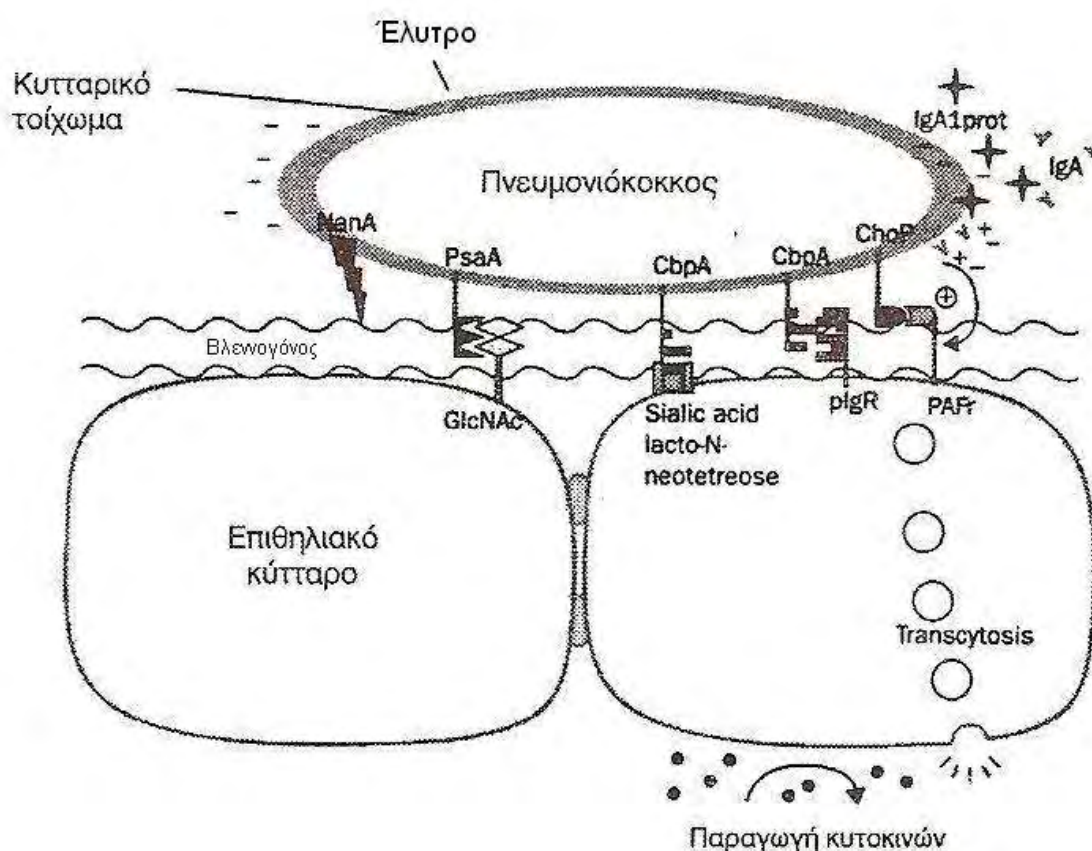
Η παθογένεση της πνευμονιοκοκκικής νόσου αποτελεί μία πολύπλοκη διαδικασία, αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης διαφόρων παραγόντων τόσο του μικροβίου όσο και του ξενιστή.

##### 4.1. Προσκόλληση

Η προσκόλληση του μικροβίου στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή αποτελεί την πρώτη επαφή με αυτόν. Η διαδικασία μετακίνησης του πνευμονιόκοκκου από το ρινοφάρυγγα σε άλλες περιοχές στείρες μικροβίων (αίμα, ΕΝΥ, πλευριτικό υγρό) αποτελεί το επόμενο βήμα για την παθογένεση της πνευμονιοκοκκικής νόσου.

Ο πνευμονιόκοκκος προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού μέσω αλληλεπίδρασης των προσκολλητινών (adhesins) που υπάρχουν στην επιφάνειά του και των υποδοχέων των επιθηλιακών κυττάρων [91, 94-97].

Οι κυριότερες προσκολλητίνες είναι το αντιγόνο Α της επιφανείας του πνευμονιόκοκκου (PspA) και οι δεσμευτικές πρωτεΐνες της χολίνης (Cbp). Πολυμερισμένοι σακχαρίτες του επιθηλιακού κυττάρου υπό την μορφή γλυκοσυζεύγματος παίζουν το ρόλο υποδοχέων. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς περιέχουν το δισακχαρίτη Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη β1-4 γαλακτόζη ή σιαλο-GM1-γλυκοπεπτίδιο [96, 97].



Σχήμα 3. Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των προσκολλητινών της επιφανείας του πνευμονιόκοκκου και των υποδοχέων του επιθηλιακού κυττάρου του ξενιστή. (nanA: νευραμινιδάση, PsaA: προσκολλητίνη A της επιφανείας του πνευμονιόκοκκου, CbpA: δεσμευτική της χολίνης πρωτεΐνη A, ChoP: φωσφορυλχολίνη, GlcNAc: N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη, pigR: υποδοχέας πολυμερικής ανοσοσφαιρίνης G, PAFr: υποδοχέας του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, IgA1prot: IgA1 πρωτεάση)



Η νευραμινιδάση μειώνει τη γλοιότητα της βλέννας και προβάλλει τους υποδοχείς της N-ακετυλογλυκοζαμίνης στα επιθηλιακά κύτταρα. Οι υποδοχείς αυτοί αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες επιφανείας του πνευμονιόκοκκου (π.χ την PsaA). Η διέγερση παραγωγής κυττοκινών οδηγεί σε αύξηση των υποδοχέων για τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF<sub>r</sub>) στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή. Ο πνευμονιόκοκκος έχει αυξημένη συγγένεια λόγω της φωσφορυλχολίνης για τον PAF<sub>r</sub>. Επιπλέον, η δεσμευτική της χολίνης πρωτεΐνη A (CbpA) δείχνει αυξημένη συγγένεια για το σιαλικό οξύ και τη λακτο-N-νεοτετραόζη (lacto-N-neotetraose) και συνδέεται απευθείας με τον υποδοχέα της πολυμερικής ανοσοσφαιρίνης G (pIgR) με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διέλευση του μικροβίου μέσω του φραγμού του βλεννογόνου (transcytosis).

Το γεγονός ότι κάποιοι οροτύποι προκαλούν νόσο συχνότερα στην παιδική ηλικία, έχει οδηγήσει σε προβληματισμό σχετικά με την ανοσογονικότητα συγκεκριμένων οροτύπων. Δεν είναι ξεκάθαρο αν η επικράτηση αυτών των οροτύπων οφείλεται στην λοιμογόνο δύναμη τους ή σε άλλα βιολογικά χαρακτηριστικά τους.

Έχουν περιγραφεί 3 τύποι πνευμονιοκοκκικών αποικιών ανάλογα με τη μορφολογία τους: διαφανείς, ημιδιαφανείς και αδιαφανείς [98]. Αυτοί οι φαινότυποι εμφανίζουν διαφορετική ικανότητα αποικισμού αλλά η βιοχημική βάση γι'αυτές τις παραλλαγές είναι άγνωστη. Τα στελέχη με διαφανείς αποικίες έχουν ένα πλεονέκτημα στον αποικισμό του ρινοφάρυγγα λόγω της ικανότητάς τους να αναγνωρίζουν τον δισακχαρίτη N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη β1-3 γαλακτόζη που υπάρχει στα επιθηλιακά κύτταρα [99]. Φέρουν αυξημένες ποσότητες φωσφορυλχολίνης που συμβάλλει στην προσκόλληση στα

κύτταρα του ξενιστή μέσω του παράγοντα για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (PAF) [91].

Χαρακτηριστικά	Διαφανείς	Αδιαφανείς
Παραγωγή ελύτρου	+	+++
Τειχοϊκό οξύ	++++	+
Έκφραση <i>lytA</i> (γονίδιο για πνευμονοκοκκική αυτολυσίνη)	+++	+
PspA	+	++
Αποικισμός	+++	+
Λοιμογόνος δύναμη	+	+++

### Πίνακας 1. Διαφορές μεταξύ διαφανών και αδιαφανών αποικιών πνευμονιόκοκκου

Υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με την δυνατότητα ενός στελέχους που αποικίζει το ρινοφάρυγγα να διεισδύσει στο βλεννογόνο και να προκαλέσει νόσο. Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι ιογενείς λοιμώξεις που προκαλούν τοπική φλεγμονή, η ελαττωμένη λειτουργικότητα των μακροφάγων και η δυσλειτουργία του κροσσωτού επιθηλίου. Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης ιών και μικροβίων με τους παραπάνω μηχανισμούς έχει περιγραφεί στην οξεία μέση ωτίτιδα. Η φλεγμονή και συμφόρηση (οίδημα) της ευσταχιανής σάλπιγγας οδηγεί στην απόφραξη και αδυναμία κάθαρσης του

μέσου ωτός από τις εκκρίσεις. Μικρόβια από το ρινοφάρυγγα παγιδεύονται και πολλαπλασιάζονται στο μέσο ουσ και διεισδύουν στον υποβλεννογόνο ιστό προκαλώντας περαιτέρω φλεγμονή. Η πεπτιδογλυκάνη και το τειχοϊκό οξύ του μικροβίου είναι οι κύριοι παράγοντες για την έναρξη της φλεγμονής του μέσου ωτός. Ενεργοποιείται η εναλλακτική οδός του συμπληρώματος και επάγεται η παραγωγή κυττοκινών, γεγονός που οδηγεί στη συσσώρευση πολυμορφοπύρηνων.

Παρόμοια πορεία ακολουθείται και στην ανάπτυξη της ρινοκολπίτιδας και της πνευμονίας. Στη λοβώδη πνευμονία το μικρόβιο πολλαπλασιάζεται στις κυψελίδες και διασπείρεται στους γύρω ιστούς. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της ερυθράς ηπάτωσης, όπου έχουμε εξίδρωμα στις κυψελίδες που περιέχει ερυθροκύτταρα, πολυμορφοπύρηννα και ινική. Καθώς αυξάνεται το εξίδρωμα, τα τριχοειδή συμπιέζονται και λιγότερα ερυθρά διεισδύουν στις κυψελίδες ενώ τα πολυμορφοπύρηννα συνεχίζουν να συσσωρεύονται με έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα, οδηγώντας στο στάδιο της φαιάς ηπάτωσης [33, 101].

Σε κάποιες περιπτώσεις ο πνευμονιόκοκκος διεισδύει και διαπερνά το φραγμό του βλεννογόνου. Αυτό συμβαίνει διότι η δεσμευμένη με τη χολίνη πρωτεΐνη A (CbpA) αντιδρά με τους υποδοχείς της πολυμερικής ανοσοσφαιρίνης (Ig – rIgR) στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου και με αποτέλεσμα την ενδοκύττωση, δηλαδή τη μεταφορά του μικροβίου δια μέσου του κυττάρου, και την απελευθέρωσή του στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης [97]. Εάν η απελευθέρωση γίνει μέσα στο αίμα μπορεί να εισέλθει στο ΚΝΣ αφού αντιδράσει με τον υποδοχέα του παράγοντα

ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF<sub>r</sub>) [91]. Δεν είναι βέβαιο, εάν η πύλη εισόδου στο ΚΝΣ είναι το χοροειδές πλέγμα ή τα επιθηλιακά κύτταρα [97].

#### **4.2. Έλυτρο και φαγοκυττάρωση**

Ο πνευμονιόκοκκος, σε ένα άτομο που δεν έχει αναπτύξει ειδικά αντισώματα εναντίον του, έχει τη δυνατότητα να αποφεύγει την κάθαρση του από το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή και τη φαγοκυττάρωση από τα κύρια φαγοκύτταρα. Το έλυτρο έχει κεντρικό ρόλο στην αποφυγή της φαγοκυττάρωσης. Διαπιστώθηκε σε πειραματόζωα, ότι αν διαταραχθεί η παραγωγή του ελύτρου στον ορότυπο 3 η λοιμογόνος δύναμη του μειώνεται [94].

Οι ακόλουθοι παράγοντες μπορεί να συνεισφέρουν στην αποφυγή της φαγοκυττάρωσης.

α) Μη αναγνώριση των πολυσακχαριτών του ελύτρου από τα φαγοκύτταρα λόγω απουσίας των ειδικών υποδοχέων.

β) Ηλεκτροχημικές δυνάμεις που απομακρύνουν τα φαγοκύτταρα.

γ) Κάλυψη των αντισωμάτων και του C3b στο κυτταρικό τοίχωμα έτσι ώστε να μην αναγνωρίζονται από τα φαγοκύτταρα [102].

#### **4.2. Λοιμογόνοι παράγοντες που δε σχετίζονται με το έλυτρο**

Άλλοι λοιμογόνοι παράγοντες του πνευμονιόκοκκου που συμμετέχουν στην παθογένεση της νόσου είναι η πνευμονολυσίνη, η προσκολλητίνη A της επιφανείας, η αυτολυσίνη, οι πρωτεΐνες A και C της επιφανείας, η νευραμινιδάση και η υαλουρονιδάση [34, 94].

Η πνευμονολυσίνη είναι κυτταροτοξική για τα φαγοκύτταρα και τα κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου και προκαλεί φλεγμονή διότι ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και διεγείρει την παραγωγή IL-1 και TNF. Η

ένεσή της στον πνεύμονα προκαλεί όλα τα ιστολογικά ευρήματα της πνευμονίας [103]. Πνευμονιόκοκκοι που δεν φέρουν πνευμονολυσίνη έχουν μειωμένη λοιμογόνο δύναμη [70]. Μετά από πνευμονία στον άνθρωπο τα αντισώματα ενάντια στην πνευμονολυσίνη αυξάνονται. Η παρουσία των αντισωμάτων αυτών ελαττώνει την πιθανότητα πνευμονιοκοκκικής νόσου και η χορήγησή τους σε μύες τους προστατεύει από πειραματική λοίμωξη [104].

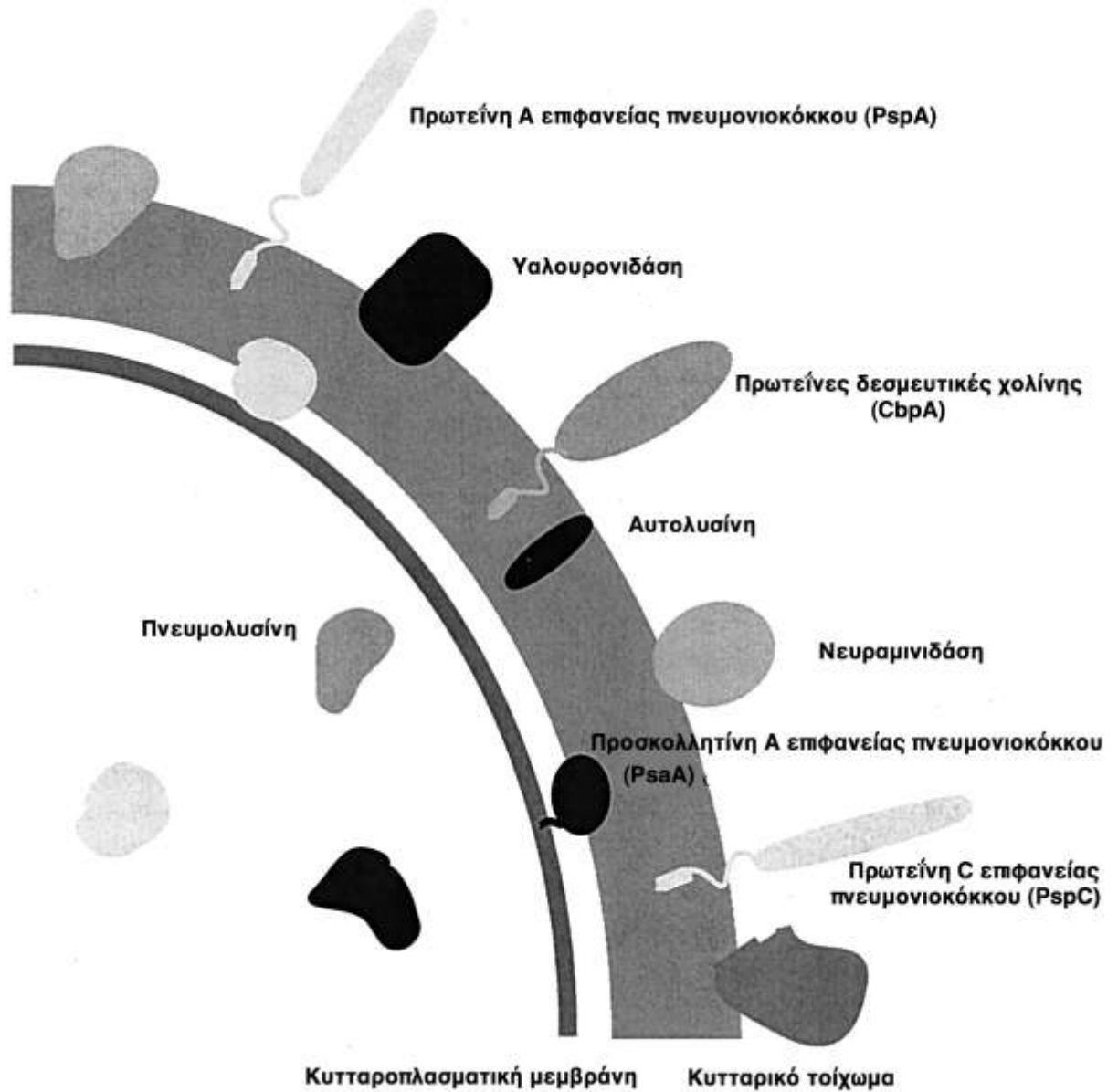
Η PspA που υπάρχει σχεδόν σε όλους τους πνευμονιόκοκκους προσφέρει αντιφαγοκυτταρική προστασία πιθανόν λόγω παρεμπόδισης της εναπόθεσης του συμπληρώματος. Αντισώματα εναντίον της προστατεύουν σε μικρό ή μεγάλο βαθμό τα πειραματόζωα από λοίμωξη με πνευμονιόκοκκο του ίδιου ή διαφορετικού στελέχους [105]. Η PsaA υπάρχει στην επιφάνεια όλων των πνευμονιόκοκκων [95]. Αντισώματα έναντι αυτής προστατεύουν μύες από τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα [106] και πιθανόν ελαττώνουν τον κίνδυνο μέσης ωτίτιδας [107].

Η αυτολυσίνη υπάρχει στο κυτταρόπλασμα και διασπά το τοίχωμα του μικροβίου. Συνεισφέρει στη λοίμωξη, καθότι απελευθερώνει τμήματα πεπτιδογλυκάνης και ενεργοποιεί έντονα το συμπλήρωμα. Η έλλειψή της καθιστά τον πνευμονιόκοκκο λιγότερο λοιμογόνο. Αντισώματα έναντι αυτής προσφέρουν περιορισμένη προστασία [108].

Ο πνευμονιόκοκκος παράγει τουλάχιστον δύο νευραμινιδάσες A (NanA) και B (NanB) που συμβάλλουν στην προσκόλληση του μικροβίου και τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα [109]. Η δράση του αυτή επιτυγχάνεται με την απομάκρυνση του σιαλικού οξέος από την επιφάνεια των κυττάρων και την αποκάλυψη των ειδικών υποδοχέων για τη σύνδεση του πνευμονιοκοκκικού κυττάρου στους δισακχαρίτες του αναπνευστικού

επιθηλίου [96]. Τα κύτταρα του χοριοειδούς πλέγματος και του ΚΝΣ φέρουν μεγάλη ποσότητα σιαλικού οξέος και ίσως η απομάκρυνσή του παίζει ρόλο στην παθογένεση της μηνιγγίτιδας. Με τον εμβολιασμό ποντικών με νευραμινιδάση και την ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι αυτής, (όταν στη συνέχεια προκλήθηκε πειραματική πνευμονιοκοκκική λοίμωξη μετά από ενδοφλέβια χορήγηση του μικροβίου), διαπιστώθηκε κάποια βαθμού προστασία έναντι πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης. Το γεγονός αυτό προσδίδει στην νευραμινιδάση και έναν επιπλέον ρόλο, πέρα από τη συμμετοχή της στον αποικισμό [110].

Όλοι οι πνευμονιόκοκκοι παράγουν υαλουρονιδάση αλλά ο ρόλος της στην παθογένεση της νόσου δεν έχει διευκρινισθεί.



**Σχήμα 4.** Απεικόνιση του ελύτρου, του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του πνευμονιόκοκκου.

#### 4.4. Ενεργοποίηση συμπληρώματος

Τα δύο στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος του πνευμονιόκοκκου (πεπτιδογλυκάνη και τειχοϊκό οξύ) ενεργοποιούν το συμπλήρωμα μέσω της εναλλακτικής οδού [110-113]. Την ίδια οδό ενεργοποίησής του, αλλά σε μικρότερο βαθμό ακολουθούν η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη που παίζει ενεργό ρόλο και οι πολυσακχαρίτες του ελύτρου.

Η κλασική οδός του συμπληρώματος ενεργοποιείται από ειδικό αντίσωμα έναντι των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος ακόμα και χωρίς την παρουσία του αντισώματος έναντι του ελύτρου. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος ακόμα και αν δεν συνδέεται το συμπλήρωμα στην επιφάνεια του μικροβίου, οδηγεί στην απελευθέρωση του κλάσματος C5A που έχει ως επακόλουθο την οψωνινοποίηση και φαγοκυττάρωση [114]. Σε ξενιστή με λοίμωξη που δεν έχει ανοσολογική μνήμη από προηγούμενη έκθεση στο συγκεκριμένο μικρόβιο το επακόλουθο της ενεργοποίησης της κλασικής και της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος είναι η έντονη φλεγμονώδης αντίδραση .



## 5. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ

### 5.1. Μη ανοσολογικοί μηχανισμοί

Αναφέρονται ανοσολογικοί και μη ανοσολογικοί μηχανισμοί άμυνας [87, 115-117]. Στους μη ανοσολογικούς μηχανισμούς άμυνας περιλαμβάνεται η ακεραιότητα της επιφάνειας του επιθηλίου των ανώτερων και κατώτερων αναπνευστικών οδών. Μεταβολές του επιθηλίου παρατηρούνται μετά από ιογενείς λοιμώξεις και εμφανίζονται σταδιακά σε καπνιστές και άτομα που εκτίθενται σε αερογενείς ρύπους. Επίσης, εμφανίζονται σε άτομα με οξύ και χρόνια αλκοολισμό, νεφρωσικό σύνδρομο, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, ανατομικές ανωμαλίες όπως διαρροή ΕΝΥ μετά από κάταγμα κρανίου ή απόφραξη ευσταχιανής σάλπιγγας, μεταβολικές και διατροφικές διαταραχές όπως Σ/Δ, έλλειψη βιταμίνης Α.

### 5.2. Ανοσολογικοί μηχανισμοί

Η ανοσολογική απάντηση που επέρχεται μέσω του βλεννογόνου αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή έναντι των λοιμώξεων από πνευμονιόκοκκο [118]. Η εκκριτική IgA παίζει σημαντικό ρόλο και προστατεύει από τον αποικισμό ενώ ανευρίσκεται μετά τον 6<sup>ο</sup> μήνα ζωής. Η IgG σπάνια ανευρίσκεται στον ορό πριν από τους 18 μήνες ζωής. Παρόλα αυτά είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η ανοσιακή απάντηση στον πνευμονιόκοκκο μέσω του βλεννογόνου είναι ανώριμη στα μικρά παιδιά σε σχέση με τους ενήλικες. Ο εμβολιασμός χωρίς προηγούμενη έκθεση στο αντιγόνο συνήθως δεν επιφέρει απάντηση μέσω της εκκριτικής IgA [119]. Με την εισπνοή, ανοσολογικοί παράγοντες, όπως η εκκριτική IgA και η IgG, καθώς και μηχανικοί παράγοντες, όπως η κάθαρση μέσω του κροσσωτού επιθηλίου,

μπορούν να αποτρέψουν τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα από τον πνευμονιόκοκκο.

Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα των παιδιών προκαλεί επίσης την παραγωγή τοπικά IgA και συστηματικά IgG αντισωμάτων στην προσκολλητίνη A (PsaA), στην επιφανειακή πρωτεΐνη A (PspA) και στην πνευμονολυσίνη [120, 121]. Σε παιδιά με θετικές καλλιέργειες ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος ή ωτικού εκκρίματος παρατηρούνται μεγαλύτερο ποσοστό IgA θετικών ρινοφαρυγγικών δειγμάτων και υψηλότεροι τίτλοι αντισωμάτων σε σύγκριση με αυτά που είχαν αρνητικές καλλιέργειες. Η ανεύρεση αντισωμάτων είναι πιθανή σε μικρή ηλικία ακόμα και από τον 6<sup>ο</sup> μήνα ζωής. Παρόλα αυτά τα IgG αντισώματα έναντι του PspA παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα έως την ηλικία των 2 ετών [120].

Ωστόσο, ο κυριότερος ανοσολογικός μηχανισμός άμυνας έναντι της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης είναι η συνδυασμένη δράση των ειδικών αντισωμάτων έναντι του ελύτρου του με την ενεργοποίηση του συμπληρώματος (οψωνινοποίηση) και στη συνέχεια η φαγοκυττάρωση με τη θανάτωση του μικροβίου από τα ουδετερόφιλα [87]. Η προστατευτική δράση των ειδικών αντισωμάτων έχει αποδειχθεί σε πειραματόζωα είτε μετά από ενεργητική ανοσοποίηση είτε μετά από παθητική μεταφορά των αντισωμάτων [122-124]. Τα αντισώματα εμφανίζονται στον ορό των ενηλίκων 7 μέρες μετά τον εμβολιασμό ή μετά από φυσική νόσηση. Σε παλιότερες μελέτες έχει βρεθεί ότι τα 2/3 των ενηλίκων και το 1/4 των βρεφών και παιδιών έχει ανοσιακή απάντηση μετά την ανάρρωση από πνευμονιοκοκκική πνευμονία. Επίσης, σε άλλη μελέτη που έγινε σε στρατιωτική μονάδα κατά την επιδημία πνευμονιοκοκκικής νόσου βρέθηκε ότι οι περισσότεροι στρατιώτες που είχαν

νοσήσει είχαν αντισώματα έναντι του υπεύθυνου οροτύπου και παρόμοια αντισωματική απάντηση είχε και το 1/3-2/3 των ασυμπτωματικών φορέων, ανάλογα με τον ορότυπο [125].

Είναι γνωστό ότι παιδιά κάτω των 2 ετών έχουν πτωχή ανοσιακή απάντηση μετά από φυσική νόσηση από πνευμονιόκοκκο ή εμβολιασμό ειδικά στις οροομάδες 6, 19 και 23 σε αντίθεση με τον ορότυπο 3 που συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο [126, 127]. Οι διαφορές ανάμεσα στους ορότυπους ως προς την ανοσιακή απάντηση μπορεί να σχετίζονται με τον τρόπο καθήλωσης (deposition) και καταβολισμού (degradation) του συμπληρώματος. Η αργή ανάπτυξη της ανοσολογικής απάντησης μπορεί να σχετίζεται με την καθυστερημένη ωρίμανση κάποιων πληθυσμών Β-κυττάρων [87]. Η απάντηση σε πνευμονιοκοκκικούς και άλλους πολυσακχαρίτες χαρακτηρίζεται ως θυμο-ανεξάρτητη γιατί δεν απαιτεί τη συμμετοχή των βοηθητικών Τ-κυττάρων, όπως συμβαίνει με τα πρωτεϊνικά αντιγόνα. Χαρακτηριστικό των Τ-ανεξάρτητων αντιγόνων είναι η αδυναμία τους να προκαλέσουν ανοσιακή μνήμη με αποτέλεσμα την αδυναμία ανάπτυξης αντισωμάτων μετά από αναμνηστική δόση εμβολίου (booster effect). Παρόλα αυτά τα επίπεδα των αντισωμάτων μπορούν να παραμένουν υψηλά για 6-10 χρόνια μετά τον αρχικό εμβολιασμό. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, πολυσακχαριδικά εμβόλια συζευγμένα με πρωτεΐνη-φορέα (απτίνη) συμπεριφέρονται ως θυμο-εξαρτώμενα αντιγόνα και μπορούν να προκαλέσουν ικανοποιητική ανοσιακή απάντηση ακόμη και στα βρέφη.

Τα μικρά παιδιά έχουν χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων έναντι των συχνότερων οροτύπων πνευμονιόκοκκου σε σύγκριση με τους εφήβους. Οι νεαροί ενήλικες έχουν αντισώματα έναντι περιορισμένου αριθμού οροτύπων

ενώ παρατηρείται ανοσιακή απάντηση μετά τον εμβολιασμό με το 23-δύναμο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο στο 75% των οροτύπων. Τα IgG και τα IgM αντισώματα εμφανίζονται περίπου την ίδια χρονική περίοδο αλλά τα επίπεδα των IgM παραμένουν χαμηλά ενώ των IgG αυξάνονται και φτάνουν στα υψηλότερα επίπεδα 4-12 εβδομάδες αργότερα. Η κυριότερη ανοσιακή απάντηση αφορά την IgG2 υποτάξη (ισότυπο) και φαίνεται ότι διευκολύνει και την οψωνινοποίηση. Μελέτες σε διδύμους έχουν δείξει ότι το επίπεδο της αντισωματικής απάντησης ελέγχεται γενετικά και έχει βρεθεί σημαντική συσχέτιση των IgG2 σε ομοζυγώτες διδύμους με αρκετούς G2m αλλότυπους [128].

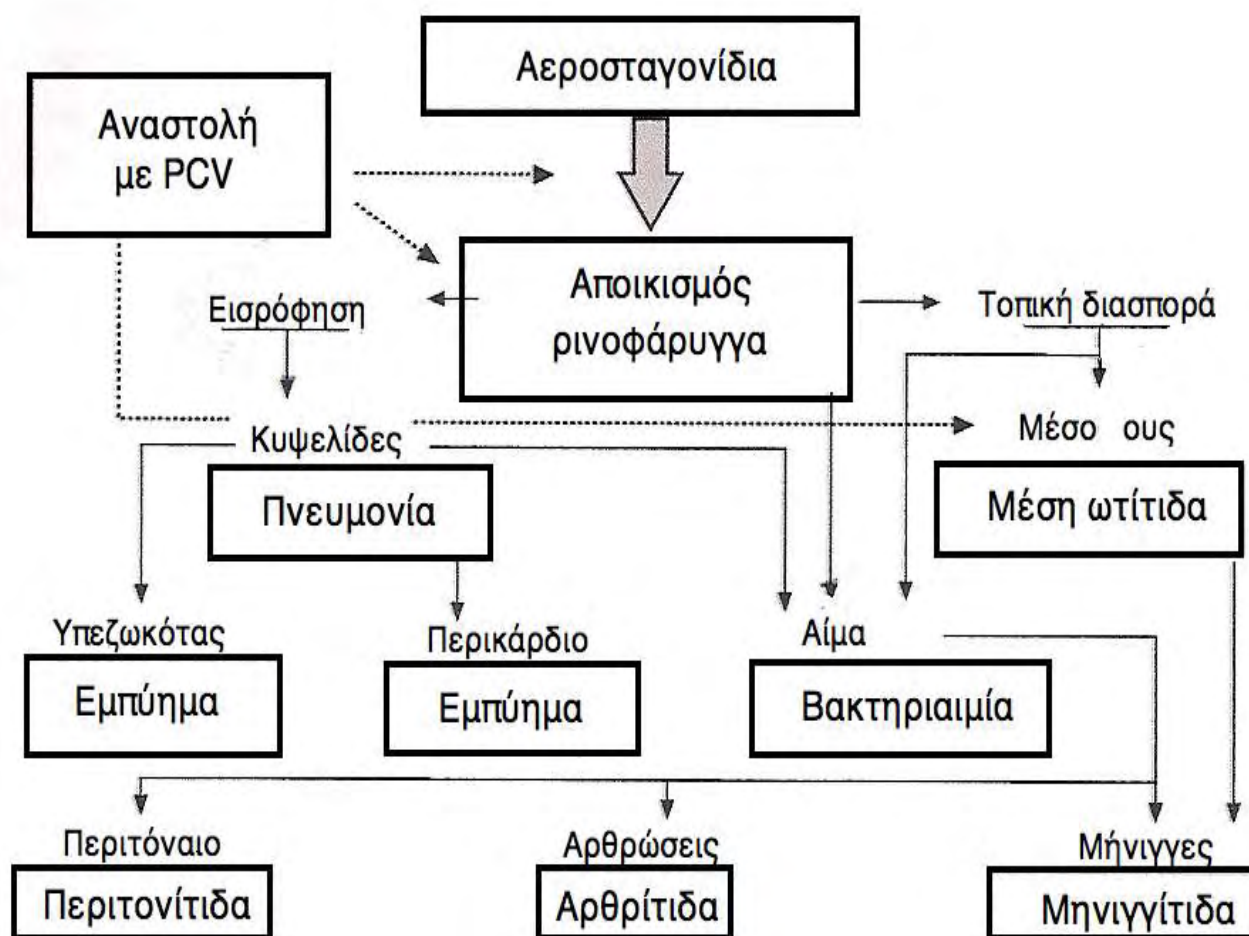
Τα επίπεδα των αντισωμάτων αυξάνουν με την ηλικία και συνδέονται στενά με την έκθεση στον πνευμονιόκοκκο είτε μέσω της φορέας είτε μέσω της λοίμωξης (π.χ στην οξεία μέση ωτίτιδα, ΟΜΩ) [121,129–130]. Ο τίτλος αντισωμάτων στους ενήλικες πέφτει στα ίδια επίπεδα με αυτά που παρατηρούνται στην ηλικία των 3 ετών, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει τη μεγαλύτερη ευαισθησία κάποιων ενηλίκων σε πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις [131].

## 6. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

Ο πνευμονιόκοκκος προκαλεί λοιμώξεις των ώτων, των παραρρινίων κόλπων, της τραχείας, των βρόγχων και των πνευμόνων μέσω άμεσης επέκτασης από το σημείο του αρχικού αποικισμού, που είναι ο ρινοφάρυγγας.

Η λοίμωξη των καρδιακών βαλβίδων, των οστών και των αρθρώσεων προκαλείται μόνο μέσω της αιματογενούς οδού, ενώ λοίμωξη του περιτοναίου, του υπεζωκότα, καθώς και του ΚΝΣ μπορεί να γίνει είτε μέσω άμεσης εξάπλωσης είτε μέσω της αιματογενούς οδού. Συνήθως δεν είναι εφικτό να διευκρινιστεί ο ακριβής τρόπος μετάδοσης του μικροοργανισμού.

Η μικροβιαμία χωρίς εστία λοίμωξης αποκαλείται πρωτοπαθής. Σε μελέτες που έγιναν σε ενήλικες με πνευμονιοκοκκική μικροβιαμία στο Ισραήλ, συνυπήρχε πνευμονία στο 71% των περιπτώσεων, μηνιγγίτιδα στο 8%, και ΟΜΩ ή ρινοκολπίτιδα στο 4% [132]. Η βακτηριαμία θεωρήθηκε πρωτοπαθής στο 18% των περιπτώσεων. Εάν δεν χορηγηθεί άμεσα θεραπευτική αγωγή, η πιθανότητα να αποκαλυφθεί η εστία της λοίμωξης είναι μεγαλύτερη.



**Σχήμα 5. Παθογένεση και διασπορά πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης-κλινικά σύνδρομα.**

**(PCV: συζευγμένο πολυσακχαριδικό πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο)**

### 6.1.Οξεία μέση ωτίτιδα

Η οξεία μέση ωτίτιδα (ΟΜΩ) είναι η συχνότερη λοίμωξη της παιδικής ηλικίας με μεγαλύτερη επίπτωση στην ηλικιακή ομάδα των 6-18 μηνών. Μελέτες σε παιδιά στις ΗΠΑ, έδειξαν ότι τα 2/3 θα έχουν ένα επεισόδιο ΟΜΩ έως την ηλικία των 12 μηνών και >80% έως την ηλικία των 3 ετών [133, 134]. Κλινικά χαρακτηρίζεται από την οξεία εμφάνιση συμπτωμάτων και σημείων λόγω της φλεγμονής του μέσου ωτός σε συνδυασμό με ωτοσκοπικά ευρήματα όπως ερυθρότητα, προβολή και μειωμένη κινητικότητα του τυμπανικού υμένα.

Ο πνευμονιόκοκκος είναι υπεύθυνος για το 30-50% των περιπτώσεων ΟΜΩ, ο αιμόφιλος της ινφλουέντζας για το 15-30%, ενώ η μοραξέλλα η καταρροϊκή για το 5-15%. Σε κάποιες μελέτες έρχεται σε δεύτερη θέση μετά τον μη τυποποιήσιμο αιμόφιλο της ινφλουέντζας. Στις μελέτες που αφορούσαν παιδιά ηλικίας 6 μηνών έως 4 ετών και πραγματοποιήθηκαν πριν από την ευρεία εφαρμογή του 7-δύναμου εμβολίου, ο πνευμονιόκοκκος ανευρέθη στο 40-50% των περιπτώσεων στις οποίες απομονώθηκε μικρόβιο [135].

Είναι δύσκολο να προσδιοριστεί το παθογόνο αίτιο μόνο με βάση το ιστορικό και την φυσική εξέταση. Ωστόσο, παιδιά με πνευμονιοκοκκική οξεία μέση ωτίτιδα τείνουν να έχουν σοβαρότερη λοίμωξη και λιγότερες πιθανότητες αυτόματης υποχώρησης αυτής χωρίς αντιμικροβιακή αγωγή.

Έχει βρεθεί ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του αποικισμού του ρινοφάρυγγα και των λοιμώξεων του μέσου ωτός. Παρόλο που οι περισσότερες περιπτώσεις αποικισμού δεν συνοδεύονται από νόσο, προοπτικές μελέτες έχουν δείξει ότι η πνευμονιοκοκκική ΟΜΩ έπεται του αποικισμού με καινούριο ορότυπο [136]. Παιδιά που αποικίζονται πολύ νωρίς πριν από την ηλικία των 3 μηνών, έχουν διπλάσιο κίνδυνο ΟΜΩ στους πρώτους 6 μήνες ζωής [136].

Ο αποικισμός στον 1<sup>ο</sup> χρόνο της ζωής από αιμόφιλο της ινφλουέντζας, πνευμονιόκοκκο και/ή μοραξέλλα καταρροϊκή, σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο υποτροπιάζουσας ΟΜΩ σε σχέση με μη αποικισμένα παιδιά [136 - 138]. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι παιδιά που είναι επιρρεπή σε ΟΜΩ τείνουν να αποικίζονται περισσότερο, και ότι ο αποικισμός με ανθεκτικά στελέχη σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα μη θεραπευθείσας ΟΜΩ. Παιδιά με ΟΜΩ έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι αποικισμένα στο ρινοφάρυγγα τη στιγμή της διάγνωσης.

Ο αποικισμός διαφέρει ανάμεσα στους υγιείς και σε αυτούς με ιογενείς λοιμώξεις και ΟΜΩ. Οι ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της οξείας μέσης ωτίτιδας. Οι αναπνευστικοί ιοί παρεμβαίνουν στο σύστημα της βλεννοκροσσωτής κάθαρσης με αποτέλεσμα την δυσλειτουργία της πρωταρχικής άμυνας του ξενιστή απέναντι στην μικροβιακή εισβολή. Επίσης, οι ιογενείς λοιμώξεις προκαλούν δυσλειτουργία της ευσταχιανής σάλπιγγας και ελάττωση της πίεσης στο μέσο ουσ. Αποτέλεσμα αυτών είναι να ωθούνται στο μέσο ουσ βλέννα, εκκρίσεις του ρινοφάρυγγα και μικρόβια που τον αποικίζουν. Συνήθως η ΟΜΩ εμφανίζεται 2-5 μέρες μετά από μία ιογενή λοίμωξη του αναπνευστικού [139]

Είναι σημαντικό το γεγονός ότι η πλειονότητα των στελεχών του πνευμονιόκοκκου που σχετίζεται με ΟΜΩ είναι στελέχη καινούρια και όχι αυτά που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα κατά την περίοδο που τα παιδιά είναι υγιή. Η πνευμονιοκοκκική ΟΜΩ είναι 3,8 φορές πιο συχνή σε παιδιά με νέα στελέχη.

Οι παραδοσιακά κυρίαρχοι ορότυποι 6A, 6B, 14, 19A, 19F και 23F, σε ότι αφορά τον αποικισμό και τη λοίμωξη σε ανεμβολίαστα παιδιά, φαίνεται να σχετίζονται με τάση για εντονότερη προσκόλληση στα κύτταρα των



θηλαστικών. Επίσης ο ορότυπος 3, αν και θεωρείται λιγότερο συχνό αίτιο διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου, αποτελεί πλέον σημαντικό αίτιο ΟΜΩ [137,140].

## **6.2. Ρινοκολπίτιδα**

Ως συχνότερα αίτια ενοχοποιούνται τα ίδια μικρόβια με αυτά της οξείας μέσης ωτίτιδας. Ο πνευμονιόκοκκος κυριαρχεί μαζί με τον αιμόφιλο της ινφλουέντζας και τη μοραξέλλα.

Η παθογένεση της νόσου είναι παρόμοια με αυτή της ΟΜΩ και σημαντικό ρόλο για τη συμφόρηση των βλεννογόνων παίζουν οι ιογενείς λοιμώξεις, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι και τα αλλεργιογόνα. Η συσσώρευση υγρού στους παραρρινίους κόλπους, ακόμη και την περίοδο του κοινού κρυολογήματος, δημιουργεί μία εξαιρετη βάση για την ανάπτυξη βακτηριακής λοίμωξης.

## **6.3. Οξεία έξαρση χρόνιας βρογχίτιδας**

Προσεκτική μικροβιολογική ανάλυση έχει επιβεβαιώσει την κλινική υποψία ότι ο πνευμονιόκοκκος ευθύνεται, σε συνδυασμό με τον αιμόφιλο της ινφλουέντζας, για τις εξάρσεις σε ασθενείς με χρόνια βρογχίτιδα. Επίσης, η κλινική αναγνώριση έξαρσης της χρόνιας νόσου συσχετίζεται σημαντικά με την παρουσία νέου πνευμονιοκοκκικού στελέχους [141].

## **6.4. Πνευμονία**

### **Παθογένεση**

Η πνευμονία δημιουργείται όταν οι προστατευτικοί μηχανισμοί του ξενιστή δεν καταφέρουν να παρεμποδίσουν την είσοδο του πνευμονιόκοκκου στις κυψελίδες, και κατ'επέκταση τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό του. Τα μικρόβια πολλαπλασιάζονται στον κυψελιδικό χώρο και διεισδύουν στο

κυψελιδικό διάφραγμα όπου διεγείρεται η φλεγμονώδης διεργασία με ενεργοποίηση του συμπληρώματος και παραγωγή κυτοκινών. Αυξάνεται η διαπερατότητα των αγγείων και η παραγωγή εξιδρωματικού υγρού και λευκοκυττάρων που συσσωρεύονται στις κυψελίδες οπότε και διαχέονται μέσω των πόρων του Κοην σε περιοχές που δεν συμμετείχαν αρχικά στην φλεγμονή. Η κλινική διάγνωση της πνευμονίας γίνεται όταν η συσσώρευση του υγρού στις κυψελίδες είναι τέτοια ώστε να οδηγεί και στην ακτινολογική εικόνα της πνευμονίας με τη μορφή πύκνωσης [142].

Ο πνευμονιόκοκκος προκαλεί λοβώδη πνευμονία που χαρακτηρίζεται από αιφνίδια έναρξη με έντονα συμπτώματα από το αναπνευστικό όπως ταχύπνοια, βήχα, δύσπνοια, πυρετό με ρίγος, ταχυκαρδία και πυώδη απόχρεμψη. Ασθενείς με πνευμονιοκοκκική πνευμονία παρουσιάζουν συνήθως όψη πάσχοντος σε αντίθεση με άτομα που έχουν ιογενή ή μυκοπλασματική πνευμονία.

Λιγότερο συχνά ο πνευμονιόκοκκος προκαλεί πνευμονικό απόστημα διότι δεν παράγει τοξίνες και ένζυμα οι οποίες προκαλούν βλάβη στους ιστούς. Στην περίπτωση που υπάρχει πνευμονικό απόστημα ιδιαίτερα σε ενήλικες θα πρέπει να αναζητηθεί, ειδικά στους ενήλικες, άλλος αιτιολογικός παράγοντας όπως αναερόβια λοίμωξη, ανατομική ανωμαλία όπως απόφραξη βρόγχου, καρκίνος ή πνευμονικό έμφρακτο.

Παρόλο που στο 40% των ασθενών συνυπάρχει πλευριτική συλλογή, μόνο στο 10% η ποσότητα είναι ικανή για να παροχτετευθεί και μόνο στο 2% παρατηρείται εμπύημα [142].

## Διάγνωση

Η διάγνωση τίθεται σε ενήλικες και μεγάλα παιδιά με μικροσκοπική εξέταση των πτυέλων (κατά Gram χρώση) και την καλλιέργεια. Η εξέταση πτυέλων δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί διαγνωστικά σε παιδιά < 5 ετών γιατί αυτά συνήθως καταπίνουν τις εκκρίσεις τους. Η καταλληλότητα του δείγματος πτυέλων ορίζεται από την ύπαρξη 10 ή περισσότερων πολυμορφοπυρήνων και λιγότερο από 25 επιθηλιακών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο (x100). Η διάγνωση θεωρείται βέβαιη όταν απομονώνεται πνευμονιόκοκκος στην κ/α αίματος. Μελέτη των Beeson και Bennet [143] έδειξε ότι οι περισσότεροι ασθενείς με πνευμονιοκοκκική πνευμονία είχαν σε κάποια περίοδο κατά τη διάρκεια της νόσου βακτηριαιμία. Θα πρέπει όμως να αναφερθεί ότι χαμηλό ποσοστό ασθενών με πνευμονιοκοκκική πνευμονία έχουν θετικές καλλιέργειες αίματος. Στη διάγνωση μπορεί να βοηθήσει η ανίχνευση αντιγόνων του πνευμονιόκοκκου στα ούρα. Στα παιδιά μπορεί να είναι θετική η εξέταση και στην περίπτωση αποικισμού του ρινοφάρυγγά τους, οπότε και δε θεωρείται διαγνωστική [144]. Τέλος, με την ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων διάγνωσης (PCR αίματος) οι Michelow και συν. [144], απέδειξαν ότι έχει υπάρξει πρόοδος σε ότι αφορά την ανεύρεση του υπεύθυνου παθογόνου. Περιορισμός της εφαρμογής της μοριακής μεθόδου είναι ότι η ανεύρεση γενετικού υλικού του μικροοργανισμού δεν πιστοποιεί απαραίτητα λοίμωξη.

## Επιπλοκές

Το εμπύημα είναι η πιο συχνή επιπλοκή της πνευμονίας με ποσοστό εμφάνισης 2% [142]. Όταν τα μικρόβια φτάσουν στον πλευριτικό χώρο (υπεζωκότα), είτε αιματογενώς, είτε λόγω εξάπλωσης της πνευμονίας μέσω της λεμφικής οδού στο σπλαγχνικό πέταλο του υπεζωκότα, τότε δημιουργείται

το εμπύημα. Η παράταση του πυρετού, ακόμη και η εμμένουσα λευκοκυττάρωση 4-5 ημέρες μετά την έναρξη κατάλληλης αντιβιοτικής αγωγής, θέτουν την υποψία εμπυήματος. Η διάγνωση θεωρείται ακόμα πιο πιθανή όταν συνυπάρχει πλευριτικό υγρό στην α/α θώρακα. Η ύπαρξη πυώδους συλλογής με (+) Gram χρώση ή υγρό με pH<7,1, γλυκόζη<60 mg/dl, λευκά>25000<sup>ηγγηγγ</sup> και LDH>200IU, αποτελεί ένδειξη για παροχέτευση με θωρακικό σωλήνα.

Οι ορότυποι που συχνά σχετίζονται με πνευμονία στα παιδιά είναι οι 1, 3, 6, 7, 14, 18, 19 και 23. Όλοι, εκτός από τον 1, 3 και 7 συμπεριλαμβάνονται στο επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο.

Η συνήθης εικόνα χαρακτηρίζεται από αιφνίδια εισβολή, συμμετοχή ενός λοβού και γρήγορη επαναφορά της μορφολογίας του τμήματος του πνεύμονα που συμμετέχει στο φυσιολογικό, από τη στιγμή που εφαρμόζεται η κατάλληλη αντιβιοτική αγωγή. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, όταν η πνευμονία οφείλεται σε *Staphylococcus aureus* ή *Klebsiella pneumoniae*, συχνά έχουμε ιστική βλάβη και δημιουργία πολλαπλών μικρών αποστημάτων.

Έχει παρατηρηθεί από κλινικούς ιατρούς ότι συμπτώματα και σημεία ήπιων αναπνευστικών λοιμώξεων που οφείλονται σε ιούς συχνά προηγούνται της βακτηριακής πνευμονίας, όμως δεν υπάρχουν επαρκείς αποδείξεις για να στηρίξουν αυτή την άποψη. Μελέτες σε πειραματόζωα, που αφορούν λοιμώξεις με τον ιό της ινφλουέντζας, δείχνουν ότι υπάρχει συγκεκριμένη περίοδο κατά την οποία ο πνεύμονας είναι ευάλωτος σε μικροβιακή λοίμωξη. Αυτό πιθανά οφείλεται στην μεταβολή της δραστηριότητας των μακροφάγων στις κυψελίδες σε ιογενείς λοιμώξεις. Σταφυλοκοκκικές ή πνευμονιοκοκκικές πνευμονίες, μπορεί να συμβούν κατά τη διάρκεια ή λίγο μετά τη λοίμωξη με

τον ιό της γρίπης, και σε αυτές τις περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί υψηλά ποσοστά θνητότητας σε παιδιά [142].

### **6.5. Βακτηριαμία**

Η συχνότερη εκδήλωση διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου στα παιδιά είναι η βακτηριαμία χωρίς εμφανή εστία λοίμωξης [145]. Το μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων παρατηρείται σε ηλικίες <2 ετών και η συχνότητα εμφάνισής της υπολογίζεται σε ποσοστό 2%. Μετά την εφαρμογή του εμβολίου για τον αιμόφιλο της ινφλουέντζας τύπου b, ο πνευμονιόκοκκος είναι το συχνότερο μικρόβιο που απομονώνεται σε κ/ες αίματος παιδιών με εικόνα λανθάνουσας βακτηριαμίας (83-92%) [146].

Ως λανθάνουσα βακτηριαμία ορίζεται η ύπαρξη θετικής αιμοκαλλιέργειας σε παιδί με πυρετό χωρίς εμφανή εστία λοίμωξης.

Πριν την εφαρμογή του επταδύναμου συζευγμένου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου οι συχνότεροι ορότυποι που απομονώνονταν ήταν οι 14, 6B και 23F [145].

### **6.6. Μηνιγγίτιδα**

Ο πνευμονιόκοκκος αποτελεί σημαντικό αίτιο βακτηριακής μηνιγγίτιδας. Στις ΗΠΑ ο πνευμονιόκοκκος είναι το συχνότερο αίτιο μικροβιακής μηνιγγίτιδας σε ενήλικες με εξαίρεση τις περιόδους που υπάρχουν επιδημίες μηνιγγιτιδόκοκκου. Στην Ελλάδα και στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες όπου εφαρμόζεται εμβολιαστικό πρόγραμμα για τον αιμόφιλο της ινφλουέντζας, αποτελεί το 2<sup>ο</sup> συχνότερο αίτιο (μετά τον μηνιγγιτιδόκοκκο) μικροβιακής μηνιγγίτιδας σε παιδιά.

Η μηνιγγίτιδα μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε άμεσης επέκτασης από τους παραρρινίους κόλπους και το μέσο ους, είτε το αποτέλεσμα

αιματογενούς εξάπλωσης. Την πρώτη πιθανότητα έρχεται να ενισχύσει η συσχέτιση ΟΜΩ και ρινοκολπίτιδας με λοίμωξη του ΚΝΣ καθώς και το γεγονός ότι ο πνευμονιόκοκκος είναι το συχνότερο αίτιο υποτροπιάζουσας μικροβιακής μηνιγγίτιδας σε άτομα με τραύμα κεφαλής, διαφυγή ΕΝΥ και διάσπαση της ακεραιότητας της σκληράς μήνιγγας. Όμως σε μελέτες με αυτοψίες στα βρεγματικά οστά παιδιών που κατέληξαν μετά από μικροβιακή μηνιγγίτιδα έχει βρεθεί ότι δεν υπήρξε επέκταση από το μέσο ους [147]. Το γεγονός αυτό στηρίζει την άποψη ότι ακόμα και όταν η μηνιγγίτιδα έπεται ενός επεισοδίου ΟΜΩ, η λοίμωξη του ΚΝΣ μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μικροβιαμίας.

Παρόλο που αρχικά για την παθογένεση είχε ενοχοποιηθεί η αιματογενής διασπορά από το χοριοειδές πλέγμα [31], πλέον υπάρχει η άποψη ότι ενεργοποιούνται τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών που εκκρίνουν κυττοκίνες και διεγείρουν την παραγωγή του παράγοντα για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (PAF) [148]. Ο πνευμονιόκοκκος δεσμεύεται από τους υποδοχείς του PAF μέσω της φωσφορυλχολίνης του κυτταρικού τοιχώματος. Μέσω της σύνδεσής του διατρέχει το ενδοθήλιο και οδεύει στον εξωκυττάριο χώρο όπου πολλαπλασιάζεται και διασπείρεται στο ΕΝΥ.

Δεν υπάρχουν κλινικά σημεία ή συμπτώματα που μπορούν να διακρίνουν την πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα από τη μηνιγγίτιδα που οφείλεται σε άλλα παθογόνα αίτια. Χρησιμοποιώντας τόσο τις συμβατικές μικροβιακές τεχνικές όσο και τις σύγχρονες μοριακές προσεγγίσεις, σήμερα υπάρχει η δυνατότητα της σωστής διάγνωσης σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Η ανίχνευση του αντιγόνου του πνευμονιόκοκκου στο κλινικό δείγμα του ΕΝΥ είναι σημαντικό βοηθητικό εργαλείο σε συνδυασμό με την Gram χρώση(137). Ωστόσο, αν

έχουν περάσει 3-6 ώρες από την χορήγηση στον ασθενή του δραστικού αντιβιοτικού, υπάρχει ικανή συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο ΕΝΥ, με αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των μικροβίων και την αδυναμία απομόνωσης του βακτηρίου στις καλλιέργειες. Στις περιπτώσεις αυτές η χρήση των μοριακών τεχνικών βοηθά σημαντικά στην ανίχνευση και ταυτοποίηση του γενετικού υλικού του παθογόνου αιτίου .

### **6.7. Άλλες λοιμώξεις**

Λιγότερο συχνές μορφές πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης αποτελούν η σηπτική αρθρίτιδα, η οστεομυελίτιδα, η ενδοκαρδίτιδα καθώς και οι λοιμώξεις μαλακών μορίων [137]. Η πνευμονιοκοκκική κυτταρίτιδα του κόγχου συναντάται συχνότερα σε παιδιά <36 μηνών. Μία σπάνια επιπλοκή πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης αποτελεί και το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο.

Παιδιά με νεφρωσικό σύνδρομο κινδυνεύουν από πνευμονιοκοκκική διεισδυτική λοίμωξη λόγω απώλειας ανοσοσφαιρινών και της επακόλουθης διαταραχής τόσο στην οψωνινοποίηση, όσο και στη λειτουργία των λεμφοκυττάρων. Αποτέλεσμα αυτών είναι η περιτονίτιδα, η σήψη, η πνευμονία, αλλά και λοιμώξεις μαλακών μορίων.

Σε άτομα με ανοσοανεπάρκεια, ειδικά ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία ή συγγενή ασπληνία ή μετά από σπληνεκτομή, η πνευμονιοκοκκική μικροβιαίμια έχει ταχεία πορεία και οδηγεί στην ανάπτυξη αιμορραγικών αλλοιώσεων, διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης, καταπληξίας και θανάτου εντός 24-48 ωρών.

## 7. ΑΝΟΣΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ - ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ

Η πρώτη προσπάθεια για την πρόληψη της πνευμονιοκοκκικής νόσου έγινε από τον Wright το 1911 που υποστήριξε ότι ο ενοφθαλμισμός με ολόκληρους νεκρούς πνευμονιόκοκκους προστατεύει από πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις [3, 6]. Δυστυχώς η προσπάθεια παρασκευής εμβολίου απέτυχε γιατί περιελάμβανε μόνο έναν από τους δύο ορότυπους που είχαν ανακαλυφθεί την εποχή εκείνη και η δόση του εμβολίου δεν επαρκούσε γιατί χρειαζόταν μεγάλη ποσότητα (inocula) για να είναι αποτελεσματική.

Το 1926 οι Felton και Bailey [8] κατάφεραν να απομονώσουν τους πολυσακχαρίτες του ελύτρου του πνευμονιόκοκκου, γεγονός που οδήγησε στην ανάπτυξη του πρώτου πολυσακχαριδικού εμβολίου. Τελικά, αποσύρθηκε από την αγορά λόγω της παράλληλης παραγωγής και χρήσης των αντιβιοτικών για την άμεση και επιτυχή αντιμετώπιση του πνευμονιόκοκκου. Το πρόβλημα ωστόσο που προέκυψε ήταν η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών στην πενικιλίνη, που αναφέρθηκαν αρχικά στην Αυστραλία και στη Νέα Γουϊνέα, και την επέκτασή τους στη συνέχεια σε όλο τον κόσμο. Η διασπορά τους παγκοσμίως οφείλεται κυρίως σε κάποιους ανθεκτικούς, σε περισσότερα από ένα αντιβιοτικά, κλώνους των οροτύπων 6B, 9V, 14, 19A, 19F, 23F [149].

Τα προβλήματα αυτά οδήγησαν στην αναζήτηση νέων στρατηγικών ανοσοποίησης και την παραγωγή τελικά το 1977 του 14-δύναμου πολυσακχαριδικού εμβολίου από τον Austrian. Το εμβόλιο αυτό εξελίχθηκε το 1983 σε 23-δύναμο το οποίο κυκλοφορεί έως σήμερα [122]. Τα μειονεκτήματα του εμβολίου αυτού, όπως η πτωχή ανοσογονικότητα σε παιδιά <2 ετών και ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς, οδήγησε στην ανάπτυξη του συζευγμένου



πολυσακχαριδικού εμβολίου, αρχικά του 7-δύναμου που κυκλοφορεί από το 2000 και στη συνέχεια του 10-δύναμου και 13-δύναμου που κυκλοφόρησαν το 2010.

### **7.1. Απλό πολυσακχαριδικό εμβόλιο**

Το 23-δύναμο πολυσακχαριδικό εμβόλιο περιέχει 25 µg κεκαθαρμένου πολυσακχαρίτη του ελύτρου από τους παρακάτω ορότυπους : 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F και 33F. Οι 23 αυτοί ορότυποι ευθύνονται για το 85-90% των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων [149]. Το εμβόλιο αυτό είναι δραστικό σε ενήλικες και παιδιά >2 ετών. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι προσφέρει προστασία σε ορισμένες ομάδες υψηλού κινδύνου όπως ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία ή ασπληνία και σε ηλικιωμένους με παθήσεις όπως χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια [87, 150, 151] .

Δυστυχώς, στα παιδιά <2 ετών που έχουν τη μεγαλύτερη συχνότητα τόσο πνευμονιοκοκκικής φορέας όσο και νόσου, καθώς και στους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, υπάρχει πτωχή ανοσιακή απάντηση στο συγκεκριμένο εμβόλιο [152, 153]. Το 23-δύναμο εμβόλιο δεν έχει δράση έναντι της οξείας μέσης ωτίτιδας από πνευμονιόκοκκο και επίσης δεν προάγει την T-εξαρτώμενη ανοσιακή απάντηση [154]. Αυτό σημαίνει ότι απουσιάζουν τα B κύτταρα μνήμης και περιορίζεται η περίοδος προστατευτικής κάλυψης με το εμβόλιο. Τέλος, κάποιοι πολυσακχαρίτες του ελύτρου έχουν χαμηλή ανοσογονικότητα και σε αυτούς περιλαμβάνονται διάφοροι ορότυποι που σχετίζονται με αντοχή στην πενικιλίνη [155]. Τα παραπάνω οδήγησαν στην παρασκευή νέων πνευμονιοκοκκικών εμβολίων, χωρίς αυτό βέβαια να

σημαίνει ότι μπορούν να αντικατασταθούν πλήρως τα πολυσακχαριδικά εμβόλια.

Η αποτελεσματικότητα των πολυσακχαριδικών εμβολίων στα παιδιά >2 ετών και στους ενήλικες είναι 61-75% και μπορούν να χορηγηθούν σε συγκεκριμένες περιπτώσεις [156, 157]. Οι συστάσεις για εμβολιασμό είναι οι εξής:

- 1) άτομα άνω των 65 ετών (επανεμβολιασμός σε άτομα που ήταν μικρότερα από 65 όταν έλαβαν την πρώτη δόση και ο χρόνος που πέρασε από αυτήν είναι >5 χρόνια)
- 2) παιδιά άνω των 5 ετών με φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα που διατρέχουν κίνδυνο για θανατηφόρο λοίμωξη λόγω χρόνιων παθήσεων (όχι επανεμβολιασμός)
- 3) παιδιά άνω των 5 ετών με λειτουργική ή ανατομική ασπληνία (σε άτομα με λειτουργική ή ανατομική ασπληνία επανεμβολιασμός αν είναι >10 ετών σε 5 χρόνια και αν είναι < 10 ετών σε 3 χρόνια από την πρώτη δόση)
- 4) ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς άνω των 5 ετών που βρίσκονται σε σοβαρό κίνδυνο για λοίμωξη (επανεμβολιασμός με μία δόση αν πέρασαν 5 χρόνια μετά την πρώτη δόση και αν είναι < 10 ετών 3 χρόνια μετά την πρώτη δόση)

Το εμβόλιο χορηγείται ενδομυϊκώς ή υποδορίως σε μία δόση των 0,5ml. Μπορεί να χορηγηθεί ταυτόχρονα με τα άλλα εμβόλια της παιδικής ηλικίας, συμπεριλαμβανομένου και του εμβολίου της γρίππης, σε ξεχωριστή όμως θέση και με άλλη σύριγγα.

Το εμβόλιο χορηγείται σε μία δόση εκτός από άτομα που είναι σε ομάδες υψηλού κινδύνου όπου χορηγείται και δεύτερη. Άτομα κάτω των 10

ετών λαμβάνουν τη δεύτερη δόση μετά από 3 χρόνια, ενώ άτομα άνω των 10 ετών μετά από 5 χρόνια.

Κάποιες μελέτες έχουν αναδείξει και μια πρόσθετη δράση του πολυσακχαριδικού εμβολίου όταν χρησιμοποιείται ως αναμνηστική δόση μετά από εμβολιασμό με το συζευγμένο [158]. Οι Breukels και συν. [159] έδειξαν ότι υπάρχει πτωχή IgG2 απάντηση σε παιδιά επιρρεπή σε ΟΜΩ μετά από εμβολιασμό με συζευγμένα εμβόλια και αυτό το πρόβλημα θα μπορούσε να ξεπεραστεί εμβολιάζοντας με αναμνηστική δόση με το πολυσακχαριδικό εμβόλιο. Έχει προταθεί ότι ο εμβολιασμός με συζευγμένα εμβόλια κατά τη βρεφική ηλικία που ακολουθείται από αναμνηστική δόση του πολυσακχαριδικού εμβολίου μετά την ηλικία των 10 ετών μπορεί να μειώσει συνολικά τα ποσοστά θνησιμότητας και θνητότητας από πνευμονιόκοκκο καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής [160].

### **Ανεπιθύμητες ενέργειες-αντενδείξεις**

Το εμβόλιο δεν έχει κάποια αντένδειξη εκτός από τη σοβαρή αλλεργική αντίδραση σε προηγούμενη δόση ή ιστορικό αλλεργίας σε κάποια από τα συστατικά του. Τοπικές αντιδράσεις όπως ερύθημα, οίδημα και πόνος συμβαίνουν σε ποσοστό 30-50% και υποχωρούν σε 1-3 ημέρες. Σοβαρότερες συστηματικές αντιδράσεις είναι σπάνιες. Ένα μικρό ποσοστό (<1%) εμφανίζει πυρετό, ρίγη και κακουχία. Γενικά, έντονες τοπικές αντιδράσεις και πυρετό εμφανίζουν άτομα με υψηλότερες συγκεντρώσεις αντισωμάτων έναντι του πολυσακχαρίτη και αυτό αντανακλά ένα φαινόμενο παρόμοιο με αυτό της αντίδρασης Arthus.

## Αποτελεσματικότητα

Μετά τον εμβολιασμό με το 23-δύναμο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο ένας υγιής ενήλικας παρουσιάζει επαρκή αντισωματική απάντηση στα 3/4 των αντιγόνων του [161]. Τα IgG και IgM αντισώματα ανιχνεύονται σε 5-7 μέρες από τον εμβολιασμό και τα IgG αντισώματα προσεγγίζουν στη μέγιστη τιμή τους 4-12 εβδομάδες μετά και αρχίζουν να υποχωρούν στα επόμενα 1-2 χρόνια. Η προστατευτική κάλυψη διατηρείται για όσο διάστημα ανιχνεύονται αντισώματα. Δυστυχώς δεν είναι γνωστό ποιο ακριβώς επίπεδο αντισωμάτων θεωρείται προστατευτικό.

Γενετικοί παράγοντες ελέγχουν την ικανότητα του ατόμου να παράγει αντισώματα στα πολυσακχαριδικά αντιγόνα και μεταβιβάζονται με τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα. Μετά τον εμβολιασμό, κάποιοι αποτυγχάνουν να απαντήσουν στα περισσότερα πολυσακχαριδικά αντιγόνα, ενώ, αντίθετα, άλλοι εμφανίζουν υψηλό τίτλο IgG αντισωμάτων σε όλα τα αντιγόνα. Ο επαναληπτικός εμβολιασμός στα άτομα που δεν είχαν επαρκή ανοσιακή απάντηση δεν προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων, παρόλο που μπορούν να ανευρεθούν IgG αντισώματα σε κάποια αντιγόνα μετά την χορήγηση του συζευγμένου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου [161]. Άτομα μεγαλύτερης ηλικίας έχουν χαμηλότερα επίπεδα αντισωμάτων από νεότερους, ειδικά αυτοί με χρόνια πνευμονοπάθεια ή καρδιακή νόσο [162].

Οι ασθενείς με ανοσοκαταστολή, που βρίσκονται εξάλλου και σε μεγαλύτερο κίνδυνο για πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις, όπως ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα, νόσο Hodgkin, σπληνεκτομή, λέμφωμα, νεφρωσικό σύνδρομο, νεφρική ανεπάρκεια, κίρρωση, δρεπανοκυτταρική αναιμία, HIV λοίμωξη, έχουν ελαττωμένη ικανότητα παραγωγής IgG αντισωμάτων [163].

Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες δεν διεγείρουν την παραγωγή κυττάρων μνήμης και για το λόγο αυτό ο επανεμβολιασμός στο διάστημα των 3-4 ετών μετά την πρώτη δόση οδηγεί στην παραγωγή αντισωμάτων που προσεγγίζει, χωρίς να φτάνει απόλυτα, τα επίπεδα της αρχικής. Συνεπώς δεν έχουμε με τον επανεμβολιασμό τα πλεονεκτήματα της αναμνηστικής απάντησης.

Σε διάφορες αναδρομικές μελέτες η αποτελεσματικότητα του εμβολίου καταγράφεται περίπου στο 60-70% [164, 165]. Παρατηρήθηκε ελάττωση κατά 56% σε πνευμονιοκοκκικές μικροβιαίμιες αλλά δεν υπήρξε συνολική μείωση της συχνότητας της πνευμονίας σε μεγαλύτερης ηλικίας άτομα [164]. Σε μία μεγάλη μελέτη (case-control study) η προστατευτική δράση του εμβολίου ήταν μεγαλύτερη σε νεαρούς ενήλικες με βραδεία υποχώρηση των τίτλων των αντισωμάτων (παραμένουν για τουλάχιστον 5 χρόνια) αλλά το ίδιο δεν ίσχυε για άτομα άνω των 65 ετών [165].

## **7.2. Συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια**

Ο Avery με τους συνεργάτες του από το 1929 είχε δείξει ότι η σύζευξη του πολυσακχαρίτη με μία πρωτεΐνη αυξάνει την ανοσογονικότητα του [155, 166]. Έτσι τα πολυσακχαριδικά αντιγόνα αποκτούν τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης-φορέα και αναγνωρίζονται ως θυμοεξαρτώμενα. Οι πρωτεΐνες διασπώνται σε πεπτίδια που συνδέονται με τάξης MHC II μόρια της κυτταρικής μεμβράνης και παρουσιάζονται στα T-κύτταρα. Αυτό οδηγεί στη διέγερση της παραγωγής B-κυττάρων μνήμης προκαλώντας ισχυρότερη αναμνηστική απάντηση σε νέα διέγερση. Επιπλέον υπάρχει καλύτερη ανοσολογική απάντηση σε μικρές ηλικίες λόγω της

ωρίμανσης της θυμοεξαρτώμενης ανοσιακής απάντησης που επιτελείται νωρίτερα στη ζωή.

Κάθε πολυσακχαρίτης συνδέεται ξεχωριστά με μία πρωτεΐνη-φορέα. Ο αριθμός ωστόσο των πρωτεϊνών-φορέων πρέπει να είναι περιορισμένος καθώς μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών-φορέων μπορεί να ελαττώσει την αντισωματική απάντηση στα πολυσακχαριδικά αντιγόνα λόγω αντιγονικού ανταγωνισμού [167]. Οι πρωτεΐνες-φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι ίδιες με αυτές που υπάρχουν στο συζευγμένο εμβόλιο του αιμοφίλου της ινφλουέντζας τύπου b και είναι το τοξοειδές του τετάνου, το τοξοειδές της διφθερίτιδας, μία μη τοξική μεταλλαγμένη διφθεριτική τοξίνη (CRM197) και ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα της εξωτερικής μεμβράνης του μηνιγγιτιδόκοκκου της ομάδας B [155].

Τα συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια περιέχουν 7-13 ορότυπους. Το 7-δύναμο εμβόλιο (PCV7) περιέχει 7 από τους πιο συχνούς ορότυπους που ευθύνονται για διεισδυτικές λοιμώξεις και εμφανίζουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα, περιέχει 2 μg για κάθε πολυσακχαρίτη των οροτύπων 4, 9V, 14, 18C, 19F, 23F και 4 μg του ορότυπου 6B (συνολικά 16 μg παλυσσακχαρίτη). Οι πολυσακχαρίτες είναι συζευγμένοι με την πρωτεΐνη-φορέα CRM197 (20 μg) και προσροφημένοι σε φωσφορικό αργίλιο (0,125 μg). Τα εμβόλια αυτά καλύπτουν το 85% των στελεχών πνευμονιόκοκκου στις ΗΠΑ, το 60-70% στην Ευρώπη και το 55% των στελεχών στην Ασία [168].

7- δύναμο	4	6B	9V	14	18C	19F	23F						
10- δύναμο	1	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F			
13- δύναμο	1	3	4	5	6A	6B	7F	9V	14	18C	19A	19F	23F

**Πίνακας 2. Ορότυποι που περιέχονται στα συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια που κυκλοφορούν στη χώρα μας.**

Η αποτελεσματικότητα του εμβολίου στις διεισδυτικές λοιμώξεις έχει μελετηθεί από τον Black [72, 169–171]. Η αποτελεσματικότητα έναντι διεισδυτικών λοιμώξεων ήταν 97% και η αποτελεσματικότητα για συγκεκριμένους ορότυπους ήταν 85% για τον 19F και 100% για τους 14, 18C και 23F. Δεν βρέθηκε αυξημένος κίνδυνος διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου από ορότυπους που δεν περιλαμβάνονται στο εμβόλιο. Σε άλλη μελέτη μετά την εφαρμογή του εμβολίου, ο αριθμός των περιστατικών με διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσο που οφειλόταν σε ορότυπους του εμβολίου μειώθηκε σε ποσοστό >75% σε παιδιά < 24 μηνών [172].

Από τη φιλανδική κλινική μελέτη φαίνεται ότι υπάρχει σημαντική προστασία έναντι της πνευμονίας και της οξείας μέσης ωτίτιδας από ορότυπους που περιέχονται στο εμβόλιο (serotype specific efficacy 57%). Ωστόσο, σημειώνεται και μείωση κατά 34% των επεισοδίων ΟΜΩ από όλους

τους ορότυπους συνολικά [173]. Επιπλέον διάφοροι μελετητές έχουν δείξει σημαντική μείωση της φορέας του ρινοφάρυγγα με τους ορότυπους του εμβολίου 3 μήνες μετά την πρώτη δόση και 1 μήνα μετά την δεύτερη δόση από 25% σε 9% και 7% αντίστοιχα [174-177]. Το γεγονός αυτό εξηγείται λόγω της επίδρασης του εμβολίου πέραν της συστηματικής απάντησης, και στην ανοσολογική απάντηση που επέρχεται μέσω των βλεννογόνων. Τα παραπάνω υποστηρίζει και δεύτερη φιλανδική μελέτη που δείχνει ότι ο εμβολιασμός με τετραδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο επάγει τόσο την συστηματική, όσο και την αντισωματική απάντηση μέσω του βλεννογόνου (mucosal immunity) στα βρέφη [178]. Η μείωση της φορέας μπορεί να παίζει ρόλο στην μείωση της διασποράς στελεχών που σχετίζονται με λοιμώξεις και αντοχή στα αντιβιοτικά, οπότε συμβάλλει τελικά στην ανάπτυξη της ανοσίας της κοινότητας (herd immunity) λόγω ελάττωσης της διασποράς από τα αποικισμένα παιδιά [174, 179].

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία προτείνεται ο εμβολιασμός με το συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο όλων των παιδιών κάτω της ηλικίας των 24 μηνών και των παιδιών 24-59 μηνών που ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου για πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις [180].

Σε ολλανδική μελέτη που ερεύνησε την αποτελεσματικότητα του εμβολίου σε παιδιά 12 μηνών - 7 ετών με υποτροπιάζουσες ΟΜΩ, το εμβόλιο φαίνεται ότι δεν είχε καμία επίδραση στον αριθμό των επεισοδίων παρά την καλή αντισωματική απάντηση [181]. Οι μελετητές υποστήριξαν ότι η ανατροπή μέσω του εμβολιασμού της υπάρχουσας ισορροπίας μεταξύ του ξενιστή και του παθογόνου μικροβίου μπορεί να επιτείνει την αντικατάσταση των στελεχών πνευμονιόκοκκου από άλλους που δεν περιλαμβάνονται στο



εμβόλιο. Η παρουσία νέου παθογόνου με τη σειρά της αυξάνει την πιθανότητα οξείας μέσης ωτίτιδας. Ωστόσο, ο εμβολιασμός στην βρεφική ηλικία μπορεί να παρεμποδίσει ή να καθυστερήσει τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα με τους κυρίαρχους ορότυπους και έτσι να αποτρέψει την εκδήλωση πνευμονιοκοκκικής ΟΜΩ σε μικρά βρέφη. Σε αυτήν την ηλικιακή ομάδα το φαινόμενο της αντικατάστασης οροτύπων δεν παρατηρείται, ενώ στην ολλανδική μελέτη (OMAVAX study) με παιδιά >12 μηνών υπήρξε πλήρης αντικατάσταση οροτύπων του εμβολίου από ορότυπους που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό [181]. Υπάρχουν και άλλες μελέτες που έρχονται να επιβεβαιώσουν αυτό το φαινόμενο της αντικατάστασης οροτύπων [176, 179].

Το 10-δύναμο πολυσακχαριδικό εμβόλιο καλύπτει επιπλέον τους ορότυπους 1, 5 και 7F ενώ το 13-δύναμο που κυκλοφόρησε το 2010, παρέχει προστασία επιπλέον έναντι των οροτύπων 3, 6A και 19A [182].

Μία πρόσφατη συστηματική ανάλυση [183] που περιελάμβανε αποτελέσματα από 5 κλινικές μελέτες σε διάφορες χώρες για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα των συζευγμένων πολυσακχαριδικών εμβολίων (7-δύναμο, 9-δύναμο, 11-δύναμο) έναντι των διεισδυτικών λοιμώξεων και της πνευμονίας έδειξε τα ακόλουθα. Σε υγιή παιδιά <2 ετών η αποτελεσματικότητα του εμβολίου ήταν: 80% για διεισδυτικές λοιμώξεις από ορότυπο του εμβολίου, 58% για λοιμώξεις από όλους τους ορότυπους, 27% για πνευμονία διαγνωσμένη με α/α θώρακα και 6% για κλινικά διαγνωσμένη πνευμονία.

### **Ανεπιθύμητες ενέργειες**

Τοπικές αντιδράσεις όπως οίδημα, ερυθρότητα και άλγος στο σημείο της ένεσης δεν είναι σπάνιες αλλά γενικά είναι ήπιες και αυτοπεριοριζόμενες. Πυρετός >38°C μπορεί να παρατηρηθεί το πρώτο 48ωρο μετά τον

εμβολιασμό. Πολύ σπάνια μπορεί να προκαλέσει συστηματικά συμπτώματα όπως κνίδωση, εξάνθημα, παρατεταμένο και επίμονο κλάμα, επεισόδιο υποτονίας. Η μόνη αντένδειξη στη χορήγηση του εμβολίου είναι η υπερευαισθησία σε προηγούμενη δόση ή σε οποιοδήποτε συστατικό του εμβολίου.

Το εμβόλιο χορηγείται ενδομυϊκά και μπορεί να χορηγηθεί συγχρόνως με οποιοδήποτε άλλο εμβόλιο ρουτίνας της παιδικής ηλικίας, σε άλλη όμως θέση και με διαφορετική σύριγγα.

### **Συστάσεις για εμβολιασμό**

- 1) εμβολιασμός ρουτίνας για όλα τα παιδιά 2-59 μηνών
- 2) εμβολιασμός για παιδιά ηλικίας 60-71 μηνών με προβλήματα υγείας (δρεπανοκυτταρική αναιμία, ασπληνία, HIV λοίμωξη, διαβήτη, χρόνιες πνευμονοπάθειες και καρδιακές νόσους, ανοσοανεπάρκειες, ανοσοκαταστολή από θεραπεία-ακτινοβολία-μεταμόσχευση, κακοήθειες, νεφρωσικό σύνδρομο)

### **7.3. Πρωτεϊνικά εμβόλια**

Τα συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια αναμφισβήτητα παρέχουν υψηλού βαθμού προστασία έναντι των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος αριθμός οροτύπων που καλύπτεται από τα εμβόλια, καθώς και το γεγονός ότι παρατηρήθηκε αύξηση των λοιμώξεων από ορότυπους που αντικατέστησαν τους ορότυπους του εμβολίου, οδηγούν στην ανάγκη για έρευνα και άλλων εναλλακτικών αντιγόνων.

Τα τελευταία χρόνια μελετάται η χρήση των πρωτεϊνών του πνευμονιόκοκκου για την παρασκευή εμβολίου. Αρκετές πρωτεΐνες όπως η πνευμονολυσίνη, η πνευμονιοκοκκική πρωτεΐνη επιφανείας A (PspA), η

προσκολλητίνη A της επιφανείας (PsaA), η νευραμινιδάση και η αυτολυσίνη θεωρούνται σημαντικές για τη λοιμογόνο δύναμη του μικροβίου. Κάθε μία από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες, με κυρίαρχες τις PspA, PsaA και πνευμονολυσίνη, έχει θεωρηθεί πιθανό πρωτεϊνικό εμβόλιο [184].

Η πνευμονιοκοκκική πρωτεΐνη επιφανείας A (PspA) δείχνει σημαντική αντιγονική ετερογένεια μεταξύ των διαφόρων στελεχών ενώ βρέθηκε ότι μετά από εμβολιασμό με ανασυνδυασμένη PspA υπήρξαν αντισώματα από διασταυρούμενη αντίδραση σε ετερόλογα μόρια πνευμονιοκοκκικής πρωτεΐνης επιφανείας A (PspA) [185]. Επιπλέον, έχει βρεθεί σε πειραματόζωα ότι εμβολιασμός με PspA προστατεύει τόσο από διεισδυτικές λοιμώξεις, όσο και από τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα [186].

Σε μελέτες που έγιναν με την προσκολλητίνη A (PsaA) έχει βρεθεί ότι υπάρχει σημαντική προστασία σε ότι αφορά τον αποικισμό αλλά χαμηλού βαθμού προστασία από διεισδυτικές λοιμώξεις [184-186].

Επίσης, έχει προταθεί οι πρωτεΐνες αυτές να χρησιμοποιηθούν ως πρωτεΐνες-φορείς σε συζευγμένο εμβόλιο ώστε και να παρέχεται προστασία έναντι των υπολοίπων οροτύπων και να αποφεύγεται το φαινόμενο αντικατάστασης οροτύπων. Επιπλέον, πολλά υποσχόμενη θεωρείται και η πιθανότητα συνδυασμού της προσκολλητίνης, της πνευμονιοκοκκικής πρωτεΐνης επιφανείας A και της πνευμονολυσίνης λόγω των συμπληρωματικών τους ρόλων τόσο στην λοιμογόνο δύναμη όσο και την προστασία. Πλεονέκτημα αυτού του συνδυασμού θα ήταν η προστατευτική κάλυψη ανεξάρτητα από ορότυπους με κίνδυνο όμως να υπάρξουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους μικροοργανισμούς, όπως ο *Streptococcus viridans*. Η εξαφάνιση αυτών δεν είναι όμως επιθυμητή γιατί

μας προστατεύουν από λοιμώξεις του αναπνευστικού που οφείλονται σε άλλους στρεπτόκοκκους [187]. Για όλους τους παραπάνω λόγους απαιτείται περαιτέρω μελέτη αυτών των πρωτεϊνών προκειμένου να ξεκινήσουν μεγάλης κλίμακας κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους.

## 8. ΑΝΤΟΧΗ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΟΥ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

### 8.1. Αντοχή στην πενικιλίνη

Ο κύριος αντιμικροβιακός παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων ήταν η πενικιλίνη. Ωστόσο, το 1967 καταγράφηκαν για πρώτη φορά λοιμώξεις από ανθεκτικό στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκο στην Αυστραλία. Μέσα στα επόμενα 10 χρόνια περιγράφηκαν σε νοσοκομεία στην Νότια Αφρική επιδημίες από πνευμονιόκοκκο ανθεκτικό στην πενικιλίνη.

Στη δεκαετία του '80 παρουσιάστηκε αύξηση του βαθμού αντοχής στην πενικιλίνη και διασπορά ανθεκτικών στελεχών. Στη δεκαετία του '90 καταγράφηκε επέκταση της αντοχής του πνευμονιόκοκκου στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς [188].

Τα στελέχη του πνευμονιόκοκκου που έχουν ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα ( $MIC \leq 0,06 \mu\text{g/ml}$ ) θεωρούνται ευαίσθητα στην πενικιλίνη, αυτά με  $MIC = 0,12-1 \mu\text{g/ml}$  ενδιάμεσης αντοχής και αυτά με  $MIC \geq 2 \mu\text{g/ml}$  ανθεκτικά. Το 2008 οι ορισμοί της ευαισθησίας στην πενικιλίνη τροποποιήθηκαν και καθορίζονται πλέον με βάση την εντόπιση της λοίμωξης και την οδό χορήγησης του αντιβιοτικού (per os, παρεντερικά) [189].

Σε ότι αφορά τις λοιμώξεις στις οποίες χρειάζεται παρεντερική χορήγηση της πενικιλίνης, πλην των λοιμώξεων του ΚΝΣ, ευαίσθητα θεωρούνται τα στελέχη με  $MIC \leq 2 \mu\text{g/ml}$ , ενδιάμεσης αντοχής αυτά με  $MIC = 4 \mu\text{g/ml}$  και ανθεκτικά αυτά με  $MIC \geq 8 \mu\text{g/ml}$ . Σε περιπτώσεις μηνιγγίτιδας, στελέχη με  $MIC \leq 0,06 \mu\text{g/ml}$  θεωρούνται ευαίσθητα και στελέχη με  $MIC \geq 0,12 \mu\text{g/ml}$  θεωρούνται ανθεκτικά. Στην περίπτωση που χορηγηθεί πενικιλίνη per os τότε ισχύουν οι παλιότεροι ορισμοί, γεγονός που αντανακλά τα χαμηλά

επίπεδα συγκέντρωσης του φαρμάκου στους ιστούς, που επιτυγχάνονται με αυτή τη θεραπεία. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τον καθορισμό ευαισθησίας των αντιμικροβιακών παραγόντων (European Committee on Antimicrobial Testing – EUCAST) έχει προτείνει για στελέχη που δεν προέρχονται από ασθενείς με μηνιγγίτιδα, αυτά με  $MIC \leq 0,06 \mu\text{g/ml}$  να θεωρούνται ευαίσθητα στην πενικιλίνη, αυτά με  $MIC = 0,12-2 \mu\text{g/ml}$  ενδιάμεσης αντοχής και αυτά με  $MIC = 4 \mu\text{g/ml}$  ανθεκτικά [190].

Η ανάπτυξη της αντοχής στην πενικιλίνη οφείλεται στη μεταβολή της δομής των υψηλού μοριακού βάρους πενικιλλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs), που οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα σύνδεσής τους με την πενικιλίνη. Ο πνευμονιόκοκκος φέρει πέντε υψηλού μοριακού βάρους πενικιλλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (1a, 1b, 2a, 2b και 2x) και τη χαμηλού μοριακού βάρους PBP3. Η PBP3 θεωρείται ότι δεν σχετίζεται με λύση του κυττάρου μετά από δράση β-λακταμικών αντιβιοτικών και ότι δεν παίζει ρόλο στην ανάπτυξη αντοχής. Η αλλαγή στις πενικιλλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες έχει ως αποτέλεσμα την ελαττωμένη συγγένεια τόσο με την πενικιλίνη G, όσο και με τα άλλα αντιβιοτικά της ομάδας των β-λακταμών [191]. Μεταβολές στην PBP 2b είναι πιθανότερο να σχετίζονται με την ανάπτυξη χαμηλού βαθμού αντοχής, ενώ αντίθετα μεταλλάξεις στην PBP 2x με υψηλότερου βαθμού αντοχή [192].

Η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών πνευμονιόκοκκου προέκυψε από την μεταφορά, σε αυτά, γενετικού υλικού από άλλα βακτήρια με τα οποία συνυπάρχουν σε κοντινή απόσταση. Το γενετικό υλικό εισάγεται στο κύτταρο μέσω γενετικού μετασχηματισμού. Οι αλλαγές στη δομή των PBPs του πνευμονιόκοκκου κωδικοποιούνται από μωσαϊκά γονίδια [189, 193]. Τα

γονίδια αυτά προέρχονται από σειρά ανασυνδυασμών ανάμεσα σε *rbp* γονίδια πνευμονιόκοκκου και *rbp* γονίδια στελεχών άλλων στρεπτόκοκκων. Η μεταβολή της δομής του γονιδίου που κωδικοποιεί την PBP 2b σε πολλά ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη φαίνεται να προέρχεται από τον *Streptococcus mitis* [194].

Η διασπορά, ανθεκτικών στην πενικιλίνη, στελεχών πνευμονιόκοκκου φαίνεται να οφείλεται είτε στην κυκλοφορία τους μέσω των φορέων ή νοσούντων (διασπορά κλώνου) είτε στην μεταφορά των μωσαϊκών *rbp* γονιδίων (οριζόντια διασπορά). Η διασπορά των στελεχών διευκολύνεται από την πίεση επιλογής από τα αντιβιοτικά (antibiotic pressure). Το φαινόμενο αυτό εξηγεί το γεγονός ότι πολλοί κλώνοι που διασπείρονται σε ευρεία κλίμακα είναι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά.

Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών θεωρούνται η μικρή ηλικία, η πρόσφατη χορήγηση αντιβιοτικών και η παρακολούθηση παιδικών σταθμών.

Την κύρια δεξαμενή διασποράς ανθεκτικών στελεχών αποτελούν οι παιδικοί σταθμοί εξαιτίας του μεγάλου ποσοστού παιδιών που λαμβάνει αγωγή με αντιβιοτικά σε οποιαδήποτε δεδομένη στιγμή. Το παραπάνω έχει ως αποτέλεσμα:

1. την αντικατάσταση των ευαίσθητων στελεχών από ανθεκτικά στελέχη πνευμονιόκοκκου
2. την αύξηση της παρουσίας ανθεκτικών *S. viridans*, γεγονός που δημιουργεί τις προϋποθέσεις για μετασχηματισμό του πνευμονιόκοκκου σε στέλεχος ανθεκτικό στα αντιβιοτικά

3. την αποκάλυψη ενός ανθεκτικού κλώνου πνευμονιόκοκκου που υπήρχε σε μικρή ποσότητα πριν από την λήψη αντιβιοτικής αγωγής
4. την εύκολη διασπορά των ανθεκτικών στελεχών στους παιδικούς σταθμούς λόγω της στενής επαφής των μικρών παιδιών.

Πρέπει να σημειωθεί ότι πολλά ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη με αλλαγή στη δομή των PBPs, ειδικά της PBP2x και της PBP1a, αναπτύσσουν αντοχή και στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς, όπως στην κεφοταξίμη και στην κεφτριαξόνη. Ακόμα και μικρές αυξήσεις στις MIC για την πενικιλίνη, για στελέχη που θεωρούνται ευαίσθητα, σχετίζονται με αντοχή σε άλλα ευρέως διαδεδομένα αντιβιοτικά όπως στις μακρολίδες, στην τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη, στις τετρακυκλίνες και σε μικρότερο βαθμό στις κινολόνες.

## 8.2. Αντοχή στις μακρολίδες

Η ανάπτυξη αντοχής στις μακρολίδες οφείλεται σε δύο κυρίως μηχανισμούς:

- 1) την απέκκριση της μακρολίδης από το μικροβιακό κύτταρο μέσω μηχανισμού αντλίας εκροής (efflux pump). Ο μηχανισμός αυτός σχετίζεται με την παρουσία του γονιδίου *mef(A)*.

Ο μηχανισμός της αντλίας επηρεάζει την ερυθρομυκίνη αλλά και τις άλλες μακρολίδες που έχουν στο μόριό τους 14-μελή ή 15-μελή δακτύλιο, όχι όμως και εκείνες με 16-μελή δακτύλιο. Έτσι, τα ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη *mefA(+)* έχουν αντοχή και στην κλαριθρομυκίνη, στην αζιθρομυκίνη και στη ροξιθρομυκίνη.

Παρά το γεγονός ότι το γονίδιο *mef(A)* καθιστά τον πνευμονιόκοκκο ανθεκτικό στις μακρολίδες που φέρουν στο μόριό τους 14-μελή ή 15-μελή



δακτύλιο, τα στελέχη αυτά είναι ευαίσθητα στις μακρολίδες με 16-μελή δακτύλιο όπως η μιντεκαμυκίνη. Πολλές φορές η υψηλή συγκέντρωση του φαρμάκου μπορεί να υπερνικήσει την αντλία εκροής και να επιτρέψει την είσοδο ικανής ποσότητας αντιβιοτικού έτσι ώστε να υπάρξει αντιβακτηριδιακή δράση. Η αντοχή μέσω του *mef(A)* γονιδίου είναι μικρότερου βαθμού (συνήθως  $\leq 16$   $\mu\text{g/ml}$ ) οπότε σε επαρκή δόση η μακρολίδη θεωρείται ότι μπορεί να είναι δραστική σε περιπτώσεις ιστικής λοίμωξης.

2) την αλλαγή του στόχου δράσης της μακρολίδης μέσω μεθυλίωσης με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η δέσμευση του αντιβιοτικού στο ριβόσωμα. Ο μηχανισμός αυτός σχετίζεται κυρίως με την παρουσία του γονιδίου *erm(B)*.

Τα ανθεκτικά στελέχη που φέρουν το γονίδιο *erm(B)* που καθορίζει τη μεθυλίωση της ακραίας αδενίνης στο 23S rRNA, εμποδίζουν τη σύνδεση της μακρολίδης στο ριβόσωμα. Έτσι, ακόμα και αν αυξηθεί η ποσότητα της μακρολίδης δεν θα υπάρξει καμία δράση. Τα στελέχη αυτά συνδέονται με υψηλού βαθμού αντοχή ( $\geq 64$   $\mu\text{g/ml}$ ). Οι κατηγορίες των αντιμικροβιακών που δρούν στο 23S rRNA είναι οι μακρολίδες με 14-μελή, 15-μελή ή 16-μελή δακτύλιο (M), οι λινκοσαμίδες (L) και οι στρεπτογραμμίνες ( $S_B$ ). Τα στελέχη αυτά εκτός από τις μακρολίδες με 14-μελή και 15-μελή δακτύλιο εμφανίζουν αντοχή και στις άλλες αυτές κατηγορίες αντιμικροβιακών (φαινότυπος αντοχής  $MLS_B$ ). Ο φαινότυπος αντοχής  $MLS_B$  παρουσιάζει πολυπλοκότητα η οποία έγκειται στο ότι η έκφρασή του μπορεί να είναι ιδιοσυστασιακή ή επαγωγίμη. Στην περίπτωση του ιδιοσυστασιακού  $MLS_B$  –φαινότυπου η παραγωγή της μεθυλάσης είναι συνεχής, ενώ στην περίπτωση του επαγωγίμου  $MLS_B$  –φαινότυπου η παραγωγή της μεθυλάσης επάγεται από διάφορες ουσίες επαγωγείς στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και οι 14-μελείς και 15-μελείς

μακρολίδες. Τα στελέχη με ιδιοσυστασιακή αντοχή είναι ανθεκτικά σε όλα τα  $MLS_B$  αντιβιοτικά, άσχετα από την παρουσία ή όχι επαγωγέα. Αντίθετα τα στελέχη με επαγωγίμη αντοχή, στον απλό έλεγχο του φαινότυπου χωρίς την ειδική δοκιμασία επαγωγής, εμφανίζουν αντοχή στις μοκρολίδες με 14-μελή και 15-μελή δακτύλιο και ευαισθησία στις λινκοσαμίδες. Ο επαγωγίμος  $MLS_B$ -φαινότυπος μοιάζει με τον M-φαινότυπο (μηχανισμός αντλίας). Όταν ο απλός φαινοτυπικός έλεγχος συνοδεύεται από τη δοκιμασία επαγωγής με τους διπλούς δίσκους (D test) επάγεται η παραγωγή μεθυλάσης και τα στελέχη πλέον εμφανίζονται να είναι ανθεκτικά στην κλινδαμυκίνη και τις άλλες λινκοσαμίδες. Η δοκιμασία των διπλών δίσκων περιλαμβάνει τον έλεγχο αντοχής με δίσκο ερυθρομυκίνης ο οποίος τοποθετείται σε μικρή απόσταση (16 mm) από το δίσκο της κλινδαμυκίνης. Στα στελέχη που εμφανίζουν τον επαγωγίμο  $MLS_B$ -φαινότυπο η ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο της κλινδαμυκίνης προς την πλευρά της ερυθρομυκίνης είναι πολύ μικρότερη σε σύγκριση με τη ζώνη που βρίσκεται από την άλλη πλευρά.

Υπάρχουν και άλλες μεταλλάξεις υπεύθυνες για αντοχή. Αυτές σχετίζονται με την αντικατάσταση άλλων βάσεων είτε στην περιοχή V του 23S rRNA είτε στις πρωτεΐνες στο σημείο σύνδεσης της μακρολίδης, ειδικά στις ριβοσωματικές πρωτεΐνες L4 και L22. Ωστόσο αυτό συμβαίνει σε μικρό ποσοστό στελεχών [195].

### **8.3. Μηχανισμοί αντοχής σε άλλα αντιβιοτικά**

Οι τετρακυκλίνες δρουν βακτηριοστατικά όταν συνδεθούν με τη 30S ριβοσωμική υπομονάδα του μικροβίου. Η ανάπτυξη αντοχής οφείλεται κυρίως στην παρεμπόδιση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης τετρακυκλίνης [196]. Αυτό συμβαίνει είτε γιατί ελαττώνεται η είσοδος του αντιμικροβιακού

παράγοντα είτε γιατί αυξάνεται η ικανότητα του μικροβιακού κυττάρου να τον απεκκρίνει.

Οι κινολόνες παρεμποδίζουν τη δράση της DNA γυράσης και της τοποϊσομεράσης IV, που είναι ένζυμα που παίζουν βασικό ρόλο στην αντιγραφή του βακτηριακού DNA [197]. Η αντοχή στις κινολόνες οφείλεται σε πολλαπλές μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τα δύο αυτά ένζυμα (*parC*, *parE*, *gyrA*, *gyrB*).

Ο συνδυασμός της τριμεθοπρίμης-σουλφομεθοξαζόλης δρά παρεμποδίζοντας το μεταβολισμό του φυλλικού οξέος στο μικροβιακό κύτταρο. Η σουλφομεθοξαζόλη αναστέλλει την δράση της διϋδροπτεροϊκής συνθετάσης και η τριμεθοπρίμη τη δράση της διϋδροφυλλικής ρεδοκτάσης [198,199]. Η αντοχή στην τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη συνδέεται με μεταβολή της διϋδροπτεροϊκής συνθετάσης, ενώ στην τριμεθοπρίμη σχετίζεται με τροποποίηση των δύο ενζύμων (διϋδροπτεροϊκής συνθετάσης και της διϋδροφυλλικής ρεδοκτάσης) με αποτέλεσμα να έχουν ελαττωμένη χημική συνάφεια με την τριμεθοπρίμη.

Η αντοχή του πνευμονιόκοκκου στην χλωραμφενικόλη οφείλεται στην παρουσία στελεχών στα οποία επάγεται η σύνθεση του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράση. Το ένζυμο αυτό ακετυλιώνει τη χλωραμφενικόλη με αποτέλεσμα να έχουμε αδρανές ακετυλιωμένο παράγωγο [196].

Η αντοχή στην ριφαμπικίνη ανευρίσκεται σε πολύ περιορισμένη κλίμακα και σχετίζεται με την ανάπτυξη μεταλλαγμένων κυττάρων που έχουν υποστεί τροποποίηση της β-υπο μονάδας της RNA πολυμεράσης.

#### 8.4. Συχνότητα ανθεκτικών στελεχών

Σε μελέτες από τις ΗΠΑ κατά τη διάρκεια της θεραπείας πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, εκτός του ΚΝΣ, φάνηκε ότι το 65% των στελεχών είναι ευαίσθητα στην πενικιλίνη (*per os*), 17% είναι ενδιάμεσης αντοχής, ενώ 17% είναι ανθεκτικά. Περίπου 93% όλων των πνευμονιόκοκκων είναι ευαίσθητοι στην πενικιλίνη που χορηγείται παρεντερικά ή στην αμοξικιλίνη *per os*, 5% έχουν ενδιάμεση αντοχή, ενώ 2% είναι ανθεκτικοί [200]. Στις περιπτώσεις μηνιγγίτιδας, 65% των στελεχών είναι ευαίσθητα και 35% ανθεκτικά. Η αντοχή στην κεφτριαξόνη για λοιμώξεις εκτός ΚΝΣ υπολογίζεται στο 1%, ενώ για λοιμώξεις του ΚΝΣ στο 3% αντίστοιχα [201].

Γενικά, στελέχη που απομονώνονται σε διεισδυτικές λοιμώξεις είναι πιθανότερο να είναι ευαίσθητα συγκριτικά με αυτά που απομονώνονται από ΟΜΩ ή αποικίζουν το ρινοφάρυγγα. Η συχνότητα της αντοχής στα αντιβιοτικά είναι υψηλότερη στις ευρωπαϊκές χώρες. Εξαιρέση αποτελούν η Ολλανδία και η Γερμανία στις οποίες εφαρμόζεται αυστηρή στρατηγική περιορισμού της χρήσης των αντιβιοτικών στην κλινική πράξη [202].

Πνευμονιόκοκκοι με χαμηλές MIC για την πενικιλίνη παραμένουν ευαίσθητοι και στα περισσότερα αντιβιοτικά. Ωστόσο, όσο αυξάνει ο βαθμός αντοχής στην πενικιλίνη τόσο αυξημένη είναι και η πιθανότητα να παρουσιάζουν αντοχή και στα υπόλοιπα αντιβιοτικά.

Στις ΗΠΑ το 25% των πνευμονιόκοκκων έχουν αντοχή στις μακρολίδες, 10% στην κλινδαμυκίνη, 30% στην τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη και 2% στις νεότερες κινολόνες [203]. Το 1/3 των ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών φέρουν το γονίδιο *erm(B)* και είναι ανθεκτικά και στην κλινδαμυκίνη. Στην Ευρώπη η συχνότητα της αντοχής στις μακρολίδες είναι υψηλότερη και

το υπεύθυνο γονίδιο στις περισσότερες περιπτώσεις είναι το *erm(B)*. Γενικότερα, περίπου το 98% των στελεχών παραμένει ευαίσθητο στις φλουοροκινολόνες, ίσως επειδή αυτές δεν χρησιμοποιούνται ευρέως στα παιδιά.

### **8.5. Ορότυποι με αντοχή στα αντιβιοτικά**

Τα περισσότερα στελέχη που παρουσιάζουν υψηλού βαθμού αντοχή στις β-λακτάμες ανήκουν στους ορότυπους 6B, 9V, 14, 19A, 19F και 23F. Οι συγκεκριμένοι ορότυποι απομονώνονται συχνότερα από παιδιά και αποικίζουν το ρινοφάρυγγα για μακρύτερο χρονικό διάστημα. Έτσι βρίσκονται και πιο εκτεθειμένοι στην πίεση επιλογής από τα αντιβιοτικά [204].

Παρά την ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στους φαινότυπους αντοχής και συγκεκριμένους ορότυπους, τα γονίδια που κωδικοποιούν τον πολυσακχαρίτη του ελύτρου, οπότε και καθορίζουν τον ορότυπο, μπορούν να μεταφερθούν από ένα στέλεχος σε άλλο με γενετικό μετασχηματισμό [205]. Έτσι, υπάρχει η πιθανότητα κλώνοι με αντοχή στα αντιβιοτικά να αποκτήσουν έλυτρο οροτύπου που μέχρι τώρα δεν χαρακτηριζόταν από πολυανθεκτικότητα. Η δυνατότητα αυτή αποδείχθηκε σε μύες, όταν ένα πολυανθεκτικό στέλεχος που ανήκε στον ορότυπο 23F απέκτησε τα γονίδια που κωδικοποιούν τον πολυσακχαρίτη του ορότυπου 3 [27].

Η αλλαγή του πολυσακχαρίτη (*capsular switching*) αποκτά ιδιαίτερη βαρύτητα μετά την εισαγωγή των συζευγμένων πνευμονιοκοκκικών εμβολίων τα οποία παρέχουν προστασία έναντι συγκεκριμένων οροτύπων. Η αλλαγή οροτύπου σε κλώνους υψηλής αντοχής θα μπορούσε να οδηγήσει στην ελάττωση της αποτελεσματικότητας αυτών των εμβολίων.

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ρινοφάρυγγας είναι η κύρια δεξαμενή του πνευμονιόκοκκου και ο αποικισμός του συνήθως προηγείται ή συνυπάρχει με την πνευμονιοκοκκική λοίμωξη [15, 136, 206, 207]. Η μελέτη του οροτύπου και της αντοχής στα αντιβιοτικά στελεχών που απομονώνονται από το ρινοφάρυγγα παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τα στελέχη που κυκλοφορούν σε μία συγκεκριμένη περιοχή και προκαλούν λοιμώξεις [83, 138]. Παράλληλα, η μελέτη της φορέας του πνευμονιόκοκκου συμβάλλει και στην αξιολόγηση παραγόντων που ευνοούν τη διασπορά ανθεκτικών στελεχών σε μία συγκεκριμένη κοινότητα [83, 138, 208-210]. Παρόλο που οι πνευμονιόκοκκοι είναι ευρέως διαδεδομένοι στην κοινότητα, τα ποσοστά φορέας είναι ιδιαίτερα υψηλά σε παιδιά προσχολικής ηλικίας που παρακολουθούν παιδικούς σταθμούς [176, 211, 212].

Ο εμβολιασμός με το επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (PCV7) έχει μειώσει τις διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις μεταξύ των παιδιών [170]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση του συζευγμένου εμβολίου συνοδεύεται από ταχεία αύξηση του ποσοστού των ρινοφάρυγγικών στελεχών που ανήκουν στους ορότυπους που δεν σχετίζονται με το εμβόλιο [50, 176, 177, 213]. Τίθεται το ερώτημα ποια είναι η επίδραση της μεταβολής της κατανομής των οροτύπων του πνευμονιόκοκκου που αποικίζουν τον ρινοφάρυγγα, στις λοιμώξεις του αναπνευστικού και στις διεισδυτικές λοιμώξεις, ιδιαίτερα από ανθεκτικούς στα αντιβιοτικά πνευμονιόκοκκους.

Οι περισσότερες πληροφορίες για την εκτεταμένη χρήση του PCV7 προέρχονται από τις Ηνωμένες Πολιτείες [214-220], αφού ήταν η πρώτη

χώρα η οποία συμπεριέλαβε το PCV7 στο εθνικό πρόγραμμα εμβολιασμού το 2000. Στη χώρα μας, το PCV7 κυκλοφόρησε τον Οκτώβριο του 2004. Σύμφωνα με τις συστάσεις της Ελληνικής Εθνικής Επιτροπής για τα Προγράμματα Εμβολιασμού [221], το PCV7 συστήθηκε επίσημα για παιδιά μικρότερα των 5 ετών τον Ιανουάριο του 2006 και το κόστος του καλύπτεται από τα ασφαλιστικά ταμεία από τον Ιούνιο του 2006.

Το Φεβρουάριο του 2005 ξεκίνησε μία μελέτη επιτήρησης του αποικισμού του ρινοφάρυγγα σε παιδιά που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς στην Κεντρική Ελλάδα. Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης πραγματοποιήθηκε και η παρούσα εργασία με στόχο να μελετήσει την επίδραση της εκτεταμένης χρήσης του PCV7: 1) στο ποσοστό του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με πνευμονιόκοκκο, 2) στην κατανομή των οροτύπων των στελεχών του πνευμονιόκοκκου και στην αντοχή τους στα αντιβιοτικά. Η παρατήρηση των αλλαγών στη φορεία του ρινοφάρυγγα φαίνεται να προσφέρει ήδη πρώιμα συμπεράσματα για την αποτελεσματικότητα της χρήσης του εμβολίου.



## 2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Πληθυσμός μελέτης

Η μελέτη ξεκίνησε στις 28 Φεβρουαρίου του 2005 με σκοπό την επιτήρηση του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με πνευμονιόκοκκο μεταξύ παιδιών που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς στη Λάρισα, στο Βόλο, στα Τρίκαλα και στην Καρδίτσα. Η μελέτη διεξαγόταν κάθε χρόνο, από το 2005 έως και το 2007, κατά τη διάρκεια μίας περιόδου 3 μηνών από το τέλος του χειμώνα έως την άνοιξη. Συνολικά, το 95% των δειγμάτων ελήφθησαν μεταξύ της πρώτης εβδομάδας του Φεβρουαρίου και της τρίτης εβδομάδας του Μαΐου. Από 28 Φεβρουαρίου του 2005 έως 17 Μαΐου του 2007 πάρθηκαν καλλιέργειες ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος από 1829 παιδιά ηλικίας 13-76 μηνών (διάμεση ηλικία 47 μήνες) με σκοπό την απομόνωση πνευμονιοκόκκου.

Οι γονείς απάντησαν σε ένα ερωτηματολόγιο που συνέλεγε δεδομένα για δημογραφικά χαρακτηριστικά, τις ημερομηνίες του εμβολιασμού με PCV7, όπως και τις ημερομηνίες, τον αριθμό και το είδος των σχημάτων της αντιμικροβιακής θεραπείας που χορηγήθηκε κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών. Επιπρόσθετα, στις πληροφορίες που δόθηκαν από τους γονείς, ο παιδίατρος που συμπλήρωνε το ερωτηματολόγιο συγκέντρωνε όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες για το ιατρικό ιστορικό κάθε παιδιού, συμπεριλαμβανομένων των συνταγών που αναγράφονταν στο βιβλιάριο υγείας που διαθέτει κάθε παιδί στην Ελλάδα. Οι απαντήσεις καταχωρήθηκαν σε ειδικά έντυπα. Το ερευνητικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου

Λάρισας. Γραπτή συγκατάθεση δόθηκε από έναν γονέα του κάθε συμμετέχοντος.

### **Πρόγραμμα εμβολιασμού.**

Η Εθνική Επιτροπή Εμβολιασμών της Ελλάδας συνιστά τη χορήγηση του PCV7 στα βρέφη σε σχήμα 4 δόσεων και σε ηλικία των 2, 4, 6 και 12-18 μηνών. Πρόγραμμα αναπλήρωσης (catch-up) συνιστάται για όλα τα παιδιά ηλικίας έως 59 μηνών [221]. Το πρόγραμμα αναπλήρωσης (catch-up) για βρέφη περιλαμβάνει 2 δόσεις σε ηλικία 7-11 μηνών και μια τρίτη δόση 12-15 μηνών, ενώ χορηγούνται 2 δόσεις σε νήπια ηλικίας 12-23 μηνών. Εάν ο εμβολιασμός ξεκινήσει μετά την ηλικία των 24 μηνών χορηγείται 1 δόση [222,223]. Κατά τη δειγματοληψία, ένα παιδί θεωρούνταν ως επαρκώς εμβολιασμένο για την ηλικία του εάν είχε λάβει όλες τις συνιστώμενες δόσεις του PCV7 για την ηλικία έναρξης του εμβολιασμού του [223]. Ένα παιδί που είχε λάβει λιγότερες από τις συνιστώμενες δόσεις του PCV7 θεωρούνταν μερικώς εμβολιασμένο. Μια δόση του PCV7 εμβολίου προσμετρίοταν αν είχε γίνει τουλάχιστον 30 ημέρες πριν από την ημερομηνία της δειγματοληψίας.

### **Εργαστηριακός έλεγχος**

Το δείγμα του ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος πάρθηκε μέσω της ρινικής χοάνης με τη χρήση αποστειρωμένου εύκαμπτου βαμβακοφόρου στυλεού που έχει ειδικό άκρο με ίνες αλγινικού ασβεστίου (Fisher Scientific, Pittsburgh, Philadelphia, PA). Οι βαμβακοφόροι στυλεοί τοποθετούνταν σε υλικό μεταφοράς Amies (TGV, Sanofi Diagnostic Pasteur, Marne la Coquette, France) μετά τη δειγματοληψία και μεταφέρονταν στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παιδιατρικών Λοιμώξεων της Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, όπου γίνονταν απομόνωση, ταυτοποίηση και έλεγχος

ευαισθησίας των στελεχών πνευμονιόκοκκου. Η μέγιστη καθυστέρηση μεταξύ της συλλογής και της καλλιέργειας ήταν 7 ώρες. Οι βαμβακοφόροι στυλεοί τοποθετούνταν σε τρυβλία με Columbia άγαρ εμπλουτισμένο με 5% αίμα αλόγου από το οποίο είχε αφαιρεθεί το ινωδογόνο, 10 μg θειικής κολιστίνης, και 15 μg ναλιδιξικού οξέος ανά mL. Τα τρυβλία επωάζονταν στους 35°C σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub> για 24-72 ώρες. Τα στελέχη επιβεβαιώνονταν ως πνευμονιόκοκκοι από την αναστολή της ανάπτυξής τους στην οπποχίνη και τη διαλυτότητα των αποικιών στα χολικά άλατα.

Ο έλεγχος ευαισθησίας γινόταν σε Muller-Hinton άγαρ εμπλουτισμένο με 5% αίμα αλόγου από το οποίο είχε αφαιρεθεί το ινωδογόνο. Αρχικά, τα στελέχη ελέγχονταν για αντοχή στην πενικιλίνη με τη χρήση δίσκων 1 μg οξακιλλίνης. Αν η ζώνη αναστολής γύρω από τον δίσκο της οξακιλλίνης ήταν <20 mm, η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) στην πενικιλίνη καθοριζόταν με τη μέθοδο του E test (AB Biodisk, Solna, Sweden). Το 2008 οι ορισμοί της ευαισθησίας τροποποιήθηκαν και καθορίζονται με βάση την εντόπιση της λοίμωξης και την οδό χορήγησης του αντιβιοτικού (per os, παρεντερικά) [224]. Η αξιολόγηση της αντοχής στην πενικιλίνη έγινε χρησιμοποιώντας τα κριτήρια που καθορίστηκαν για την από του στόματος χορήγηση πενικιλίνης V. Τα στελέχη του πνευμονιοκόκκου που έχουν ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα πενικιλίνης (MIC) ≤0.06 μg/mL θεωρούνται ευαίσθητα στην πενικιλίνη, αυτά με MIC=0.12-1 μg/mL, ενδιάμεσης αντοχής και αυτά με MIC≥2 μg/mL ανθεκτικά. Για την κεφοταξίμη, MIC≤1 μg/mL σημαίνει ευαίσθητο, 2 μg/mL, ενδιάμεσα ανθεκτικό και ≥4 μg/mL, ανθεκτικό [224]. Για την ερυθρομυκίνη, στελέχη με MIC≤0,25 μg/mL θεωρούνται ευαίσθητα, αυτά με MIC=0,5 μg/mL, ενδιάμεσης αντοχής και αυτά με MIC≥1

μg/mL, ανθεκτικά [224]. Η επώαση των τρυβλίων με τους δίσκους των αντιβιοτικών και τις ταινίες E test γινόταν σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>.

Ο καθορισμός των οροτύπων των πνευμονιοκόκκων έγινε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παιδιατρικών Λοιμώξεων της Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τη συγκολλητινοαντίδραση Latex χρησιμοποιώντας δεξαμενή αντιορών (Pneumotest-Latex), ενώ ο περαιτέρω καθορισμός του οροτύπου εντός οροομάδας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο εξοίδησης του ελύτρου. Όλοι οι αντιοροί που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από το Statens Serum Institute (SSI, Copenhagen, Denmark). Οι πνευμονιόκοκκοι που δεν αντιδρούσαν με τους διαθέσιμους αντιορούς επιβεβαιώθηκαν από το SSI ως μη τυποποιήσιμοι. Τα στελέχη του πνευμονιοκόκκου ταξινομήθηκαν ως ορότυποι του PCV7, ορότυποι σχετιζόμενοι με το PCV7 (που ανήκουν στην ίδια οροομάδα όπως 6A, 9A, 9L, 9N, 18A, 18B, 19A, 19B, 19C, 23A, ή 23B), ορότυποι που δεν έχουν σχέση με το PCV7 και μη τυποποιήσιμοι. Οι αναλύσεις των οροτύπων που δεν περιλαμβάνονται στο εμβόλιο έχουν γίνει με δύο διαφορετικούς τρόπους: κατανέμονται ως ορότυποι που δεν έχουν σχέση με το εμβόλιο (NVT-non vaccine), ορότυποι σχετιζόμενοι με το εμβόλιο (VrT-vaccine related) και μη τυποποιήσιμοι (Nt-non typeable) ή ως ορότυποι του PCV7, ορότυποι εκτός PCV7 (περιλαμβάνονται και οι σχετιζόμενοι με το εμβόλιο) και μη τυποποιήσιμοι.

### **Στατιστική ανάλυση.**

Για να εκτιμηθούν οι 3 ομάδες των παιδιών που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς και καταχωρήθηκαν στη μελέτη του 2005, 2006 και 2007,

οι συνεχείς παράμετροι συγκρίθηκαν με τη δοκιμασία Kruskal-Wallis, που ακολουθήθηκε από συγκρίσεις μεταξύ 2 ομάδων με τη δοκιμασία Mann-Whitney U με διόρθωση Bonferroni και οι κατηγορικές παράμετροι συγκρίθηκαν με το κριτήριο  $\chi^2$  - trend. Για την εκτίμηση των 2 ομάδων, οι κατηγορικές παράμετροι συγκρίθηκαν με τον ακριβή έλεγχο Fisher διπλής ουράς. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το SPSS έκδοση 13.0. Ένα αποτέλεσμα θεωρούνταν στατιστικά σημαντικό όταν  $P < 0.05$ . Όλα τα ποσοστά που ήταν μεγαλύτερα του 10 στρογγυλοποιήθηκαν στον πλησιέστερο ακέραιο αριθμό.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### Πληθυσμός και δείγματα

Από 28 Φεβρουαρίου του 2005 έως 17 Μαΐου του 2007 ελήφθησαν καλλιέργειες από 1829 παιδιά ηλικίας 13-76 μηνών (διάμεση ηλικία 47 μήνες, μέση τιμή  $\pm$  ΣΑ: 46,6  $\pm$  11,8 μήνες). Σε κάθε παιδικό σταθμό ελέγχθηκαν 13 έως 123 παιδιά, με μέσο όρο 57 παιδιά, αντιπροσωπεύοντας ~80% των παιδιών που παρακολουθούσαν τους παιδικούς σταθμούς.

#### Χαρακτηριστικά παιδιών κατά τη δειγματοληψία

Τα χαρακτηριστικά των παιδιών την περίοδο της δειγματοληψίας παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Τα παιδιά με ηλικία κάτω των 24 μηνών ήταν 21 (2,7%) από τα 769 που παρακολουθούσαν τους παιδικούς σταθμούς και καταχωρήθηκαν στη μελέτη του 2005, 22 (4,5%) από τα 494 που καταχωρήθηκαν τον επόμενο χρόνο και 26 (4,6%) από τα 566 τον τρίτο χρόνο. Από τα 1829 παιδιά που μελετήθηκαν 1662 (91%) ήταν ηλικίας 30 μηνών ή μεγαλύτερα.

Ο μέσος όρος (διακύμανση) των ποσοστών των παιδιών που παρακολουθούσαν παιδικό σταθμό και ήταν εμβολιασμένα με  $\geq 1$  δόση του PVC7 ήταν 7,8% (3,3-33%) το 2005, 38% (4-45%) το 2006 και 71% (54-82%) το 2007.

Πεντακόσια ενενήντα τρία παιδιά ήταν επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους (Πίνακας 2). Από αυτά τα 593 παιδιά, 504 (85%) είχαν λάβει μία μόνο δόση σε ηλικία  $\geq 24$  μηνών και 77 (13%) είχαν λάβει 2 δόσεις μετά τα πρώτα τους γενέθλια. Τελικά, 11 παιδιά (1,8%) είχαν λάβει 2 δόσεις σε ηλικία 7-11 μηνών και μια αναμνηστική δόση μετά τα πρώτα τους γενέθλια, ενώ 1 παιδί (0.2%) είχε λάβει 3 δόσεις σε ηλικία 2-6 μηνών και μια αναμνηστική

δόση σε ηλικία 12 μηνών. Εξήντα τέσσερα παιδιά ηλικίας 14-49 μηνών ήταν μερικώς εμβολιασμένα (διάμεση ηλικία, 31,5 μήνες, μέση τιμή  $\pm$  ΣΑ: 31,4  $\pm$  10,7 μήνες). Σαράντα επτά (73%) από αυτά τα 64 παιδιά είχαν λάβει μία μόνο δόση κατά τη διάρκεια του δεύτερου χρόνου ζωής, ενώ 9 (14%) είχαν λάβει 1-3 δόσεις κατά τη διάρκεια του πρώτου χρόνου ζωής, αλλά όχι αναμνηστική δόση. Τελικά, 8 παιδιά (13%) είχαν λάβει μία δόση κατά τη διάρκεια του πρώτου χρόνου ζωής και μία άλλη κατά τη διάρκεια του δεύτερου χρόνου ζωής, σε ηλικία  $\leq$  17 μηνών.

### **Αποικισμός του ρινοφάρυγγα παιδιών με πνευμονιόκοκκο**

Οχτακόσια εξήντα δύο παιδιά ήταν φορείς πνευμονιόκοκκου. Ένα στέλεχος πνευμονιόκοκκου απομονώθηκε από κάθε φορέα, με εξαίρεση 38 φορείς (4,4%), από τους οποίους απομονώθηκαν 2 διαφορετικά στελέχη. Το συνολικό ποσοστό αποικισμού με πνευμονιόκοκκο ήταν παρόμοιο μεταξύ της ομάδας των επαρκώς εμβολιασμένων παιδιών και της ομάδας των ανεμβολίαστων παιδιών (Πίνακας 1). Το ποσοστό αποικισμού με πνευμονιόκοκκο μεταξύ των μερικώς εμβολιασμένων παιδιών ήταν 86% (6 από 7 παιδιά) το 2005, 27% (3 από 11) το 2006 και 50% (23 από 46) το 2007 ( $P = 0.62$ ).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Χαρακτηριστικά των παιδιών κατά τη δειγματοληψία (N = 1829)**

Χαρακτηριστικά	Έτος της Μελέτης			P
	2005	2006	2007	
<b>Χρονική περίοδος δειγματοληψίας</b>	28 Φεβρ. έως 7 Ιουν.	2 Φεβρ. έως 13 Απριλ.	26 Φεβρ. έως 17 Μαΐου	--
PCV7 στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμού	--	+	+	--
PCV7 καλύπτεται από ασφαλιστικά ταμεία	--	--	+	--
<b>Αριθμός παιδιών</b>	769	494	566	--
<b>Ηλικία, μήνες</b>				--
Διάμεση τιμή (εύρος)	49 (15-76)	46.5 (13-70)	46 (13-73)	--
Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση	48.4 ± 12.6	45.5 ± 10.6	45.2 ± 11.4	<0.001*
<b>Αγόρια</b>	417 (54)	248 (50)	297 (52)	0.76
<b>Εμβολιασμένα με ≥1 δόση του CV7</b>	99 (13)	161 (33)	397 (70)	<0.001
Επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους	92 (12)	150 (30)	351 (62)	<0.001
Μερικώς εμβολιασμένα	7 (0.9)	11 (2.2)	46 (8.1)	<0.001
<b>Χρήση αντιβιοτικών τους προηγούμενους 3 μήνες</b>	433/764 (57)	260/489 (53)	284/566 (50)	0.06
<b>Φορέια του πνευμονιοκόκκου</b>	370 (48)	206 (42)	286 (51)	0.81
Επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους	43/92 (47)	63/150 (42)	171/351 (49)	0.74
Ανεμβολίαστα	321/670 (48)	140/333 (42)	92/169 (54)	0.84

Ο αριθμός στην παρένθεση είναι ποσοστό, εκτός αν υποδεικνύεται διαφορετικά. Όλα τα ποσοστά πάνω από 10 στρογγυλοποιήθηκαν στον πλησιέστερο ακέραιο αριθμό.

\*2005 vs 2006, P < 0.001` 2005 vs 2007, P < 0.001` και 2006 vs 2007, P = 0.99.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.** Χαρακτηριστικά των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους παιδιών κατά τη δειγματοληψία (N = 593)

Χαρακτηριστικά	Έτος της Μελέτης			P
	2005	2006	2007	
<b>Αριθμός των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους παιδιών</b>	92	150	351	
<b>Ηλικία έναρξης εμβολιασμού με PCV7 και αριθμός των δόσεων που χορηγήθηκαν</b>				
2–6 μηνών 3 δόσεις και ≥12 μηνών 1 δόση	0	0	1 (0.3)	0.75
7–11 μηνών 2 δόσεις και ≥12 μηνών 1 δόση	0	1 (0.7)	10 (2.8)	0.11
12–23 μηνών 2 δόσεις	1 (1.1)	8 (5.3)	68 (19)	<0.001
≥24 μηνών 1 δόση	91 (99)	141 (94)	272 (77)	<0.001
<b>Ηλικία ολοκλήρωσης του εμβολιασμού με PCV7, μήνες</b>				
Διάμεση τιμή (εύρος)	43.5 (21-60 <sup>*</sup> )	35 (15-58)	30(13-65 <sup>*</sup> )	--
Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση	42.8 ± 9.2	35.5 ± 8.7	31.4 ± 9.3	<0.001
<b>Ηλικία στη δειγματοληψία, μήνες</b>				
Διάμεση τιμή (εύρος)	47 (24-63)	45 (22-70)	48 (17-71)	--
Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση	46.6 ± 9.4	44.1 ± 8.8	46.7 ± 10.2	0.01 <sup>†</sup>
<b>Χρονικό διάστημα από την τελευταία δόση του PCV7, μήνες</b>				
Διάμεση τιμή (εύρος)	4 (1-9)	8.5 (1-34)	16 (1-48)	--
Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση	3.8 ± 1.8	8.6 ± 5.1	15.3 ± 7.8	<0.001

Ο αριθμός στην παρένθεση είναι ποσοστό, εκτός αν υποδεικνύεται διαφορετικά. Όλα τα ποσοστά πάνω από 10 στρογγυλοποιήθηκαν στον πλησιέστερο ακέραιο αριθμό.

<sup>\*</sup>Δύο υγιή παιδιά είχαν εμβολιαστεί σε ηλικία μεγαλύτερη των 59 μηνών, το ένα στους 60 μήνες και το άλλο στους 65 μήνες.

<sup>†</sup>2005 vs 2006,  $P = 0.11$ · 2005 vs 2007,  $P = 0.99$ · και 2006 vs 2007,  $P = 0.01$ .

## **Η επίδραση του πνευμονιοκοκκικού εμβολίου στον αποικισμό με ορότυπους του εμβολίου**

Στην ομάδα των επαρκώς εμβολιασμένων φορέων, το ποσοστό των στελεχών του πνευμονιόκοκκου που ανήκουν σε ορότυπους του PVC7 μειώθηκε από τον πρώτο στον τρίτο χρόνο, με την αύξηση του εμβολιασμού με PVC7. Για κάθε περίοδο μελέτης, το ποσοστό των οροτύπων του PVC7 ήταν χαμηλότερο μεταξύ των επαρκώς εμβολιασμένων φορέων παρά μεταξύ των ανεμβολίαστων (Πίνακας 3). Η σχετική διαφορά των συχνοτήτων των οροτύπων του εμβολίου μεταξύ των 2 ομάδων ήταν -9.7% το 2005, -33% το 2006 και -50% το 2007.

Από τον πρώτο έως τον τρίτο χρόνο, το ποσοστό των οροτύπων του PVC7 μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν από τους επαρκώς εμβολιασμένους φορείς μειώθηκε κατά 74%. Συγκεκριμένα, στην ομάδα των εμβολιασμένων παιδιών το ποσοστό των στελεχών με ορότυπους του PVC7 ήταν 33% το 2005 και 8,6% το 2007 (σχήμα 1). Στην ομάδα των ανεμβολίαστων παιδιών, το ποσοστό των οροτύπων του PVC7 μειώθηκε κατά 52% το 2007 σε σύγκριση με την μελέτη του 2005 (σχήμα 2).

Η φορεία του οροτύπου 19F μεταξύ των παιδιών που ήταν επαρκώς εμβολιασμένα μειώθηκε κατά 56% το 2007 σε σύγκριση με την μελέτη του 2005, αλλά η μείωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 4).

## **Η επίδραση του πνευμονιοκοκκικού εμβολίου στην φορεία των οροτύπων που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό**

Παράλληλα με την αύξηση του ποσοστού των παιδιών που ήταν εμβολιασμένα με το PCV7, από τον πρώτο έως τον τρίτο χρόνο, παρατηρήθηκε αύξηση και των οροτύπων που δεν περιλαμβάνονται σ' αυτό.

Συγκεκριμένα, στην ομάδα των εμβολιασμένων παιδιών το ποσοστό των στελεχών με ορότυπους που δεν περιλαμβάνονταν στο PVC7 ήταν 61% το 2005 και 83% το 2007 (Πίνακας 3). Στην ομάδα των ανεμβολίαστων παιδιών, το ποσοστό των στελεχών με ορότυπους εκτός PVC7 αυξήθηκε από 53% το 2005 σε 70% το 2007 (Πίνακας 3).

Τον πρώτο και το δεύτερο χρόνο, ο μικρός αριθμός των μερικώς εμβολιασμένων φορέων περιορίσε τη δυνατότητα στατιστικής ανάλυσης. Υπήρχαν 23 φορείς οι οποίοι ήταν μερικώς εμβολιασμένοι στην μελέτη του 2007. Απομονώθηκαν 24 στελέχη από αυτούς τους 23 φορείς. Μεταξύ των μερικώς εμβολιασμένων φορέων, το ποσοστό των σχετιζόμενων με το PCV7 οροτύπων ήταν 25%, των οροτύπων που δεν έχουν σχέση με το PCV7 42% και των μη τυποποιήσιμων 12%. Αυτές οι συχνότητες ήταν παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των ανεμβολίαστων φορέων την περίοδο της μελέτης (Πίνακας 3).

Τα ενενήντα ένα (10%) από τα 900 στελέχη πνευμονιοκόκκου ήταν μη τυποποιήσιμα. Συγκεκριμένα, οι μη τυποποιήσιμοι πνευμονιόκοκκοι αντιπροσώπευαν το 10% των ρινοφαρυγγικών στελεχών το 2005, το 10% το 2006 και το 9,8% το 2007. Τα είκοσι τρία (25%) από τα 91 μη τυποποιήσιμα στελέχη απομονώθηκαν από παιδιά τα οποία ήταν αποικισμένα με 2 διαφορετικά στελέχη.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.** Κατανομή οροτύπων των στελεχών του πνευμονιόκοκκου ανάλογα με το έτος της μελέτης και την εμβολιαστική κατάσταση των φορέων.

Εμβολιαστική κατάσταση των φορέων, ορότυποι των στελεχών	Έτος της Μελέτης			P
	2005	2006	2007	
<b>Επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους</b>				
Σύνολο στελεχών	n = 46	n = 65	n = 174	
PCV7	15 (33)	19 (29)	15 (8.6)	<0.001
Εκτός PCV7	28 (61)	37 (57)	145 (83)	<0.001
Μη τυποποιήσιμα	3 (6.5)	9 (14)	14 (8)	0.98
<b>Ανεμβολίαστα</b>				
Σύνολο στελεχών	n = 338	n = 146	n = 98	
PCV7	122 (36)	64 (44)	17 (17)	0.05
Εκτός PCV7	179 (53)	69 (47)	69 (70)	0.023
Μη τυποποιήσιμα	37 (11)	13 (8.9)	12 (12)	0.99

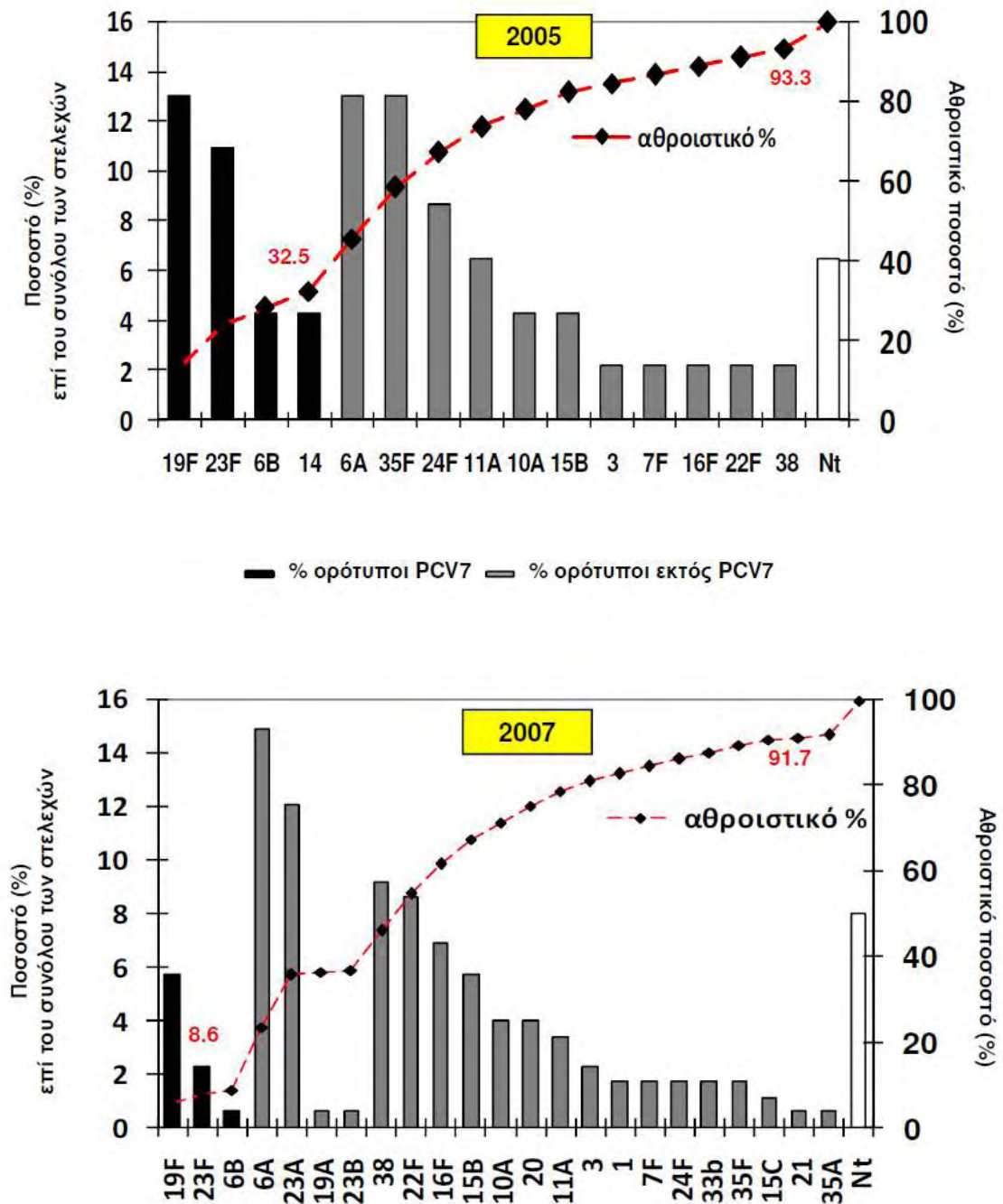
Ο αριθμός στην παρένθεση είναι ποσοστό, εκτός αν υποδεικνύεται διαφορετικά. Όλα τα ποσοστά πάνω από 10 στρογγυλοποιήθηκαν στον πλησιέστερο ακέραιο αριθμό.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4.** Κατανομή οροτύπων των ρινοφαρυγγικών στελεχών του πνευμονιόκοκκου ανάλογα με το έτος της μελέτης και την εμβολιαστική κατάσταση των φορέων.

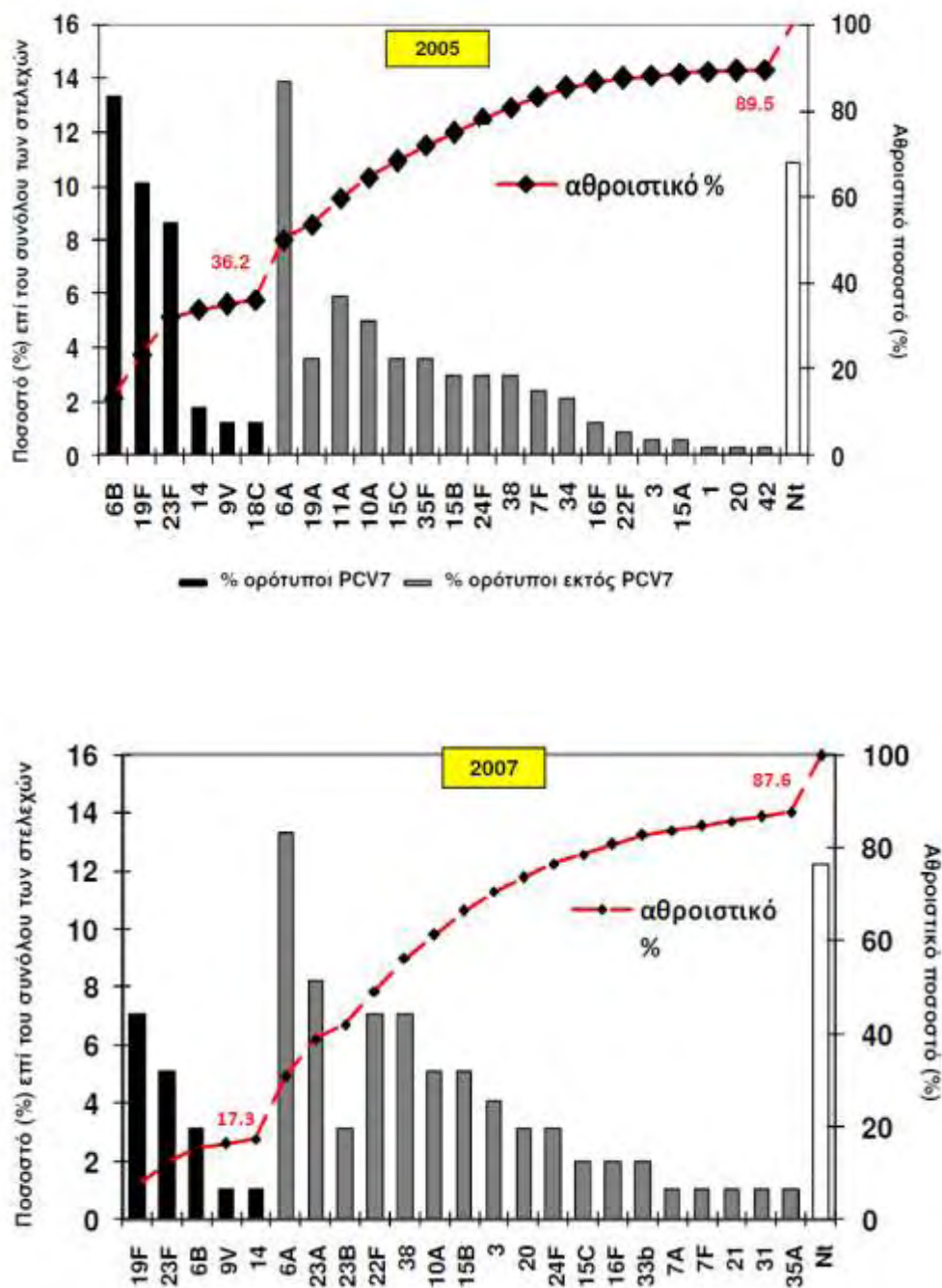
Οροτύποι	Επαρκώς εμβολιασμένοι για την ηλικία τους φορείς				Ανεμβολίαστοι φορείς			
	2005	2006	2007	P	2005	2006	2007	P
<b>Σύνολο στελεχών PCV7</b>	n = 46	n = 65	n = 174		n = 338	n = 146	n = 98	
4	0	0	0	0.77	0	0	0	0.80
6B	2 (4.3)	5 (7.7)	1 (0.6)	0.09	45 (13)	14 (9.6)	3 (3.1)	0.02
9V	0	1 (1.5)	0	0.84	4 (1.2)	3 (2.1)	1 (1)	0.99
14	2 (4.3)	2 (3.1)	0	0.04	6 (1.8)	8 (5.5)	1 (1)	0.92
18C	0	0	0	0.77	4 (1.2)	2 (1.4)	0	0.71
19F	6 (13)	8 (12)	10 (5.7)	0.16	34 (10)	23 (16)	7 (7.1)	0.99
23F	5 (11)	3 (4.6)	4 (2.3)	0.04	29 (8.6)	14 (9.6)	5 (5.1)	0.71
<b>Σύνολο</b>	<b>15(33)</b>	<b>19(29)</b>	<b>15 (8.6)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>122(36)</b>	<b>64 (44)</b>	<b>17</b>	<b>0.05</b>
<b>Εκτός PCV7</b>								
1	0	0	3 (1.7)	0.45	1 (0.3)	0	0	0.74
3	1 (2.2)	0	4 (2.3)	0.90	2 (0.6)	1 (0.7)	4 (4.1)	0.05
5	0	0	0	0.77	0	0	0	0.80
6A	6 (13)	7 (11)	26 (15)	0.85	47 (14)	26 (18)	13	0.98
7A	0	0	0	0.77	0	0	1 (1)	0.06
7F	1 (2.2)	0	3 (1.7)	0.99	8 (2.4)	0	1 (1)	0.35
9N	0	2 (3.1)	0	0.70	0	5 (3.4)	0	0.48
10A	2 (4.3)	1 (1.5)	7 (4)	0.83	17 (5)	2 (1.4)	5 (5.1)	0.56
11A	3 (6.5)	3 (4.6)	6 (3.4)	0.35	20 (5.9)	9 (6.2)	0	0.04
15A	0	0	0	0.77	2 (0.6)	0	0	0.27
15B	2 (4.3)	1 (1.5)	10 (5.7)	0.42	10 (3)	2 (1.4)	5 (5.1)	0.52
15C	0	4 (6.2)	2 (1.1)	0.70	12 (3.6)	2 (1.4)	2 (2)	0.26
16F	1 (2.2)	2 (3.1)	12 (6.9)	0.13	4 (1.2)	6 (4.1)	2 (2)	0.26
19A	0	2 (3.1)	1 (0.6)	0.96	12 (3.6)	2 (1.4)	0	0.09
20	0	0	7 (4)	0.05	1 (0.3)	0	3 (3.1)	0.02
21	0	0	1 (0.6)	0.46	0	0	1 (1)	0.06
22F	1 (2.2)	1 (1.5)	15 (8.6)	0.11	3 (0.9)	1 (0.7)	7 (7.1)	0.003
23A	0	6 (9.2)	21 (12)	0.06	0	2 (1.4)	8 (8.2)	<0.001
23B	0	0	1 (0.6)	0.77	0	0	3 (3.1)	0.006
24B	0	1 (1.5)	0	0.55	0	0	0	0.80
24F	4 (8.7)	2 (3.1)	3 (1.7)	0.02	10 (3)	3 (2.1)	3 (3.1)	0.89
31	0	3 (4.6)	0	0.30	0	2 (1.4)	1 (1)	0.09
33A	0	0	3 (1.7)	0.20	0	0	2 (2)	0.009
34	0	2 (3.1)	0	0.40	7 (2.1)	6 (4.1)	0	0.55
35A	0	0	1 (0.6)	0.46	0	0	1 (1)	0.06
35F	6 (13)	0	3 (1.7)	0.002	12 (3.6)	0	0	0.007
38	1 (2.2)	0	16 (9.2)	0.05	10 (3)	0	7 (7.1)	0.43
42	0	0	0	0.77	1 (0.3)	0	0	0.44
<b>Σύνολο</b>	<b>28(61)</b>	<b>37(57)</b>	<b>145(83)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>179(53)</b>	<b>69(47)</b>	<b>69(70)</b>	<b>0.02</b>
<b>Μη τυποποιήσιμοι</b>	<b>3 (6.5)</b>	<b>9 (14)</b>	<b>14 (8)</b>	<b>0.98</b>	<b>37 (11)</b>	<b>13 (8.9)</b>	<b>12(12)</b>	<b>0.99</b>

Ο αριθμός στην παρένθεση είναι ποσοστό, εκτός αν υποδεικνύεται διαφορετικά. Όλα τα ποσοστά πάνω από 10 στρογγυλοποιήθηκαν στον πλησιέστερο ακέραιο αριθμό.

**Σχήμα 1. Επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους παιδιά: Επίδραση του πνευμονιοκοκκικού εμβολίου (PCV7) στην φορεία των οροτύπων που περιέχονται στο PCV7 και των οροτύπων εκτός του PCV7.**



**Σχήμα 2. Ανεμβολίαστα παιδιά:** Επίδραση του πνευμονιοκοκκικού εμβολίου (PCV7) στην φορέα των οροτύπων που περιέχονται στο PCV7 και των οροτύπων εκτός του PCV7.



## **Αντοχή των πνευμονιοκόκκων στα αντιβιοτικά**

### **Η φορεία των πνευμονιοκόκκων με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη**

Από τον πρώτο στον τρίτο χρόνο, η συχνότητα των πνευμονιοκόκκων με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη αυξήθηκε μεταξύ των επαρκώς για την ηλικία τους εμβολιασμένων και των ανεμβολίαστων φορέων, αλλά η αύξηση δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 5). Στη μελέτη του 2007, τα στελέχη τα οποία ανήκαν στους σχετιζόμενους με το PCV7 ορότυπους ή ήταν μη τυποποιήσιμα συνιστούσαν τους περισσότερους πνευμονιόκοκκους με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη (σχήμα 5).

Μεταξύ των επαρκώς για την ηλικία τους εμβολιασμένων φορέων, στην μελέτη του 2005 οι πνευμονιόκοκκοι με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη ανήκαν στους ορότυπους 19F (n =2) και 6A (n = 2) ή ήταν μη τυποποιήσιμοι (n = 2). Το 2006 ανήκαν στους ορότυπους 14 (n = 2), 19F (n = 5), 23F (n = 3), 6A (n = 2) και 19A (n = 1) ή ήταν μη τυποποιήσιμοι (n = 2). Τέλος το 2007 ανήκαν στους ορότυπους 19F (n = 9), 23F (n = 4), 6A (n = 15), 19A (n = 1), 23B (n = 1), 7F (n = 1) και 15B (n = 2) ή ήταν μη τυποποιήσιμοι (n = 12).

Μεταξύ των ανεμβολίαστων φορέων, οι πνευμονιόκοκκοι με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη ανήκαν στους ορότυπους 9V (n = 4), 19F (n = 4), 23F (n = 1), 6A (n = 7), 19A (n = 12), και 15B (n = 3) ή ήταν μη τυποποιήσιμοι (n = 35) το 2005, στους ορότυπους 14 (n = 4), 19F (n =6), 23F (n = 6), 6A (n = 12), 19A (n = 2), και 15B (n = 1) ή ήταν μη τυποποιήσιμοι (n = 4) το 2006 και στους ορότυπους 9V (n = 1), 14 (n = 1), 19F (n = 5), 23F (n = 5), 6A (n = 7), 23B (n = 3), και 15B (n = 1) ή ήταν μη τυποποιήσιμοι (n = 7) το 2007.

Στη μελέτη του 2007 τα 9 (38%) από τα 24 στελέχη που απομονώθηκαν από τους 23 μερικώς εμβολιασμένους φορείς είχαν ενδιάμεση



αντοχή στην πενικιλίνη. Αυτά τα 9 στελέχη ανήκαν στους ορότυπους 19F (n = 1), 23F (n = 1), 6A (n = 3), και 35F (n = 1) ή ήταν μη τυποποιήσιμα (n = 3).

Η MIC στην πενικιλίνη των στελεχών του πνευμονιόκοκκου με ελαττωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη, ανάλογα με το έτος απομόνωσης, φαίνεται στο σχήμα 3. Το 2005 τα στελέχη πνευμονιόκοκκου με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη τα οποία ανήκαν στους σχετιζόμενους με το PCV7 ορότυπους ή στους ορότυπους που δεν έχουν σχέση με το PCV7 ή ήταν μη τυποποιήσιμα ήταν 15 (58%) από τα 26 στελέχη με MIC στην πενικιλίνη 0,5 ή 1 µg/mL και 48 (100%) από τα 48 στελέχη με MIC στην πενικιλίνη 0,125 ή 0,25 µg/mL ( $P < 0,001$ ).

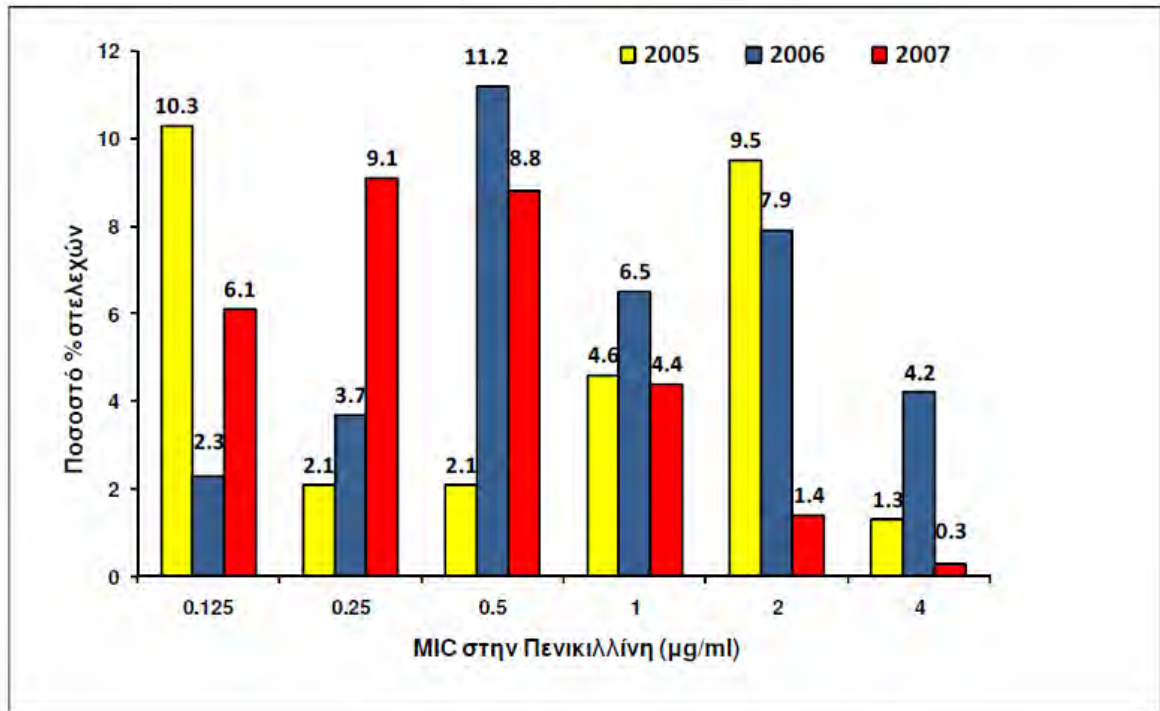
Ελαττωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη παρατηρήθηκε σε 65 (71%) από τα 91 μη τυποποιήσιμα στελέχη. Αυτά τα 65 μη τυποποιήσιμα στελέχη παρουσίαζαν χαμηλού βαθμού αντοχή στην πενικιλίνη και η MIC τους στην πενικιλίνη κυμαίνονταν από 0,125 έως 1 µg/mL, MIC<sub>90</sub> 0,125 µg/ mL.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.** Μερική ή πλήρης αντοχή στην πενικιλίνη και/ή στην κεφοταξίμη των στελεχών του πνευμονιόκοκκου ανάλογα με το έτος της μελέτης και την εμβολιαστική κατάσταση των φορέων.

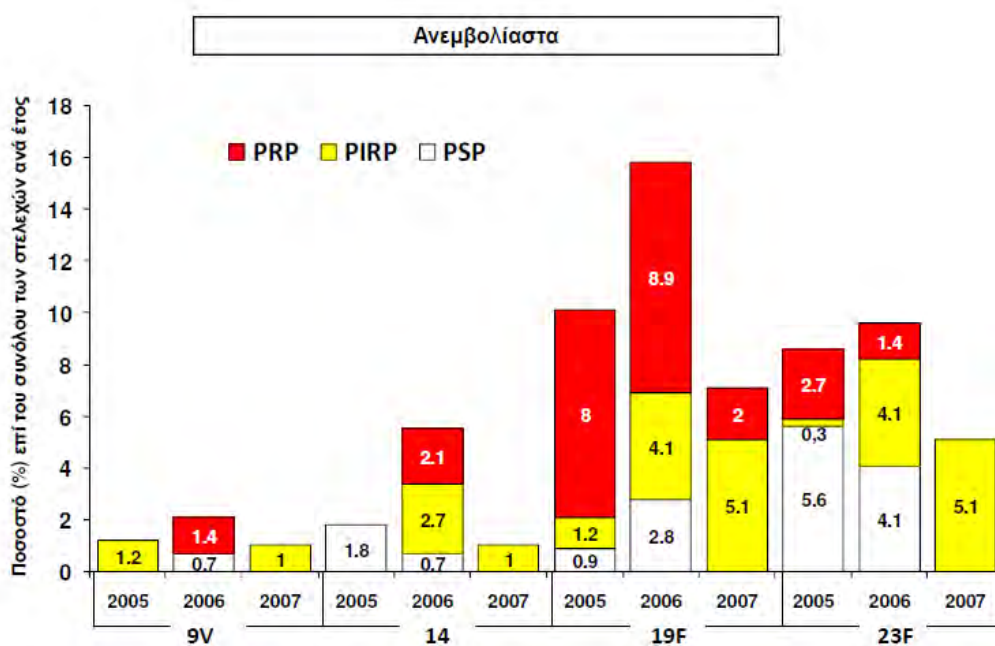
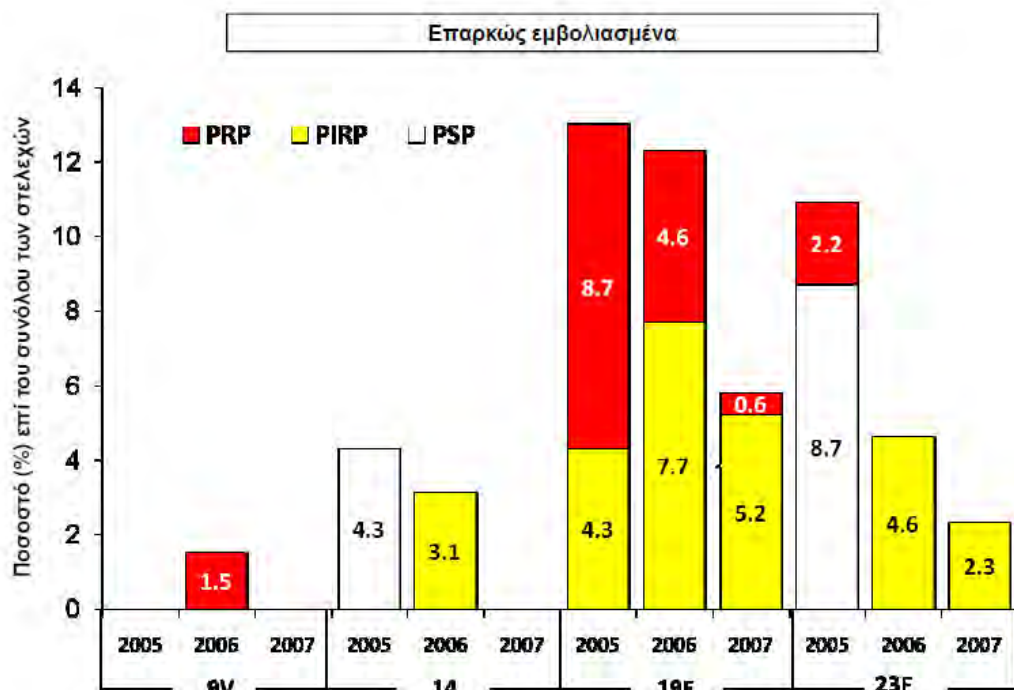
Κατάσταση εμβολιασμού των φορέων, Στελέχη	Έτος της Μελέτης			P
	2005	2006	2007	
<b>Επαρκώς εμβολιασμένοι</b>				
Σύνολο στελεχών	n = 46	n = 65	n = 174	
Ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη	6 (13)	15 (23)	45 (26)	0.22
Πλήρης αντοχή στην πενικιλίνη	5 (11)	5 (7.7)	1 (0.6)	0.001
Ενδιάμεση αντοχή στην κεφοταξίμη	1 (2.2)	2 (3.1)	6 (3.4)	0.91
Πλήρης αντοχή στην κεφοταξίμη	2 (4.3)	2 (3.1)	0	0.04
<b>Ανεμβολίαστοι</b>				
Σύνολο στελεχών	n = 338	n = 146	n = 98	
Ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη	66 (20)	35 (24)	30 (31)	0.06
Πλήρης αντοχή στην πενικιλίνη	36 (11)	20 (14)	2 (2)	0.19
Ενδιάμεση αντοχή στην κεφοταξίμη	5 (1.5)	2 (1.4)	0	0.57
Πλήρης αντοχή στην κεφοταξίμη	17 (5)	10 (6.8)	1 (1)	0.53

Ο αριθμός στην παρένθεση είναι ποσοστό, εκτός αν υποδεικνύεται διαφορετικά. Όλα τα ποσοστά πάνω από 10 στρογγυλοποιήθηκαν στον πλησιέστερο ακέραιο αριθμό.

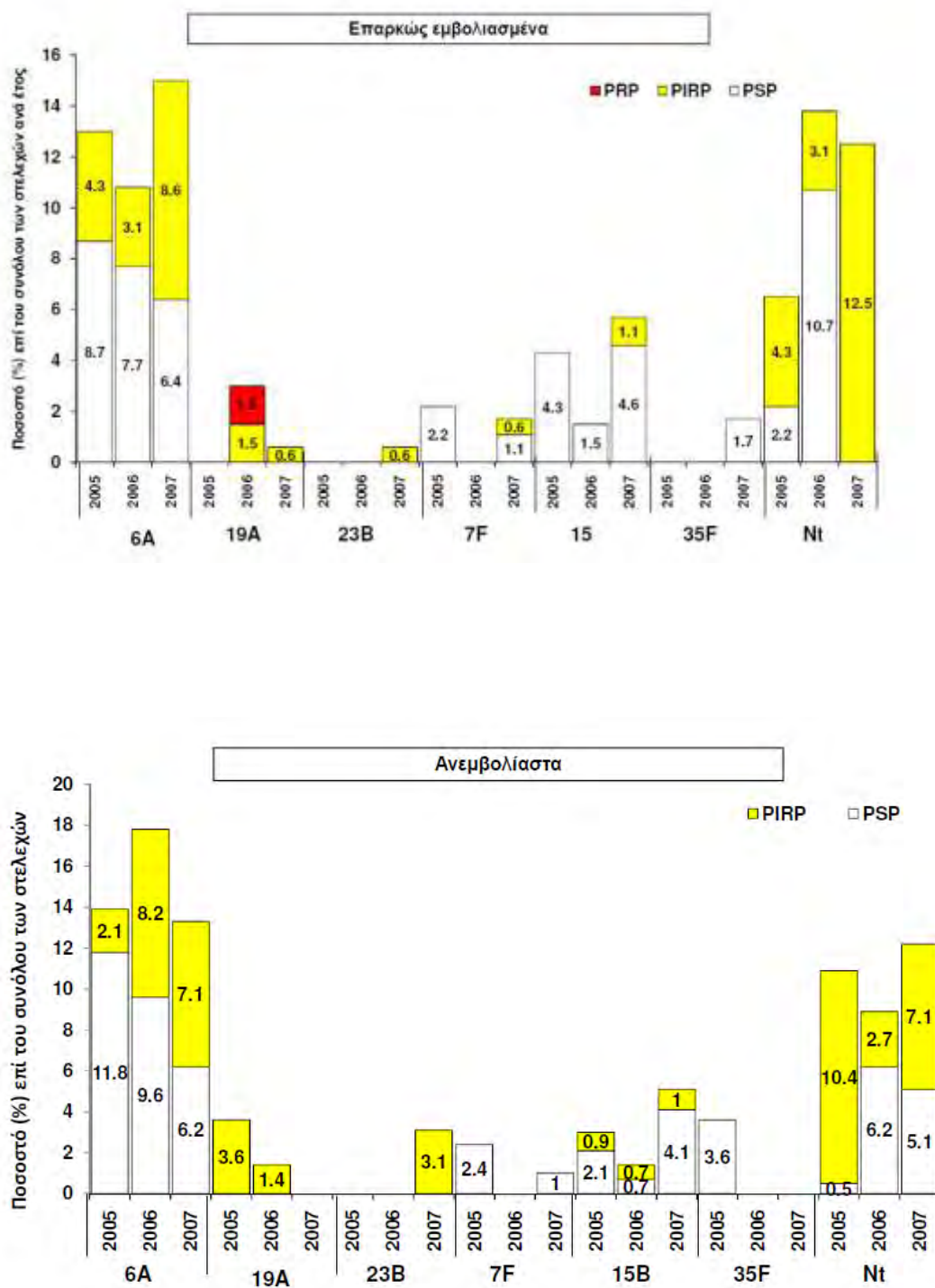
**ΣΧΗΜΑ 3.** Η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) στην πενικιλίνη των στελεχών του πνευμονιόκοκκου ανάλογα με το έτος της μελέτης.



**Σχήμα 4.** Συχνότητα ανά έτος, οροτύπων που περιέχονται στο PCV7 με πλήρη ανοχή (PRP), ενδιάμεση ανοχή (PIRP) και ευαισθησία (PSP) στην πενικιλίνη, σε επαρκώς εμβολιασμένα και ανεμβολίαστα παιδιά.



**Σχήμα 5.** Συχνότητα ανά έτος, οροτύπων που δεν περιέχονται στο PCV7 με πλήρη ανοχή (PRP), ενδιάμεση ανοχή (PIRP) και ευαισθησία (PSP) στην πενικιλίνη, σε επαρκώς για την ηλικία τους εμβολιασμένα και ανεμβολίαστα παιδιά.



## **Η φορεία των ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιοκόκκων**

Κατά το 2006 και το 2007 η συχνότητα των ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιοκόκκων στους επαρκώς για την ηλικία τους εμβολιασμένους φορείς ήταν χαμηλότερη από τη συχνότητα που παρατηρήθηκε στους ανεμβολίαστους φορείς (Πίνακας 5). Η σχετική διαφορά των συχνοτήτων των ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιοκόκκων μεταξύ των 2 ομάδων ήταν -44% το 2006 και -70% το 2007.

Από τον πρώτο στον τρίτο χρόνο, το ποσοστό των ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιοκόκκων μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν από τους επαρκώς για την ηλικία τους εμβολιασμένους φορείς μειώθηκε κατά 94%. Κατά τη διάρκεια του τρίτου χρόνου παρατηρήθηκε επίσης μείωση στη φορεία των ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιοκόκκων μεταξύ των ανεμβολίαστων παιδιών που παρακολουθούσαν παιδικό σταθμό. Υπήρχε μια τάση η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 5).

Μεταξύ των εμβολιασμένων φορέων, οι ανθεκτικοί στην πενικιλίνη πνευμονιοκόκκοι ανήκαν στους ορότυπους 19F (n = 4) και 23F (n = 1) το 2005, στους ορότυπους 9V (n = 1), 19F (n = 3) και 19A (n = 1) το 2006, ενώ υπήρχε μόνο ένα στέλεχος του οροτύπου 19F το 2007 (σχήμα 4). Μεταξύ των ανεμβολίαστων φορέων, οι ανθεκτικοί στην πενικιλίνη πνευμονιοκόκκοι ανήκαν στους ορότυπους 19F (n = 27) και 23F (n = 9) το 2005, στους ορότυπους 9V (n = 2), 14 (n = 3), 19F (n = 13), και 23F (n = 2) το 2006, ενώ υπήρχαν μόνο 2 στελέχη του οροτύπου 19F (n = 2) το 2007 (σχήμα 4). Επιπλέον, υπήρχαν 2 ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη, ένα 19F στέλεχος και ένα 23F, τα οποία απομονώθηκαν από μερικώς εμβολιασμένους φορείς το

2007. Η MIC στην πενικιλίνη των ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιοκόκκων κυμαίνονταν από 2 έως 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  με  $\text{MIC}_{90}$  2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **Η φορεία των στελεχών πνευμονιόκοκκου με μερική ή πλήρη αντοχή στην κεφοταξίμη**

Τα σαράντα οκτώ (96%) από τα 50 στελέχη του πνευμονιόκοκκου με μερική ή πλήρη αντοχή στην κεφοταξίμη ανήκαν στους ορότυπους του εμβολίου. Συγκεκριμένα, από τους 34 ανθεκτικούς στην κεφοταξίμη πνευμονιόκοκκους, 31 (91%) ανήκαν στον ορότυπο 19F, 2 (6%) στον 23F και 1 (3%) στον 9V. Από τα 16 στελέχη με ενδιάμεση αντοχή στην κεφοταξίμη, 12 (75%) ανήκαν στον ορότυπο 19F, 2 (13%) στον 23F, 1 (6%) στον 6A και 1 (6%) ήταν μη τυποποιήσιμο.

### **Η φορεία των στελεχών πνευμονιόκοκκου με αντοχή στην ερυθρομυκίνη**

Από τα 900 στελέχη πνευμονιόκοκκου που απομονώθηκαν, τα 277 (30,8%) ανέπτυξαν αντοχή στην ερυθρομυκίνη και μάλιστα το 85,2% των στελεχών παρουσίαζαν πλήρη ή ενδιάμεση αντοχή και στην πενικιλίνη. Στα 271 στελέχη (97,8%) η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) στην ερυθρομυκίνη ήταν  $\geq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Επίσης, πέντε φορείς βρέθηκαν αποικισμένοι με 2 διαφορετικά ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη. Από το σύνολο των 277 ανθεκτικών στη ερυθρομυκίνη στελεχών που απομονώθηκαν, τα 261 (94,2%) παρουσίαζαν αντοχή και σε άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες, με 15 διαφορετικούς φαινότυπους αντοχής. Συγκεκριμένα, η συχνότητα αντοχής στην πενικιλίνη ήταν 85,2% , στην τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη 76,2%, στην κλινδαμυκίνη 64,3%, στην τετρακυκλίνη 64,3% και στην

χλωραμφενικόλη 14,4% . Πολυανθεκτικότητα παρουσίαζαν 218 (78,7%) από τα 277 ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη.

Στην ομάδα των επαρκώς για την ηλικία τους εμβολιασμένων παιδιών παρατηρήθηκε ελάττωση της συχνότητας στελεχών με αντοχή στην ερυθρομυκίνη από 16,3% το 2005 σε 13,3% το 2006 και σε 13,1% το 2007, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Στην ομάδα των ανεμβολίαστων παιδιών η συχνότητα των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών δε μειώθηκε και συγκεκριμένα ήταν 14,5% το 2005, 15,3% το 2006 και 18,9% το 2007 (σχήμα 6).

Στην ομάδα των επαρκώς για την ηλικία τους εμβολιασμένων παιδιών, το ποσοστό των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών που ανήκε σε ορότυπους του εμβολίου μειώθηκε σημαντικά. Αποτελούσε το 19,5% του συνόλου των στελεχών που απομονώθηκαν το 2005, ενώ το 2007 το ποσοστό αυτό μειώθηκε σε 8,6% (σχήμα 7). Αντίστοιχα, στην ομάδα των ανεμβολίαστων παιδιών το ποσοστό των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών με ορότυπους του εμβολίου ήταν 15,5% για το 2005 και 13,2% για το 2007 (σχήμα 8).

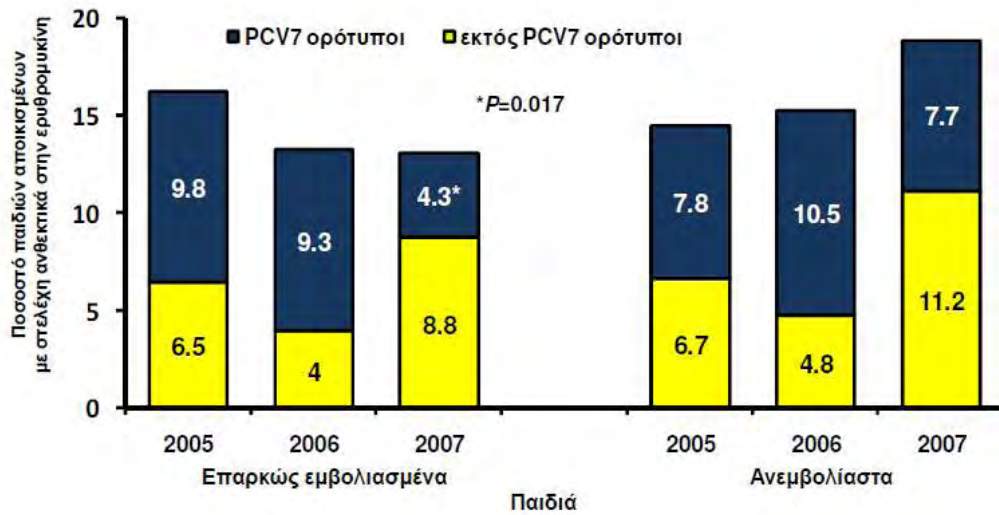
Οι ορότυποι που απομονώθηκαν από το σύνολο των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών ανήκαν στους εξής: 19F (29,6%), 6A (18,1%), 23F (10,8%), 14 (6,1%), 6B (4,3%), 10A (1,8%), 15B (0,7%), 19A (0,7%), 35A (0,7%), 9V (0,4%) και 35F (0,4%). Μη τυποποιήσιμα στελέχη βρέθηκαν σε ποσοστό 26,4%. Στα επαρκώς εμβολιασμένα παιδιά υπήρξε σημαντική μείωση της φορέας από στελέχη ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη με ορότυπους που καλύπτονται από το εμβόλιο (από 9,8% το 2005 σε 4,3% το 2007) (σχήμα 6) και ιδιαίτερα σε αυτά που δεν είχαν λάβει αντιβιοτικά τους



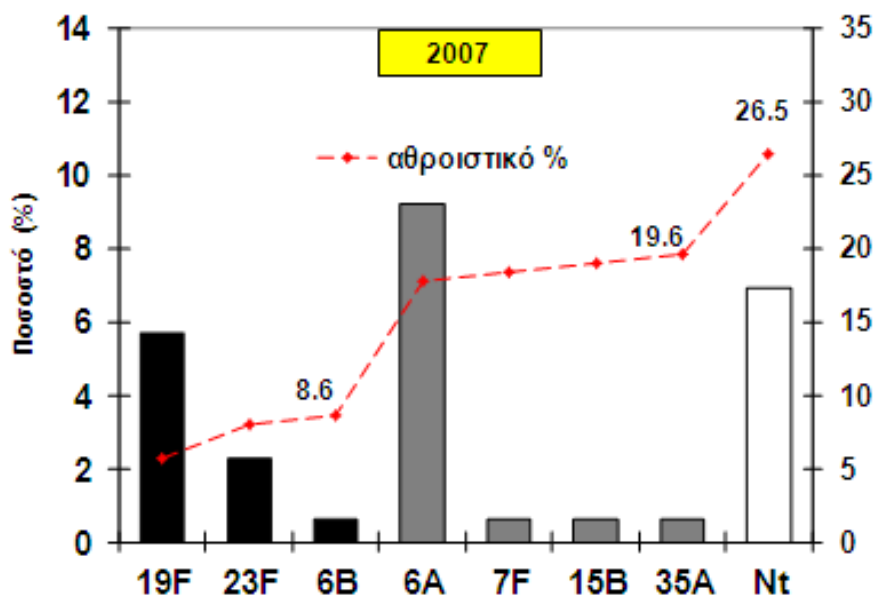
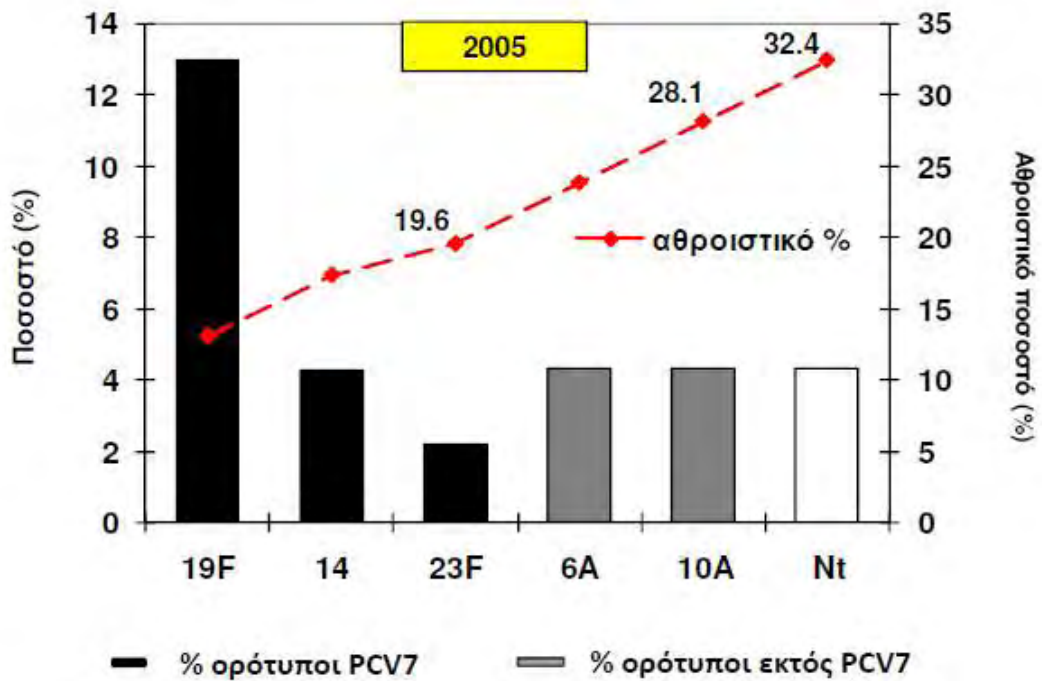
τελευταίους 3 μήνες. Από το σύνολο των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών στην ομάδα των κατάλληλα εμβολιασμένων παιδιών το 60% ανήκε σε ορότυπους του εμβολίου το 2005 (19F, 23F, 14), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό μειώθηκε σε 32,6% το 2007 (19F, 23B, 14) (σχήμα 9). Δεν παρατηρήθηκε ανάλογη μείωση στην ομάδα των ανεμβολίαστων παιδιών όπου το ποσοστό ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών με ορότυπο του εμβολίου ήταν 52% για το 2005 και 40,6 για το 2007 (σχήμα 10).

Κατά τη διάρκεια των 2 ετών της έρευνας διαπιστώθηκε αύξηση της αντοχής στην ερυθρομυκίνη σε στελέχη που ανήκαν στους ορότυπους 23F και 6A . Το ποσοστό των στελεχών με ορότυπο 6A που ήταν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη αυξήθηκε από 14,9% (7/47) το 2005 σε 42,3% (11/26) το 2006 και σε 61,5% (8/13) το 2007 ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα στελέχη με ορότυπο 23F ήταν 31% (9/29) το 2005, 50% (7/14) το 2006 και 100% (5/5) το 2007. Συγκεκριμένα στην ομάδα των επαρκώς εμβολιασμένων παιδιών το 2005 το ποσοστό των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών που ανήκαν στον ορότυπο 6A ήταν 13,3% ενώ το 2007 στην ίδια ομάδα παιδιών ήταν 35% (σχήμα 9).

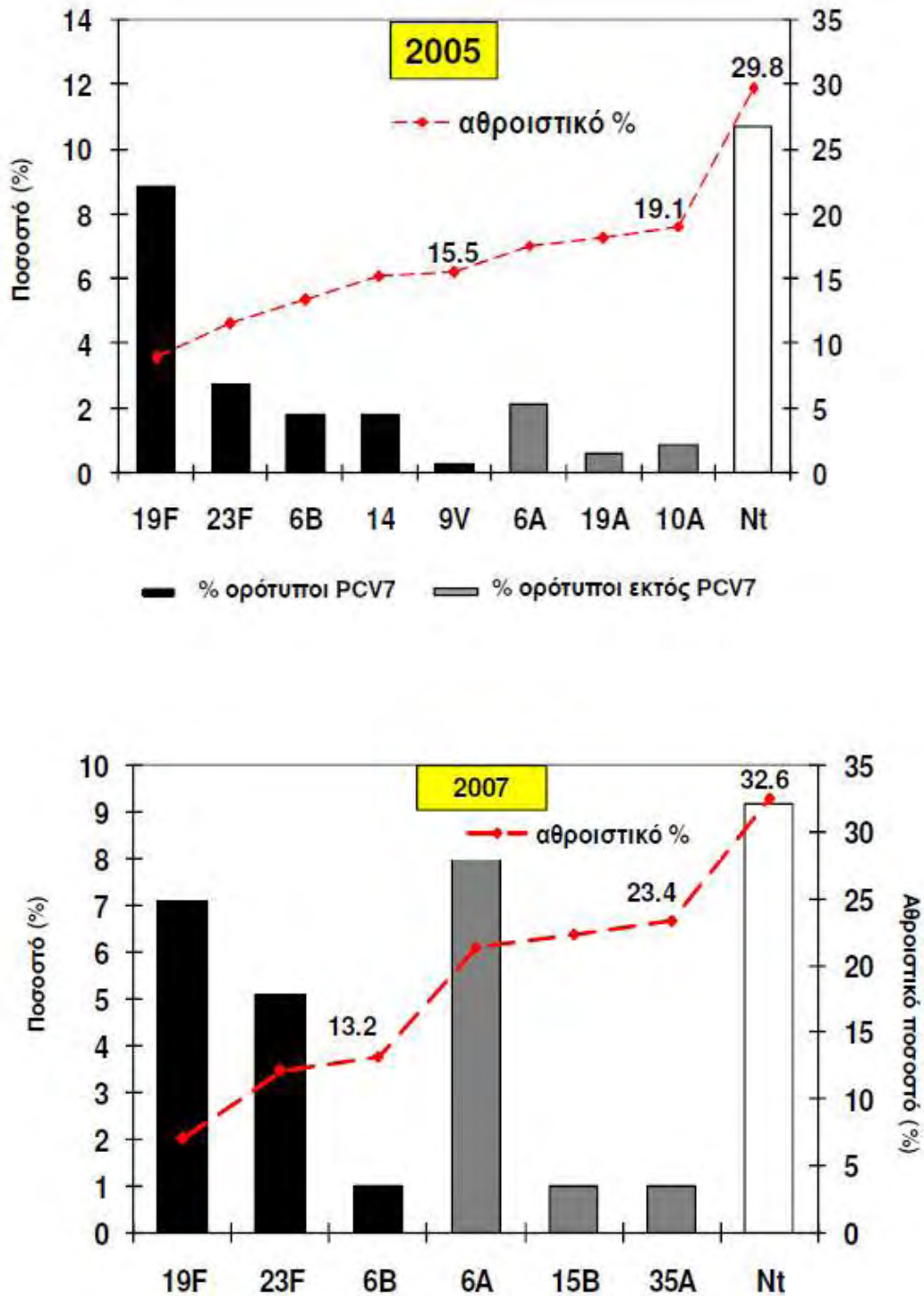
**Σχήμα 6.** Ποσοστό παιδιών αποικισμένων με ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη ανάλογα με το έτος της μελέτης και την εμβολιαστική τους κάλυψη



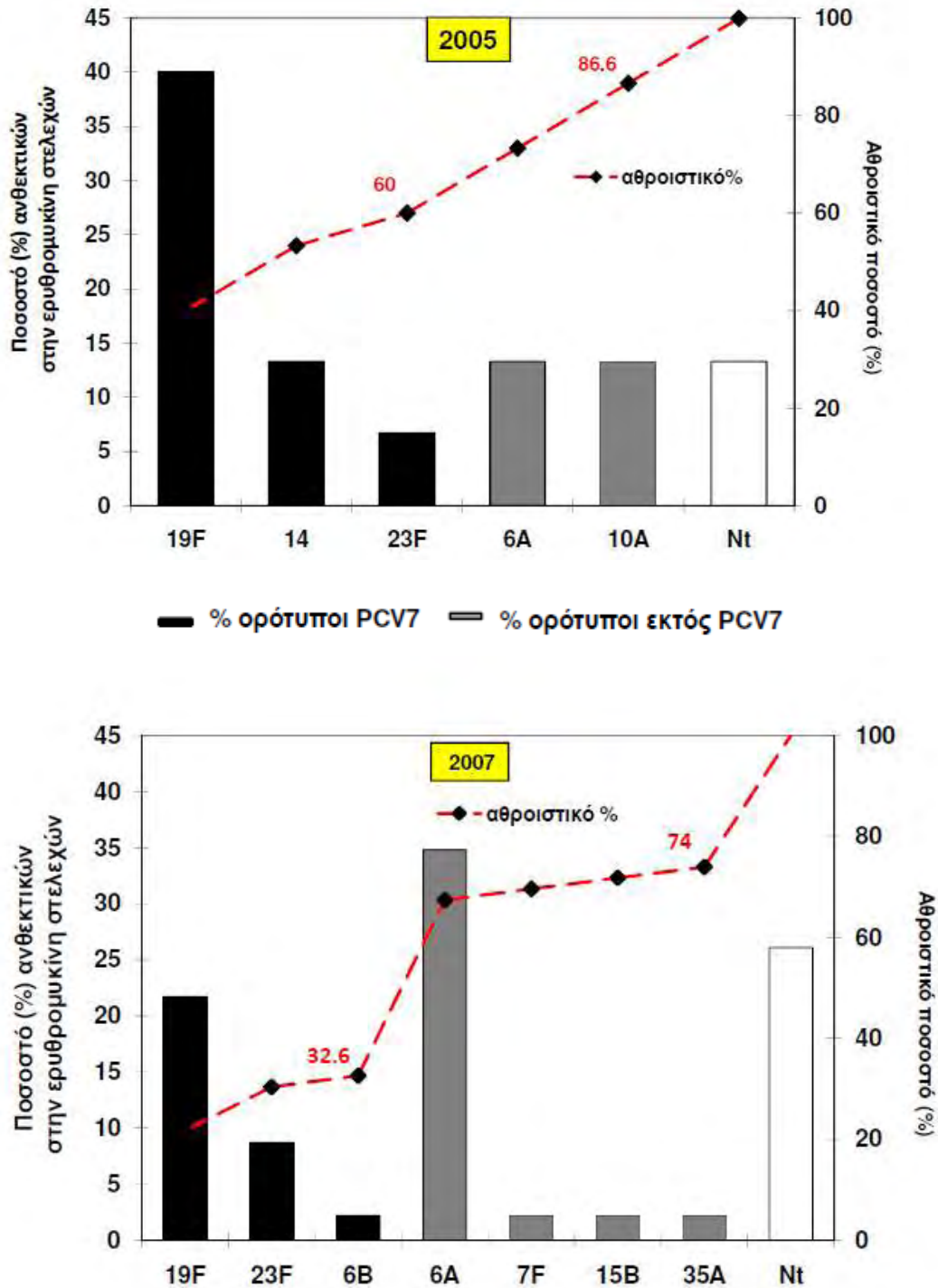
**Σχήμα 7.** Κατανομή οροτύπων των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών στα επαρκώς εμβολιασμένα παιδιά



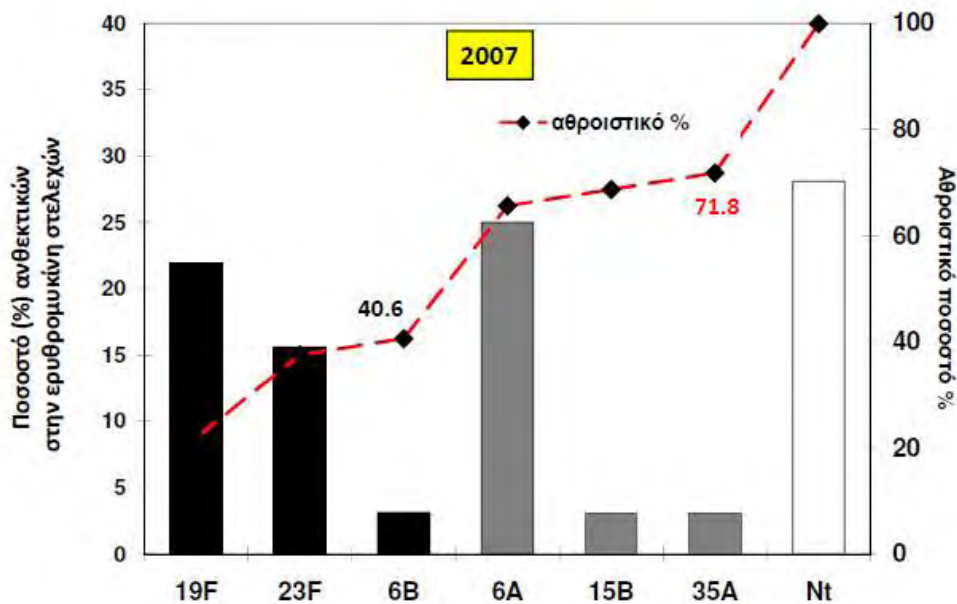
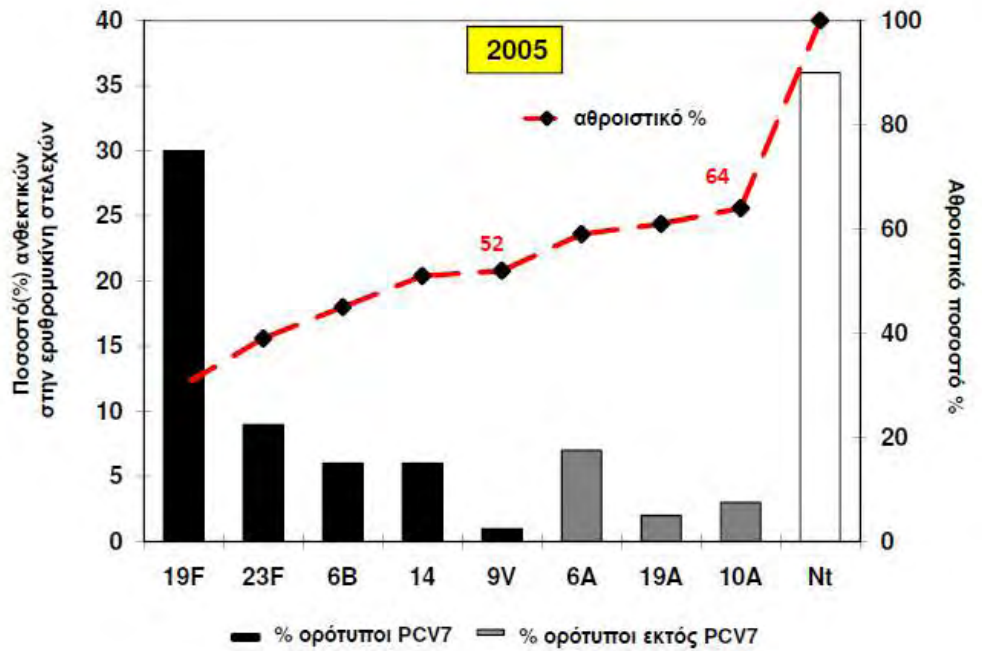
**Σχήμα 8.** Κατανομή οροτύπων των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών στα ανεμβολίαστα παιδιά



**Σχήμα 9.** Κατανομή οροτύπων των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών στα επαρκώς εμβολιασμένα παιδιά



**Σχήμα 10.** Κατανομή οροτύπων των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών στα ανεμβολίαστα παιδιά



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη παρουσιάζει τα αποτελέσματα μετά την εφαρμογή του εμβολιασμού με PCV7 σε παιδιά προσχολικής ηλικίας στο πλαίσιο προγράμματος αναπλήρωσης (catch-up), κατά τη διάρκεια μιας περιόδου στην οποία η εμβολιαστική κάλυψη με το PCV7 στα βρέφη ήταν χαμηλή. Η μελέτη αυτή διαφέρει από μελέτες που διεξήχθησαν σε χώρες με γενικευμένο εμβολιασμό με PCV7, όπου το μεγαλύτερο ποσοστό παιδιών εμβολιάστηκαν στην πρώτη βρεφική ηλικία [225, 226, 227].

Στην Ελλάδα, περίπου το 90-95% των παιδιών ξεκινούν την παρακολούθηση παιδικού σταθμού μετά το δεύτερο έτος ζωής [53, 211], γεγονός που διαφέρει σημαντικά από τις συνήθειες σε άλλες χώρες [177, 225]. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι το 98% των επαρκώς εμβολιασμένων παιδιών, είχε λάβει το PCV7 στο πλαίσιο προγράμματος αναπλήρωσης (catch-up). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η μελέτη άρχισε 4 μήνες μετά την κυκλοφορία του PCV7 στην χώρα μας και περίπου 16 μήνες από την στιγμή που το εμβόλιο άρχισε να καλύπτεται κατά 80% από τα ασφαλιστικά ταμεία.

Στην Ελλάδα εμβολιάστηκαν αρχικά τα νήπια. Οι ιδιώτες παιδίατροι εμβολίαζαν πιο συχνά με PCV7 τα παιδιά που ανήκαν στις ηλικιακές ομάδες για τις οποίες ο προτεινόμενος αριθμός δόσεων ήταν 1 ή 2 (ηλικίας 12 μηνών και μεγαλύτερα). Μόνο η τρίτη ετήσια επιτήρηση διεξήχθη 8 μήνες μετά την έναρξη της κάλυψης του εμβολίου από τα ασφαλιστικά ταμεία και ουσιαστικά αυτή η περίοδος χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερο βαθμό κάλυψης με το PCV7. Παρόλο που δεν γνωρίζαμε για την περίοδο της μελέτης τα ακριβή επίπεδα της κάλυψης με το PCV7 των βρεφών ηλικίας 2-11 μηνών, τα διαθέσιμα

δεδομένα υποδεικνύουν ότι η εμβολιαστική τους κάλυψη παρέμενε σε σχετικά χαμηλά επίπεδα, σημαντικά χαμηλότερα από εκείνα που επιτεύχθηκαν σε παιδιά ηλικίας μεγαλύτερης των 12 μηνών, και πιο συγκεκριμένα σε παιδιά μεγαλύτερα των 24 μηνών.

Η συχνότητα αποικισμού με στελέχη πνευμονιόκοκκου, όπως αυτή μετρήθηκε κατά την περίοδο των 3 μηνών από το τέλος του χειμώνα έως την άνοιξη, παρέμεινε στα ίδια επίπεδα μετά την έναρξη του εμβολιασμού με το PCV7 από το 2005 (48%) έως το 2007 (51%). Επιπλέον, δεν σημειώθηκαν διαφορές στα ποσοστά φορέας ανάμεσα στις ομάδες των επαρκώς εμβολιασμένων παιδιών και των ανεμβολίαστων παιδιών. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκαν μεταβολές σε ότι αφορά μεμονωμένα τη συχνότητα αποικισμού με ορότυπους που καλύπτονται από το PCV7 καθώς και με ορότυπους που δεν καλύπτονται από το εμβόλιο.

Παράλληλα με την αύξηση του αριθμού των παιδιών τα οποία εμβολιάστηκαν με το PCV7, η μελέτη αυτή, από τον πρώτο έως τον τρίτο χρόνο, ανέδειξε:

1. σημαντική μείωση των στελεχών με ορότυπο του εμβολίου
2. αύξηση των στελεχών με ορότυπο που δεν περιλαμβάνεται στο PCV7
3. αξιοσημείωτη μείωση στο ποσοστό των ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιοκόκκων.

Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με μια πρόσφατη γαλλική μελέτη [225]. Επίσης, το ίδιο φαινόμενο καταγράφηκε και σε μελέτη στην Πορτογαλία, όπου το ποσοστό των οροτύπων που καλύπτονται από το PCV7 μειώθηκε από 53,1% το 2001 σε 11,2% το 2006, ενώ παράλληλα αυξήθηκε το ποσοστό των



οροτύπων που δεν περιλαμβάνονται στο PCV7 από 46,9% το 2001 σε 88,8% το 2006 [228].

Επιπλέον, παρατηρήσαμε μια συνολική μείωση της MIC στην πενικιλίνη, αποτέλεσμα της μείωσης απομόνωσης στελεχών με υψηλή αντοχή στην πενικιλίνη και της επικράτησης στελεχών με MIC στην πενικιλίνη  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/mL}$ . Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση της φορέας των πνευμονιοκόκκων με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη στα εμβολιασμένα και στα ανεμβολίαστα παιδιά που παρακολουθούσαν παιδικό σταθμό, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Στα επαρκώς εμβολιασμένα παιδιά, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του αποικισμού με τους ορότυπους 6B, 14 και 23F. Άλλοι ορότυποι (π.χ. 9V) φάνηκε να παρουσιάζουν μείωση, αλλά οι μικροί αριθμοί περιόρισαν την στατιστική αξιολόγηση. Παρατηρήσαμε ελάττωση της φορέας του οροτύπου 19F στα επαρκώς εμβολιασμένα παιδιά, αλλά η μείωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Σε μια τυχαίοποιημένη μελέτη η οποία διεξήχθη σε νήπια που εμβολιάστηκαν με 1 ή 2 δόσεις από το 9-δύναμο συζευγμένο με CRM197 πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο παρατηρήθηκε ελαττωμένος κίνδυνος αποικισμού με τους ορότυπους 6B, 6A, 9V, 14 και 23F [176].

Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της φορέας των οροτύπων πνευμονιοκόκκου του PCV7 στα παιδιά τα οποία ήταν επαρκώς εμβολιασμένα (άμεση συνέπεια), αλλά και στα παιδιά τα οποία ήταν ανεμβολίαστα (έμμεση συνέπεια). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ολλανδία καταγράφηκε μείωση της φορέας με ορότυπους του εμβολίου κατά 80-90% σε εμβολιασμένα βρέφη 11-24 μηνών αλλά και στους γονείς τους όπου ο αποικισμός με ορότυπους PCV7 είχε σχεδόν εξαλειφθεί [229]. Αυτή η

μείωση είναι μεγαλύτερη από αυτήν που είχε παρατηρηθεί στις κλινικές δοκιμές του εμβολίου (50-60%) και θα πρέπει να αποδοθεί στην επίδραση της ανοσίας της αγέλης.

Η διάδοση του εμβολιασμού με PCV7 ανέκοψε τη μετάδοση των στελεχών πνευμονιόκοκκου οροτύπου του PCV7 και με υψηλού βαθμού αντοχή στην πενικιλίνη. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια του τρίτου έτους, παρατηρήθηκε ελάττωση της φορέας των ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιοκόκκων και στα ανεμβολίαστα παιδιά που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς. Το 2007, τα ανεμβολίαστα παιδιά που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς ήταν λιγότερο πιθανό να είναι αποικισμένα με ορότυπους του PCV7, συγκριτικά με το 2006.

Παράλληλα με την αύξηση του αριθμού των παιδιών που εμβολιάστηκαν με το επταδύναμο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο, παρατηρήθηκε μείωση της φορέας με στελέχη ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη που ανήκαν σε ορότυπους του εμβολίου στην ομάδα των επαρκώς εμβολιασμένων παιδιών. Δεν βρέθηκε αντίστοιχη ελάττωση της φορέας στην ομάδα των ανεμβολίαστων παιδιών.

Η αντοχή στην ερυθρομυκίνη από τον πρώτο στον τρίτο χρόνο της μελέτης αυξήθηκε σημαντικά για τους ορότυπους 23F σε εμβολιασμένα και ανεμβολίαστα παιδιά, καθώς και για τον ορότυπο 6A στην ομάδα των ανεμβολίαστων παιδιών. Η αύξηση της αντοχής σε έναν ορότυπο είναι το αποτέλεσμα της πίεσης των αντιβιοτικών και ίσως να μην σχετίζεται με το εμβόλιο.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων 31 μηνών μετά την κυκλοφορία του PCV7 στην Ελλάδα, δεν υπήρχε αύξηση της συχνότητας των 6A και 19A στελεχών στα εμβολιασμένα παιδιά. Αντίθετα, παρατηρήθηκε τάση προς

ελαττωμένη φορεία του 19A. Παρόμοια αποτελέσματα, σε ότι αφορά τους συγκεκριμένους ορότυπους, ανέδειξε και μελέτη σε παιδιά 6-24 μηνών με ΟΜΩ στην Γαλλία (2001-2006) από τους Cohen και συν. [230]. Αυτός ο σχετιζόμενος με το εμβόλιο ορότυπος παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον σε άλλες χώρες με πρόγραμμα γενικευμένου εμβολιασμού [218-220, 225]. Σε πολλές χώρες έχει παρατηρηθεί αύξηση του 19A και θεωρείται πλέον ο συχνότερος ορότυπος που απομονώνεται σε ασθενείς με διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις και λοιμώξεις βλεννογόνων. Επίσης, ο 19A απομονώνεται συχνά σε καλλιέργειες ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος και συχνά παρουσιάζει αντοχή στα αντιβιοτικά. Οι περισσότεροι ορότυποι εκτός PCV7 δεν διαθέτουν αυτές τις ιδιότητες και είναι σημαντικό να αποτυπώνονται οι διαφορές τους και να αναγνωρίζονται οι παράγοντες που επιδρούν στα διαφορετικά πρότυπα. Στην Γαλλία η αύξηση του 19A στην φορεία, στην ΟΜΩ και σε διεισδυτικές λοιμώξεις σχετίζεται με την επέκταση του κλώνου ST276, ενώ στις ΗΠΑ των κλώνων ST199 και ST320, που είναι γνωστοί για την πολυανθεκτικότητα που παρουσιάζουν στα αντιβιοτικά. Στο Ισραήλ και στην Κορέα η αύξηση του 19A σημειώθηκε πριν από την εφαρμογή του εμβολιασμού με το PCV7. Οι δύο βασικοί παράγοντες που συσχετίζονται με την αυξημένη συχνότητα του συγκεκριμένου οροτύπου, η οποία και διαφέρει από χώρα σε χώρα, είναι η προϋπάρχουσα συχνότητα και το επίπεδο κατανάλωσης αντιβιοτικών. Άλλοι παράγοντες που εμπλέκονται και αναδείχθηκαν από μελέτη που έγινε στη Γαλλία από το 2006 έως το 2009 σε παιδιά 6-24 μηνών με υψηλή εμβολιαστική κάλυψη, ήταν η έκθεση στα αντιβιοτικά, η παρακολούθηση παιδικού σταθμού και η παρουσία ΟΜΩ [231]. Είναι η πρώτη φορά που συσχετίζεται η αύξηση του 19A με την

παρακολούθηση παιδικού σταθμού, καθώς υπάρχουν και άλλες μελέτες στις οποίες έχει παρατηρηθεί η συσχέτιση του παιδικού σταθμού με τα αυξημένα ποσοστά αποικισμού με άλλα στελέχη πνευμονιόκοκκου. Ο 19A ήταν ο συχνότερος ορότυπος σε παιδιά-φορείς πνευμονιόκοκκου και σε φορείς με ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη. Έτσι, το ποσοστό των παιδιών που παρακολουθούν παιδικούς σταθμούς σε μία χώρα μπορεί να επηρεάζει την αυξημένη συχνότητα πνευμονιοκοκκικής νόσου από τον 19A. Επίσης, σημειώνεται ότι παιδιά με ΟΜΩ έχουν περισσότερες πιθανότητες να αποικίζονται με τον ορότυπο 19A. Είναι ο συχνότερος ορότυπος που απομονώνεται από καλλιέργειες ωτικού εκκρίματος σε παιδιά εμβολιασμένα με PCV7.

Αύξηση του ποσοστού φορέας του οροτύπου 23A παρατηρήθηκε τόσο στα εμβολιασμένα όσο και στα ανεμβολίαστα παιδιών. Κατά τη διάρκεια του τρίτου χρόνου μελέτης ο 23A ήταν ο δεύτερος πιο συχνός ορότυπος μετά τον 6A. Σημαντικές αυξήσεις στους οροτύπους 23A, 19A και 35B καταγράφηκαν και σε μελέτη στη Μασαχουσέτη [232]. Αντίθετα, σε άλλες εργασίες [176, 227], δεν υπήρξε μείωση του 6A. Η παραμονή του 6A, παρά τον εμβολιασμό με το PCV7, μπορεί να αποτελεί συνέπεια της επέκτασης του οροτύπου 6C. Στην ολλανδική μελέτη υπήρξε τάση προς μείωση του 6A και αύξηση του οροτύπου 6C γεγονός που υποδεικνύει την προστασία που παρέχει το PCV7 για τον 6A αλλά όχι και για τον 6C.

Στην παρούσα μελέτη, 10% από όλα τα πνευμονιοκοκκικά στελέχη ήταν μη τυποποιήσιμα. Η μη τυποποίηση και των 91 πνευμονιοκόκκων επιβεβαιώθηκε από το SSI. Το ένα τέταρτο των μη τυποποιήσιμων πνευμονιοκόκκων απομονώθηκαν από παιδιά με πολλαπλό αποικισμό. Δεν

κατέστη δυνατόν να ανιχνευθούν σημαντικές αλλαγές στη συχνότητα των μη τυποποιήσιμων στελεχών από τον πρώτο στον τρίτο χρόνο στα εμβολιασμένα και ανεμβολίαστα παιδιά. Σε πρόσφατες μελέτες, οι μη τυποποιήσιμοι πνευμονιόκοκκοι αντιπροσωπεύουν το 5,1-5,9% από τα ρινοφαρυγγικά στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από παιδιά προσχολικής ηλικίας [53, 233, 234] και το 17% από τα στελέχη που απομονώθηκαν από ενήλικες [235].

Το προφίλ των πνευμονιοκοκκικών οροτύπων που αποικίζουν τα παιδιά και προκαλούν παιδιατρικές λοιμώξεις φαίνεται ότι σχετίζεται με την ηλικία, τη χρονική περίοδο και τις γεωγραφικές συνθήκες [226, 227, 236, 237]. Έχει αναφερθεί μείωση του ποσοστού των οροτύπων του PCV7 και αύξηση των σχετιζόμενων με το PCV7 οροτύπων καθώς και των οροτύπων που δεν έχουν σχέση με το PCV7 και οι οποίοι αποικίζουν εμβολιασμένα υγιή παιδιά σε διάφορες περιοχές του κόσμου [225, 226]. Πρόσφατα, έχουν αναφερθεί αλλαγές σε παιδιά που ζούσαν σε 16 κοινότητες της Μασαχουσέτη [227]. Μεταξύ των πνευμονιοκοκκικών στελεχών, οι ορότυποι του PCV7 ελαττώθηκαν από 36% σε 14% και οι ορότυποι που δεν έχουν σχέση με το PCV7 αυξήθηκαν από 34% σε 55%. Ανάμεσα στα στελέχη που ανήκαν σε ορότυπο που δεν είχε σχέση με το PCV7, μεγαλύτερη συχνότητα είχαν αυτά των οροτύπων/οροομάδων 11A, 15 και 29.

Στη χώρα μας, σε μελέτη που έγινε στην Κρήτη μετά την έναρξη του εμβολιασμού σε στελέχη από παιδιά με πνευμονιοκοκκική νόσο ή από φορείς, παρατηρήθηκε μείωση των στελεχών με ορότυπο του PCV7 και αύξηση των στελεχών που ανήκαν στους ορότυπους 7F και 19A [238].

Η πρόσφατη αύξηση της συχνότητας που παρατηρήθηκε σε συγκεκριμένους ορότυπους που δεν περιλαμβάνονται στο PCV7, μπορεί να είναι ένα τυχαίο γεγονός αλλά μπορεί και να σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος του ελύτρου τους, τη σύνθεση των πολυσακχαριτών του και τις μεταβολικές τους ιδιότητες. Οι πνευμονιόκοκκοι με μεγαλύτερου μεγέθους έλυτρο είναι πιο ανθεκτικοί στην μη οψωνική φαγοκυττάρωση και αποικίζουν συχνότερα τα παιδιά. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι το συγκεκριμένο έλυτρο του κάθε οροτύπου αποτελεί σημαντικό παράγοντα της λοιμογονικότητας του μικροβίου καθώς και της δυνατότητας που έχει να προκαλέσει διεισδυτική νόσο. Επίσης, οι Harboe και συν. έχουν δείξει ότι ορότυποι όπως ο 11A, 19A, 10A (highly encapsulated) έχουν υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας σε υγιή άτομα >5 ετών τα οποία είναι συγκρίσιμα με αυτά οροτύπων του PCV7 όπως ο 19F ή ο 6B [239]. Οι ορότυποι λοιπόν που αντικαθιστούν τους ορότυπους του εμβολίου και αποικίζουν τον ρινοφάρυγγα μπορούν δυνητικά να προκαλέσουν το ίδιο σοβαρές λοιμώξεις με αυτές των οροτύπων του εμβολίου. Επιπλέον, ορότυποι που αποικίζουν συχνότερα έχουν την τάση να επηρεάζουν περισσότερο ασθενείς με προϋπάρχοντα προβλήματα υγείας συγκριτικά με ορότυπους που αποικίζουν μεν σπανιότερα αλλά έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να προκαλέσουν διεισδυτική νόσο (ορότυπος 1 και 7F). Έτσι, η αντικατάσταση των οροτύπων ενδέχεται να μειώσει τα οφέλη του εμβολίου σε μεγαλύτερους σε ηλικία ασθενείς με χρόνια νοσήματα. Εκτός βέβαια από τη συχνότητα αποικισμού και τη δυνατότητα συγκεκριμένου ορότυπου να προκαλέσει λοίμωξη, ρόλο στη σοβαρότητα και στη συχνότητα της νόσου παίζουν και το γενετικό πλαίσιο, η παρουσία ανθεκτικών στα αντιβιοτικά

στελεχών, η σύνθεση του πληθυσμού και τα χαρακτηριστικά του ασθενούς [229].

Μετά από τη εκτεταμένη χρήση του PCV7, είναι πιθανή η εμφάνιση δυνητικά λοιμογόνων στελεχών και η ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά των πνευμονιοκοκκικών στελεχών που ανήκουν σε ορότυπους οι οποίοι δεν περιλαμβάνονται στο εμβόλιο. Η συνετή χρήση των αντιβιοτικών πρέπει συνεχώς να ενθαρρύνεται, για να διατηρηθούν οι ωφέλιμες συνέπειες του PCV7 [225]. Αυτό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για χώρες με υψηλή κατανάλωση αντιβιοτικών.

Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι η ένταξη του PCV7 στο πρόγραμμα εμβολιασμού της χώρας μας είχε σημαντική επίδραση στη φορεία των πνευμονιοκοκκικών στελεχών με υψηλή αντοχή στην πενικιλίνη μεταξύ των παιδιών της Ελλάδας. Η τριετής μελέτη έδειξε ότι μεταξύ των φορέων, οι οποίοι σχεδόν όλοι είχαν εμβολιαστεί στο πλαίσιο προγράμματος αναπλήρωσης (catch-up), το ποσοστό των πνευμονιοκκόκων με υψηλού βαθμού αντοχή στην πενικιλίνη ελαττώθηκε κατά 94%. Μια παρόμοια ελάττωση της φορείας των ανθεκτικών στην κεφοταξίμη στελεχών πνευμονιόκοκκου παρατηρήθηκε μεταξύ των εμβολιασμένων φορέων. Η συχνότητα των πνευμονιοκκόκων με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη δεν άλλαξε σημαντικά ανάμεσα στα εμβολιασμένα παιδιά. Αυτές οι παρατηρήσεις υπογραμμίζουν τη σημασία της επιτήρησης των στελεχών του πνευμονιόκοκκου που αποικίζουν τον ρινοφάρυγγα των παιδιών.

## Γ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη των οροτύπων και της αντοχής στα αντιβιοτικά των στελεχών πνευμονιόκοκκου που απομονώνονται από το ρινοφάρυγγα, συμβάλλει σημαντικά στην αποτύπωση της επιδημιολογίας του πνευμονιόκοκκου σε μία συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή. Η επιτήρηση αυτή αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον μετά την κυκλοφορία του επταδύναμου συζευγμένου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου (PCV7). Στην Ελλάδα, το PCV7 κυκλοφόρησε τον Οκτώβριο του 2004 και εντάχθηκε επίσημα στο εθνικό πρόγραμμα εμβολιασμών τον Ιανουάριο του 2006. Στο διάστημα μεταξύ Φεβρουαρίου του 2005 και Μαΐου του 2007 πραγματοποιήσαμε μία μελέτη επιτήρησης της φορέας του πνευμονιόκοκκου σε παιδιά που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς στην Κεντρική Ελλάδα. Ελήφθησαν καλλιέργειες ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος από 1829 παιδιά ηλικίας 13-76 μηνών με σκοπό τη μελέτη της αντοχής στα αντιβιοτικά και των οροτύπων των στελεχών του πνευμονιόκοκκου. Το ποσοστό των παιδιών που είχαν εμβολιαστεί με  $\geq 1$  δόσεις του PCV7, από 13% που ήταν το 2005 αυξήθηκε σε 70% το 2007 ( $P < 0,001$ ). Κατά το τρίτο έτος της επιτήρησης, το 2007, στα επαρκώς εμβολιασμένα παιδιά παρατηρήθηκε το φαινόμενο αναπλήρωσης των οροτύπων, δηλαδή ελάττωση της φορέας στελεχών που ανήκαν στους ορότυπους του εμβολίου, από 33% το 2005 σε 8,6% το 2007, και ταυτόχρονη αύξηση αυτών με ορότυπο εκτός του PCV7, από 61% το 2005 σε 83% το 2007 ( $P < 0,001$ ). Ο αποικισμός με ορότυπους του εμβολίου ελαττώθηκε και στην ομάδα των ανεμβολίαστων παιδιών, γεγονός που επιβεβαιώνει το ότι άρχισε να διαφαίνεται η ανοσία της κοινότητας ως αποτέλεσμα της επέκτασης της χρήσης του PCV7. Στα επαρκώς εμβολιασμένα παιδιά διαπιστώθηκε



σημαντική ελάττωση της κυκλοφορίας στελεχών πνευμονιόκοκκου με πλήρη αντοχή στην πενικιλίνη (-94%) και στην κεφοταξίμη (-100%). Στην ίδια ομάδα παιδιών παρατηρήθηκε και ελάττωση της φορέας στελεχών που ανήκαν σε ορότυπους του εμβολίου και ήταν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη. Συμπερασματικά, η επέκταση του εμβολιασμού με PCV7 συνέβαλε στην ελάττωση φορέας στελεχών που ανήκαν σε ορότυπους του εμβολίου και στην ταυτόχρονη αύξηση του αποικισμού με στελέχη που ανήκαν σε ορότυπους που δεν περιλαμβάνονταν σε αυτό. Παράλληλα, το PCV7 συνέβαλε στη σημαντική ελάττωση της κυκλοφορίας στελεχών πνευμονιόκοκκου με πλήρη αντοχή στην πενικιλίνη.

## **Δ. SUMMARY**

Monitoring the nasopharyngeal colonization and studying the serotype distribution and antibiotic resistance of pneumococcal isolates, provides us with important information about the epidemiology of a certain geographical area. This surveillance has become of special interest after the introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7). In Greece, PCV7 became available in October 2004 and was officially incorporated in the national immunization program in January 2006. Between February 2005 and May 2007 we conducted a surveillance study regarding the nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* in children attending day-care centers in Central Greece. We obtained nasopharyngeal cultures from 1829 children aged 13-76 months in order to study the antibiotic resistance and the serotype distribution of pneumococcal isolates. The proportion of children that were vaccinated with  $\geq 1$  doses of PCV7 increased from 13% in 2005 to 70% in 2007 ( $P < 0,001$ ). On the third annual surveillance in 2007, we observed some replacement of vaccine serotypes with nonvaccine serotypes in the group of adequately vaccinated children. There was a significant decrease in the carriage of PCV7 serotypes from 33% in 2005 to 8,6% in 2007 ( $P < 0,001$ ) and a parallel increase in the proportion of non-PCV7 serotypes from 61% in 2005 to 83% in 2007 ( $P < 0,001$ ). The carriage of vaccine serotypes was also decreased among unvaccinated attendees. This result suggested that herd immunity is evident and comes as a result of the expanded use of PCV7. Among adequately vaccinated children, we noted a great decrease in the circulation of highly penicillin-resistant isolates (-94%) as well as in the proportion of cefotaxime-resistant pneumococcal isolates (-100%). In the

same group of children, we also observed a decline in the carriage of erythromycin-resistant pneumococcal isolates that belonged to PCV7 serotypes. In conclusion, the widespread use of PCV7 has contributed to a substantial reduction in the carriage of pneumococcal isolates belonging to vaccine serotypes parallel to an increase in the carriage of isolates belonging to non-PCV7 serotypes. In addition, PCV7 vaccination was followed by a significant decrease in the circulation of highly penicillin-resistant pneumococcal isolates.

**E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunizations Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46:1-24.
2. Obaro S, Adegbola R. The pneumococcus: carriage, disease, and conjugate vaccines. *J Med Microbiol* 2002; 51:98-104.
3. Hefron R. Pneumonia with special reference to *Pneumococcus Lobar Pneumonia*. New York: Commonwealth Fund; 1939 (reprinted by Harvard University Press, 1979).
4. White B, Robinson ES, Barnes LA. *The Biology of the Pneumococcus: The Bacteriological, Biochemical and Immunological Characters and Activities of Diplococcus Pneumoniae*. New York: Commonwealth Fund; 1938(reprinted by Harvard University Press, 1979).
5. Gray BM, Musher DM. The history of pneumococcal disease. In: Siber G, Klugman KP, Makela p, eds. *Pneumococcal Vaccines: The impact of Conjugate Vaccine*. Washington DC:ASM Press;2008: 3-17.
6. Musher DM, Watson DA, Dominguez EA. Pneumococcal vaccination: Work to date and future prospects. *Am J Med Sci* 1990; 300: 45-52.
7. Heidelberger M, Avery OT. The soluble specific substance of pneumococcus. *J Exp Med* 1923; 38:73.
8. Felton LD. Studies on the immunizing substances in pneumococci. *J Immunol* 1934; 27:379-93.
9. Smilie WG, Wornock GH, White HJ. A study of a type I pneumococcus epidemic at the State Hospital at Worcester, Mass. *Am J Publ Health* 1938; 28: 293-302.

10. MacLeod CM, Hodges RG, Heidelberger M, et al. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *J Exp Med* 1945; 82: 445-65.
11. Griffith F. The significance of pneumococcal types. *J Hyg(Lond)*1928; 27: 113-59.
12. Avery OT, MacLeod C, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J Exp Med* 1944: 79; 137-57.
13. Αρσένη Α. Κλινική Μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων. Αθήνα, 4<sup>η</sup> έκδοση, εκδόσεις «Ζήτα» 1994 .Τόμος Ι, σελ 144-154.
14. Weiser JN, Markiewicz Z, Tuomanen E, Wani JH. Relationship between phase variation in colony morphology, intrastain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1996; 64:2240-2245.
15. Gray BM, Converse GM, Dillon HC Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: Acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis* 1980; 142:923-33.
16. Munoz R, Fenoll A, Vicioso D, Casal J. Optochin resistant variants of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbial Infect Dis* 1999; 13:63-6
17. Pikis A, Campos JM, Rodriguez WJ, Keith JM. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Mechanism, Significance, and Clinical Implications. *J Infect Dis* 2001;184:582-90.
18. Mundy LS, Janoff EN, Schwebke KE, et al. Ambiguity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*: optochin, bile solubility, quelling, and the AccuProbe DNA tests. *Am J Clin Pathol* 1998;109:55-61.

19. Sorensen UBS. Pneumococcal polysaccharide antigens: capsules and C-polysaccharide. *Dan Med Bull* 1995; 42:47-52.
20. Guidolin A, Morona JK, Morona R, et al. Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19F. *Infect Immun* 1994; 62:5384-96.
21. Watson DA, Kapur V, Musher DM, et al. Identification, cloning, and sequencing of DNA essential for encapsulation of *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Microbiol* 1995; 31:251-9.
22. Dillard JP, Caimano M, Kelly T, Yother J. Capsules and cassettes: Genetic organization of the capsule locus of *Streptococcus pneumoniae*. *Dev Biol Stand* 1995; 85:261-5.
23. Morona JK, Morona R, Paton JC. Comparative genetics of capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* types belonging to serogroup 19. *J Bacteriol* 1999; 181:5355-64.
24. Morrison DA. Streptococcal competence for genetic transformation: regulation by peptide pheromones. *Microb Drug Resist* 1997; 3:27-37.
25. Havarstein LS, Coomaraswamy G, Morrison DA. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:11140-4.
26. Morrison DA, Lee MS. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: a link between quorum sensing and DNA processing genes. *Res Microbiol* 2000; 151:445-51.
27. Nesin M, Ramirez M, Tomasz A. Capsular transformation of a multidrug resistant *Streptococcus pneumoniae* in vivo. *J Infect Dis* 1998; 177:707-13.

28. Sorensen UB. Pneumococcal polysaccharide antigens: Capsules and C-polysaccharide. An immunochemical study. *Dan Med Bull* 1995; 42:47-53.
29. Gray BM. Pneumococcal infections in an era of multiple antibiotic resistance. *Adv Pediatr Infect Dis* 1996;11:55-99.
30. Garcia-Bustos J, Tomasz A. A biological price of antibiotic resistance : major changes in the peptidoglycan structure of penicillin- resistant pneumococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:5415-19.
31. Quagliarello V, Scheld WM. Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology and progress. *N Engl J Med* 1992;327:864-72.
32. Carlsen BD, Kawana M, Kawana C, et al. Role of the bacterial cell wall in middle ear inflammation caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1992;60:2850-54.
33. Boulnois GJ. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* 1992; 138:249-59.
34. Mitchell TJ. Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* 2000; 151:413-9.
35. Jin P, Kong F, Xiao M, Oftadech S, et al. First report of putative *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D among nasopharyngeal isolates from Fijian children. *J Infect Dis* 2009;200(9):1375-1380.
36. Calix JJ, Nahm MH. A new pneumococcal serotype 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. *J Infect Dis* 2010;202(1):29-38.
37. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995; 33(10):2759-2762.
38. Park IH, Park S, Hollinghead SK, Nahm MH. Genetic basis for the new pneumococcal serotype 6C. *Infect Immun* 2007; 75(9):4482-4489.

39. Lund E, Henrichsen J: Laboratory Diagnosis, Serology and Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. In: Methods in Microbiology, vol12. London, New York and San Francisco, Academic Press 1978:242-262.
40. Brito DA, Ramirez M, de Lencastre H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. J Clin Microbiol 2003; 41(6):2378-2384.
41. Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, et al. Genetic analysis of the capsular biosynthesis locus from all pneumococcal serotypes. PLoS Genet 2006; 2(3):e31.
42. Jourdain S, Dreze P, Vandeven J, et al. Sequential multiplex PCR assay for determining capsular serotypes of colonizing *Streptococcus pneumoniae*. BMC Infectious diseases 2011,11:100.
43. da Gloria Carvalho M, Pimenta FC, Jackson D, et al. Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. J Clin Microbiol 2010;48(5):1611-1618.
44. Antonio M, Hakeem I, Sankareh K, et al. Evaluation of sequential multiplex PCR for direct detection of multiple serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions. J Med Microbiol 2009; 58(Pt 3):296-302.
45. Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, et al. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive potential. J Infect Dis 2003; 187:1424-32.
46. Sandgren A, Sjostrom K, Olsson-Liljequist B, et al. Effect of clonal and serotype-specific properties on the invasive capacity of *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 2003; 189:785-96.



47. Feikin DR, Klugman KP. Historical changes in pneumococcal serogroup distribution: implications for the era of pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Infect Dis* 2002; 35:547-55.
48. Feiken DR, Davis M, Nwanyanwu OC, et al. Antibiotic resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* colonizing rural Malawian children. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:564-67.
49. Jeberaj R, Cherian T, Raghupathy P, et al. Nasopharyngeal colonization of infants in Southern India with *Streptococcus pneumoniae*. *Epidemiol Infect* 1999; 123:383-88.
50. Mbelle N, Huebner RE, Wasas AD, et al. Immunogenicity and impact of nasopharyngeal carriage of a nonavalent pneumococcal conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1999; 180:1171-76.
51. Smith T, Lehmann D, Montgomery J, et al. Acquisition and invasiveness of different serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in young children. *Epidemiol Infect* 1993; 111:27-39.
52. Scott JA, Hall AJ, Hannington A, et al. Serotype distribution and prevalence of resistance to benzylpenicillin in three representative populations of *Streptococcus pneumoniae* isolates from the coast of Kenya. *Clin Infect Dis* 1998; 27:1442-50.
53. Syrogiannopoulos GA, Katopodis GD, Grivea IN, Beratis NG. Antimicrobial use and serotype distribution of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates recovered from Greek children younger than 2 years old. *Clin Infect Dis* 2002; 35:1174-82.
54. Yagupsky P, Porat N, Fraser D, et al. Acquisition, carriage and transmission of pneumococci with decreased antibiotic susceptibility in young

children attending a day care facility in southern Israel. *J Infect Dis* 1998; 177: 1003-12.

55. Hsueh PR, Luh KT. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:1487-91.

56. Muhlemann K, Matter HC, Tauber MG, Bodmer T. Nationwide surveillance of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with respiratory infection, Switzerland, 1998-1999. *J Infect Dis* 2003; 187:589-96.

57. Corso A, Severina EP, Petruk VF, et al. Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing respiratory disease in the United States. *Microb Drug Resist* 1998; 4:325-37.

58. Gherardi G, Whitney CG, Facklam RR, Beall B. Major related sets of antibiotic-resistant pneumococci in the United States as determined by pulse-field gel electrophoresis and *pbp1a-pbp2b-pbp2x-dhf* restriction profiles. *J Infect Dis* 2000; 181:216-29.

59. Richter SS, Heilmann KP, Coffman SL, et al. The molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1994-2000. *Clin Infect Dis* 2002; 34:330-39.

60. Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, et al. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part II. *Clin Infect Dis* 2000; 30:122-40.

61. Dagan R, Givon-Lavi N, Shkolnik L, et al. Acute otitis media caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in southern Israel: implications for immunizing with conjugate vaccines. *J Infect Dis* 2000; 181:1322-29.

62. Doit C, Loukil C, Geslin P, Bingen E. Phenotypic and genetic diversity of invasive pneumococcal isolates recovered from French children. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2994-98.
63. Hausdoff WP, Yothers G, Daran R, et al. Multinational study of pneumococcal serotypes causing acute otitis media in children. *Ped Infect Dis J* 2002; 21: 1008-16.
64. Dagan R, Givon-Lavi N, Bar-Ziv J, Porat N. The association of nasopharyngeal (NP) *S. pneumoniae* (Pnc0 serotypes with community – acquired alveolar pneumonia (CAAP0 determined by WHO standardization of interpretation of chest radiographs in children (WHO-SICR). 4th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases; Helsinki, Finland; May 9-13, 2004. Abstract 44.
65. Miller E, Waight P, Efstratiou A, Brisson M, et al. Epidemiology of invasive and other pneumococcal disease in children in England and Wales 1996-1998. *Acta Paediatr Suppl* 2000; 89:11-16.
66. Kaltoft MS, Zeuthen N, Konradsen HB. Epidemiology of invasive pneumococcal infections in children aged 0-6 years in Denmark: a 19-year nationwide surveillance study. *Acta Paediatr Suppl* 2000; 89:3-10.
67. Paragi M, Kolman J, Kraigher A, et al. Possibility of application of new pneumococcal conjugate vaccines in children in Slovenia. *Vaccine* 2003; 21:4708-14.
68. Rudolph KM, Parkinson AJ, Reasonover AJ, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Alaska, 1991-1998. *J Infect Dis* 2000; 182:490-96.

69. Goldblatt D, Ashton L, Southern J, et al. Immunogenicity and boosting following a reduced number of doses of pneumococcal conjugate vaccine in infants and toddlers. Programme and Abstracts of 4th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD-4 2004); Helsinki, Finland; May 9-13, 2004. Abstract NEW-06.

70. Pilishvilli T, Farley M, Vasquez M, et al. Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Abstracts of 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Chicago, IL, USA; Sept 14-17, 2003. Abstract G-1079.

71. Klugman KP. Efficacy of pneumococcal conjugate vaccines and their effect on carriage and antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis* 2001; 1: 85-91.

72. Black S, Shinefield H, Fireman B, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 187-95.

73. Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, et al. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med* 2003; 349: 1341-48.

74. O Brein KL, Moulton LH, Reid R, et al. Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal in American Indian children: group randomised trial. *Lancet* 2003; 362: 355-61.

75. Kim PE, Musher DM, Glezen WP, et al. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution, and the isolation of respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 100-06.

76. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 100-21.
77. Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004;4; 144-54.
78. Lloyd Evans N, O'Dempsey TJD, Baldech I, et al. Nasopharyngeal carriage of pneumococci in Gambian children and their families. *Ped Infect Dis J* 1996; 15: 866-71.
79. Gratten M, Montgomery J, Gerega G, et al. Multiple colonization of the upper respiratory tract of Papua New Guinea children with *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health* 1989; 20: 501-09.
80. Fredericksen B, Hendrichsen J. Throat carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* among infants and children in Zambia. *J Trop Pediatr* 1988; 34:114-17.
81. Obaro SK, Adegbola RA, Banya WAS, Greenwood BM. Carriage of pneumococci after pneumococcal vaccination. *Lancet* 1996; 348: 271-72.
82. Vives M, Garcia ME, Saenz P, et al. Nasopharyngeal colonization in Costan Rican children during the first year of life. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 852-58.
83. Syrjanen RK, Kilpi TM, Kaijalainen TH, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Finnish children younger than 2 years old. *J Infect Dis* 2001; 184:451-59.

84. Principi N, Marchisio P, Schito GC, Manneli S. Risk factors for carriage of respiratory pathogens in the nasopharynx of healthy children. Ascanius Project Collaborative Group. *Ped Infect Dis J* 1999; 18: 517-23.
85. Ghaffar F, Friedland IR, McCracken GH, Jr. Dynamics of nasopharyngeal colonization of *Streptococcus pneumoniae*. *Ped Infect Dis J* 1999; 18: 638-46.
86. Bogaert D, Engelen MN, Timmers-Rekar AJ, et al. Pneumococcal carriage in children in the Netherlands: a molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3316-20.
87. Bruyn GA, Zegers BJ, van Furth R. Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1992; 14:251-62.
88. Watson DA, Musher DM. A brief history of the pneumococcus in biomedical research. *Semin Respir Infect* 1999; 14:198-208.
89. Bruyn GA, van Furth R. Pneumococcal polysaccharide vaccines: indications, efficacy and recommendations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10:897-910.
90. Tuomanen EI. The biology of pneumococcal infection. *Pediatr Res* 1997; 42:253-58.
91. Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, et al. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 1995; 377:435-38.
92. McCullers JA, Rehg JE. Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor. *J Infect Dis* 2002; 186: 341-50.

93. Rosenow C, Ryan P, Weiser JN, et al. Contribution of novel choline – binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 1997; 25:819-29.
94. Watson DA, Musher DM, Verhoef J. Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. Eur J Microbiol Infect Dis 1995;14:479-90.
95. Cundell DR, Pearse BJ, Sandros J, et al. Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eukaryotic cells. Infect Immun 1995; 63:2493-98.
96. Krivan HC, Roberts DD, Ginsberg V. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc B1-4-Gal found in some glycolipids. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:6157-61.
97. Sundberg-Kovamees M, Holme T, Sjorgren A. Interaction of the C-polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* with the receptor asialo-GM1. Microb Pathog 1996; 21: 233-4.
98. Weiser JN, Austrian R, Sreenivasan PK, et al. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. Infect Immun 1994; 62: 2582-2589.
99. Cundell DR, Tuomanen EI. Receptor specificity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type-II pneumocytes and vascular endothelial cells in vitro. Microb Pathog 1994; 17:361-374.
100. Gillespie SH, Balakrishnan I. Pathogenesis of pneumococcal infection. J Med Microbiol 2000; 49: 1057-67.
101. Johnson RB Jr. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. Rev Infect Dis 1991; 13:S509-S517.

102. Angel CS, Ruzek M, Hostetter MK. Degradation of C3 by *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1994;170:600-8.
103. Mitchell TJ, Andrew PW. Biological properties of pneumolysin. Microb Drug Resist 1997;3:19-26.
104. Alexander JE, Lock R, Peeters CC, et al. Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 1994;62:5683-8.
105. McDaniel LS, Sheffield JS, Delucchi P, Briles DE. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one serotype. Infect Immun 1991; 59:222-8.
106. Tart RC, McDaniel LS, Ralph BA, Briles DE. Truncated *Streptococcus pneumoniae* PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice. J Infect Dis 1996; 173:380-6.
107. Berry AN, Paton JC, Hansman D. Effect of insertional inactivation of the genes encoding pneumolysin and autolysin on the virulence of *Streptococcus pneumoniae* type 3. Microb Pathog 1992; 12:87-93.
108. Berry AM, Lock RA, Hansman D, Paton JC. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 1989; 57:2324-30.
109. Paton JC, Berry AM, Lock R. Molecular analysis of putative pneumococcal virulence proteins. Microb Drug Resist 1997; 3:1-10
110. Lock RA, Hansman D, Paton JC. Comparative of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by *Streptococcus pneumoniae*. Microb Pathog 1992; 12:137-43.



111. Winkelstein JA, Tomatz A. Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal cell wall teichoic acid. *J Immunol* 1978; 120:174-8.
112. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, et al. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis* 1985; 151:859-68.
113. Winkelstein JA, Bocchini JA, Schiffman G. The role of the capsular polysaccharide in the activation of the alternative pathway by the pneumococcus. *J Immunol* 1976; 116:367-70
114. Rodriguez-Barradas MC, Das TS, Watson DA, Musher DM. Relative contribution of cell wall and capsular polysaccharides in activating alternative and classical complement pathways by *Streptococcus pneumoniae*. *Med Microbiol Lett* 1993; 2:427-35.
115. Musher DM. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis* 1992; 14:801-809.
116. Austrian R. Pneumococcal pneumonia. Diagnostic, epidemiologic, therapeutic and prophylactic considerations. *Chest* 1986; 90:738-743.
117. Gillepsie SH. Aspects of pneumococcal infection including bacterial virulence, host response and vaccination. *J Med Microbiol* 1989; 237-248.
118. Reynolds HM. Immunoglobulin G and its function in the human respiratory tract. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 161-174.
119. Tarkowski A, Lue C, Moldoveanu H, et al. Immunization of humans with polysaccharide vaccines induces systemic, predominantly polymeric IgA2-subclass antibody responses. *J Immunol* 1990; 144:3770-3778.

120. Simmel B, Korkeila M, Kilpi TM, Kayhty M. Pneumococcal carriage and otitis media induce salivary antibodies to pneumococcal surface adhesion A, pneumolysin, and pneumococcal surface protein A in children. *J Infect Dis* 2001; 183, 887-96.
121. Rapola S, Janntti V, Haikala R, et al. Natural development of antibodies to pneumococcal surface protein A, pneumococcal surface adhesin A, and pneumolysin in relation to pneumococcal carriage and acute otitis media. *J Infect Dis* 2000; 182: 1146-52.
122. Fedson DS, Musher DM, Eskola J. Pneumococcal vaccine. In: Plotkin SA Orenstein WA, eds. *Vaccines* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1988; 553-608.
123. Musher DM, Chapman AJ, Goree A, et al. Natural and vaccine-related immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1986; 154: 245-56.
124. Romero-Steiner S, Libutti D, Pais LB, et al. Standardization of an opsonophagocytic assay for the management of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4:415-22.
125. Musher DM, Groover JE, Reichler MR, et al. Emergence of antibody to capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* during outbreaks of pneumoniae: association with nasopharyngeal colonization. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 441-6.
126. Gray BM, Dillon HC Jr. Epidemiological studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: Antibody to types 3,6, 14, and 23 in the first two years of life. *J Infect Dis* 1988; 158:948-55.

127. Prober CG, Frayha H, Klein M, Schiffman G. Immunologic responses of children to serious infections with *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1983; 148:427-35.
128. Konradsen HB, Oxelius V-A, Hanson LA. The importance of G1m and 2 allotypes for the IgG2 antibody levels and avidity against pneumococcal polysaccharide type 1 within mono- and dizygotic twin-pairs. Scand Immunol 1994; 40:251-56.
129. Samukawa T, Yamanaka N, Hollingshead S, et al. Immune responses to specific antigens of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* in the respiratory tract. Infect Immun 2000; 68:1569-73.
130. Soininen A, Pursiainen H, Kilpi T, Kayhty H. Natural development of antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides depends on the serotype: association with pneumococcal carriage and acute otitis media in young children. J Infect Dis 2001; 184:569-76.
131. Faden H. The microbiologic and immunologic basis for recurrent otitis media in children. Eur J Ped 2001; 160:407-13.
132. Raz R, Elhanan G, Shimoni Z, et al. Pneumococcal bacteremia in hospitalized Israeli adults: Epidemiology and resistance to penicillin. Clin Infect Dis 1997; 24:1164-68.
133. Dowell SF, Butler JC, Giebink GS, et al. Acute otitis media: Management and surveillance in an era of pneumococcal resistance – a report from the Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. Pediatr Infect Dis J. 1999;18:1-9.
134. Teele DW, Klein JO, Rosner B, Greater Boston Otitis Media Study Group. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in

children in greater Boston: a prospective, cohort study. *J Infect Dis* 1989;160: 83-94.

135. Jacobs MR, Dagan R, Appelbaum PC, Burch DJ. Prevalence of antimicrobial resistant pathogens in middle ear fluid: multinational study of 917 children with acute otitis media. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42: 589-95.

136. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, et al. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *J Infect Dis* 1997; 175:1440-5.

137. Alter SJ. Pneumococcal infections. *Ped Rev* 2009; 30: 155-64.

138. Eldan M, Leibovitz E, Piglanski L, et al. Predictive value of nasopharyngeal cultures for the assessment of nonresponsive acute otitis media in children. *Ped Infect Dis J* 2000; 19:298-303.

139. Revai K, Mamidi D, Chonmaitree T. Association of nasopharyngeal bacterial colonization during upper respiratory tract infection and the development of acute otitis media. *Clin Infect Dis* 2008; 46:e34-7.

140. Rodgers GL, Arguedas A, Cohen R, Dagan R. Global serotype distribution among *Str. Pneumoniae* isolates causing otitis media in children: Potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine* 2009;27: 3802-3810.

141. Sethi S, Evans N, Grant BJ, et al. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2002; 347:465-71.

142. Klein JO: Bacterial pneumonias. In: Feigin, Cherry, Denmler-Harrison, Kaplan eds. Textbook of Pediatric infectious diseases, 5th ed. Saunders 2004; 299-311.
143. Bennett IL.Jr, and Beeson PB. Bacteremia: Aconsideration of some experimental and clinical aspects. Yale J. Biol. Med. 26;241-262,1954.
144. Michelow IC, Lozano J, Olsen K, et al. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* lower respiratory infection in hospitalized children by culture, polymerase chain reaction, serological testing and urinary antigen detection. Clin Infect Dis 2002; 34:e1-11.
145. Alpern E, Alessandrini E, McGowan K, et al. Serotype prevalence of occult pneumococcal bacteremia.Pediatrics 2001; 108:e23.
146. Lee GM, Harper MB. Risk of bacteremia for febrile young children in the post- Haemophilus influenzae type b era. Arch Pediatr Adolesc Med. 1998; 152:624-28.
147. Eavery RD, Gao Y, Schuknecht HF, et al. Otologic features of bacterial meningitis of childhood. J Pediatr 1985;136:2025-29.
148. Fillon S, Soulis K, Rajasekaran S, et al. Platelet activating factor receptor and innate immunity: uptake of gram-positive bacterial cell wall into host cells and cell-specific pathophysiology. J Immunol 2006; 177:6182-91.
149. Bogaert D, Hermans PWM, Adrian PV, et al. Pneumococcal vaccines: an update on current strategies.Vaccine 2004; 22:2209-20.
150. Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices(ACIP). MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997, 46(RR-8), 1-24.

151. Rubins JB, Alter M, Loch J, Janoff EN. Determination of antibody responses of elderly adults to all 23 capsular polysaccharides after pneumococcal vaccination. *Infect Immun* 1999; 67:5979-84.
152. Koskela M, Leinonen M, Haiva VM. First and second dose antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in infants. *Ped Infect Dis* 1986; 5:45-50.
153. O'Brein KL, Steinhoff MC, Edwards K, et al. Immunologic priming of young children by pneumococcal glycoprotein conjugate, but not polysaccharide, vaccines. *Ped Infect Dis J* 1996; 15:425-30.
154. Wadwa RP, Feigin RD. Pneumococcal vaccine: an update. *Pediatrics* 1999;103:1035-7.
155. Poland GA. The burden of pneumococcal disease and the role of conjugate vaccines. *Vaccine* 1999;17:1674-9.
156. Butler JC, Shapiro ED, Carlone GM. Pneumococcal vaccines: history, current status, and future directions. *Am J Med* 1999;107:69S-76S.
157. Fedson DS. Pneumococcal vaccination in the United States and 20 other developed countries, 1981-1996. *Clin Infect Dis* 1998; 26:1117-23.
158. Obaro SK, Huo Z, Banya WA, et al. A glycoprotein pneumococcal conjugate vaccine primes for antibody responses to a pneumococcal polysaccharide vaccine in Gambian children. *Ped Infect Dis J* 1997; 16:1135-40.
159. Breukels MA, Rijkers GT, Voorhorst-Ogink MM, et al. Pneumococcal conjugate vaccine primes for polysaccharide-inducible IgG2 antibody response in children with recurrent otitis media acuta. *J Infect Dis* 1999; 179:1152-6.

160. Austrian R. The pneumococcus at the millennium: not down, not out. *J Infect Dis* 1999;179:S338-41.
161. Musher DM, Groover JE, Watson DA, et al. IgG responses to protein-conjugated pneumococcal capsular polysaccharides in persons who are genetically incapable of responding to unconjugated polysaccharides. *Clin Infect Dis* 1998;27:1487-1490.
162. Romero-Steiner S, Musher DM, Cetron MS, et al. Reduction in functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* in vaccinated elderly individuals highly correlates with decreased IgG antibody avidity. *Clin Infect Dis*.1999;29:281-88.
163. Rodriguez-Barradas MC, Musher DM, Lahart C, et al. Antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* after vaccination of human immunodeficiency virus-infected subjects with 23-valent pneumococcal vaccine. *J Infect Dis* 1992;165:553-56.
164. Jakson LA, Neuzil KM, Yu O, et al. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine in older adults. *N Engl J Med*2003;348:1747-55.
165. Shapiro ED, Berg AT, Austrian R, et al. The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N Engl J Med*. 1991;325:1453-60.
166. Klein JO. The pneumococcal conjugate vaccine arrives: a big win for kids. *Ped Infect Dis J* 2000;19:181-2.
167. Sorensen RU, Leiva LE, Giangrosso PA, et al. Response to a heptavalent conjugate *Streptococcus pneumoniae* vaccine in children with recurrent infections who are unresponsive to the polysaccharide vaccine. *Ped Infect Dis J* 1998;17:685-91.

168. Pelton SI, Dagan R, Gaines BM, et al. Pneumococcal conjugate vaccines: Pneumococcal conjugate vaccines: proceedings from an Interactive Symposium at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Vaccine* 2003; 21:1562-71.
169. Black SB, Shinefield H, Ling S, et al. Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children younger than 5 years of age for prevention of pneumonia. *Ped Infect Dis J* 2002;21:810-5.
170. Shinefield HR, Black S, Ray P, et al. Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal CRM197 conjugate vaccine in infants and toddlers. *Ped Infect Dis J* 1999;18(9):757-63.
171. Fireman B, Black SB, Shinefield H, et al. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:10-6.
172. Kaplan SL, Mason EO, Wald ER, et al. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* 2004; 113(3 Pt ):443-9.
173. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, et al. Efficacy of pneumococcal conjugate vaccine against otitis media. *N Engl J Med* 2001;344:403-9.
174. Dagan R, Muallem M, Melamed R, et al. Reduction of pneumococcal nasopharyngeal carriage in early infancy after immunization with tetravalent pneumococcal vaccines conjugated to either tetanus toxoid or diphtheria toxoid. *Ped Infect Dis J* 1997;16:1060-4.
175. Laksman R, Murdoch C, Race G, et al. Pneumococcal nasopharyngeal carriage in children following heptavalent pneumococcal conjugate vaccination in infancy . *Arch Dis Child* 2003;88:211-4.



176. Dagan R, Givon-Lavi N, Zamir O, et al. Reduction of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* after administration of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine to toddlers attending day care centers. *J Infect Dis* 2002;185:927-36.
177. Dagan R, Muallem M, Melamed R, et al. Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. *J Infect Dis* 1996;174:1271-8.
178. Nieminen T, Kayhty H, Leroy O, Eskola J. Pneumococcal conjugate vaccination in toddlers: mucosal antibody response measured as circulating antibody secreting cells and as salivary antibodies. *Ped Infect Dis J* 1999;18:764-72.
179. Dagan R, Sikuler-Cohen M, Zamir O, et al. Effect of conjugate pneumococcal vaccine on the occurrence of respiratory infections and antibiotic use in day-care center attendees. *Ped Infect Dis* 2001;20:951-8.
180. Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2000, 49(RR-9), 1-35.
181. Veenhoven R, Bogaert D, Uiterwaal C, et al. Effect of pneumococcal vaccine followed by polysaccharide pneumococcal vaccine on recurrent acute otitis media. *Lancet* 2003;361:2189-95.
182. Nuorti JP, Whitney CG; Centers for Disease Control and Prevention(CDC). Prevention of pneumococcal disease among infants and children- use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal conjugate vaccine- recommendations of the Advisory

Committee on Immunization Practices(ACIP). MMWR Recomm Rep. 2010 Dec 10;59(RR-11):1-18.

183. Lucero MG, Dulalia VE, Nillos LT, et al. Pneumococcal conjugate vaccines for preventing vaccine-type invasive pneumococcal disease and X-ray defined pneumonia in children less than two years of age. Cochrane Database Syst Rev 2009 Oct 7;(4):CD004977.

184. Briles DE, Hollingshead SK, Nabors GS, et al. The potential of using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. Vaccine 2000;19(Suppl 1):S89-95.

185. Briles DE, Tart RC, Swiato E, et al. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). Clin Microbiol Rev 1998;11(4):645-57.

186. Wu HY, Nahm MH, Guo Y, et al. Intranasal immunization of mice with PspA (pneumococcal surface protein A) can prevent intranasal carriage, pulmonary infection, and sepsis with *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1997; 175(4):839-46.

187. Faden H, Stanievich J, Brodsky L, et al. Changes in nasopharyngeal flora during otitis media of childhood. Pediatr Infect Dis J 1990;9(9):623-6.

188. Figueiredo AM, Connor JD, Severin A, et al. A pneumococcal clinical isolate with high level resistance to cerotaxime and ceftriaxone. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36:886-9.

189. Effects of new penicillin susceptibility breakpoints for *Streptococcus pneumoniae*- United States, 2006-2007. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2008;57:1353-1357.

190. European Committee on Antimicrobial Testing (EUCAST). Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0 [[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_2.0\\_120221.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0_120221.pdf)].
191. Champers HF. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *J Infect Dis* 1998;179(Suppl):S353-9.
192. Smith AM, Klugman KP, Coffey TJ, et al. Genetic diversity of penicillin-binding protein 2B and 2X genes from *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:859-67.
193. Maiden MCJ. Horizontal genetic exchange, evolution and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clin Infect Dis* 1998;27(Suppl):S12-20.
194. Dowson CG, Coffey TJ, Kell C, et al. Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; The role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S.pneumoniae*. *Mol Microbiol*. 1993;9:635-43.
195. Musher DM, Dowell ME, Shortridge VD, et al. Emergence of macrolide resistance during treatment of pneumococcal pneumonia. *N Engl J Med* 2002;346:630-1.
196. Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:171-96.
197. Hooper DC. Quinolones. In: Mandell GL, Dolin R(eds). Principles and practice of infectious diseases, 5th ed. New York, NY: Churchill Livingstone, 2000; 404-23.
198. Adrian PV, Klugman KP. Mutations in the dihydrofolate reductase gene of trimethoprim-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2406-13.

199. Papayachee T, Klugman KP. Novel expansions of the gene encoding dihydropteroate synthase in trimethoprim-sulfomethoxazole-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2225-30.
200. Sahm DF, Brown MP, Draghi DC, et al. Tracking resistance among bacterial respiratory tract pathogens: Summary of findings of the Trust Surveillance Initiative, 2001-2005. *Postgrad Med* 2008;120(Suppl 1):8-15.
201. Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med* 2009;360:244-256.
202. Harbath S, Albrich W, Brun-Buisson C. Outpatient antibiotic use and prevalence of antibiotic-resistant pneumococci in France and Germany: A sociocultural perspective. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:1460-7.
203. Doern GV, Richter SS, Miller A, et al. Antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: Have we begun to turn the corner on resistance to certain antimicrobial classes? *Clin Infect Dis* 2005; 41:139-48.
204. Schrag SJ, Beall B, Dowell SF. Limiting the spread of resistant pneumococci: biological and epidemiologic evidence for the effectiveness of alternative interventions. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:588-601.
205. Coffey TJ, Enright MC, Daniels M, et al. Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1998;27:73-83.
206. Klein JO. The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. *Rev Infect Dis* 1981;3:246-253.

207. Sleeman KL, Griffiths D, Shackley F, Diggle L, Gupta S, Maiden MC, et al. Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. *J Infect Dis* 2006;194:682-688.
208. Kellner JD, Ford-Jones EL, Members of the Toronto Child Care Study Group. *Streptococcus pneumoniae* carriage in children attending 59 Canadian child care centers. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1999; 153: 495-502.
209. Arason VA, Kristinsson KG, Sigurdson JA, et al. Do antimicrobials increase the carriage rate of penicillin resistant pneumococci in children? Cross sectional study. *BMJ* 1996; 313: 387-91.
210. Guillemot D, Carbon C, Balkau B, et al. Low dosage and long treatment duration of beta-lactam: risk factors for carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *JAMA* 1998; 279: 365-70.
211. Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, Beratis NG, Spiliopoulou AE, Fasola EL, Bajaksouzian S, et al. Resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* from carriers attending day-care centers in Southwestern Greece. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 188-194.
212. Nunes S, Sá-Leão R, Carriço J, Alves CR, Mato R, Avô AB, et al. Trends in drug resistance, serotypes, and molecular types of *Streptococcus pneumoniae* colonizing preschool-age children attending day care centers in Lisbon, Portugal: a summary of 4 Years of Annual surveillance. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1285–1293.
213. Dagan R, Givon-Lavi N, Zamir O, Fraser D. Effect of a nonavalent conjugate vaccine on carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in day-care centers. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22: 532–540.

214. Hennessy TW, Singleton RJ, Bulkow LR, Bruden DL, Hurlburt DA, Parks D, et al. Impact of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on invasive disease, antimicrobial resistance and colonization in Alaska Natives: progress towards elimination of a health disparity. *Vaccine* 2005; 23:5464–5473.
215. Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, Craig AS, Hadler J, Reingold A, et al. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med* 2006; 354:1455–1463.
216. Whitney CG, Pilishvili T, Farley MM, Schaffner W, Craig AS, Lynfield R, et al. Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case-control study. *Lancet* 2006;368: 1495-1502.
217. Grijalva CG, Nuorti JP, Arbogast PG, Martin SW, Edwards KM, Griffin MR. Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunisation with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis. *Lancet* 2006; 369: 1179-1186.
218. Messina AF, Katz-Gaynor K, Barton T, Ahmad N, Ghaffar F, Rasko D, et al. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Dallas,TX, children from 1999 through 2005. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:461-467.
219. Pelton SI, Huot H, Finkelstein JA, Bishop CJ, Hsu KK, Kellenberg J, et al. Emergence of 19A as virulent and multidrug resistant pneumococcus in Massachusetts following universal immunization of infants with pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:468-472.

220. Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS, et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis* 2007;196:1346-1354.
221. Κανακούδη-Τσακαλίδου Φ. Εμβολιασμοί 2005. Νέα εμβόλια στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών. *Παιδιατρ Β Ελλάδας* 2005;17:213–230.
222. Centers for Disease Control and Prevention. Preventing pneumococcal disease among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2000; 49:1–35.
223. American Academy of Pediatrics. Pneumococcal infections. In: Pickering LK, Baker CJ, Long SS, McMillan JA, editors. *Red Book. 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases. 27<sup>th</sup> ed.* Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics 2006: 525–537.
224. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth Informational Supplement M100-S18; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
225. Cohen R, Levy C, de La Rocque F, Gelbert N, Wollner A, Fritzell B, et al. Impact of pneumococcal conjugate vaccine and of reduction of antibiotic use on nasopharyngeal carriage of nonsusceptible pneumococci in children with acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:1001-1007.
226. Moore MR, Hyde TB, Hennessy TW, Parks DJ, Reasonover AL, Harker-Jones M, et al. Impact of a conjugate vaccine on community-wide carriage of nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in Alaska. *J Infect Dis* 2004;190:2031–2038.

227. Huang SS, Platt R, Rifas-Shiman SL, Pelton SI, Goldmann D, Finkelstein JA. Post-PCV7 changes in colonizing pneumococcal serotypes in 16 Massachusetts Communities, 2001 and 2004. *Pediatrics* 2005;116:e408-e413.
228. Sa-Leao R, Nunes S, Brito-Avo A, et al. Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centers attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(11):1002-7.
229. Spijkerman J, van Gils EJ, Veenhoven RH, et al. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* 3 years after start of vaccination program, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2011;17(4):584-91.
230. Cohen R, Levy C, Bonnet E, et al. Dynamic of nasopharyngeal carriage in children with acute otitis media following PCV7 introduction in France. *Vaccine* 2010;28: 6114-6121.
231. Cohen R, Levy C, Bonnet E, et al. Risk factors for serotype 19A carriage after introduction of 7-valent pneumococcal vaccination. *BMC Infect Dis* 2011;11:95.
232. Huang SS, Hinrichsen VL, Stevenson AE, et al. Continued impact of pneumococcal conjugate vaccine on carriage in young children. *Pediatrics* 2009;124:e1-e11.
233. Porat N, Greenberg D, Givon-Lavi N, Shuval DS, Treffer R, Segev O, et al. The important role of nontypable *Streptococcus pneumoniae* international clones in acute conjunctivitis. *J Infect Dis* 2006; 194:689-696.



234. Sá-Leão R, Simoes AS, Nunes S, Sousa NG, Frazão N, de Lencastre H. Identification, prevalence and population structure of non-typable *Streptococcus pneumoniae* in carriage samples isolated from preschoolers attending day-care centres. *Microbiology* 2006; 152: 367-376.
235. Hammitt LL, Bruden DL, Butler JC, Baggett HC, Hurlburt DA, Reasonover A, et al. Indirect effect of conjugate vaccine on adult carriage of *Streptococcus pneumoniae*: an explanation of trends in invasive pneumococcal disease. *J Infect Dis* 2006;193: 1487-1494.
236. Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis* 2005;5: 83-93.
237. O'Brien TF. The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (Suppl 1): S2-8.
238. Maraki S, Samonis G, Galanakis E. Serotypes and susceptibilities of pediatric clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Crete, Greece, before and after the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:1449-51.
239. Harboe ZB, Thomsen RW, Riis A, et al. Pneumococcal serotypes and mortality following invasive pneumococcal disease: A population-based cohort study. *PLoS Med* 2009;6(5):e100081.



