



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Α. Συρογιαννόπουλος**

**Το είδος της πρόσφατης αντιμικροβιακής θεραπείας  
ως παράγων αυξημένης φορέας  
ανθεκτικών στελεχών *Streptococcus pneumoniae*  
σε παιδιά εμβολιασμένα με το  
επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Αλεξάνδρα Γ. Τσαντούλη**

**Λάρισα, Ιούλιος 2015**

© 2015 Αλεξάνδρα Τσαντούλη

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).

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**1<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**(Επιβλέπων)**

**Δρ. Γεώργιος Α. Συρογιαννόπουλος**

Καθηγητής Παιδιατρικής,

Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**2<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Ιωάννα Γριβέα**

Επίκουρος Καθηγήτρια Παιδιατρικής,

Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**3<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Μαρία Παπαγρηγορίου-Θεοδωρίδου**

Καθηγήτρια Παιδιατρικής Λοιμωξιολογίας,

Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού

Πανεπιστημίου Αθηνών

**4<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Γεώργιος Νταλέκος**

Καθηγητής Παθολογίας,

Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**5<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Ευθυμία Πετεινάκη**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας,

Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**6<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Νικόλαος Σκεντέρης**

Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής,

Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**7<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Σταύρος Διαμαντόπουλος**

Λέκτορας Παιδιατρικής - Παιδοενδοκρινολογίας,

Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή ολοκληρώθηκε με τη συμβολή και πνευματική καθοδήγηση ανθρώπων που εκτιμώ ιδιαίτερως και στους οποίους θέλω να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής μου, κύριο Γεώργιο Συρογιαννόπουλο, Καθηγητή Παιδιατρικής και Διευθυντή της Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τον οποίο σέβομαι και εκτιμώ απεριόριστα. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου πορείας και θεωρώ τιμή μου το γεγονός ότι με επέλεξε ως συνεργάτη του. Τον ευχαριστώ για την ανεκτίμητη συμβολή του στην επιστημονική μου εξέλιξη και την εκπαίδευσή μου ως παιδίατρου. Μου προσέφερε τη δυνατότητα να εργαστώ στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παιδιατρικών Λοιμώξεων της Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και οι γνώσεις και οι εμπειρίες που μου μετέδωσε είναι πολύτιμες. Η επιστημονική αρτιότητα, ο επαγγελματισμός και η μεθοδικότητα που τον διακρίνουν αποτέλεσαν για εμένα πηγή έμπνευσης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην κυρία Ιωάννα Γριβέα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, της οποίας ο ρόλος υπήρξε καθοριστικός για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Την ευχαριστώ για την επιστημονική καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Προσέφερε με προθυμία και ανιδιοτέλεια τις γνώσεις και την εμπειρία της για την καλύτερη δυνατή εκπαίδευσή μου στην απομόνωση, την ταυτοποίηση, τον έλεγχο αντοχής και την οροτυπία του πνευμονιόκοκκου, καθώς και στην εκπαίδευσή μου ως παιδίατρου. Η ενεργός συνεισφορά και οι επιστημονικές συμβουλές της υπήρξαν πολύτιμες, και η συνεργασία μαζί της μου προσέφερε πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες.

Ευχαριστώ θερμά την κυρία Μαρία Παπαγρηγορίου-Θεοδωρίδου, Καθηγήτρια Παιδιατρικής Λοιμωξιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη συμμετοχή της στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή.

Ευχαριστώ θερμά τον κύριο Νικόλαο Σκεντέρη, Επίκουρο Καθηγητή Παιδιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την συμμετοχή του στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή και την συμβολή του στην εκπαίδευσή μου ως παιδίατρου.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον κύριο Γεώργιο Νταλέκο, Καθηγητή Παθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, την κυρία Ευθυμία Πετεινάκη,

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και τον κύριο Σταύρο Διαμαντόπουλο, Λέκτορα Παιδιατρικής – Παιδοενδοκρινολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμβολή τους στην αξιολόγηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ηλία Ζιντζαρά, Καθηγητή Βιομετρικών – Βιομετρίας, και την κυρία Αφροδίτη Παπαθανασίου, επιστημονική συνεργάτιδα του εργαστηρίου Βιομετρικών – Βιομετρίας, για την καθοδήγησή τους στη διενέργεια της στατιστικής ανάλυσης της μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ερευνητές και υποψηφίους διδάκτορες με τους οποίους συνεργάστηκα όλα αυτά τα χρόνια, στην προσπάθειά μου να ολοκληρώσω την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Το πιο μεγάλο όμως ευχαριστώ και το μεγαλύτερο μέρος της ευγνωμοσύνης μου το οφείλω δικαιωματικά στην οικογένεια μου, η οποία ήταν η δύναμή μου όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Ευχαριστώ θερμά τους αγαπημένους μου γονείς, τον αδερφό μου και τον σύζυγό μου για την ηθική συμπαράσταση, την ανοχή που επέδειξαν αδιαμαρτύρητα και τη βοήθεια που μου παρείχαν ο καθένας με τον δικό του τρόπο αυτά τα χρόνια. Δεν μπορεί να περιγραφεί με ένα απλό ευχαριστώ, ο σεβασμός και η αγάπη που νιώθω για τους γονείς μου και πόσο ευγνώμων είμαι για την ολόψυχη αγάπη και διαρκή υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια. Απλά, τους οφείλω τα πάντα.

*Στις κορούλες μου,  
που έχουν κάνει την μεγαλύτερη  
υπομονή από όλους χωρίς να το γνωρίζουν*

## **ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

### **ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Όνοματεπώνυμο: Αλεξάνδρα Γ. Τσαντούλη  
Διεύθυνση κατοικίας: Μανδηλαρά 36, Λάρισα, 41222  
Τηλέφωνο: 2413010370, 6973384374  
Ημερομηνία γεννήσεως: 13 Δεκεμβρίου 1982  
Τόπος γεννήσεως: Λάρισα  
Υπηκοότητα: Ελληνική  
Οικογενειακή κατάσταση: Παντρεμένη, δύο παιδιά  
Ηλεκτρονική διεύθυνση: [atsantouli@hotmail.com](mailto:atsantouli@hotmail.com)

### **ΣΠΟΥΔΕΣ**

2000: Απολυτήριο Λυκείου, 1<sup>ο</sup> Λύκειο Λάρισας  
2006: Πτυχίο Ιατρικής Σχολής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (Λίαν Καλώς)  
Οκτώβριος 2007: Υποψήφια διδάκτορας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

11/6/2007 - 10/12/2008: Ιατρός Υπηρεσίας Υπαίθρου, Κέντρο Υγείας Αγίας, Ν. Λάρισας  
27/5/2010 - 24/2/2011: Ειδικευόμενη στην Παιδιατρική Κλινική του Γ.Ν. Λάρισας  
25/2/2011 – 22/1/2015: Ειδικευόμενη στην Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ**

3/2007 - 12/2012: Ερευνητικό Εργαστήριο Παιδιατρικών Λοιμώξεων Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας: απομόνωση, ταυτοποίηση, έλεγχος αντοχής και οροτυπία πνευμονιόκοκκου και στρεπτόκοκκου ομάδας Α

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Grivea IN, Panagiotou M, **Tsantouli AG**, Syrogiannopoulos GA. Impact of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among day-care center attendees in central Greece. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 6: 519-525.
2. Grivea IN, **Tsantouli AG**, Chryssanthopoulou DC, Syrogiannopoulos GA. Interaction of the heptavalent pneumococcal conjugate 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.
3. Grivea IN, **Tsantouli AG**, Michoula AN, Syrogiannopoulos GA. Dynamics of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage with high heptavalent pneumococcal conjugate vaccine coverage in Central Greece. *Vaccine* 2011;29: 8882-7.
4. 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 Infectious Diseases* 2012; 12:255
5. Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, Al-Lahham A, Panagiotou M, **Tsantouli AG**, Michoula AN, Reinert RR, van der Linden M. Seven-year surveillance of emm types of pediatric Group A streptococcal pharyngitis isolates in Western Greece. *PloS One* 2013:e71558. doi: 10.1371/journal.pone.0071558
6. Grivea IN, Priftis KN, Giotas A, Kotzia D, **Tsantouli AG**, Douros K, Michoula AN, Syrogiannopoulos GA. Dynamics of pneumococcal carriage among day-care center attendees during the transition from the 7-valent to the higher-valent pneumococcal conjugate vaccines in Greece. *Vaccine* 2014; 32:6513–20.

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Grivea IN, Panagiotou M, **Tsantouli AG**, Syrogiannopoulos GA. Impact of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: Three years of annual surveillance in day-care centers in Central Greece. 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, Illinois, USA, 2007.
2. Grivea IN, Panagiotou M, **Tsantouli AG**, Syrogiannopoulos GA. Impact of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among day-care center attendees in central Greece. 6th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, Reykjavik, Iceland, 2008.
3. Grivea IN, Panagiotou M, **Tsantouli AG**, Michoula AN, Syrogiannopoulos GA. Antibiotic pressure drives nasopharyngeal carriage of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among heptavalent pneumococcal conjugate vaccine recipients in Central Greece. 48<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy and the Infectious Diseases Society of America, Washington, DC, October 2008.

4. Grivea IN, **Tsantouli AG**, Sourla AI, Syrogiannopoulos GA. The 2005-2009 Study of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in day-care centers in Central Greece: Annual variation in the replacing nonvaccine serotypes. 49<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy and the Infectious Diseases Society of America, San Francisco, California, USA, 2009.
5. Grivea I, **Tsantouli A**, Sourla A, Syrogiannopoulos G. Temporal trends of nasopharyngeal carriage of serotype 6C *Streptococcus pneumoniae* in Greece. 7<sup>th</sup> International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, Tel Aviv, Israel, March 2010.
6. Katopodis GD, Grivea IN, **Tsantouli AG**, Pourmaras S, Petinaki E, Syrogiannopoulos GA. Fusidic acid and clindamycin resistance in community-associated (CA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children of Central Greece. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy and the Infectious Diseases Society of America, Boston, Massachusetts, USA, 2010.
7. Grivea IN, Giotas A, Kotzia D, Douros K, **Tsantouli A**, Priftis KN, Nicolaidou P, Syrogiannopoulos GA. Serotypes not included in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine dominate the nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among children attending day-care centers in Greece. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy and the Infectious Diseases Society of America, Chicago, Illinois, USA, September 2011.
8. Grivea IN, Giotas A, Kotzia D, Douros K, **Tsantouli AG**, Priftis KN, Nicolaidou P, Syrogiannopoulos GA. Serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage among children attending day-care centers in Greece during 2011. 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Thessaloniki, Greece, May 2012.
9. Giotas A, Kotzia D, Grivea IN, **Tsantouli AG**, Attilakos A, Syrogiannopoulos GA, Fretzayas A. Timeliness of pneumococcal conjugate vaccination in Greece. 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Thessaloniki, Greece, May 2012.

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΟΣΙΑ

Γριβέα Ι, Στάρη Ν, **Τσαντούλη Α**, Δημητρίου-Μπαλάσκα Μ, Πελεκούδα Ε, Γρηγορίου Κ, Μεριστούδη Σ, Γκάγκα Φ, Ζυγογιώργος Α, Μπουραντά Α, Γερογιάννης Χ, Μυσίρης Σ, Συρογιαννόπουλος Γ. Φορεία του ρινοφάρυγγα σε παιδιά <24 μηνών με οξεία μέση ωτίτιδα στη Λάρισα (Απρίλιος 2008-Μάρτιος 2009). 47ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Χανιά, 2009.



## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Γεώργιος Α. Συρογιαννόπουλος**, Καθηγητής Παιδιατρικής,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπων**)
2. **Δρ. Ιωάννα Γριβέα**, Επίκουρος Καθηγήτρια Παιδιατρικής, Τμήμα  
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Μαρία Παπαγρηγορίου-Θεοδωρίδου**, Καθηγήτρια Παιδιατρικής  
Λοιμωξιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>A. Γενικό μέρος.....</b>	<b>11</b>
1. Ιστορική αναδρομή.....	12
2. Μικροβιολογία.....	18
3. Εργαστηριακές μέθοδοι.....	31
4. Αποικισμός του ρινοφάρυγγα.....	40
5. Πνευμονιοκοκκική νόσος.....	46
6. Μηχανισμοί άμυνας του ξενιστή.....	64
7. Παράγοντες που προδιαθέτουν σε πνευμονιοκοκκική λοίμωξη.....	68
8. Κλινικές εκδηλώσεις.....	71
9. Δραστικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων.....	84
10. Αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων.....	92
11. Αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.....	97
12. Ανοσοπροφύλαξη – ενεργητική ανοσοποίηση.....	114
 <b>B. Ειδικό μέρος.....</b>	<b>134</b>
1. Εισαγωγή.....	135
2. Μέθοδοι.....	138
3. Αποτελέσματα.....	146
4. Συζήτηση.....	187
 <b>Γ. Περίληψη – Summary.....</b>	<b>196</b>
 <b>Δ. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>200</b>

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Ο πνευμονιόκοκκος (στρεπτόκοκκος της πνευμονίας) αποτελεί σημαντικό παθογόνο μικροοργανισμό για τον άνθρωπο. Έχει αναγνωρισθεί από πολύ παλιά ως η κύρια αιτία της πνευμονίας, της μηνιγγίτιδας, της ρινοκολπίτιδας, και της μέσης ωτίτιδας. Αποτελεί λιγότερο συχνό αίτιο ενδοκαρδίτιδας, σηπτικής αρθρίτιδας, και περιτονίτιδας και ασυνήθιστο αίτιο ποικίλων άλλων λοιμωδών παθήσεων [1]. Ανήκει στη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του ρινοφάρυγγα και αποτελεί το πρότυπο εξωκυττάριο παθογόνο βακτήριο με έλυτρο (κάψα). Έχει την ικανότητα να ανθίσταται στη φαγοκυττάρωση, σε απουσία των ειδικών για τον τύπο αντισωμάτων, και να αντιγράφεται σε ιστούς θηλαστικών, προκαλώντας πνευμονία, μέση ωτίτιδα, μηνιγγίτιδα, και μεγάλο αριθμό άλλων κλινικών εκδηλώσεων [2].

Μια σύντομη ανασκόπηση της ιστορίας του πνευμονιόκοκκου, τεκμηριώνει τον σημαντικό ρόλο που έπαιξε αυτός ο οργανισμός στην ιστορία και ανάπτυξη της μικροβιολογίας, της γενετικής, της ανοσολογίας, της αντιμικροβιακής θεραπείας και της ανοσοποίησης με τα εμβόλια [1-4]. Ιστορικά, ο πνευμονιόκοκκος σχετίζεται πιο στενά με τη λοβώδη πνευμονία, καθώς αρχικά έγινε ορατός σε βρογχικές εκκρίσεις και πνευμονικούς ιστούς από τον Klebs το 1875 και αργότερα αναγνωρίστηκε ως η κύρια αιτία αυτής της ασθένειας. Ο παθογενετικός του ρόλος δεν είχε ακόμη εκτιμηθεί όταν απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1880 [2-3]. Το 1881, ο οργανισμός αναγνωρίστηκε ταυτόχρονα από τον Pasteur στην Γαλλία, ο οποίος τον ονόμασε *Microbe septicémique du salive*, και από τον Sternberg στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο οποίος τον ονόμασε *Micrococcus pasteurii*. Ο Sternberg τον απομόνωσε από κουνέλι στο οποίο είχε γίνει ένεση με τον δικό

του σίελο, και ο Pasteur τον απομόνωσε από κουνέλι στο οποίο είχε γίνει ένεση με σίελο από ένα παιδί που είχε αποβιώσει από λύσσα [1-4]. Στα τέλη της δεκαετίας του 1880 χρησιμοποιούνταν κυρίως ο όρος *πνευμονιόκοκκος* επειδή αυτό το βακτήριο είχε αναγνωριστεί ως η πιο συχνή αιτία της λοβώδους πνευμονίας. Το όνομα του γένους *Διπλόκοκκος* προσδιορίστηκε το 1926 λόγω της εμφάνισής του σε πτύελα μετά από Gram χρώση, και το 1974 ο οργανισμός μετονομάστηκε για μια ακόμα φορά σε *Στρεπτόκοκκο της πνευμονίας* λόγω της μορφολογίας του κατά την ανάπτυξή του σε υγρό θρεπτικό υλικό [1, 3].

Το 1881 ο Friedländer παρατήρησε διπλόκοκκους και αλυσίδες κόκκων σε πνευμονικούς ιστούς στους περισσότερους από τους 50 ασθενείς του με πνευμονία [3]. Εκείνη τη χρονική περίοδο, ο Christian Gram πειραματίζονταν στο εργαστήριο του Friedländer με τεχνικές για την οπτικοποίηση του βακτηρίου σε παθολογικά δείγματα. Ο Gram εξέτασε τμήματα πνευμονικού ιστού από ασθενείς που είχαν πεθάνει από πνευμονία, εξέθεσε τα δείγματα διαδοχικά σε ιώδες της ανιλίνης-γεντιανής. Ο Gram βρήκε ότι αυτοί οι ιστοί περιέχουν πολλά ζεύγη από ελαφρώς επιμηκυμένους κόκκους οι οποίοι διατηρούσαν το σκούρο χρώμα του ιώδους της ανιλίνης-γεντιανής. Η αποτυχία των άλλων βακτηρίων στα δείγματα του Gram να διατηρήσουν το ιώδες της ανιλίνης-γεντιανής απέδειξε ένα φαινόμενο το οποίο θα αποτελέσει έναν από τους ακρογωνιαίους λίθους της κλινικής μικροβιολογίας – δηλαδή, ότι σχεδόν όλα τα κλινικά σημαντικά βακτήρια είναι είτε Gram-θετικά είτε Gram-αρνητικά. Έτσι, η ταυτοποίηση του οργανισμού διευκολύνθηκε από την Gram χρώση που δημοσιεύτηκε το 1884 και στην οποία συγκεκριμένοι κόκκοι (Gram-θετικοί) διατηρούν τη χρώση με το ιώδες της γεντιανής παρά τη χρήση

ιωδίου και αιθανόλης [3-5]. Το 1886 ο Fraenkel παρείχε την πρώτη ολοκληρωμένη περιγραφή του πνευμονιόκοκκου, υποστήριξε την αιτιολογική του συσχέτιση με τη λοβώδη πνευμονία και ταυτοποίησε ότι πρόκειται για τον ίδιο μικροοργανισμό που είχε περιγραφεί από τους Sternberg και Pasteur. Από τότε αυτός ο οργανισμός αναφέρονταν ως πνευμονιόκοκκος λόγω της τάσης του να προκαλεί πνευμονική νόσο. Επίσης, ο Fraenkel υπήρξε από τους πρώτους που αναγνώρισε τις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις και σε άλλα σημεία του σώματος σε συνδυασμό με την πνευμονία. Περιέγραψε πνευμονιόκοκκους σε εκκρίσεις της χοριοειδούς μήνιγγας σε ασθενή που απεβίωσε από μηνιγγίτιδα, αλλά δεν μπορούσε να καθορίσει εάν η μηνιγγίτιδα ήταν πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής μετά από πνευμονία. Την ίδια χρονική περίοδο, από το 1881 έως το 1886, ο Weichselbaum επανέλαβε και επέκτεινε το έργο των Friedländer και Fraenkel. Στην μελέτη, ορόσημο για την καριέρα του, επιβεβαίωσε ότι ο πνευμονιόκοκκος παρατηρήθηκε μικροσκοπικά στους πνεύμονες 94 από 127 ασθενών με πνευμονία και απομονώθηκε από 54 καλλιέργειες [3].

Ο πνευμονιόκοκκος ήταν ο πρώτος εξωκυττάριος παθογόνος μικροοργανισμός που ανακαλύφθηκε. Δηλαδή σε απουσία αντισώματος αυτό το βακτήριο αντιστέκεται στη φαγοκυττάρωση και αντιγράφεται εξωκυττάρια στους ιστούς θηλαστικών. Στις αρχές της δεκαετίας του 1890, οι Felix και Georg Klempner έδειξαν ότι ο εμβολιασμός με νεκρούς πνευμονιόκοκκους σε πειραματόζωα παρείχε προστασία σε αυτά έναντι επακόλουθης πνευμονιοκοκκικής επαφής και, επιπλέον, ότι αυτή η προστασία μπορούσε να μεταφερθεί με έγχυση ορού από τα ανοσοποιημένα πειραματόζωα σε φυσικούς αποδέκτες. Διαδοχικά, ο ορός από άτομα τα οποία είχαν αναρρώσει

από πνευμονιοκοκκική πνευμονία βρέθηκε ότι προκαλεί τον ίδιο βαθμό ανοσοπροστασίας. Το 1891 ο ανοσολόγος Elie Metchnikoff ήταν ο πρώτος που παρατήρησε τη συγκόλληση των πνευμονιόκοκκων σε παρουσία ορού από ανοσοποιημένα πειραματόζωα [2-4]. Λίγα χρόνια αργότερα (1897), οι Bezançon και Griffon παρείχαν μια επίσημη περιγραφή της συγκόλλησης σε ανοσοποιημένο ορό και παρατήρησαν ότι «υπάρχουν αρκετές φυλές πνευμονιόκοκκων που συμπεριφέρονται ως διαφορετικά μικρόβια». Στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα ο Neufeld παρουσίασε την μακροσκοπικά ορατή συγκόλληση, καθώς και την μικροσκοπικά ορατή εξοίδηση του εξωτερικού ελύτρου μετά από προσθήκη ειδικού αντιορού σε εναιώρημα πνευμονιόκοκκων. Έτσι το 1902 ανέπτυξε την αντίδραση Quellung ή δοκιμασία εξοίδησης του ελύτρου. Ως η βάση αυτής της ανοσίας αποδείχτηκε από τους Neufeld και Rimpau (1904) ότι είναι η παρουσία παραγόντων στον ορό οι οποίοι διευκολύνουν τη φαγοκυττάρωση από τα λευκά αιμοσφαίρια, μια διαδικασία η οποία ονομάστηκε οψωνοποίηση (προέρχεται από την ελληνική λέξη όψων που σημαίνει έδεσμα). Αυτές οι παρατηρήσεις παρείχαν τη βάση γι' αυτό που σήμερα ονομάζουμε χυμική ανοσία [2-4].

Οι ορότυποι αναγνωρίστηκαν μετά από την παρατήρηση ότι η έγχυση νεκρών οργανισμών σε ένα κουνέλι διέγειρε την παραγωγή αντισωμάτων του ορού τα οποία συγκολλούνται και προκαλούν εξοίδηση του ελύτρου του ανοσοποιημένου στελέχους, όπως επίσης και μερικών άλλων, αλλά όχι όλων των άλλων πνευμονιοκοκκικών στελεχών. Το 1910 οι Neufeld και Haendel ταξινόμησαν τα στελέχη πνευμονιόκοκκου από ασθενείς με επιβεβαιωμένη πνευμονιοκοκκική πνευμονία σε δύο ομάδες, ανάλογα με το αν σκότωναν πειραματόζωα (ποντίκια) που είχαν εμβολιαστεί με στελέχη πνευμονιόκοκκου

του τύπου I ή του τύπου II. Λίγο αργότερα (1913) οι Dochez και Gillespie αναγνώρισαν τους τρεις πιο συχνούς τύπους, τους οποίους ονόμασαν I, II και III, καθώς και την ετερογενή ομάδα IV. [2-4] Από την ομάδα IV προέκυψαν τελικά οι υπόλοιποι ορότυποι του πνευμονιόκοκκου. Πριν το 1960 είχαν περιγραφεί 85 διαφορετικοί ορότυποι, κυρίως μέσα από τις έρευνες των Cooper, Eddy, Morch και Lund.

Την πρώτη δεκαετία του 20<sup>ου</sup> αιώνα, οι Maynard, Lister, Wright, και άλλοι ξεκίνησαν να εφαρμόζουν τις αρχές της χυμικής ανοσίας για το πρόβλημα της επιδημικής λοβώδους πνευμονίας η οποία κάθε χρόνο προσέβαλλε 1 στους 10 άντρες οι οποίοι εργάζονταν στα ορυχεία της Αφρικής. Ο εμβολιασμός (1911) των εργαζομένων στα ορυχεία με νεκρούς πνευμονιόκοκκους προκάλεσε σημαντική ελάττωση της συχνότητας της πνευμονίας [2, 3]. Το 1917, οι Dochez και Avery περιέγραψαν μια διαλυτή ειδική ουσία που βρήκαν στον ορό και τα ούρα ασθενών με πνευμονιοκοκκική λοβώδη πνευμονία, καθώς και στο αίμα πειραματόζωων που είχαν μολυνθεί με πνευμονιόκοκκο. Αυτή η ουσία σχημάτιζε ίζημα με τον ειδικό αντιορό για τον ομόλογο πνευμονιόκοκκο. Την δεκαετία του 1920, οι Heidelberger και Avery απομόνωσαν την ουσία αυτή από τον πνευμονιόκοκκο τύπου II και την αναγνώρισαν ως πολυσακχαρίτη. Απέδειξαν ότι το αντίσωμα το οποίο ήταν υπεύθυνο για την ανοσία αντιδρούσε με πολυσακχαρίτες της επιφανείας του ελύτρου. Αργότερα ο Heidelberger συμπέρανε ότι ο πολυσακχαρίτης του ελύτρου είναι η ουσία που καθορίζει την ειδικότητα του κάθε τύπου [3, 4]. Σύντομα ο Felton παρασκεύασε τους πρώτους κεκαθαρμένους πολυσακχαρίτες του ελύτρου του πνευμονιόκοκκου για ανοσοποίηση ανθρώπων, και η παρασκευή του πολυσακχαρίτη τύπου 1 χρησιμοποιήθηκε



για να αναστείλει μια επιδημία πνευμονίας σε ένα κρατικό νοσοκομείο στην Worcester, Massachusetts, το 1938. Αυτές οι μελέτες υποστήριζαν ότι ένα ειδικό βακτηριακό πολυσακχαριδικό αντιγόνο μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να διεγείρει αντισώματα της χυμικής ανοσίας τα οποία παρέχουν προστασία ενάντια σε επιδημικές λοιμώξεις του ανθρώπου. Επιπλέον επιβεβαίωση δόθηκε κατά τη διάρκεια του 2<sup>ου</sup> Παγκοσμίου Πολέμου (1942-1944), όταν ο MacLeod και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι ο εμβολιασμός νεοσύλλεκτων του στρατού με υλικό του ελύτρου από τέσσερις ορότυπους του πνευμονιόκοκκου ελάττωσε σημαντικά την συχνότητα της πνευμονίας που προκαλούνταν από τους ορότυπους στο εμβόλιο, αλλά όχι από τους άλλους πνευμονιοκοκκικούς ορότυπους. Μετά τον 2<sup>ο</sup> Παγκόσμιο Πόλεμο, ένα εξαδύναμο εμβόλιο εγκρίθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες, αλλά δεν χρησιμοποιήθηκε σε μεγάλο βαθμό, επειδή πολλοί ιατροί είχαν ήδη στραφεί στα αντιμικροβιακά ως την εύκολη θεραπεία των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων [1-4].

Ο πνευμονιόκοκκος έπαιξε επίσης κεντρικό ρόλο στην ανακάλυψη του DNA. Πειράματα τα οποία έγιναν από τον Griffith την δεκαετία του 1920 έδειξαν ότι η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση ζώντων, χωρίς έλυτρο (μεταλλαγμένων) πνευμονιόκοκκων μαζί με νεκρούς φέροντες έλυτρο πνευμονιόκοκκους σε ποντίκια οδήγησε στην εμφάνιση βιώσιμων, με έλυτρο βακτηρίων. Ονόμασε αυτή τη διαδικασία μεταμόρφωση. Αυτή η παρατήρηση παρέμεινε ανεξήγητη μέχρι την δεκαετία του 1940, όταν ο Avery και οι συνεργάτες του παρείχαν αποδεικτικά στοιχεία ότι αυτοί οι μεταλλάκτες ανάκτησαν την ικανότητα να παράγουν έλυτρο παίρνοντας το DNA από νεκρούς, λοιμογόνους οργανισμούς – με άλλα λόγια, ότι το DNA είναι υπεύθυνο για την

μεταμόρφωση και, στην πραγματικότητα, είναι το γενετικό υλικό το οποίο κωδικοποιεί τον φαινότυπο [1-4].

## 2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

### 2.1. Γενικά

Ο πνευμονιόκοκκος είναι Gram-θετικός κόκκος, προαιρετικά αναερόβιος και ανήκει στο γένος *Streptococcus* της οικογένειας Streptococcaceae. Οι πνευμονιόκοκκοι περιγράφονται ως διπλόκοκκοι σχήματος λόγχης αλλά συχνά εμφανίζονται ως στρεπτοκοκκικές αλυσίδες σε καλλιέργεια αίματος ή σε υγρό θρεπτικό υλικό. Είναι μικροοργανισμοί με σύνθετες τροφικές ανάγκες, οι οποίοι απαιτούν πλούσιο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ή ζώντα οργανισμό για ανάπτυξη και δεν επιζούν σε θερμοκρασία δωματίου ή σε φυσιολογικό ορό. Όπως και οι άλλοι στρεπτόκοκκοι, είναι καταλάση αρνητικοί μικροοργανισμοί, αλλά χρησιμοποιούν το οξυγόνο μέσω ενός συστήματος φλαβοενζύμου για να παράγουν  $H_2O_2$ . Επειδή δεν μπορούν να διασπάσουν το  $H_2O_2$  δεν αναπτύσσονται καλά στην απουσία καταλάσης, την οποία μπορούν να προμηθεύονται από τα ερυθροκύτταρα του υλικού καλλιέργειας ή από τους ιστούς του ξενιστή κατά την λοίμωξη [1, 2]. Οι πνευμονιόκοκκοι παράγουν πνευμολυσίνη (παλαιότερα ονομάζονταν α-αιμολυσίνη), η οποία διασπά την αιμοσφαιρίνη σε μια πράσινη χρωστική, και ως αποτέλεσμα οι αποικίες του πνευμονιόκοκκου περιβάλλονται από μία πράσινη ζώνη κατά την ανάπτυξή του σε τρυβλία με αιματούχο άγαρ. Η ανάπτυξη των πνευμονιόκοκκων αναστέλλεται από την αιθυλική υδροκουπρεΐνη (οπτοχίνη), και οι

μικροοργανισμοί διαλύονται στα χολικά άλατα. Συνεπώς, οι πνευμονιόκοκκοι ταυτοποιούνται στο μικροβιολογικό εργαστήριο από τέσσερις αντιδράσεις: (1) α-αιμόλυση στο αιματούχο άγαρ, (2) αρνητική αντίδραση καταλάσης, (3) ευαισθησία στην οπτοχίνη, και (4) διαλυτότητα στα χολικά άλατα. Η διαπίστωση ότι μερικοί πνευμονιόκοκκοι είναι ανθεκτικοί στην οπτοχίνη οδήγησε σε μεγαλύτερη χρήση της διαλυτότητας στα χολικά άλατα για την οριστική ταυτοποίηση. [1]

Το κύτταρο του πνευμονιόκοκκου περιβάλλεται από λιποπολυσακχαριδική κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα. Πολυάριθμες γέφυρες συνδέουν τη μεμβράνη με το κυτταρικό τοίχωμα. Όλο αυτό το σύνολο καλύπτεται από ένα πολυσακχαριδικό έλυτρο, το οποίο χαρακτηρίζει τον πνευμονιόκοκκο.

## **2.2. Πνευμονιοκοκκικό έλυτρο**

Το καθοριστικό δομικό και αντιγονικό χαρακτηριστικό των πνευμονιόκοκκων είναι το πολυσακχαριδικό έλυτρο. Σχεδόν κάθε κλινικό στέλεχος πνευμονιόκοκκου περιέχει ένα εξωτερικό έλυτρο. Το έλυτρο αποτελείται από επαναλαμβανόμενους ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι συντίθενται μέσα στο κυτταρόπλασμα, πολυμερίζονται, και μεταφέρονται στην επιφάνεια του βακτηρίου από τρανσφεράσες της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτοί οι πολυσακχαρίτες συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό με την πεπτιδογλυκάνη και τον C- πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο εξηγεί τη δυσκολία διαχωρισμού του ελύτρου από τον πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος. Το έλυτρο είναι ο κύριος λοιμογόνος παράγοντας του πνευμονιόκοκκου. [1, 2]

Οι πολυσακχαρίτες του ελύτρου αναστέλλουν την οψωνοποίηση και τη φαγοκυττάρωση. Η οψωνοποίηση των περισσότερων τύπων πνευμονιόκοκκου απαιτεί την παρουσία αντισώματος έναντι του ελύτρου. Οι πνευμονιόκοκκοι με έλυτρο έχουν πολύ μεγαλύτερη επιφάνεια που πρέπει να καλυφθεί με οψωνίνες, και το έλυτρο δυσκολεύει τον ομοιοπολικό δεσμό με το κλάσμα C3 και την μετατροπή του σε ενεργό C3b. Όταν ειδικά για τον τύπο αντισώματα είναι παρόντα, 2 έως 4 φορές περισσότερο C3 εναποτίθεται στην επιφάνεια του ελύτρου. Αυτό βοηθάει πολύ στην αναγνώριση, προσκόλληση, κατάποση, και καταστροφή από τα φαγοκύτταρα. Η λοιμογόνος δύναμη, ωστόσο, δεν εξαρτάται πλήρως από τον τύπο του ελύτρου ή από το σημείο της λοίμωξης, αλλά μπορεί να επηρεάζεται και από ιδιότητες του είδους του ξενιστή. [2]

Οι πολυσακχαρίτες του ελύτρου αποτελούνται από μακρά πολυμερή από επαναλαμβανόμενες μονάδες 2 έως 7 μονοσακχαριτών. Κάποιες από τις επαναλαμβανόμενες μονάδες είναι γραμμικοί πολυσακχαρίτες, και μερικοί έχουν διακλαδωμένες αλυσίδες. Άλλοι έχουν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και μοιάζουν με τειχοϊκά οξέα. Οι πιο σύνθετοι πολυσακχαρίτες αποτελούνται πιθανόν από επαναλαμβανόμενες υποομάδες ολιγοσακχαριτών που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα από πρόδρομους μονοσακχαρίτες. Τα πολυμερή επιμηκύνονται με την προσθήκη των υποομάδων αυτών στο εγγύς άκρο της αλυσίδας και τελικά καθλώνονται στην πεπτιδογλυκάνη και στον C-πολυσακχαρίτη πάνω στο κυτταρικό τοίχωμα. Εξαίρεση αποτελεί ο τύπος 3, ο οποίος παράγει άφθονες ποσότητες υλικού του ελύτρου, από το οποίο λίγο, αν όχι καθόλου, είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο σε δομές του κυτταρικού τοιχώματος. [2]

### 2.3. Κυτταρικό τοίχωμα

Όπως και στους άλλους στρεπτόκοκκους, η πεπτιδογλυκάνη και το τειχοϊκό οξύ αποτελούν τα κύρια συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος του πνευμονιόκοκκου.

Η πεπτιδογλυκάνη συντίθεται ενδοκυττάρια από πρόδρομους δισακχαρίτες από N-ακετυλγλυκοζαμίνη (GlcNAc) και N-ακετυλμουραμικό οξύ (MurNAc). Δηλαδή αποτελείται από μακρές αλυσίδες από εναλλασσόμενα N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη και N-ακετυλμουραμικό οξύ, από το οποίο εκτείνονται αλυσίδες από τέσσερα έως έξι αμινοξέα που ονομάζονται στελεχιαία πεπτίδια [1, 2]. Τα στελεχιαία πεπτίδια συνδέονται με γέφυρες πενταγλυκίνης, οι οποίες παρέχουν σημαντική σταθερότητα στο κυτταρικό τοίχωμα. Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την διασταυρούμενη σύνδεση των αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης περιλαμβάνουν έξι τρανσπεπτιδάσες και τρανσκαρβοξυλάσες περισσότερο γνωστές ως πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs) 1a, 1b, 2a, 2b, 2x, και 3. Οι PBPs 1a και 1b έχουν δύο λειτουργίες, καταλύουν τη σύνδεση των υποομάδων δισακχαρίτη σε μια ενζυματική θέση και συνδέουν διασταυρούμενα τα στελεχιαία πεπτίδια σε άλλη θέση. Οι PBPs 2b και 2x είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και είναι σημαντικές στα ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη. Η PBP 3 είναι ένα χαμηλού μοριακού βάρους ένζυμο το οποίο λειτουργεί κυρίως στη διαίρεση του κυττάρου. Το πρότυπο στελεχιαίο πεπτίδιο αποτελείται από το πενταπεπτίδιο L-αλανίνη - D-ισογλουταμίνη - L-λυσίνη - D-αλανίνη - D-αλανίνη. Οι πνευμονιόκοκκοι, ωστόσο, χρησιμοποιούν μια ευρεία σειρά από στελεχιαία πεπτίδια τα οποία είναι σημαντικά στην ανάπτυξη αντοχής στα β-λακταμικά αντιμικροβιακά. Το κυτταρικό τοίχωμα συνεχώς ανακατασκευάζεται κατά τη

διάρκεια της ανάπτυξης και της κυτταρικής διαίρεσης. Η αποσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης ελέγχεται από αυτολυτικά ένζυμα. Το μουραμικό διπεπτίδιο (MurNAc-D-alanyl-D-isoglutamine) είναι η ελάχιστη ενεργής μονάδα των προϊόντων διάσπασης της πεπτιδογλυκάνης. Πολλά από αυτά τα προϊόντα είναι πολύ φλεγμονώδη και είναι υπεύθυνα για τις περισσότερες τοξικές επιδράσεις που χαρακτηρίζουν τις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις. [2]

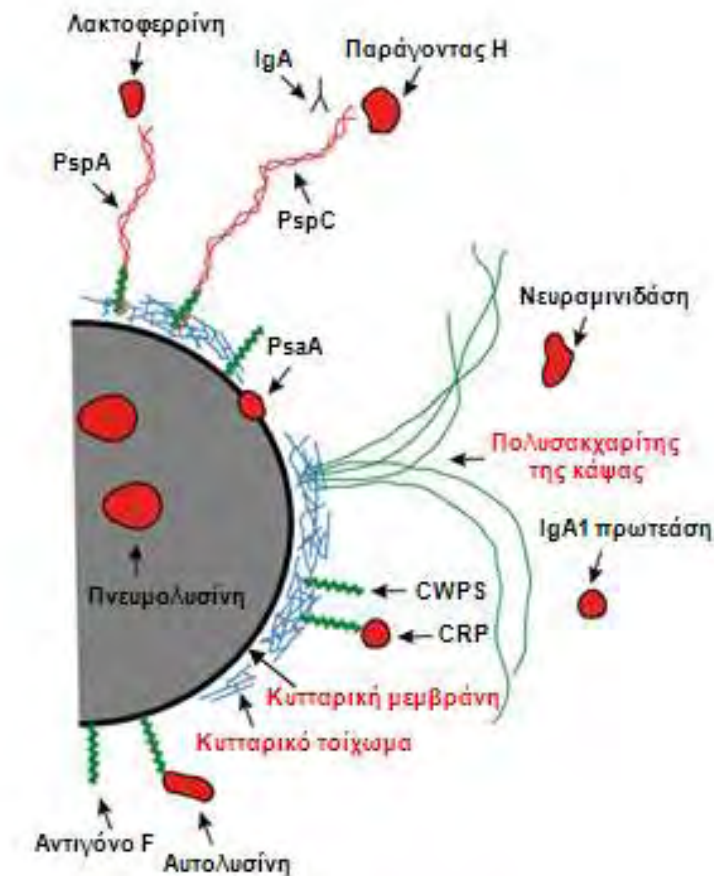
Το τειχοϊκό οξύ, ένα υδρογονανθρακικό πολυμερές το οποίο περιέχει φωσφορυλχολίνη, είναι συνδεδεμένο με ομοιοπολικό δεσμό στην πεπτιδογλυκάνη και πιθανόν και στο λιποτειχοϊκό οξύ στην εξώτατη επιφάνεια του βακτηριακού τοιχώματος και προεξέχει μέσα στο έλυτρο. Το τειχοϊκό οξύ μαζί με στερεά προσκολλημένα κλάσματα της πεπτιδογλυκάνης σχηματίζουν τον C-πολυσακχαρίτη, μια ουσία η οποία είναι παρούσα σε όλους τους πνευμονιόκοκκους, ενώ ανιχνεύεται μόνο σε λίγα είδη του πρασινίζοντα στρεπτόκοκκου. Αυτή η περιοχή είναι υπεύθυνη για την αντίδραση των πνευμονιόκοκκων με πρωτεΐνες οι οποίες εμφανίζονται στην κυκλοφορία του αίματος σε ορισμένες παθήσεις (ονομάζονται πρωτεΐνες οξείας φάσης ή C-αντιδρώσες πρωτεΐνες) ή που απαντώνται σε μερικές περιπτώσεις του πολλαπλού μυελώματος. [1]

Πολλές πρωτεΐνες εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου. Σ'αυτές περιλαμβάνονται πέντε πρωτεΐνες δεσμευτικές της πενικιλίνης (PBPs), δύο νευραμινιδάσες και μία IgA πρωτεάση. Σημαντική ομάδα πρωτεϊνών είναι αυτές που δεσμεύουν τη χολίνη (CBPs) και περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες A (PspA) και C (PspC) της επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου, την προσκολλητίνη (αντχεσίνη) A της επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου (PsaA), την πρωτεΐνη C που δεσμεύει τη χολίνη, την πνευμολυσίνη, διάφορες

αυτολυσίνες και άλλες πρωτεΐνες που όλες φαίνεται να έχουν κάποιο ρόλο στη λοιμογόνο δύναμη. [1]

Η πρωτεΐνη A της επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου (PspA) βρίσκεται υποχρεωτικά σε όλα τα κλινικά σημαντικά στελέχη πνευμονιόκοκκου. Η PspA είναι μια ελικοειδής πρωτεΐνη η οποία παρουσιάζει ποικιλία μεταξύ των ορότυπων όσον αφορά το μοριακό μέγεθος και τους αντιγονικούς επιτόπους αλλά είναι γενετικά σταθερή για οποιοδήποτε στέλεχος. Η PspA παίζει ρόλο στη λοιμογόνο δύναμη των πνευμονιόκοκκων, και τα αντισώματα έναντι των πιο συχνών επιτόπων προστατεύουν τα πειραματόζωα από την πειραματική λοίμωξη. [2]

Η χαρακτηριστική τριών στιβάδων κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από λιπίδια και τειχοϊκό οξύ και ονομάζεται F αντιγόνο λόγω της διασταυρούμενης αντίδρασης με τα Forssman αντιγόνα.



**Εικόνα 1.** Δομή του πνευμονιόκοκκου. (PspA: πρωτεΐνη A της επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου, PspC: πρωτεΐνη C της επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου, PsaA: προσκολλητίνη A της επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου, CWPS: πολυσακχαρίτης του κυτταρικού τοιχώματος)

## 2.4. Ένζυμα

Η αυτολυσίνη, μια αυτολυτική αμιδάση (N-acetyl-muramoyl-L-alanine amidase), φυσιολογικά διαχωρίζει τα θυγατρικά κύτταρα σε διπλόκοκκους στο τέλος της κυτταρικής διαίρεσης, διασπά τους οργανισμούς στο τέλος της εκθετικής ανάπτυξης, και ίσως καθιστά τα κύτταρα ικανά για μεταμόρφωση. Οι μεταλλάκτες με ελαττωματικές αμιδάσες αποτυγχάνουν να διαιρεθούν σε φυσιολογικούς διπλόκοκκους ή να λυθούν όταν εκτίθενται στις πενικιλίνες.



Ένα δεύτερο αυτολυτικό ένζυμο είναι μια γλυκοσιδάση η οποία διασπά τις σακχαριδικές μονάδες της πεπτιδογλυκάνης. Και τα δύο ένζυμα αναστέλλονται από τα τειχοϊκά οξέα και τη χολίνη, τα οποία είναι προϊόντα διάσπασης του C-πολυσακχαρίτη. Αυτός ο μηχανισμός αρνητικής ανάδρασης πιθανώς χρησιμεύει στο να ρυθμίζει τη διαδικασία της αυτόλυσης και ευνοεί την επιβίωση κάποιων κυττάρων μέσα σε έναν πληθυσμό ο οποίος φυσιολογικά ξεκινά να αυτοκαταστρέφεται στο τέλος της εκθετικής φάσης της ανάπτυξης. Τα αυτολυσίνη-αρνητικά στελέχη είναι λιγότερο λοιμογόνα και τα αντισώματα έναντι του ενζύμου αυτού προκαλούν μια περιορισμένη προστασία. Στις φυσικές λοιμώξεις η ρύθμιση της αυτολυτικής δραστηριότητας φαίνεται να είναι σημαντική στον συγχρονισμό και στο μέγεθος της λύσης του πνευμονιοκοκκικού κυττάρου, και διαδοχικά, στον καθορισμό της φλεγμονώδους απάντησης του ξενιστή. Ο άνθρωπος ως ξενιστής μπορεί να επάγει την αυτολυτική δραστηριότητα της αμιδάσης με τη δράση της λυσοζύμης, και να προκαλέσει εκτεταμένη λύση των μικροοργανισμών με τη χορήγηση της πενικιλίνης. Κάποια κλινικά στελέχη, ιδιαίτερα αυτά που είναι ανθεκτικά στην πενικιλίνη, παρουσιάζουν διάφορα ελαττώματα στη λυτική δραστηριότητα τα οποία μπορούν να προκαλέσουν διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις σχετιζόμενες με το μέγεθος της φλεγμονώδους απάντησης. Οι μικροοργανισμοί με ελαττωματική λύση συνεχίζουν να αναπτύσσονται, ενώ απελευθερώνουν λιγότερο υλικό κυτταρικού τοιχώματος και προκαλούν αρχικά επιβραδυμένη και μειωμένη φλεγμονή, αλλά τελικά προκαλούν χειρότερη νόσο. [2]

Η πνευμολυσίνη είναι μια κυττοτοξίνη που ενεργοποιείται από τη θειόλη, παρόμοια με την στρεπτολυσίνη Ο του στρεπτόκοκκου ομάδας Α και

την λιστεριολυσίνη. Αυτό το πολυπεπτίδιο απαντάται στο κυτταρόπλασμα και δεν ασκεί καμία παθολογική επίδραση μέχρι να απελευθερωθεί με την κυτταρική λύση. Μελέτες για καθορισμένες σημειακές μεταλλάξεις προτείνουν ότι οι μείζονες επιδράσεις της πνευμονολυσίνης οφείλονται στις κυτταρολυτικές της ιδιότητες, αν και μπορεί επίσης να επάγει τα μονοκύτταρα του ανθρώπου για να παράγουν τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor, TNF) και την ιντερλευκίνη-1 (interleukin-1, IL-1). Η πνευμονολυσίνη φαίνεται να παίζει έναν περιορισμένο ρόλο στην παθογένεση της μηνιγγίτιδας. [2]

Οι IgA πρωτεάσες διασπούν την IgA1 ανοσοσφαιρίνη του ορού και την εκκριτική IgA1 (αλλά όχι την IgA2), απελευθερώνοντας Fc, Fab, και άλλα συστατικά. Τα Fab κλάσματα διατηρούν την ικανότητά τους να δεσμεύουν αντιγόνα, αλλά δεν μπορούν πλέον να επάγουν τη συγκόλληση των μικροβίων, να αναστέλλουν την προσκόλληση, ή να πραγματοποιούν άλλες λειτουργίες οι οποίες εξαρτώνται από ένα άθικτο μόριο IgA. Ο παθογενετικός ρόλος των IgA πρωτεασών δεν είναι σαφής, αλλά βασικά όλα τα σημαντικά βακτήρια της αναπνευστικής οδού τις εκκρίνουν, και οι άνθρωποι δημιουργούν αντισώματα τα οποία εξουδετερώνουν την δράση τους, πιθανώς σε μια προσπάθεια να περιορίσουν τον αποικισμό και τη λοίμωξη.

Τουλάχιστον δύο ξεχωριστές νευραμινιδάσες παράγονται από τους πνευμονιόκοκκους. Αυτά τα ένζυμα απομακρύνουν τα τελικά σιαλικά οξέα από δεσμούς γλυκόζης στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή, αποκαλύπτοντας υποκείμενους Glc-NAc-Gal καθοριστές που θεωρούνται σημαντικοί στην προσκόλληση των πνευμονιόκοκκων και άλλων βακτηρίων της αναπνευστικής οδού. Τα κύτταρα του χοριοειδούς πλέγματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος επικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό με σιαλικά

οξέα. Η μετατροπή αυτών των προστατευτικών φραγμών μπορεί να εξηγήσει την τάση ορισμένων πνευμονιόκοκκων να προκαλούν μηνιγγίτιδα. Μια άλλη πιο σπάνια νόσος που σχετίζεται με πνευμονιόκοκκους που παράγουν νευραμινιδάση είναι μια ασυνήθιστη αλλά καταστρεπτική μορφή του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου. Η νευραμινιδάση που εκκρίνεται στην κυκλοφορία αποκαλύπτει το T (Thomsen-Freidenreich) αντιγόνο στα ερυθροκύτταρα, στα αιμοπετάλια, και στο νεφρικό σπείραμα, επάγοντας την αιμόλυση, τη θρομβοκυττοπενία, και την εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων. Ο βαθμός μέχρι τον οποίο αυτή η διαδικασία μπορεί να συμβάλλει σε άλλες σοβαρές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις δεν είναι γνωστός. [2]

Η υαλουρονιδάση παράγεται από την πλειονότητα των κλινικών στελεχών πνευμονιόκοκκου. Αυτό το ένζυμο φαίνεται να σχετίζεται πιο στενά με την υαλουρονιδάση των στρεπτόκοκκων ομάδας B. Ο παθογενετικός της ρόλος είναι να διευκολύνει τον αποικισμό και να προάγει την μετάθεση των μικροοργανισμών από ιστούς, όπως είναι οι πνεύμονες, στο αγγειακό σύστημα. [2]

## **2.5. Γενετική**

Ο πνευμονιόκοκκος υπήρξε σημαντικός συντελεστής για την κατανόηση της γενετικής των βακτηρίων, περιλαμβάνοντας τις δημιουργικές ανακαλύψεις της μεταμόρφωσης και του DNA, οι οποίες άνοιξαν τον δρόμο για τη μοριακή βιολογία. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα υπεύθυνα γονίδια για την παραγωγή του ελύτρου είναι στενά συνδεδεμένα στο χρωμόσωμα και μπορούν να μεταφέρονται ως μια λειτουργική μονάδα μέσω της γενετικής μεταμόρφωσης. [2, 4]

Κάποιες αλληλουχίες DNA οι οποίες ελέγχουν τον σχηματισμό του ελύτρου έχουν βρεθεί σε όλους τους πνευμονιόκοκκους που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, ενώ άλλες είναι μοναδικές για κάποιον συγκεκριμένο ορότυπο [6]. Τα γονίδια που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση του ελύτρου είναι οργανωμένα σε μια ομάδα όμοια με «cassette» μοναδική για κάθε τύπο. Επίσης σημαντικό είναι ότι η γονιδιακή θέση για το έλυτρο εντοπίζεται πολύ κοντά σε γονίδια που κωδικοποιούν την PBP 2x και την PBP 1a. Οι πνευμονιόκοκκοι έχουν την ικανότητα να αποκτούν νέα χαρακτηριστικά μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται μεταμόρφωση. [2]

Ο βαθμός στον οποίο η οριζόντια μεταφορά γονιδίων του ελύτρου συνέβαλε στην ποικιλία των ορότυπων είναι άγνωστος. Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν την PBP 2b έχει συμβεί αρκετές φορές ως ανεξάρτητα γεγονότα μεταμόρφωσης, δημιουργώντας ξεχωριστές ομάδες ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκων. Η αντοχή είναι ανεξάρτητη του ορότυπου αλλά είναι πιο συχνή στις ομάδες/τύπους 6, 14, 19, και 23, πιθανώς επειδή αυτοί οι τύποι αποικίζουν συχνά παιδιά που εκτίθενται σε συχνές ή περιπτώσεις αγωγές με αντιμικροβιακά. Η δομή του πληθυσμού των πνευμονιόκοκκων χαρακτηρίζεται από συχνές οριζόντιες γενετικές ανταλλαγές, όπως αποδείχτηκε πρόσφατα σε μια μελέτη για την αντιγονική ποικιλία της IgA1 πρωτεΐνης [7]. Πολλοί παράγοντες ευνοούν τη γενετική ανταλλαγή μεταξύ των πνευμονιοκοκκικών στελεχών· η φορεία περισσότερων του ενός τύπου, η φυσιολογική αυτόλυση των πνευμονιόκοκκων απελευθερώνοντας DNA, και η φυσική ικανότητα των πνευμονιόκοκκων να προσλαμβάνουν DNA. Η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή και οι

επιδράσεις του περιβάλλοντος, όπως είναι η χρήση αντιμικροβιακών, χωρίς αμφιβολία καλλιεργούν αντιγονική και μεταβολική ποικιλία. [2]

## 2.6. Ορότυποι

Ο πνευμονιόκοκκος έχει τη σημαντική ικανότητα (competence) να προσλαμβάνει και να μετασχηματίζει εξωγενές DNA από άλλους πνευμονιόκοκκους ή από άλλα βακτήρια, το οποίο και ενσωματώνει στο γονιδίωμά του. Λόγω της ιδιότητας αυτής μπορεί να αποκτά νέες φαινοτυπικές μορφές (μεταμόρφωση) παράγοντας έτσι οροτυπικά διαφορετικές κάψες. Ουσιαστικά οι πνευμονιόκοκκοι έχουν τη δυνατότητα μεταβολής του ελύτρου τους.

Ενενήντα διακριτοί τύποι πνευμονιόκοκκου είχαν αναγνωρισθεί με βάση τις αντιγονικές διαφορές των πολυσακχαριτών του ελύτρου τους. Επειδή το αντίσωμα του ορού αποτελεί τη βάση για την ταυτοποίηση αυτών των τύπων του πνευμονιόκοκκου, αυτοί ονομάζονται ορότυποι. Στο σύστημα αρίθμησης της Αμερικής, οι ορότυποι αριθμούνταν από το 1 έως το 90 με τη σειρά κατά την οποία αυτοί αναγνωρίστηκαν. Το πιο ευρέως αποδεκτό σύστημα τυποποίησης της Δανίας, το οποίο αναπτύχθηκε από τον Lund την δεκαετία του 1940, διακρίνει ομάδες ορότυπων ανάλογα με τις αντιγονικές τους ομοιότητες. Όλοι οι διακριτοί τύποι του αμερικάνικου συστήματος περιλαμβάνονται, αλλά οι τύποι με διασταυρούμενη αντίδραση συνδυάζονται σε ομάδες των δύο ή περισσότερων τύπων. Οι 90 ορότυποι του πνευμονιόκοκκου κατατάσσονται σε 25 ατομικούς ορότυπους και σε 65 ορότυπους που ομαδοποιούνται σε 21 οροομάδες (κάθε οροομάδα περιλαμβάνει 2 έως 5 ορότυπους). Για παράδειγμα, οι τύποι 1 – 5 , 8, και 14

υπάρχουν ως ανεξάρτητοι τύποι, η ομάδα 9 περιλαμβάνει τους τύπους 9V και 9N, μαζί με τους σπανιότερους τύπους 9A και 9L (αμερικάνικοι τύποι 68, 9, 33, και 49). Η οροομάδα 19 των Δανών περιλαμβάνει τους τύπους 19F, 19A, 19B, και 19C (το γράμμα F δηλώνει το πρώτο μέλος της ομάδας το οποίο αναγνωρίστηκε, ακολουθούμενο από A, B, C, κλπ), τα οποία στο σύστημα της Αμερικής θα ήταν οι τύποι 19, 57, 58, και 59, αντίστοιχα. Οι ορότυποι οι οποίοι προκαλούν πιο συχνά νόσο στους ανθρώπους ήταν αυτοί που αναγνωρίστηκαν πιο νωρίς και ήταν οι πρώτοι στους οποίους δόθηκαν αριθμοί, το οποίο εξηγεί γιατί οι ορότυποι με τους χαμηλότερους αριθμούς είναι γενικά πιο πιθανό να εμπλέκονται σε λοιμώξεις του ανθρώπου. Κάθε ορότυπος έχει ιδιαίτερη δομή, ενώ οι ορότυποι της ίδιας οροομάδας έχουν την ίδια αλληλουχία ολιγοσακχαριτών συνδεδεμένων όμως διαφορετικά. Οι περισσότεροι ορότυποι έχουν έναν αντιγονικό καθοριστή, ενώ οι οροομάδες έχουν έναν ή περισσότερους αντιγονικούς καθοριστές κοινούς για την ομάδα και έναν καθοριστή μοναδικό για κάθε ορότυπο. [1,2]

Έως το 1995 είχαν αναγνωριστεί και ταυτοποιηθεί 90 ορότυποι πνευμονιόκοκκου [8], αλλά ο αριθμός αυτός αυξήθηκε το 2007 με την περιγραφή του ορότυπου 6C. Αυτός ο νέος ορότυπος παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με τον ορότυπο 6A, αλλά διαφοροποιείται από μία μεταβολή στην περιοχή του *wciN* γονιδίου που κωδικοποιεί την γαλακτοζυλ-τρανσφεράση [9-12]. Επίσης το 2008 προτάθηκε η ύπαρξη του ορότυπου 6D [13], αρχικά παρασκευάστηκε πειραματικά [14], και αργότερα ταυτοποιήθηκαν κυκλοφορούντα στελέχη πνευμονιόκοκκου με ορότυπο 6D [15-21]. Το 2010 ανακαλύφθηκαν δύο ορολογικά και βιοχημικά διακριτοί υπότυποι μεταξύ των

στελεχών με ορότυπο 11A και έτσι προτάθηκε ο ένας υπότυπος να ονομαστεί 11E, συνιστώντας έναν νέο ορότυπο πνευμονιόκοκκου [22].

Κάποια στελέχη, ενώ έχουν αναγνωρισθεί ως πνευμονιόκοκκοι με τις συνηθισμένες δοκιμασίες ταυτοποίησης, δεν αντιδρούν με τους ειδικούς για τον τύπο αντιορούς που κυκλοφορούν. Αυτά τα άτυπα στελέχη ονομάζονται μη τυποποιήσιμοι πνευμονιόκοκκοι. [23]

### **3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1. Καλλιέργεια και ταυτοποίηση**

Οι πνευμονιόκοκκοι μπορούν να απομονωθούν στο κλινικό εργαστήριο σε άγαρ εμπλουτισμένο με 5% αίμα προβάτου. Μερικές φορές οι πνευμονιόκοκκοι σε καλλιέργειες αίματος αυτολύονται πριν μπορέσουν να απομονωθούν, αλλά αυτοματοποιημένα συστήματα για καλλιέργειες αίματος διευκολύνουν την πρώιμη δειγματοληψία και βοηθούν να αποφευχθεί αυτό το πρόβλημα. Η απομόνωση των πνευμονιόκοκκων από τα πτύελα, το ρινοφάρυγγα, και άλλα σημεία όπου είναι πιθανό να αναμιχθούν με «φυσιολογική χλωρίδα» είναι συχνά δύσκολη λόγω της ανταγωνιστικής ανάπτυξης άλλων ειδών, ειδικά άλλων πρασινίζοντων στρεπτόκοκκων. Προσοχή πρέπει να δίνεται στην επιλογή επαρκούς αριθμού αντιπροσωπευτικών αποικιών για ανακαλλιέργεια και πιθανή ταυτοποίηση. Για τις μελέτες αποικισμού ένα ειδικό αιματούχο άγαρ που περιέχει 5 mg θειικής γενταμικίνης έχει αποδειχτεί ιδιαίτερα χρήσιμο. Η ανάπτυξη είναι καλή σε θερμοκρασίες 35°-37°C και επιπλέον βελτιώνεται με 3%-5% CO<sub>2</sub>. [2]

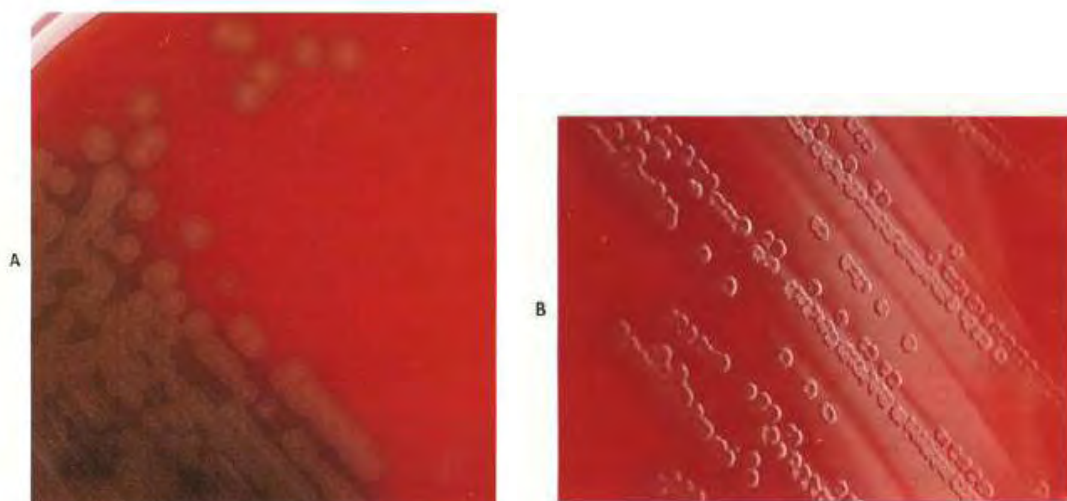
Οι αποικίες του πνευμονιόκοκκου είναι λείες, λαμπερές, και σχήματος θόλου όταν είναι φρέσκες. Όσο παλαιώνουν και αρχίζουν να αυτολύονται, σχηματίζονται ευρείς κρατήρες στο κέντρο τους. Οι πνευμονιόκοκκοι ποικίλουν σημαντικά ως προς τη μορφολογία των αποικιών τους, αλλά λεπτές διαφορές μπορεί να είναι φανερές μόνο με μεγέθυνση. Οι αποικίες του τύπου 3 είναι χαρακτηριστικά πολύ μεγάλες (>3mm) και βλεννώδεις, σε μερικά στελέχη του τύπου 19 είναι κάπως βλεννώδεις αλλά όχι τόσο μεγάλες, ενώ οι αποικίες του τύπου 1 και του τύπου 14 είναι συνήθως πολύ μικρότερες (<1mm). Αν και οι πνευμονιόκοκκοι αναφέρονται ως α-αιμολυτικοί, αυτό δεν οφείλεται σε πραγματική αιμόλυση αλλά σε διάσπαση της αιμοσφαιρίνης από την οποία σχηματίζεται μια πράσινη χρωστική η οποία περιβάλλει τις αποικίες σε αιματούχο ή σοκολατούχο άγαρ. Πιθανή ταυτοποίηση επιτυγχάνεται στο άγαρ μέσω εμφάνισης ζώνης αναστολής γύρω από έναν δίσκο "P" ο οποίος περιέχει οπτοχίνη (αιθυλ-υδροκουπρεΐνη) [24]. Κάποιοι άλλοι στρεπτόκοκκοι μπορούν ενίοτε να παρουσιάζουν ευαισθησία στην οπτοχίνη, και μερικοί πνευμονιόκοκκοι μπορούν να είναι ανθεκτικοί στην οπτοχίνη [25-32]. Σε τέτοιες περιπτώσεις οι πνευμονιόκοκκοι μπορούν να ταυτοποιηθούν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία διαλυτότητας στα χολικά άλατα. Παρασκευάζεται ένα πυκνό εναιώρημα από φρέσκο καλλιέργημα πνευμονιόκοκκων σε μια μικρή ποσότητα νερού, ίσοι όγκοι (λίγες σταγόνες) από αυτό προστίθενται για να δώσουν ορατή θολερότητα σε ένα 10% υδατικό διάλυμα δεοξυχολικού (ή χολικού οξέος) και σε ένα παρόμοιο σωληνάριο με απλό νερό ως μάρτυρας. Το δεοξυχολικό θα προκαλέσει λύση των πνευμονιόκοκκων μέσα σε λίγα λεπτά, προκαλώντας μια οπτικά εμφανή ελάττωση της θολερότητας, συγκριτικά με το σωληνάριο μάρτυρα. Μια



γρήγορη και πρόχειρη μέθοδος είναι απλά να ρίξει κάποιος μια σταγόνα του δεοξυχολικού κατευθείαν σε φρέσκες αποικίες πνευμονιόκοκκου σε τρυβλίο με αιματούχο άγαρ και να εξετάσει για λύση των αποικιών μετά από λίγα λεπτά επώασης. Πνευμονιόκοκκοι που δεν είναι ευαίσθητοι στα χολικά άλατα έχουν αναφερθεί αλλά είναι εξαιρετικά σπάνιοι. [2]

Η καλλιέργεια πτυέλων μπορεί να είναι χρήσιμη σε περιοχές όπου οι ανθεκτικοί στην πενικιλίνη και οι πολυανθεκτικοί πνευμονιόκοκκοι είναι συχνοί. Σε θετικά δείγματα οι διπλόκοκκοι βρίσκονται συνήθως σε αριθμό >25 κατά οπτικό πεδίο, ενώ όταν είναι ορατοί >10 διπλόκοκκοι κατά οπτικό πεδίο οι καλλιέργειες είναι θετικές σε περίπου 60% των περιπτώσεων. Στα παιδιά είναι δύσκολο να ληφθούν καλά δείγματα πτυέλων και η υψηλή συχνότητα του ασυμπτωματικού αποικισμού ελαττώνει περαιτέρω τη χρησιμότητά τους στην αιτιολογική διάγνωση.

Η απομόνωση μικροοργανισμών με καλλιέργεια είναι απαραίτητη για την οροτυπία και τις δοκιμασίες ευαισθησίας έναντι διαφόρων αντιμικροβιακών παραγόντων.

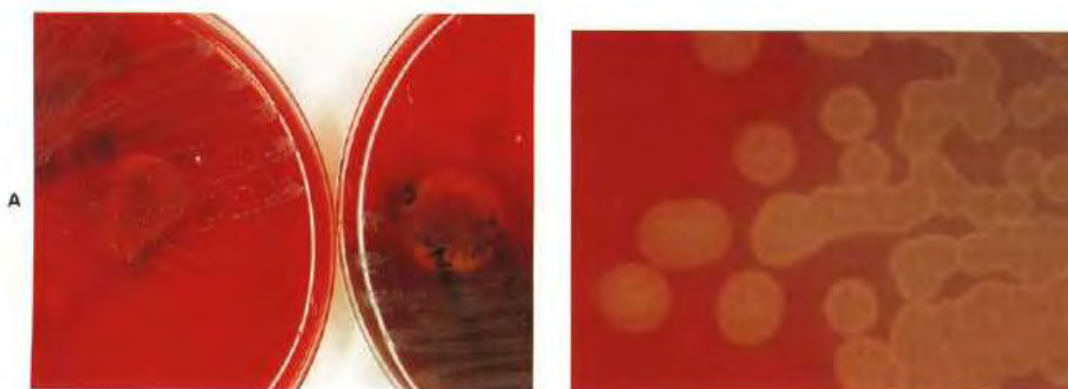


**Εικόνα 2.** Αποικίες πνευμονιόκοκκου σε άγαρ εμπλουτισμένο με 5% αίμα προβάτου.

**A.** Αυτές οι φρέσκες αποικίες είναι στρογγυλές, σε κάποιο βαθμό βλεννώδεις, και με διάμετρο περίπου 1mm. Περιβάλλονται από μια ζώνη α-αιμόλυσης. **B.** Αυτές οι λίγο παλιότερες αποικίες εμφανίζουν κεντρική κοίλανση που οφείλεται στην εύκολα επαγόμενη αυτόλυση, τυπική του πνευμονιόκοκκου.



**Εικόνα 3.** Δοκιμασία ευαισθησίας στην οπτοχίνη. Οι αποικίες του πνευμονιόκοκκου αναστέλλονται από την οπτοχίνη που περιέχεται στον χάρτινο δίσκο που τοποθετείται στην επιφάνεια του τρυβλίου με άγαρ εμπλουτισμένο με 5% αίμα προβάτου.

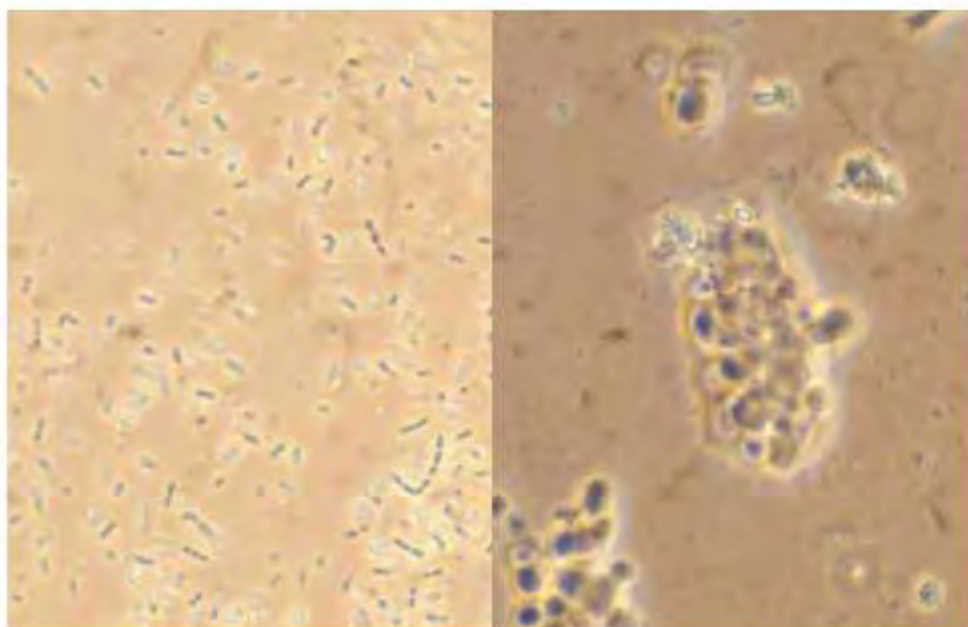


**Εικόνα 4.** Δοκιμασία διαλυτότητας στα χολικά άλατα. Οι αποικίες του πνευμονιόκοκκου θα διαλυθούν μέσα σε 30 λεπτά στους 35°C στην παρουσία 2% δεοξυχολικού νατρίου. Μια σταγόνα του αντιδραστηρίου εφαρμόζεται απευθείας στις αποικίες, οι οποίες διαλύονται (τρυβλίο στα αριστερά) εάν ο μικροοργανισμός είναι πνευμονιόκοκκος. Οι αποικίες στο τρυβλίο με αιματούχο άγαρ στα δεξιά, που επίσης επικαλύφθηκαν με χολικά άλατα, παραμένουν ανέπαφες, υποδεικνύοντας ότι το στέλεχος δεν είναι πνευμονιόκοκκος.

### 3.2. Ορολογική τυποποίηση

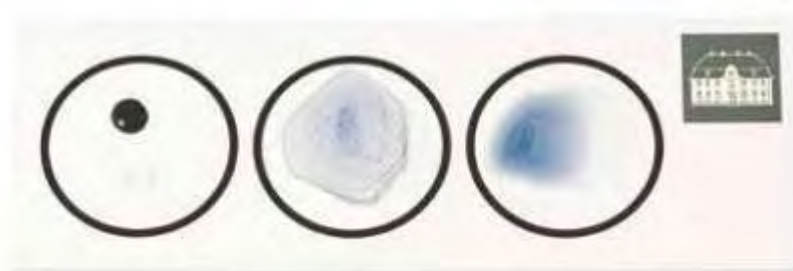
Η τυποποίηση του πνευμονιόκοκκου, οροτυπία, γίνεται με την αντίδραση του Neufeld ή Quellung, στην οποία παρατηρείται εξοίδηση του ελύτρου του πνευμονιόκοκκου στο μικροσκόπιο [33]. Αυτό στην πραγματικότητα οφείλεται σε μεταβολές στην αναλογία του νερού του ελύτρου καθώς τα αντισώματα συνδέονται με τους πολυσακχαρίτες της επιφάνειας και μεταβάλλουν τη διάθλαση του φωτός που περνάει μέσα από το έλυτρο και το καθιστούν ορατό στο μικροσκόπιο. Οι ορότυποι που ανήκουν σε μία συγκεκριμένη οροομάδα μπορούν να ταυτοποιηθούν χρησιμοποιώντας παράγοντες ορού (αντιορούς) που παράχθηκαν έναντι ενός τύπου, όπως είναι ο 6A, μετά τη διασταυρούμενη απορρόφηση με τους άλλους ορότυπους της ίδιας οροομάδας. Οι αντιοροί αυτοί χρησιμοποιούνται στην αντίδραση

Quellung. Άρα, η δοκιμασία Quellung δεν είναι η εξοίδηση του ελύτρου αλλά η αντίδραση του ειδικού για τον τύπο αντιορού με τον πολυσακχαρίτη του ελύτρου. Παραμένει ένα απαραίτητο επιδημιολογικό εργαλείο για την παρακολούθηση των ορότυπων σύμφωνα με την κατάσταση της νόσου, την ανάπτυξη πολλαπλής αντοχής στα αντιμικροβιακά, και τους πληθυσμούς ασθενών. Χρησιμοποιήθηκε για να επιλεγθούν οι τύποι που θα περιλαμβάνονταν στα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια.



**Εικόνα 5.** Αντίδραση Neufeld ή Quellung, αριστερά αρνητική και δεξιά θετική αντίδραση.

Το 2004 αναπτύχθηκε μια δοκιμασία Latex που βασίζεται στην συγκόλληση ειδικών αντιορών με συγκεκριμένες οροομάδες ή ορότυπους του πνευμονιόκοκκου [34]. Η δοκιμασία συγκόλλησης με τη μέθοδο Latex παρουσιάστηκε από το Statens Serum Institute και ονομάστηκε Pneumotest-Latex.

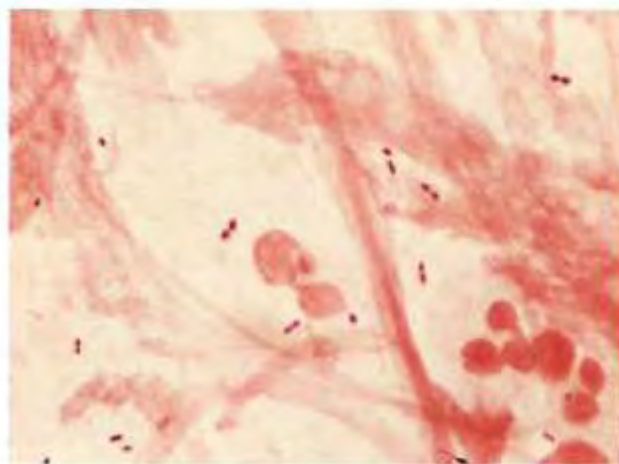


**Εικόνα 6.** Δοκιμασία συγκόλλησης Latex: Αριστερά μία σταγόνα του αντιορού και μία σταγόνα μικροβιακού εναιωρήματος. Στο κέντρο θετική δοκιμασία συγκόλλησης και δεξιά αρνητική δοκιμασία συγκόλλησης.

### 3.3. Gram χρώση, ανίχνευση αντιγόνου, και μοριακές μέθοδοι

Η Gram χρώση δειγμάτων εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) παραμένει βασική για την εκτίμηση της μηνιγγίτιδας. Προσοχή πρέπει να δοθεί για να μην υπερ- ή υπο- χρωματιστεί η αντικειμενοφόρος πλάκα, από φόβο μήπως οι πνευμονιόκοκκοι εσφαλμένα θεωρηθούν μηνιγγιτιδόκοκκοι ή αντίστροφα. Η Gram χρώση του ENY μπορεί να αρνητικοποιηθεί σύντομα μετά τη χορήγηση αντιμικροβιακών. Οι μέθοδοι του latex και της συγκόλλησης για την ανίχνευση των πνευμονιοκοκκικών αντιγόνων στο ENY συνήθως χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τη Gram χρώση της οποίας η ευαισθησία εξαρτάται άμεσα από το μικροβιακό φορτίο του κλινικού δείγματος. Επιπλέον, η ανίχνευση αντιγόνων μπορεί να είναι χρήσιμη σε ασθενείς που έχουν ήδη λάβει αντιμικροβιακά, και στους οποίους οι καλλιέργειες και Gram χρώσεις είναι αρνητικές. Η δοκιμασία είναι επίσης χρήσιμη όταν εφαρμόζεται στο πλευριτικό υγρό για τη διάγνωση της πνευμονίας. Αναφέρεται ότι η συγκόλληση με τη μέθοδο Latex απαιτεί συγκεντρώσεις  $10^6$ - $10^7$  πνευμονιόκοκκων/ml, σχεδόν όσο χρειάζεται για την οπτικοποίηση με το μικροσκόπιο ή για την ανάπτυξη αποικιών σε τρυβλία με άγαρ. [2]

Οι μέθοδοι με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) μπορούν να προσφέρουν επιπλέον τρόπους άμεσης ανίχνευσης των πνευμονιόκοκκων σε κλινικά δείγματα. Οι πνευμονιόκοκκοι μπορούν να ταυτοποιηθούν σε δείγμα πτυέλων με ενίσχυση του γονιδίου της αυτολυσίνης και σε υγρό από το μέσο ους με ενίσχυση του γονιδίου της πνευμολυσίνης με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

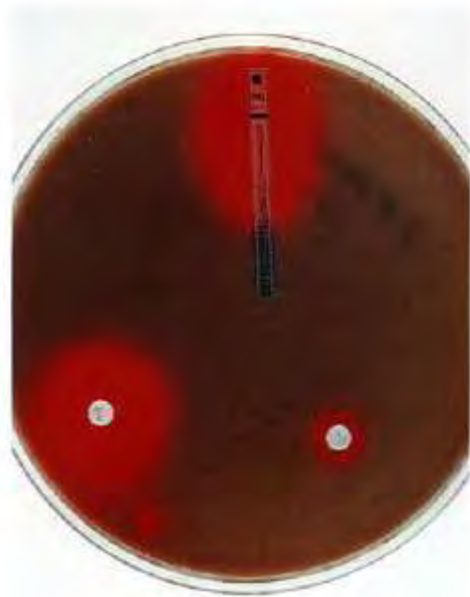


**Εικόνα 7.** Gram χρώση εκκρίσεων του αναπνευστικού παρουσιάζει Gram-θετικούς, σχήματος λόγχης διπλόκοκκους που υποδηλώνουν στελέχη πνευμονιόκοκκου.

### **3.4. Δοκιμασίες ευαισθησίας στους αντιμικροβιακούς παράγοντες**

Πριν από την εμφάνιση αντοχής στην πενικιλίνη υπήρχε μικρή ανάγκη για τα κλινικά εργαστήρια να εκτελούν δοκιμασίες ευαισθησίας στους πνευμονιόκοκκους ως ρουτίνα. Μέχρι και τα μέσα της δεκαετίας του 1970 οι τιμές της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (minimal inhibitory concentrations, MICs) στην πενικιλίνη G κυμαίνονταν σταθερά κάτω από 0.03 µg/ml. Καθώς στελέχη με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη (MIC 0.1-1.0 µg/ml) και στελέχη ανθεκτικά στην πενικιλίνη (MIC >1.0 µg/ml) άρχισαν

να εμφανίζονται, βρέθηκε ότι η χρήση συμβατικού δίσκου 10 µg πενικιλίνης συχνά αποτύγχανε να ανιχνεύσει την αντοχή με τη μέθοδο Kirby-Bauer. Αυτό το πρόβλημα επιλύθηκε σε μεγάλο βαθμό με τη χρήση δίσκων 1.0 µg οξακιλλίνης που παρουσιάστηκαν από τον Dixon το 1977 και περαιτέρω από τον Swenson [35]. Σύμφωνα με την οδηγία της Εθνικής Επιτροπής για τις Σταθερές των Κλινικών Εργαστηρίων (CLSI) στελέχη με ζώνη αναστολής >20mm είναι ταυτόχρονα ευαίσθητα και σε πενικιλίνη. Ωστόσο, σε στελέχη με ζώνη αναστολής ≤19mm, οι MICs στην πενικιλίνη, κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη πρέπει να προσδιορίζονται. Το E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden, and Piscataway, NJ) είναι μια εμπορική μέθοδος στην οποία προσδιορίζεται η τιμή της MIC και εφαρμόζεται εύκολα στο εργαστήριο ρουτίνας [36]. Χρησιμοποιείται μια πλαστική ταινία η οποία περιέχει διαβαθμισμένη ποσότητα αντιμικροβιακού ξεκινώντας από χαμηλή έως υψηλή συγκέντρωση. Η τιμή της MIC προσδιορίζεται βάσει του σημείου όπου η ανάπτυξη του μικροοργανισμού εκτείνεται μέχρι το χείλος της ταινίας. Τα E-test έχουν χρησιμοποιηθεί για προσδιορισμό MIC σε κεφοταξίμη, κεφουροξίμη, κεφτριαξόνη, χλωραμφενικόλη, ερυθρομυκίνη, και τετρακυκλίνη. [2]. Οι δοκιμασίες με τους δίσκους και τα E-test γίνονται χρησιμοποιώντας Mueller-Hinton άγαρ που εμπλουτίζεται με 5% αίμα προβάτου και επωάζεται στους 35°C και σε ατμόσφαιρα με 5% CO<sub>2</sub>.



**Εικόνα 8.** Δοκιμασίες ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.

#### **4. ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΡΙΝΟΦΑΡΥΓΓΑ**

Ο πνευμονιόκοκκος είναι παθογόνο που προσβάλλει αποκλειστικά τον άνθρωπο και ο ρινοφάρυγγας αποτελεί την κύρια φυσική δεξαμενή των στελεχών πνευμονιόκοκκου. Οι πνευμονιόκοκκοι αποτελούν τμήμα της φυσιολογικής χλωρίδας της ανώτερης αναπνευστικής οδού του ανθρώπου και μπορούν να καλλιεργούνται από το ρινοφάρυγγα στο 5%-10% των υγιών ενηλίκων και το 20%-40% των υγιών παιδιών. Με επανειλημμένες καλλιέργειες, το ποσοστό αυξάνεται σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, φτάνοντας στο 40% ή 60% ή και περισσότερο στα βρέφη και νήπια ηλικίας κάτω των 2 ετών. Το ποσοστό αποικισμού αυξάνεται κατά 22-45% κατά τη διάρκεια λοιμώξεων του αναπνευστικού, το οποίο υποστηρίζει τη θεωρία της μεγαλύτερης προσκόλλησης κατά τη διάρκεια των ιογενών λοιμώξεων [37]. Ο ασυμπτωματικός αποικισμός με έναν συγκεκριμένο ορότυπο μπορεί να



επιμένει για ένα έτος ή περισσότερο, αλλά η διάρκεια της φορείας ελαττώνεται με την ηλικία και έτσι τείνει να είναι μεγαλύτερη στα παιδιά από τους ενήλικες [38, 39]. Παρόλο που οι πνευμονιόκοκκοι μπορούν να απομονωθούν από υγιή παιδιά και ενήλικες καθόλη τη διάρκεια του έτους, τα ποσοστά αποικισμού κυμαίνονται σε κάποιο βαθμό κατά τη διάρκεια του έτους με μια μέτρια ελάττωση κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών [39]. Για να τεκμηριωθεί αυτή η εποχικότητα απαιτείται ένα τεράστιο δείγμα. Ο ρινοφάρυγγας αποικίζεται κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους ζωής και η πνευμονιοκοκκική φορεία αυξάνεται πριν από την ηλικία των 2 ετών [37]. Ο αποικισμός με πνευμονιόκοκκο μπορεί να εμφανιστεί από την πρώτη κιόλας ημέρα ζωής, με μέση ηλικία εμφάνισης τους 6 μήνες, ενώ >95% των παιδιών θα αποικιστούν με πνευμονιόκοκκο κάποια στιγμή κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ετών ζωής [38, 40, 41]. Η διάρκεια του αποικισμού είναι μεγαλύτερη στα παιδιά κάτω των 5 ετών από ότι στους ενήλικες [42]. Μια προσεκτική προοπτική μελέτη σε βρέφη [43] έδειξε ότι ο πρώτος πνευμονιόκοκκος που αποικίζει ένα βρέφος αποκτάται περίπου στους 6 μήνες ζωής και μπορεί να ανιχνεύεται κατά μέσο όρο για περίπου 4 μήνες. Στους ενήλικες, ένας συγκεκριμένος ορότυπος επιμένει για βραχύτερες περιόδους, συνήθως 2 ως 4 εβδομάδες [44].

Ανεξάρτητοι καθοριστικοί παράγοντες αποικισμού του ρινοφάρυγγα είναι η εθνικότητα, ο συνωστισμός, περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά και κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες. Οι κοινωνικοοικονομικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν το μέγεθος της οικογένειας [42] (ειδικά τον αριθμό των μεγαλύτερων αδερφιών), το εισόδημα, το κάπνισμα (παθητικό και ενεργητικό) [45], και την πρόσφατη χρήση

αντιμικροβιακών. Ο συνωστισμός αποτελεί μείζονα παράγοντα στον αποικισμό και τη διάδοση των πνευμονιοκοκκικών στελεχών. Τα μικρά παιδιά, ειδικά αυτά που παρακολουθούν παιδικό σταθμό σχετίζονται με στατιστικά σημαντικά αυξημένα ποσοστά αποικισμού. [37] Σε μια μελέτη από την Ολλανδία, ο σχετικός κίνδυνος αποικισμού του ρινοφάρυγγα με πνευμονιόκοκκο στα παιδιά που παρακολουθούν παιδικό σταθμό συγκριτικά με παιδιά που μεγαλώνουν στο σπίτι ήταν 1,6. Αυτή η μελέτη υποστηρίζει επίσης την υπόθεση της αυξημένης οριζόντιας διασποράς συγκεκριμένων πνευμονιοκοκκικών στελεχών μεταξύ των παιδιών που παρακολουθούσαν παιδικό σταθμό. [46] Τα ποσοστά πνευμονιοκοκκικού αποικισμού είναι αυξημένα και στα παιδιά που παρακολουθούν παιδικό σταθμό και στα μικρότερα αδέρφια τους [47]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί αυξημένη συχνότητα αποικισμού σε οικογένειες με μικρά παιδιά σε αντίθεση με οικογένειες χωρίς παιδιά [48]. Η μετάδοση μέσα στην οικογένεια είναι πιο σημαντική σε μεγάλες οικογένειες [42]. Εθνικότητες με αυξημένο κίνδυνο πνευμονιοκοκκικού αποικισμού είναι οι Αφρικοαμερικανοί, οι αυτόχθονες Αμερικανοί (των φυλών Apache και Navajo), και οι αυτόχθονες της Αλάσκας.

Σε μια πολυπαραγοντική ανάλυση που διενεργήθηκε στην Αλάσκα, ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου του πνευμονιοκοκκικού αποικισμού ήταν η ηλικία κάτω των 2 ετών, η παρακολούθηση παιδικού σταθμού, η ύπαρξη παιδιού κάτω των 5 ετών στην οικογένεια και η χρήση αντιμικροβιακών κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 90 ημερών [49]. Επίσης, σε μια μελέτη από τη Βραζιλία, ως παράγοντες κινδύνου του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με πνευμονιόκοκκο μεταξύ των εφήβων βρέθηκαν ότι είναι η μικρότερη ηλικία, η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου στο σπίτι, η λοίμωξη του ανώτερου

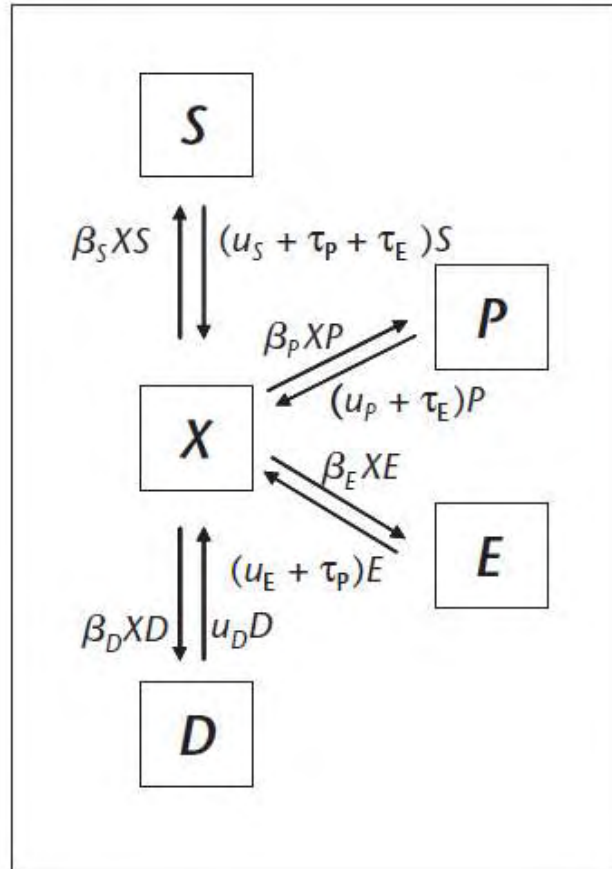
αναπνευστικού κατά τη διάρκεια της μελέτης και το ιστορικό τουλάχιστον ενός επεισοδίου άσθματος κατά τη διάρκεια του τελευταίου έτους [50].

Τα ποσοστά αποικισμού τείνουν να είναι υψηλότερα κατά τη διάρκεια λοιμώξεων της αναπνευστικής οδού και σε ομάδες κινδύνου όπως είναι τα παιδιά που παρακολουθούν παιδικό σταθμό. Γενικώς, πρόκειται για ασυμπτωματική φορεία, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις ο αποικισμός ακολουθείται από νόσο. Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα θεωρείται σημαντική πηγή οριζόντιας διασποράς του πνευμονιόκοκκου στην κοινότητα. Ο συνωστισμός, όπως απαντάται σε νοσοκομεία, παιδικούς σταθμούς και φυλακές, αυξάνει την οριζόντια διασπορά των πνευμονιοκοκκικών στελεχών. Επειδή, η υψηλότερη συχνότητα του πνευμονιοκοκκικού αποικισμού και ο υψηλότερος δείκτης συνωστισμού ανευρίσκεται στα μικρά παιδιά, αυτή η ομάδα κινδύνου θεωρείται ότι είναι ο πιο σημαντικός φορέας για την οριζόντια διασπορά των πνευμονιοκοκκικών στελεχών μέσα στην κοινότητα. [37]

Ο πνευμονιοκοκκικός αποικισμός, ειδικά με στελέχη ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά, αυξάνεται επίσης ως αποτέλεσμα πρόσφατης αγωγής με αντιμικροβιακά. Η επιλογή των ανθεκτικών σε αντιμικροβιακούς παράγοντες πνευμονιόκοκκων στον ρινοφάρυγγα θεωρείται ότι είναι η αιτία της διασποράς ανθεκτικών πνευμονιοκοκκικών στελεχών στην κοινότητα. [37]

Στο παρακάτω σχήμα [51] παρουσιάζεται ένα μαθηματικό μοντέλο μεταδόσης του πνευμονιόκοκκου. Οι μεταβλητές στο μοντέλο εκφράζουν τη συχνότητα 5 τύπων ξενιστή: μη αποικισμένος ( $X$ ) ή αποικισμένος με ένα στέλεχος το οποίο είναι ευαίσθητο και στην πενικιλίνη και στην ερυθρομυκίνη ( $S$ ), ανθεκτικό στην πενικιλίνη ( $P$ ), ανθεκτικό στην ερυθρομυκίνη ( $E$ ) ή

ανθεκτικό και στην πενικιλίνη και στην ερυθρομυκίνη ( $D$ ). Το μαθηματικό μοντέλο υποθέτει ότι κάθε άτομο μπορεί να αποικίζεται από ένα μόνο στέλεχος σε μια δεδομένη στιγμή. Το  $\beta_i$  εκφράζει τον σταθερό ρυθμό μετάδοσης και το  $u_i$  τον ρυθμό κάθαρσης. Αυτό το μοντέλο επίσης θεωρεί ότι ένα άτομο μπορεί να έχει λάβει αγωγή με μια  $\beta$ -λακτάμη στον «αποτελεσματικό ρυθμό»  $\tau_p$  (αγωγή με κάθε αντιμικροβιακό παράγοντα  $x$  πιθανότητα ότι αυτή η θεραπεία εξαφανίζει τον αποικισμό με πνευμονιόκοκκους ευαίσθητους σε αυτό το αντιμικροβιακό) ή με μια μακρολίδη στον «αποτελεσματικό ρυθμό»  $\tau_E$ . Το μαθηματικό αυτό μοντέλο εκφράζει τη δυνατότητα του μη αποικισμένου ξενιστή ( $X$ ) να αποικιστεί με στέλεχος ευαίσθητο στην πενικιλίνη και στην ερυθρομυκίνη ( $S$ ), ή με αντοχή στην πενικιλίνη ( $P$ ), ή με αντοχή στην ερυθρομυκίνη ( $E$ ) ή με ταυτόχρονη αντοχή στην πενικιλίνη και την ερυθρομυκίνη ( $D$ ), και στην συνέχεια εάν λάβει αποτελεσματική αντιμικροβιακή αγωγή να αρθεί ο αποικισμός και να επανέλθει στην προηγούμενη κατάστασή του.



**Σχήμα 1.** Μαθηματικό μοντέλο μετάδοσης του πνευμονιόκοκκου.  $X$ : μη αποικισμένος ξενιστής,  $S$ : στελέχη ευαίσθητα και στην πενικιλίνη και στην ερυθρομυκίνη,  $P$ : στελέχη ανθεκτικά μόνο στην πενικιλίνη,  $E$ : στελέχη ανθεκτικά μόνο στην ερυθρομυκίνη,  $D$ : στελέχη ανθεκτικά και στην πενικιλίνη και στην ερυθρομυκίνη,  $\beta$ : σταθερός ρυθμός μετάδοσης,  $u$ : ρυθμός απομάκρυνσης,  $\tau_p$ : ρυθμός αποτελεσματικής θεραπείας με  $\beta$ -λακτάμες,  $\tau_E$ : ρυθμός αποτελεσματικής θεραπείας με μακρολίδες. (McCormick et al. Nat Med 2003; 9: 424-430)

Η κατανομή των ορότυπων μεταξύ των στελεχών που αποικίζουν τον ρινοφάρυγγα ποικίλλει ελαφρώς ανάλογα με τη χώρα, την ηλικιακή ομάδα, και τον τύπο της μελέτης. Στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες εμφανίζεται παρόμοια κατανομή ορότυπων με ελάχιστες διαφορές. Για παράδειγμα, στην Ολλανδία, οι ορότυποι 19F (19%), 6B (16%), 6A (13%), 9V (7%), και 23F (7%) ανευρίσκονται πιο συχνά μεταξύ των παιδιών ηλικίας μικρότερης των 3

ετών [46]. Στην Ελλάδα οι επικρατέστεροι ορότυποι μεταξύ των παιδιών ηλικίας μικρότερης των 2 ετών είναι οι 6B, 19F, 23F, 14 και 18C [52], και στην Φινλανδία οι ορότυποι 6B (16%), 23F (14%), 19F (14%), και 6A (9%) είναι οι πιο διαδεδομένοι [53]. Στις ΗΠΑ, οι ορότυποι 6B, 14, 19F και 23F είναι επίσης διαδεδομένοι. Δεν έχουν βρεθεί σημαντικές διαφορές στην κατανομή ορότυπων μεταξύ των παιδιών με παράγοντες κινδύνου, όπως είναι η παρακολούθηση παιδικού σταθμού και οι λοιμώξεις της ανώτερης αναπνευστικής οδού, και των υγιών παιδιών.

## **5. ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΗ ΝΟΣΟΣ**

Η πνευμονιοκοκκική νόσος ακολουθεί τον ασυμπτωματικό αποικισμό ο οποίος είναι ιδιαίτερα υψηλός στα παιδιά. Οι περισσότερες πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις απαντώνται σε κατά τα άλλα υγιή βρέφη/νήπια ηλικίας κάτω των 2 ετών ή σε ενήλικες ηλικίας μεγαλύτερης των 65 ετών. Οι πνευμονιόκοκκοι μεταδίδονται από το ένα άτομο στο άλλο ως αποτέλεσμα της εκτεταμένης, στενής επαφής, αλλά η λοίμωξη γενικά δεν θεωρείται μεταδοτική επειδή μεσολαβούν τόσοι πολλοί παράγοντες μεταξύ του αποικισμού και της λοίμωξης. Διαδίδονται σχετικά αργά μεταξύ των μελών της οικογένειας και μεταξύ των παιδιών του παιδικού σταθμού, συνήθως με την ανάπτυξη μόνο περιστασιακών λοιμώξεων. Παρόλα αυτά, η διεισδυτική νόσος είναι πιο συχνή μεταξύ των βρεφών που παρακολουθούν παιδικούς σταθμούς και μεταξύ παιδιών με αδέρφια. Ο παιδικός σταθμός είναι ένα περιβάλλον που διευκολύνει την μετάδοση των λοιμογόνων παραγόντων και επειδή τα παιδιά προέρχονται από διαφορετικά σπίτια, εκτίθενται σε μεγαλύτερο αριθμό

πνευμονιοκοκκικών στελεχών [54]. Οι παιδικοί σταθμοί αποτελούν μείζονα οικολογική δεξαμενή για τα ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά στελέχη πνευμονιόκοκκου [40, 55]. Δημιουργούν συνθήκες στενής φυσικής επαφής μεταξύ παιδιών μιας συγκεκριμένης ηλικιακής ομάδας, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένα ποσοστά φορέας πνευμονιόκοκκου, ανώριμο ανοσιακό σύστημα και συχνές ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος που οδηγούν σε εκτεταμένη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών. Στους ενήλικες, οι συνθήκες συνωστισμού όπως στις στρατιωτικές κατασκηνώσεις, στις φυλακές, στα άσυλα/καταφύγια για τους άστεγους, και στα γηροκομεία συσχετίζονται με επιδημίες, αλλά η επαφή στα σχολεία ή στους εργασιακούς χώρους γενικά δεν σχετίζεται.

Σε εύκρατα κλίματα η ανταλλαγή και απόκτηση νέων τύπων αυξάνεται δραματικά κατά τη διάρκεια του χειμώνα και νωρίς την άνοιξη. Αυτό επίσης συμφωνεί με την εποχιακή εμφάνιση των ιογενών αναπνευστικών λοιμώξεων, οι οποίες μπορεί να παίζουν ρόλο στη διευκόλυνση της διάδοσης και της απόκτησης των αναπνευστικών βακτηρίων. Η ιογενής λοίμωξη μπορεί επίσης να ευνοεί τον πνευμονιόκοκκο μεταβάλλοντας την επιφάνεια των κυττάρων, τη λειτουργία των φαγοκυττάρων, και άλλα χαρακτηριστικά των φυσιολογικών μηχανισμών άμυνας του ξενιστή. Η εμφάνιση της λοίμωξης, για παράδειγμα, της μέσης ωτίτιδας [38] ή της βακτηριαιμίας, σχετίζεται με την εποχή, πιθανόν λόγω της συσχέτισης με τις ιογενείς αναπνευστικές λοιμώξεις. Η μέση ωτίτιδα στα παιδιά είναι έντονα εποχιακή, με τις περισσότερες περιπτώσεις να συμβαίνουν από τον Νοέμβριο μέχρι τον Μάιο, ενώ η εποχιακή συνιστώσα είναι λιγότερο αποφασιστική στην εμφάνιση της βακτηριαιμίας και της

μηνιγγίτιδας. Στην μελέτη των Gray και Dillon [42] παρατηρείται συσσώρευση περιστατικών μέσης ωτίτιδας από τον Νοέμβριο μέχρι και τον Απρίλιο με μια σαφή αιχμή τον Φεβρουάριο. Το πιο αξιοσημείωτο εποχιακό χαρακτηριστικό δεν είναι τόσο πολύ μια εποχιακή αιχμή όσο ένα καλοκαιρινό ναδίρ, που επίσης παρατηρήθηκε σε μια πρόσφατη μελέτη από το Χιούστον [56]. Στο Χιούστον, Τέξας (Houston, Texas), η διεισδυτική νόσος στα παιδιά απαντάται κυρίως κατά τη διάρκεια της περιόδου από τον Σεπτέμβριο μέχρι τον Μάιο, συνεπώς συμπίπτει με το σχολικό έτος, και είναι σπάνια κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, αλλά χωρίς σαφή αιχμή στην μεσότητα του χειμώνα. Αντίθετα, η διεισδυτική νόσος στους ενήλικες εμφανίζει ξεκάθαρα αιχμή στην μέση του χειμώνα, αντιστρόφως ανάλογη με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και άμεσα σχετιζόμενη με την αιχμή των ιογενών αναπνευστικών νόσων.

Τα ποσοστά αποικισμού δεν συσχετίζονται καλά με τα ποσοστά προσβολής, ωστόσο, τα εποχιακά ποσοστά προσβολής ακολουθούν τα ποσοστά απόκτησης, τα οποία ορίζονται ως η έναρξη του αποικισμού με έναν νέο ορότυπο [38]. Τα παιδιά συχνά αποικίζονται με πνευμονιόκοκκους για μεγάλες χρονικές περιόδους. Έχει παρατηρηθεί όμως αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση του ποσοστού προσβολής από έναν ορότυπο με τη διάρκεια αποικισμού με τον συγκεκριμένο ορότυπο [41]. Ανεξάρτητα από τον ορότυπο, οι λοιμώξεις (κυρίως η μέση ωτίτιδα) σπάνια προκαλούνται από στελέχη σχετιζόμενα με παρατεταμένη φορεία αλλά συνήθως οφείλονται σε νέους τύπους οι οποίοι αποκτούνται μέσα στον προηγούμενο μήνα. Οι λοιμώξεις οφείλονται κυρίως σε νέα στελέχη με τα οποία ο ξενιστής είχε μικρή προηγηθείσα ανοσολογική εμπειρία. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι



διαταραχές του ξενιστή μπορούν να ωθήσουν την ισορροπία προς όφελος της νόσου.

Άτομα με υποκείμενα νοσήματα της άμυνας του ξενιστή βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για πνευμονιοκοκκική νόσο, ειδικά αυτοί με ασπληνία, υπογαμμασφαιριναιμία, και ανεπάρκεια των παραγόντων του συμπληρώματος (C2, C3, παράγοντας Ι) [57]. Η επίπτωση της διεισδυτικής λοίμωξης από πνευμονιόκοκκο είναι 6,9 λοιμώξεις ανά 100 ασθενείς ανά έτος μεταξύ παιδιών ηλικίας κάτω των 5 ετών με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Αυτό το ποσοστό είναι 30-100 φορές μεγαλύτερο από αυτό στον υγιή πληθυσμό της ίδιας ηλικίας. Η δυσλειτουργία του σπλήνα είναι ο κύριος συντελεστής για τον αυξημένο κίνδυνο πνευμονιοκοκκικής νόσου [58]. Οι πνευμονιόκοκκοι είναι το πιο συχνό αίτιο σοβαρών βακτηριακών λοιμώξεων μεταξύ των παιδιών με HIV λοίμωξη [59].

Πληθυσμιακές μελέτες που διεξάγονται σε διαφορετικά μέρη του κόσμου δείχνουν ότι το συνολικό ποσοστό της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου, η οποία ορίζεται ως η απομόνωση του πνευμονιόκοκκου από μια φυσιολογικά στείρα περιοχή όπως είναι το αίμα, το πλευριτικό υγρό, ή το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), είναι περίπου 15 περιστατικά ανά 100.000 άτομα ανά έτος. Σε συγκεκριμένους πληθυσμούς, που περιλαμβάνουν τους Αφροαμερικανούς, τους αυτόχθονες Αμερικανούς (ειδικά αυτούς της Αλάσκας) [60], και τους αυτόχθονες Αυστραλούς [61, 62], η επίπτωση της νόσου μπορεί να αυξηθεί μέχρι 10 φορές, παρόλο που είναι ασαφές σε τι βαθμό γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι υπεύθυνοι. Η διεισδυτική πνευμονιοκοκκική λοίμωξη είναι σχετικά συχνή στα νεογνά και βρέφη/νήπια ηλικίας έως 2 ετών και λιγότερο συχνή στους

εφήβους και στους νέους ενήλικες, ενώ αυξάνεται ξανά στους ενήλικες ηλικίας άνω των 65 ετών [63]. Δεδομένα από τη Νότια Καρολίνα (South Carolina) [64] είναι αντιπροσωπευτικά και δείχνουν ότι η επίπτωση της πνευμονιοκοκκικής βακτηριαιμίας είναι 160, 5, και 70 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα, αντίστοιχα, σε βρέφη/νήπια, νέους ενήλικες, και ενήλικες άνω των 70 ετών. Η επίπτωση της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου σε παιδιά ηλικίας κάτω των 2 ετών ποικίλλει από 11 περιστατικά ανά 100000 παιδιά ηλικίας κάτω των 2 ετών ανά έτος στην Ελβετία [65], 14,5 περιστατικά στην Αυστρία [66], 16,8 περιστατικά στην Ισπανία [67], 44,9 περιστατικά στην Σκωτία [68], 45,3 περιστατικά στη Φιλανδία [69], 104,4 περιστατικά στο Βέλγιο [70], 166,9 περιστατικά στις ΗΠΑ [71] (145 περιστατικά στη Νότια Καλιφόρνια [72]), 538 περιστατικά μεταξύ των παιδιών της φυλής Navajo [73], 624 περιστατικά μεταξύ των παιδιών των αυτοχθόνων της Αλάσκας [60], έως και >1000 περιστατικά ανά 100000 παιδιά ηλικίας κάτω των 2 ετών μεταξύ των αυτόχθονων Αυστραλών [61]. Παρόλο που η συνολική επίπτωση της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης στον πληθυσμό ελαττώθηκε σε μεγάλο βαθμό σε σύγκριση με την εποχή πριν από τη χρήση αντιμικροβιακών, αυτή η συσχέτιση με την ηλικία δεν έχει μεταβληθεί. Οι περισσότερες περιπτώσεις βακτηριαιμίας σε ενήλικες προκαλούνται από πνευμονία, πιθανόν 3 ή 4 περιπτώσεις μη βακτηριαμικής πνευμονίας απαντώνται για κάθε 1 βακτηριαμική, κι αυτό οδηγεί σε εκτιμήσεις 25 περιστατικών πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας ανά 100.000 νέων ενηλίκων και 280 ανά 100.000 ηλικιωμένων κάθε έτος. Λόγω έλλειψης επιβεβαίωσης, η αληθινή επίπτωση μπορεί να είναι πολλές φορές μεγαλύτερη. Αντίθετα, στην εποχή

πριν από τη χρήση αντιμικροβιακών, περίπου 700 περιστατικά πνευμονίας απαντώνταν ανά 100.000 νέους ενήλικες.

Πληθυσμιακές μελέτες της πνευμονιοκοκκικής βακτηριαιμίας στις Ηνωμένες Πολιτείες αποκαλύπτουν κατά προσέγγιση τα ακόλουθα ειδικά για την ηλικία ποσοστά προσβολής ανά 100.000 πληθυσμό: βρέφη <1 έτους, 160-180 περιστατικά· παιδιά 1-5 ετών, 40-60· νέοι ενήλικες 20-55 ετών, 5-10· και ηλικιωμένοι ενήλικες >65 ετών, 50-80. Μέσα σε αυτούς τους πληθυσμούς, όμως, τα ποσοστά προσβολής μεταξύ των Αφροαμερικανών ήταν 4 με 5 φορές υψηλότερα από ότι μεταξύ των λευκών Αμερικανών. Η επίδραση της φυλής δεν μπορούσε να εξαλειφθεί με τον έλεγχο της κοινωνικοοικονομικής κατάστασης μέσω της καταγραφής των εισοδημάτων, παρόλο που οι διαφορές στην πρόσβαση στις υπηρεσίες υγείας, ο συνωστισμός, οι σχετιζόμενες υποκείμενες συνθήκες, και άλλοι περιβαλλοντικοί και βιολογικοί παράγοντες παραμένουν πιθανές εξηγήσεις [64, 74]. Ακόμη μεγαλύτερες ασυμφωνίες έχουν αναφερθεί μεταξύ των πληθυσμών της Αλάσκας, όπου τα αυτόχθονα παιδιά ηλικίας κάτω των 2 ετών έχουν 624 περιστατικά βακτηριαιμίας ανά 100.000, και μεταξύ των παιδιών Apache στην Αριζόνα, όπου έχουν 1800 περιστατικά βακτηριαιμίας ανά 100.000 [60]. Τα υψηλότερα ποσοστά προσβολής έχουν αναφερθεί μεταξύ των Αυστραλών ιθαγενών, με 1025 ανά 100.000 παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών και >2000 ανά 100.000 για βρέφη/νήπια μικρότερα των 24 μηνών [62].

Η κατανομή των ορότυπων που προκαλούν λοιμώξεις είναι παρόμοια παντού στις Ηνωμένες Πολιτείες, περιλαμβάνοντας την Αλάσκα και την Αριζόνα, και δεν διαφέρει πολύ από αυτή στις περισσότερες βιομηχανοποιημένες χώρες. Τα βρέφη/νήπια προσβάλλονται από έναν

περιορισμένο αριθμό ορότυπων οι οποίοι αποικίζουν συχνά την παιδική ηλικία (π.χ., ομάδες/τύποι 6, 14, 19, και 23), ενώ τα μεγαλύτερα παιδιά και οι ενήλικες αποικίζονται λιγότερο συχνά αλλά με τον χρόνο εκτίθενται και προσβάλλονται από ένα ευρύτερο φάσμα στελεχών, κάποια από τα οποία έχουν περιγραφεί ως «ενήλικοι» ή «επιδημικοί» ορότυποι (π.χ., ομάδες/τύποι 1, 3, 4, 7, 8, και 12). Αυτή η αλλαγή στην κατανομή των ορότυπων συμβαίνει περίπου στην ηλικία των 5 ετών. Η παρατεταμένη φορεία αυτών των ορότυπων από τα μικρά παιδιά μπορεί να μειώνει τον αποικισμό με πιο διεισδυτικά στελέχη πνευμονιόκοκκου και επομένως τον κίνδυνο πνευμονιοκοκκικής νόσου [38]. Στα νεογνά οι περισσότερες περιπτώσεις διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου οφείλονται στους ορότυπους 1, 3, 5 και 7F [75]. Η κατανομή των τύπων ποικίλει σε κάποιο βαθμό ανάλογα με τον τύπο της νόσου και με την εστία της λοίμωξης. Αυτό περιγράφεται σε μια μελέτη που διεξήχθη σε μια 15-ετή περίοδο στο Birmingham, Alabama και παρουσιάζει τους τύπους που παρατηρούνται στα παιδιά με μηνιγγίτιδα, βακτηριαιμία, και μέση ωτίτιδα [76]. Η ομάδα 6 (τύποι 6A + 6B) ήταν η κατ'εξοχήν αιτία της μηνιγγίτιδας με 28% των περιστατικών, ενώ οι πέντε ομάδες/τύποι – 6, 14, 18, 19, και 23 – υπολογίζονται για περίπου το 70% όλων των περιστατικών βακτηριαιμίας ή μηνιγγίτιδας. Οι ίδιοι τύποι ήταν συχνοί στην μέση ωτίτιδα, αλλά η ομάδα 19 ήταν η κατ'εξοχήν ένοχη με 29%. Οι τύποι 1 και 4 ήταν ειδικά συχνοί σε περιστατικά βακτηριακής πνευμονίας. Οι ορότυποι που προκαλούν νόσο σε αυτήν την κοινότητα ήταν αξιοσημείωτα παρόμοιοι με αυτούς που παρατηρούνται στις Ηνωμένες Πολιτείες στο σύνολο. Τα μη τυποποιήσιμα στελέχη πνευμονιόκοκκου σπάνια προκαλούν

διδυμική νόσο, αλλά έχουν συσχετιστεί με σποραδικά περιστατικά καθώς και επιδημίες επιπεφυκίτιδας [77, 78].

### **5.1. Παθογένεια**

Η παθογένεια της πνευμονιοκοκκικής νόσου είναι μια σύνθετη διαδικασία πολλαπλών παραγόντων του βακτηρίου και του ξενιστή που αλληλεπιδρούν. Για να προκαλέσουν νόσο, οι πνευμονιόκοκκοι, όπως άλλα εξωκυττάρια παθογόνα βακτήρια, πρέπει να προσκολληθούν στα κύτταρα των θηλαστικών, να αντιγραφούν στη φυσιολογική τους θέση (in situ), να μεταφερθούν, να αντιγραφούν, και να αποτύχουν να απομακρυνθούν από ανατομικές περιοχές οι οποίες είναι φυσιολογικά ελεύθερες από αυτούς, να διαφύγουν τη φαγοκυττάρωση, και να προκαλέσουν καταστροφή των ιστών προκαλώντας φλεγμονή και/ή παράγοντας ουσίες που καταστρέφουν απευθείας τα κύτταρα. Πολλές από αυτές τις αντιδράσεις ελέγχονται σε μοριακό επίπεδο από ιδιότητες των βακτηρίων και του ξενιστή. [1, 2]

#### **5.1.1. Προσκόλληση, αποικισμός, διείσδυση**

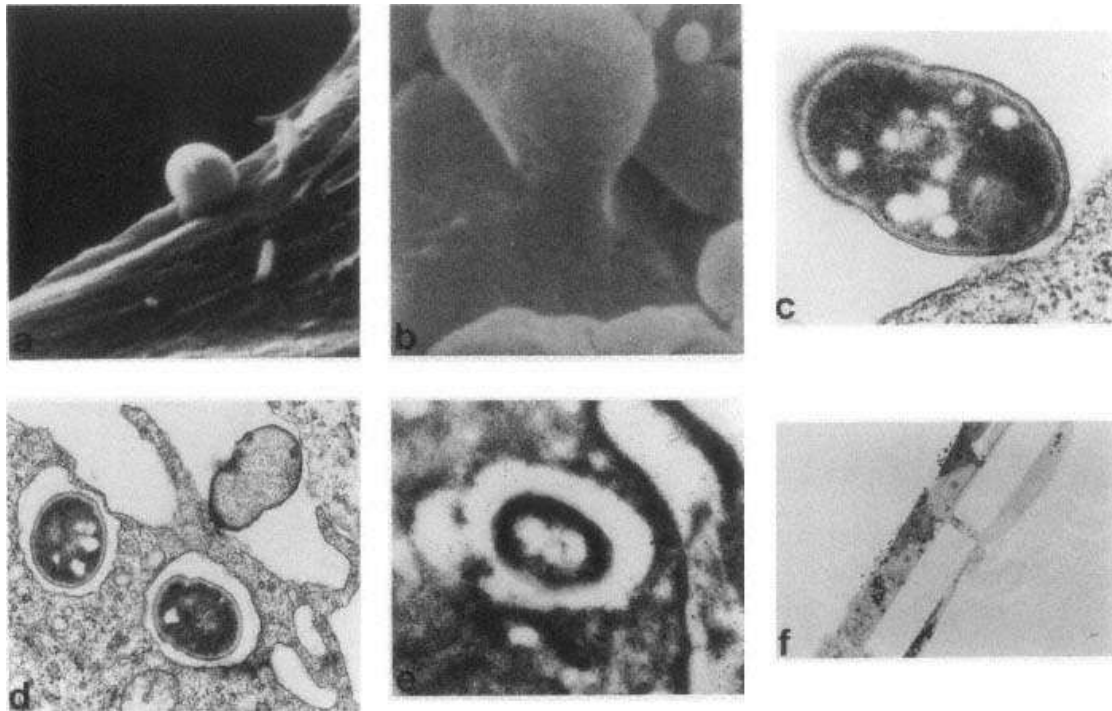
Η επίπτωση του πνευμονιοκοκκικού αποικισμού επιβεβαιώνει την επιτυχία αυτού του μικροοργανισμού να προσκολλάται στα κύτταρα των θηλαστικών και να αναπαράγεται στη φυσιολογική του θέση στον ρινοφάρυγγα. Ο πνευμονιόκοκκος προσκολλάται στα ανθρώπινα κύτταρα του φάρυγγα μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών που περιλαμβάνουν την ειδική αλληλεπίδραση των επιφανειακών προσκολλητινών του βακτηρίου (όπως είναι η πνευμονιοκοκκική επιφανειακή προσκολλητίνη A και οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν τη χολίνη) και των υποδοχέων των επιθηλιακών κυττάρων. Οι νευραμινιδάσες μπορούν να βοηθήσουν τους οργανισμούς στη διάσπαση της

προστατευτικής βλεννώδους στιβάδας και στην αποκάλυψη ειδικών υποδοχέων. Οι γλυκονικές συζεύξεις των επιθηλιακών κυττάρων που περιέχουν τον δισακχαρίτη GlcNAcb1-4Gal [79] ή το ασιαλικό-GM [80] γλυκολιπίδιο είναι πιθανές θέσεις συνδέσεως. Η φάση διαφοροποίησης των πνευμονιόκοκκων μπορεί επίσης να παίξει κάποιο ρόλο. Σε καλλιέργεια σε τεχνητό περιβάλλον, ένας μικτός πληθυσμός από διαφανείς και αδιαφανείς αποικίες μπορεί να αναγνωριστεί. Οι μικροοργανισμοί από τις διαφανείς αποικίες έχουν πολύ αυξημένες ποσότητες της δεσμευτικής πρωτεΐνης A για τη φωσφορυλχολίνη και τη χολίνη (διαφορετική από την επιφανειακή προσκολλητίνη A), το οποίο συμβάλλει στην ικανότητά τους να προσκολλώνται στα κύτταρα των θηλαστικών [81, 82]. Όταν μια αδιαφανής αποικία ενοφθαλμίζεται ενδορρινικά σε ένα πειραματόζωο, μόνο αυτοί οι μικροοργανισμοί που σχηματίζουν διαφανείς αποικίες παραμένουν. Αντίθετα, ο ενδοπεριτοναϊκός ενοφθαλμισμός των αδιαφανών αποικιών μπορεί να είναι θανάσιμος, ενώ οι διαφανείς αποικίες είναι λιγότερο πιθανό να είναι τόσο θανάσιμες. Η αυξημένη παραγωγή ελύτρου από τις αδιαφανείς μορφές μπορεί να είναι εν μέρει υπεύθυνη. Μελέτες της προσκόλλησης σε τεχνητό περιβάλλον (*in vitro*) υποδηλώνουν ότι οι πνευμονιόκοκκοι που απομονώνονται από το μέσο αυτή προσκολλώνται πιο ειδικά στα επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπου από ότι στελέχη που απομονώνονται σε περιπτώσεις βακτηριαιμίας ή μηνιγγίτιδας [83].

Η προσκόλληση μπορεί να απαιτείται για την εγκατάσταση και διατήρηση του αποικισμού, αλλά αυτή δεν είναι μια ιδιότητα η οποία διακρίνει τα στελέχη που προκαλούν λοιμώξεις από αυτά που σχετίζονται με ασυμπτωματική φορεία. Επιπρόσθετοι παράγοντες πρέπει να υπεισέρχονται

στον καθορισμό του κατά πόσον ένα στέλεχος που αποικίζει είναι ικανό να παραβιάζει τις άμυνες της βλεννώδους στιβάδας και να προκαλεί νόσο. Αυτοί μπορούν να περιλαμβάνουν συνακόλουθες ιογενείς λοιμώξεις που προκαλούν τοπική φλεγμονή, εξασθένηση της λειτουργίας των μακροφάγων, δυσλειτουργία του κροσσώτου επιθηλίου, και μειωμένη βλεννοκροσσωτή μεταφορά. [2]

Μόλις συμβεί ο αποικισμός, η λοίμωξη μπορεί να επακολουθήσει εάν οι μικροοργανισμοί μεταφερθούν μέσα σε κοιλότητες από τις οποίες δεν μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, όταν οι μικροοργανισμοί βρίσκουν δίοδο μέσα στις ευσταχιανές σάλπιγγες, στους κόλπους, ή στους βρόγχους, οι μηχανισμοί κάθαρσης, κυρίως η δράση των κροσσών, οδηγούν στη γρήγορη απομάκρυνσή τους. Εάν αλλεργία ή συνυπάρχουσα ιογενής λοίμωξη, για παράδειγμα, έχει προκαλέσει οίδημα το οποίο εμποδίζει το στόμιο της ευσταχιανής σάλπιγγας στον φάρυγγα ή το στόμιο ενός παραρρίνιου κόλπου, κλινικά αναγνωρίσιμη λοίμωξη μπορεί να επακολουθήσει. Παρομοίως, η βλάβη στα κύτταρα του κροσσώτου επιθηλίου των βρόγχων ή η αυξημένη παραγωγή βλέννας, είτε χρόνια (π.χ., από το κάπνισμα τσιγάρων ή από επαγγελματική έκθεση) είτε οξεία (από γρίπη ή κάποια άλλη ιογενή λοίμωξη), μπορούν να εμποδίσουν την απομάκρυνση των εισπνεόμενων μικροοργανισμών και να οδηγήσουν σε λοίμωξη. [1]

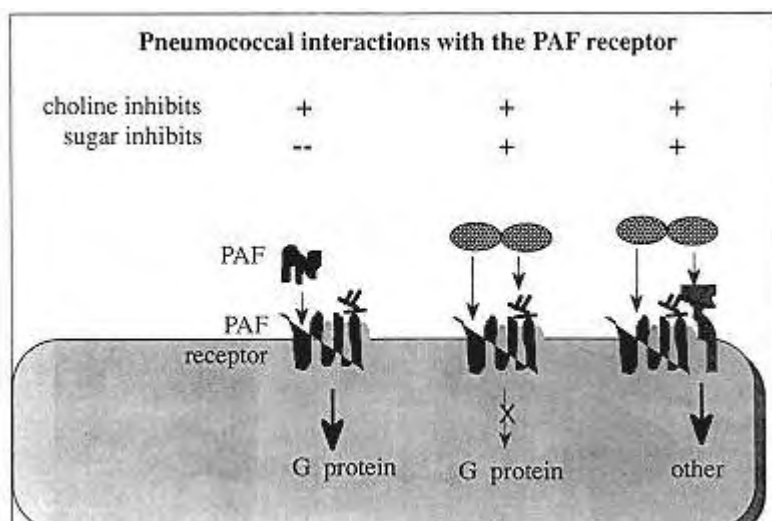


**Εικόνα 9.** Πνευμονιόκοκκος: προσκόλληση και διείσδυση.

Σε κάποιες περιπτώσεις, οι πνευμονιόκοκκοι επίσης δρουν ως διεισδυτικοί οργανισμοί, διαπερνώντας τους βλεννογόνιους φραγμούς. Αυτό πιστεύεται ότι συμβαίνει επειδή η πρωτεΐνη A που δεσμεύει τη χολίνη αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της ανοσοσφαιρίνης στην επιφάνεια των επιθηλιακών και βλεννογόνων κυττάρων, με επακόλουθα την ενδοκύτωση του πνευμονιόκοκκου, τη μεταφορά διαμέσου του κυττάρου, και την απελευθέρωση μέσω της εσωτερικής κυτταρικής μεμβράνης. Εάν οι πνευμονιόκοκκοι απελευθερωθούν στην κυκλοφορία του αίματος, μπορούν να διεισδύσουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων ο οποίος υπερλειτουργεί λόγω των φλεγμονωδών γεγονότων. Ο υποδοχέας του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων διευκολύνει την ενδοκύτωση



των πνευμονιόκοκκων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μια διαδικασία η οποία μπορεί να προάγει τη διείσδυση των πνευμονιόκοκκων. Δεν είναι βέβαιο εάν η θέση της εισόδου είναι το χοριοειδές πλέγμα ή τα ενδοθηλιακά κύτταρα. [1]



**Εικόνα 10.** Αλληλεπίδραση του πνευμονιόκοκκου με τον υποδοχέα του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF receptor).

### 5.1.2. Αποφυγή φαγοκυττάρωσης

Ο πνευμονιόκοκκος προκαλεί νόσο επειδή είναι ικανός να αποφεύγει την κατάποση και την καταστροφή από τα φαγοκύτταρα του ξενιστή. Σε έναν ανοσολογικά φυσιολογικό ξενιστή, συγκεκριμένα στην απουσία αντισώματος έναντι του ελύτρου, οι πνευμονιόκοκκοι φαγοκυτταρώνονται και καταστρέφονται σε μικρό βαθμό από τα φαγοκύτταρα, τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (PMNs), και τα μακροφάγα του ξενιστή. Το έλυτρο παίζει κεντρικό ρόλο στην αποφυγή της φαγοκυττάρωσης. Πιθανοί μηχανισμοί που συμβάλλουν είναι (1) η απουσία υποδοχέων στα φαγοκύτταρα οι οποίοι αναγνωρίζουν τους πολυσακχαρίτες του ελύτρου, (2) η παρουσία

ηλεκτροχημικών δυνάμεων οι οποίες απωθούν τα φαγοκύτταρα, (3) η συγκάλυψη του αντισώματος από συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και τον παράγοντα C3b που μπορούν να είναι συνδεδεμένα στο κυτταρικό τοίχωμα αλλά κάτω από το έλυτρο, και (4) η αδρανοποίηση του συμπληρώματος. Πρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια επίσης συμβάλλουν στην αποφυγή της φαγοκυττάρωσης. Η PspA εμποδίζει την εναπόθεση και την ενεργοποίηση του παράγοντα C3b επιδρώντας με τον παράγοντα B του συμπληρώματος, και η PspC εμποδίζει την ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος δεσμεύοντας τον παράγοντα H του συμπληρώματος. [1]

### **5.1.3. Μη καψιδικοί λοιμογόνοι παράγοντες**

Οι μη καψιδικές πρωτεΐνες, που περιλαμβάνουν την πνευμονολυσίνη, τις επιφανειακές πρωτεΐνες, και την αυτολυσίνη, συμβάλλουν στην παθογένεια της πνευμονιοκοκκικής νόσου. Γενετικά σχεδιασμένοι μεταλλάκτες οι οποίοι στερούνται της ικανότητας να παράγουν μία ή περισσότερες από αυτές τις ουσίες έχει γενικά αποδειχτεί ότι έχουν μειωμένη λοιμογόνο δύναμη, και η ανοσοποίηση με την κεκαθαρμένη ουσία διεγείρει την παραγωγή αντισωμάτων τα οποία προκαλούν προστασία στα πειραματόζωα. [84, 85]

Όλα τα στελέχη του πνευμονιόκοκκου παράγουν πνευμονολυσίνη, μια τοξίνη που ενεργοποιείται από τη θειόλη. Πρόκειται για ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο το οποίο απελευθερώνεται με τη δράση της αυτολυσίνης που βρίσκεται στην επιφάνεια του πνευμονιόκοκκου. Η πνευμονολυσίνη είναι κυτταροτοξική για τα φαγοκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού [86] και προκαλεί φλεγμονή ενεργοποιώντας

το συμπλήρωμα [87] και επάγοντας την παραγωγή του παράγοντα-α νέκρωσης των όγκων και της ιντερλευκίνης-1 (IL-1) [88]. Η πνευμονολυσίνη συνδέεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων του ξενιστή μέσω της αλληλεπίδρασής της με τη χοληστερόλη, στην συνέχεια διεισδύει στη λιπιδική διπλοστιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών δημιουργώντας μεγάλους πόρους και έτσι προκαλεί τη λύση των κυττάρων στόχων [89]. Η ένεση πνευμονολυσίνης στον πνεύμονα πειραματόζωου (ποντικίου) προκαλεί όλα τα ιστολογικά ευρήματα της πνευμονίας, και η ανοσοποίηση των ποντικών με αυτή την ουσία πριν από την λοίμωξη ή η πρόκληση με γενετικά σχεδιασμένους πνευμονιόκοκκους οι οποίοι δεν παράγουν την ουσία αυτή σχετίζονται με σημαντική ελάττωση της λοιμογόνου δύναμης. Διαφορετικές περιοχές του μορίου της πνευμονολυσίνης είναι υπεύθυνες για τις ιδιότητες της κυτταροτοξικότητας και της ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Το ανθρώπινο αντίσωμα έναντι της πνευμονολυσίνης αυξάνεται μετά από πνευμονιοκοκκική πνευμονία, η παρουσία αυτού του αντισώματος σχετίζεται με μειωμένη πιθανότητα βακτηριαιμίας, και προστατεύει τα ποντίκια ενάντια σε πνευμονιοκοκκική πρόκληση. [90-93]

Οι πρωτεΐνες στην επιφάνεια του πνευμονιόκοκκου που συνδέονται με τα υπολείμματα χολίνης μπορούν να μεσολαβήσουν στην προσκόλληση και τη διείσδυση στα κύτταρα των θηλαστικών, ειδικά εάν αυτά τα κύτταρα έχουν διεγερθεί από προηγούμενη έκθεση σε κυτταροκίνες. Η πνευμονιοκοκκική επιφανειακή πρωτεΐνη A (PspA) είναι παρούσα στο κυτταρικό τοίχωμα σχεδόν όλων των πνευμονιόκοκκων και ασκεί μια αντιφαγοκυτταρική δράση, πιθανόν εμποδίζοντας την εναπόθεση του συμπληρώματος [94, 95]. Παρά κάποια αντιγονική μεταβλητότητα, τα αντισώματα που παράγονται έναντι της

πνευμονιοκοκκικής επιφανειακής πρωτεΐνης A προστατεύουν τα πειραματόζωα σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό από την πρόκληση με το ίδιο ή διαφορετικό στέλεχος, και οι γενετικά σχεδιασμένοι μεταλλάκτες οι οποίοι στερούνται αυτής της ιδιότητας έχουν μειωμένη λοιμογόνο δύναμη [96]. Τα ανθρώπινα αντισώματα γι' αυτή την πρωτεΐνη προστατεύουν τα ποντίκια από την πνευμονιοκοκκική λοίμωξη. Παιδιά με διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσο είχαν έξι φορές χαμηλότερα επίπεδα αντισώματος IgG έναντι της PspA από ότι παιδιά με διεισδυτικές λοιμώξεις από άλλους παράγοντες. Η πνευμονιοκοκκική επιφανειακή πρωτεΐνη C (PspC) προάγει την είσοδο των πνευμονιόκοκκων στα επιθηλιακά κύτταρα του ρινοφάρυγγα. Πειραματικά απώλεια της δραστηριότητας της PspC μειώνει τον αποικισμό στα ποντίκια. Η προσκολλητίνη A της επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου (PsaA), μια εκφραζόμενη στην επιφάνεια περμεάση, είναι πάντοτε παρούσα στον πνευμονιόκοκκο [85]. Αυτή η πρωτεΐνη παρουσιάζει πολύ μικρή αντιγονική μεταβλητότητα. Τα αντισώματα γι' αυτή την πρωτεΐνη ελαττώνουν τον πνευμονιοκοκκικό αποικισμό του ρινοφάρυγγα στα πειραματόζωα, πιθανόν εμποδίζοντας την προσκόλληση, ενώ αυτά τα αντισώματα μπορούν επίσης να σχετίζονται με ελαττωμένο κίνδυνο μέσης ωτίτιδας. Η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να εμπλέκεται στον αποικισμό του ρινοφάρυγγα, αλλά φαίνεται ότι συμβάλλει στη λοιμογόνο δύναμη και με άλλους, μέχρι τώρα αδιευκρίνιστους τρόπους. Η αυτολυσίνη συμβάλλει στη λοιμογόνο δύναμη του πνευμονιόκοκκου [97] απελευθερώνοντας άλλους παράγοντες και συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Η αυτολυσίνη διασπά το βακτηριακό τοίχωμα στη θέση σύνδεσης των στελεχιαίων πρωτεϊνών. Στη φύση, αυτό το ένζυμο συμβάλλει στην ανακατασκευή του κυτταρικού τοιχώματος. Στη λοίμωξη, πιθανόν συμβάλλει

στη νόσο απελευθερώνοντας συστατικά της πεπτιδογλυκάνης τα οποία ενεργοποιούν το συμπλήρωμα, καθώς και ουσίες (όπως η πνευμολυσίνη) στις οποίες οι ιστοί του προσβεβλημένου ξενιστή δε θα μπορούσαν αλλιώς να είχαν εκτεθεί. Όπως με άλλους κεκαθαρμένους λοιμογόνους παράγοντες, τα στελέχη τα οποία στερούνται της αυτολυσίνης είναι λιγότερο λοιμογόνα στα πειραματόζωα, και το αντίσωμα για την αυτολυσίνη είναι μέτρια προστατευτικό. Η νευραμινιδάση είναι παρούσα σε όλα τα στελέχη πνευμονιόκοκκου. Συμβάλλει στην προσκόλληση και τον αποικισμό των βακτηρίων απομακρύνοντας το σιαλικό οξύ από την επιφάνεια των κυττάρων του βλεννογονικού επιθηλίου και ξεσκεπάζοντας το GlcNAc-Gal, στο οποίο ο πνευμονιόκοκκος προσκολλάται πιο εύκολα. Η ανοσοποίηση των πειραματόζων με νευραμινιδάση παρέχει επίσης μέτρια προστασία από την παρεντερική πνευμονιοκοκκική πρόκληση. Όλοι οι πνευμονιόκοκκοι επίσης παράγουν υαλουρονιδάση. Η υαλουρονιδάση διευκολύνει τη διείσδυση του πνευμονιόκοκκου στους ιστούς του ξενιστή διασπώντας το υαλουρονικό οξύ, το οποίο είναι απαραίτητο συστατικό του συνδετικού ιστού [98].

<b>Πίνακας 1.</b> Ο ρόλος των πνευμονιοκοκκικών συστατικών ως λοιμογόνων παραγόντων	
Πολυσακχαρίτης του ελύτρου	Προλαμβάνει τη φαγοκυττάρωση, ενεργοποιεί το συμπλήρωμα
Πολυσακχαρίτης του κυτταρικού τοιχώματος	Διεγείρει τη φλεγμονή ενεργοποιώντας ισχυρά το συμπλήρωμα και διεγείροντας την απελευθέρωση κυτταροκινών
Πνευμολυσίνη	Κυτταροτοξική, ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και τις κυτταροκίνες
PspA	Αναστέλλει τη φαγοκυττάρωση εμποδίζοντας την ενεργοποίηση και την εναπόθεση του συμπληρώματος στην επιφάνεια του βακτηρίου
PspC	Αναστέλλει τη φαγοκυττάρωση δεσμεύοντας τον παράγοντα Η του συμπληρώματος
PsaA	Μεσολαβεί στην προσκόλληση
Αυτολυσίνη	Προκαλεί βακτηριακή αποσύνθεση, απελευθερώνει συστατικά
Νευραμινιδάση	Πιθανώς μεσολαβεί στην προσκόλληση
Υαλουρονιδάση	Συμβάλλει στη διείσδυση

#### 5.1.4. Ενεργοποίηση του συμπληρώματος και φλεγμονώδεις κυττοκίνες

Αντίθετα προς κάποιους άλλους μικροοργανισμούς όπως είναι ο πυογόνος στρεπτόκοκκος, ο οποίος παράγει μια ποικιλία ουσιών που προκαλούν βλάβες στους ιστούς, ο πνευμονιόκοκκος παράγει λίγες τοξίνες, από τις οποίες η πνευμονολυσίνη είναι η κύρια. Ο πνευμονιόκοκκος σε μεγάλο βαθμό προκαλεί νόσο επειδή τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματός του και η πνευμονολυσίνη παράγουν μια έντονη φλεγμονώδη απάντηση. Αυτή η φλεγμονώδης απάντηση είναι χαρακτηριστική στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος και στη διέγερση των λευκοκυττάρων μέσω των toll-like υποδοχέων. Το κυτταρικό τοίχωμα του πνευμονιόκοκκου, περιλαμβάνοντας και συστατικά του τειχοϊκού οξέος και της πεπτιδογλυκάνης, ενεργοποιεί το συμπλήρωμα μέσω της εναλλακτικής οδού [99, 100]. Η έγχυση αυτών των συστατικών μέσα στον υπαραχνοειδή χώρο προκαλεί μια φλεγμονώδη αντίδραση η οποία έχει τα χαρακτηριστικά της βακτηριακής μηνιγγίτιδας. Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) μπορεί επίσης να παίξει ενεργό ρόλο, ενεργοποιώντας την κλασσική οδό του συμπληρώματος και προάγοντας τη φαγοκυττάρωση. Το πολυσακχαριδικό έλυτρο επιπλέον εμφανίζεται να ενεργοποιεί την εναλλακτική οδό σε τεχνητό περιβάλλον, μολονότι σε κάπως μικρότερο βαθμό [101]. Αυτός ο τύπος της ενεργοποίησης σχετίζεται με την απελευθέρωση του παράγοντα C5a. Η κλασσική οδός του συμπληρώματος ενεργοποιείται από αντισώματα έναντι των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος ακόμη και σε απουσία των αντισωμάτων έναντι του ελύτρου. Συνεπώς, μια έντονη φλεγμονώδης απάντηση που πυροδοτείται με ενεργοποίηση και της εναλλακτικής και της κλασσικής οδού του

συμπληρώματος συνοδεύει την πνευμονιοκοκκική λοίμωξη ενός ανοσολογικά φυσιολογικού ξενιστή.

Η πεπτιδογλυκάνη και το λιποτειχοϊκό οξύ αλληλεπιδρούν με το CD14, διεγείροντας τον toll-like υποδοχέα 2, και η πνευμονολυσίνη αλληλεπιδρά με τον toll-like υποδοχέα 4 για να επάγει τον πυρηνικό παράγοντα κάππα Β (NF-κΒ). Ο NF-κΒ, στην συνέχεια, διεγείρει την παραγωγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1, IL-6, και του παράγοντα νέκρωσης των όγκων α (TNF-α). Η πνευμονολυσίνη και το βακτηριακό DNA (που σε μεγάλο βαθμό απελευθερώνεται από τη δράση της αυτολυσίνης) επίσης διεγείρουν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, προφανώς με άλλους μηχανισμούς. Αυτές οι παρατηρήσεις είναι όλες σύμφωνες με την αντίληψη ότι η πνευμονιοκοκκική νόσος είναι σε μεγάλο βαθμό αποτέλεσμα της φλεγμονής.

[1]

## **6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ**

### **6.1. Μη ειδικοί ανοσολογικοί μηχανισμοί**

Μη ειδικοί μηχανισμοί άμυνας του ξενιστή παίζουν αποφασιστικό προστατευτικό ρόλο και περιλαμβάνουν το βλεννογόνιο επιθήλιο της αναπνευστικής οδού, τη βλεννοκροσώτη κάθαρση των βακτηρίων και των νεκρωμένων ιστών, και το αντανεκλαστικό του βήχα. Τα πνευμονικά μακροφάγα, και πιθανόν τα ιστικά μακροφάγα, είναι ικανά να παγιδεύουν και να σκοτώνουν τους λοιμογόνους πνευμονιόκοκκους σε απουσία αντισώματος και με μικρή ή καθόλου συμμετοχή του συμπληρώματος. Οι μη ειδικές



οψωνίνες περιλαμβάνουν τη φιμπρονεκτίνη, τον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων του ανθρώπου, και την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP). Η CRP είναι μια πρωτεΐνη οξείας φάσης η οποία συνδέεται στους καθοριστές φωσφορικής χολίνης των πνευμονιόκοκκων και άλλων βακτηρίων καθώς και σε κατεστραμμένες επιφάνειες των κυττάρων του ξενιστή. Ενεργοποιεί την κλασσική οδό του συμπληρώματος και προάγει τη φαγοκυττάρωση.

## **6.2. Ειδικοί ανοσολογικοί μηχανισμοί**

Η κύρια άμυνα έναντι της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης αναγνωρίζεται ότι είναι η συνδυασμένη δράση των ειδικών για τον τύπο αντισωμάτων έναντι του ελύτρου και του συμπληρώματος (οψωνοποίηση), ακολουθούμενη από αποτελεσματική φαγοκυττάρωση και εξουδετέρωση από τα ουδετερόφιλα [102].

Ο ρόλος του πολυσακχαρίτη του ελύτρου στην πρόκληση ειδικού τύπου ανοσίας αποδείχτηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1930. Υπάρχουν επαρκείς αποδείξεις ότι τα αντισώματα έναντι του ελύτρου προστατεύουν από πνευμονιοκοκκική λοίμωξη, με μικρή ή καθόλου απόδειξη μέχρι σήμερα που να υποστηρίζει τον ρόλο των αντισωμάτων έναντι άλλων βακτηριακών συστατικών. (1) Τα αντισώματα έναντι του ελύτρου εμφανίζονται στην κυκλοφορία του αίματος 5 ως 8 ημέρες μετά την έναρξη της λοίμωξης, που είναι η χρονική στιγμή όταν ο πυρετός λύεται αυτόματα σε απουσία θεραπευτικής αγωγής. (2) Στην εποχή πριν από την εμφάνιση των αντιμικροβιακών, η χορήγηση ορού που περιείχε ειδικά για τον τύπο αντισώματα ήταν μετρίως αποτελεσματική στη θεραπεία της

πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας. (3) Σε διάφορες αναλύσεις παρουσιάζεται εξαιρετικά αυξανόμενη προσλήψη και καταστροφή των πνευμονιόκοκκων σε τεχνητό περιβάλλον (*in vitro*) σε παρουσία των αντισωμάτων έναντι του ελύτρου. [103] Αντίθετα, εκτός από έμμεσα δεδομένα που προτείνουν μια συσχέτιση μεταξύ των αντισωμάτων έναντι της πνευμονολυσίνης ή της πνευμονιοκοκκικής επιφανειακής προσκολλητίνης A, υπάρχουν λίγα δεδομένα που υποστηρίζουν έναν προστατευτικό ρόλο των αντισωμάτων έναντι σε άλλων ουσιών. Είναι σημαντικό να σημειώσουμε, όμως, ότι στην εποχή πριν από την εμφάνιση των αντιμικροβιακών, κάποιο ποσοστό ασθενών ανέρρωσε από πνευμονιοκοκκική πνευμονία χωρίς να παράγουν μετρήσιμα ποσά αντισωμάτων έναντι του ελύτρου. Επιπλέον, κάποιοι ενήλικες στερούνται της ικανότητας να δημιουργούν αντισώματα έναντι των περισσότερων πνευμονιοκοκκικών ελύτρων, εν τούτοις ζουν υγιείς ζωές ελεύθερες από πνευμονιοκοκκική νόσο. Συνεπώς, όταν το αντίσωμα έναντι του ελύτρου υπάρχει, θεωρείται ως ένας γενικά καλός, αλλά όχι ιδανικός, δείκτης ανοσίας. Η συζήτηση δηλαδή, ότι η απουσία τέτοιων αντισωμάτων υποδηλώνει έναν σχετικό βαθμό ευαισθησίας, είναι πιθανόν αληθινή, έστω και αν πολλοί άλλοι παράγοντες υπεισέρχονται στην προστασία από την πνευμονιοκοκκική νόσο.

Μετά από πνευμονιοκοκκική λοίμωξη, εμφανίζονται αντισώματα έναντι του λοιμογόνου ορότυπου στον ορό των ενηλίκων σε περίπου 2/3 των περιπτώσεων, με κάποια διακύμανση ανάλογα με τον ορότυπο. Στα παιδιά η συχνότητα εμφάνισης αντισωμάτων είναι χαμηλότερη. Παιδιά ηλικίας κάτω των 2 ετών είναι γνωστό ότι ανταποκρίνονται φτωχά στην πνευμονιοκοκκική λοίμωξη ή ανοσοποίηση, ειδικά έναντι συχνών ορότυπων όπως οι 6, 19, και

23. Οι λόγοι για την αποτυχία ανάπτυξης ανιχνεύσιμων επιπέδων αντισωμάτων μετά τη λοίμωξη παραμένουν ασαφείς. Μια εξήγηση είναι η γενετικά μεσολαβούμενη ανικανότητα να αναγνωρίσουν ως «ξένο» τον πολυσακχαρίτη του ελύτρου και συνεπώς να παράγουν αντισώματα έναντι αυτού [104]. Η αποτυχία να αλλάξουν σε IgG σύνθεση ή να παράγουν ειδικές υποομάδες IgG μπορούν επίσης να εμπλέκονται.

Ο αποικισμός επίσης οδηγεί σε δημιουργία αντισωμάτων. Σε απουσία συνθηκών που προδιαθέτουν σε λοίμωξη, αντισώματα έναντι του πολυσακχαρίτη του ελύτρου ενός οργανισμού που αποικίζει είναι πιθανόν να εμφανιστούν πριν από τη λοίμωξη. Ωστόσο, η οξεία μέση ωτίτιδα είναι πιο πιθανό να προηγείται της εμφάνισης αντισωμάτων σε παιδιά που έχουν οξεία συμφόρηση των ρινικών βλεννογόνων δευτεροπαθώς μετά από ιογενή λοίμωξη. Βεβαίως, άτομα που έχουν ελαττωμένη ικανότητα να σχηματίζουν αντισώματα παραμένουν ευαίσθητα εφόσον είναι αποικισμένα, κάτι που εξηγεί την υψηλή συχνότητα της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα, σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας, και άλλες τέτοιες καταστάσεις. Ο μέγιστος προστατευτικός ρόλος των αντισωμάτων έναντι άλλων συστατικών του πνευμονιόκοκκου μπορεί να είναι να προλαμβάνουν τη λοίμωξη μέχρι τα αντισώματα έναντι του πολυσακχαρίτη του ελύτρου να εμφανιστούν. [1]

Λίγα είναι γνωστά σχετικά με τον ρόλο της βλεννογονικής ανοσίας στον αποικισμό ή τη λοίμωξη στον άνθρωπο. Τα ειδικά για τον τύπο αντισώματα έναντι του ελύτρου έχουν ανιχνευτεί στον σίελο και σε χαμηλά επίπεδα στο μητρικό γάλα, αλλά δεν υπάρχει εμφανής συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων αυτών των αντισωμάτων και του αποικισμού ή της ανάπτυξης μέσης ωτίτιδας

στα βρέφη και νήπια [105, 106]. Οι βλεννογονικές απαντήσεις μπορούν να επάγονται ανεξάρτητα της συστηματικής απάντησης, και τα ειδικά για τον τύπο εκκριτικά IgA αντισώματα μπορούν να εμφανίζονται από την ηλικία των 6 μηνών στις ρινικές εκκρίσεις των βρεφών με πνευμονιοκοκκική μέση ωτίτιδα. Το προβάδισμα της βλεννογονικής απόκρισης υποστηρίζεται επιπλέον από την ανίχνευση ειδικών B κυττάρων που εκκρίνουν IgA στο περιφερικό αίμα βρεφών σύντομα μετά την έναρξη της πνευμονιοκοκκικής μέσης ωτίτιδας [107]. Τα εκκριτικά αντισώματα πιθανόν παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της προσκόλλησης και στην παρεμπόδιση των πνευμονιόκοκκων που αποικίζουν να διεισδύσουν στη βλεννογόνια επιφάνεια.

## **7. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΔΙΑΘΕΤΟΥΝ ΣΕ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΗ ΛΟΙΜΩΞΗ**

Ο πνευμονιόκοκκος είναι ένα εξωκυττάριο παθογόνο βακτήριο και η άμυνα του ξενιστή έναντι στη λοίμωξη βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε παράγοντες της χυμικής ανοσίας, όπως είναι τα αντισώματα και το συμπλήρωμα, και στα φαγοκύτταρα, ειδικά τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα.

Η ελαττωματική ανάπτυξη αντισωμάτων, είτε συγγενής είτε επίκτητη, έχει την μεγαλύτερη επίδραση στην ευαισθησία σε πνευμονιοκοκκική λοίμωξη. Η αρχική περιγραφή του Bruton της συγγενούς αγαμμασφαιριναιμίας τόνισε την εξέχουσα θέση του πνευμονιόκοκκου ως λοιμογόνου παράγοντα. Ο πνευμονιόκοκκος αποτελεί επίσης μείζων αίτιο σοβαρής λοίμωξης στην

επίκτητη αγαμμασφαιριναιμία (κοινή ποικίλλουσα υπογαμμασφαιριναιμία) και πιθανόν στην ανεπάρκεια των IgG υποτάξεων. [1]

Η λοίμωξη από τον ιό της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου (HIV) προκαλεί ανεπάρκειες σε πολλά σημεία της άμυνας του ξενιστή, αλλά η ελαττωματική παραγωγή αντισωμάτων πιθανόν επικρατεί στην προδιάθεση για πνευμονιοκοκκική λοίμωξη. Καθώς η HIV λοίμωξη εξελίσσεται και ο αριθμός των CD4 λεμφοκυττάρων πέφτει κάτω από 500/mm<sup>2</sup>, η ικανότητα να παράγονται αντισώματα για τους πολυσακχαρίτες του ελύτρου του πνευμονιόκοκκου μειώνεται γρήγορα. [108] Η συχνότητα της πνευμονιοκοκκικής βακτηριαιμίας σε ανθρώπους με HIV λοίμωξη προσεγγίζει το 10 ανά 1000 ασθενείς ανά έτος, μια αύξηση κατά 200 φορές σε σύγκριση με τον υπόλοιπο πληθυσμό.

Από τις πολλές πιθανές ανωμαλίες στο συμπλήρωμα, μόνο αυτοί οι παράγοντες που χρειάζονται για την παραγωγή του κλάσματος C3b σχετίζονται με την πνευμονιοκοκκική λοίμωξη. Επίσης ανεπάρκειες στα κλάσματα C1, C2, και C4, είτε συγγενείς είτε επίκτητες, αναμένεται να σχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία στην πνευμονιοκοκκική λοίμωξη.

Πολλές χρόνιες παθήσεις σχετίζονται με πνευμονιοκοκκική πνευμονία. Η πνευμονιοκοκκική πνευμονία μπορεί να ακολουθεί τη νοσηλεία για άλλες αιτίες και έχει ακόμη παρατηρηθεί ως νοσοκομειακή λοίμωξη. Άλλοι παράγοντες όπως η έκθεση στο κρύο, το άγχος/στρες, και η κακουχία μπορούν να προδιαθέσουν σε πνευμονιοκοκκική πνευμονία με άγνωστους μηχανισμούς.

Προηγούμενη ιογενής λοίμωξη του αναπνευστικού, ειδικά λοίμωξη από τον ιό της γρίπης, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην προδιάθεση για πνευμονιοκοκκική λοίμωξη [56]. Η υπερρύθμιση των επιφανειακών υποδοχέων κατά τη διάρκεια ιογενούς λοίμωξης μπορεί να προάγει την πνευμονιοκοκκική προσκόλληση και διείσδυση. Τα βακτήρια απομακρύνονται λιγότερο από τους αεραγωγούς λόγω της ιογενούς βλάβης.

#### Καταστάσεις που προδιαθέτουν σε πνευμονιοκοκκική λοίμωξη:

- ❖ Ελαττωματική ανάπτυξη αντισωμάτων:
  - Πρωτοπαθής: συγγενής αγαμμασφαιριναιμία, κοινή ποικίλλουσα (επίκτητη) υπογαμμασφαιριναιμία, ανεπάρκεια ειδικών IgG υποτάξεων
  - Δευτεροπαθής: πολλαπλούν μυέλωμα, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, λέμφωμα, HIV λοίμωξη
- ❖ Ελαττωματικό συμπλήρωμα (πρωτοπαθώς ή δευτεροπαθώς): ελάττωση ή απουσία των C1, C2, C3, C4
- ❖ Ανεπάρκεια Πολυμορφοπύρηνων: πρωτοπαθής στην κυκλική ουδετεροπενία, δευτεροπαθής στην ουδετεροπενία την οφειλόμενη σε φάρμακα και στην απλαστική αναιμία
- ❖ Πολυμορφοπύρηννα με ελαττωμένη λειτουργία: αλκοολισμός, κίρρωση ήπατος, σακχαρώδης διαβήτης, αγωγή με κορτικοστεροειδή, νεφρική ανεπάρκεια
- ❖ Ελαττωματική κάθαρση στην πνευμονιοκοκκική βακτηριαιμία: πρωτοπαθής στην συγγενή ασπληνία και την υποσπληνία, δευτεροπαθής στην σπληνεκτομή και τη δρεπανοκυτταρική νόσο

- ❖ Πολυπαραγοντικές και/ή άλλες καταστάσεις: βρέφη και ηλικιωμένοι, αγωγή με κορτικοστεροειδή, υποσιτισμός, κίρρωση ήπατος, νεφρική ανεπάρκεια, σακχαρώδης διαβήτης, αλκοολισμός, χρόνια νόσος – νοσηλεία, κακουχία, άγχος/στρες, έκθεση στο κρύο
- ❖ Αυξημένη πιθανότητα έκθεσης: παιδικοί σταθμοί, στρατόπεδα εκπαίδευσης, φυλακές, άσυλα για άστεγους
- ❖ Προηγούμενη λοίμωξη του αναπνευστικού: γρίπη
- ❖ Φλεγμονώδεις καταστάσεις: κάπνισμα, άσθμα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια

## 8. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Ο πνευμονιόκοκκος προκαλεί λοίμωξη του μέσου ωτός, των παραρρίνιων κόλπων, της τραχείας, των βρόγχων, και των πνευμόνων μέσω άμεσης διασποράς των μικροοργανισμών από το σημείο αποικισμού στον ρινοφάρυγγα και προκαλεί λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, των καρδιακών βαλβίδων, των οστών, των αρθρώσεων, και της περιτοναϊκής κοιλότητας μέσω αιματογενούς διασποράς. Η λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, της υπεζωκοτικής ή της περιτοναϊκής κοιλότητας μπορεί να συμβεί με άμεση επέκταση ή μέσω αιματογενούς διασποράς, σε κάθε περίπτωση, η πορεία της λοίμωξης δεν μπορεί συνήθως να προσδιοριστεί. Η βακτηριαιμία που απαντάται χωρίς εμφανή πηγή ή εστία λοίμωξης ονομάζεται πρωτοπαθής βακτηριαιμία. Η πρωτοπαθής βακτηριαιμία ήταν πάντα πιο συχνή στα παιδιά από ότι στους ενήλικες, και όταν η θεραπεία καθυστερούσε συχνά μια εστία λοίμωξης γίνονταν εμφανής.

### 8.1. Μέση Ωτίτιδα

Η οξεία μέση ωτίτιδα, η οποία ορίζεται από την ύπαρξη υγρού στην περιοχή του μέσου ωτός συνοδευόμενη από σημεία και συμπτώματα οξείας νόσου, είναι η πιο συχνή βακτηριακή λοίμωξη της παιδικής ηλικίας. Ουσιαστικά κάθε μελέτη για την οξεία μέση ωτίτιδα στην οποία έχει καλλιεργηθεί υλικό από το μέσο ους έχει αποδείξει ότι ο πνευμονιόκοκκος είναι το πιο συχνό στέλεχος ή δεύτερο σε συχνότητα μετά από τον μη τυποποιήσιμο *Haemophilus influenzae*, η *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* είναι συνήθως σε απόσταση τρίτη. Σε αυτές τις μελέτες, οι οποίες συνήθως διεξάγονται σε παιδιά ηλικίας 6 μηνών έως 4 ετών, ο πνευμονιόκοκκος εμπλέκεται σε περίπου 40% ως 50% των περιστατικών στα οποία απομονώνεται ένας αιτιολογικός παράγοντας ή στο 30% ως 40% όλων των περιστατικών. Τα τελευταία χρόνια οι πνευμονιόκοκκοι με αντοχή στην πενικιλίνη έχουν αποτελέσει αιτία αποτυχίας της θεραπευτικής αγωγής [109]. Ακόμη και όταν η οξεία λοίμωξη ελεγχθεί με την αντιμικροβιακή αγωγή, το υπολειπόμενο υγρό στο μέσο ους μπορεί να επιμένει για εβδομάδες ή μήνες προκαλώντας λίγα συμπτώματα εκτός από ήπια ή μέτρια βαρηκοΐα αγωγιμότητας. Αυτή η κατάσταση γνωστή ως εκκριτική μέση ωτίτιδα μπορεί να σχετίζεται με καθυστέρηση στην ανάπτυξη του λόγου.

Η προηγούμενη λοίμωξη από ιό του αναπνευστικού πιστεύεται ότι παίζει μείζονα ρόλο προκαλώντας συμφόρηση του στομίου της ευσταχιανής σάλπιγγας. Η φλεγμονή και η υπεραιμία του επιθηλίου της ευσταχιανής σάλπιγγας έχει ως αποτέλεσμα την απόφραξη και την αποτυχία κάθαρσης των εκκρίσεων από το μέσο ους. Τα βακτήρια από το σημείο αποικισμού στον ρινοφάρυγγα παγιδεύονται και πολλαπλασιάζονται στο υγρό του μέσου ωτός,



και μπορούν να εισβάλλουν στον υποβλεννογόνιο προκαλώντας περαιτέρω φλεγμονή. Η πεπτιδογλυκάνη και το τειχοϊκό οξύ του πνευμονιόκοκκου (C-πολυσακχαρίτης) είναι οι κύριοι εκκινητές της φλεγμονής του μέσου ωτός. Αυτά τα προϊόντα διάσπασης του κυτταρικού τοιχώματος ενεργοποιούν την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος, επάγουν τις κυτοκίνες, και οδηγούν στην στρατολόγηση των ουδετερόφιλων.

Προοπτικές μακροχρόνιες μελέτες [38, 43, 110] έχουν δείξει ότι όταν αναπτύσσεται λοίμωξη, στις περισσότερες περιπτώσεις ακολουθεί αρκετά στενά μετά από αποικισμό με έναν νέο ορότυπο, αν και, στις περισσότερες περιπτώσεις αποικισμού δεν αναπτύσσεται νόσος. Οι ορότυποι 6, 14, 19F, και 23F επικρατούν ως οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν και προκαλούν λοίμωξη.

## **8.2. Ρινοκολπίτιδα**

Η ρινοκολπίτιδα μπορεί να ταξινομηθεί σε οξεία (διάρκειας <1 μήνα), υποξεία (1 έως 3 μήνες) και χρόνια (>3 μήνες). Η οξεία λοίμωξη των παραρρίνιων κόλπων προκαλείται από τους ίδιους μικροοργανισμούς όπως στην οξεία μέση ωτίτιδα, συνεπώς ο πνευμονιόκοκκος επικρατεί ή είναι δεύτερος μετά τον *H. influenzae*. Ο πνευμονιόκοκκος και ο *H. influenzae* αποτελούν περίπου το 70% των στελεχών που απομονώνονται με παρακέντηση των ιγμορείων άντρων σε οξείες και υποξείες περιπτώσεις. Στην παθογένεση αυτής της λοίμωξης σημαντική είναι η υπεραιμία του βλεννογόνου που προκαλείται από αλλεργία ή ιογενή λοίμωξη. Η επακόλουθη απόφραξη εμποδίζει την κάθαρση των βακτηρίων. Η συσσώρευση υγρού στις κοιλότητες των παραρρίνιων κόλπων, ακόμη και κατά τη διάρκεια απλών

κρυολογημάτων, παρέχει υλικό για τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων και την επακόλουθη οξεία λοίμωξη των κόλπων.

### 8.3. Μηνιγγίτιδα

Εκτός από τη διάρκεια επιδημίας μηνιγγιδοκοκκικής λοίμωξης, ο πνευμονιόκοκκος είναι το πιο συχνό αίτιο βακτηριακής μηνιγγίτιδας στους ενήλικες. Σε χώρες που έχουν εφαρμόσει αποτελεσματικά σχήματα εμβολιασμού για τον *H. Influenza* τύπου b, ο πνευμονιόκοκκος έχει γίνει το πιο συχνό σποραδικό αίτιο μηνιγγίτιδας σε παιδιά ηλικίας άνω των 6 μηνών. Η πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα μπορεί να είναι γρήγορα θανατηφόρα εάν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα και αποτελεσματικά με αντιμικροβιακά.

Η παθογένεση της μηνιγγίτιδας μπορεί να οφείλεται σε άμεση επέκταση από τους κόλπους ή το μέσο ους ή να είναι το αποτέλεσμα βακτηριαιμίας. Αν και η αιματογενής διασπορά στο χοριοειδές πλέγμα αρχικά θεωρήθηκε ότι είναι η παθογένεση στις περισσότερες περιπτώσεις πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας, τώρα πιστεύεται ότι η λοίμωξη υπερ-ρυθμίζει τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων πάνω στο αγγειακό ενδοθήλιο στις μήνιγγες, και οι πνευμονιόκοκκοι προσκολλώνται και ενθυλακώνονται με αυτόν τον μηχανισμό. Η επικοινωνία μεταξύ του έσω ωτός και του υπαραχνοειδούς χώρου μπορεί να εξηγήσει την κώφωση σε ασθενείς με αιματογενή βακτηριακή μηνιγγίτιδα.

Μόλις οι πνευμονιόκοκκοι εμφανιστούν στις μήνιγγες ή στον υπαραχνοειδή χώρο, η ικανότητα να διαφεύγουν τη φαγοκυττάρωση και να

προκαλούν φλεγμονή παίζει κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της λοίμωξης. Η φλεγμονώδης απάντηση ξεκινά καθώς οι πνευμονιόκοκκοι καταστρέφονται και απελευθερώνουν κυτταρικό τοίχωμα, πνευμολυσίνη, και άλλα συστατικά. Ο βαθμός της φλεγμονής και η πορεία της νόσου ποικίλλουν και εξαρτώνται από το λοιμογόνο στέλεχος ή ορότυπο, πιθανόν λόγω διαφορών στη λοιμογόνο δύναμη, στον μεταβολισμό του κυτταρικού τοιχώματος, και στην ικανότητα έναρξης φλεγμονής. Όταν οι πνευμονιόκοκκοι καταστρέφονται γρήγορα από την αντιμικροβιακή αγωγή, τα προϊόντα διάσπασής τους προκαλούν απελευθέρωση της IL-1 και του TNF, έχοντας ως αποτέλεσμα μια έντονη φλεγμονώδη απάντηση. Η φλεγμονώδης απάντηση προάγει τη δημιουργία ενδιάμεσων προϊόντων του οξυγόνου στα μικρότερα αγγεία, προκαλώντας μια αρχική αύξηση της εγκεφαλικής αιματικής ροής. Αργότερα στην πορεία της νόσου, η εγκεφαλική αιματική ροή μειώνεται από το εγκεφαλικό οίδημα και από την αυξανόμενη ενδοκρανιακή πίεση. Το αγγειακό σύστημα του εγκεφάλου τελικά χάνει τη φυσιολογική αυτορρυθμιστική του λειτουργία, και στο σημείο αυτό η εγκεφαλική αιματική ροή αυξομειώνεται σύμφωνα με την αρτηριακή πίεση του αίματος.

Κανένα διακριτό κλινικό ή εργαστηριακό χαρακτηριστικό της πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας δε βοηθά τον κλινικό ιατρό να υποπτευθεί τον πνευμονιόκοκκο παρά οποιονδήποτε άλλον αιτιολογικό παράγοντα. Τα βρέφη συχνά έχουν λίγα ή καθόλου μηνιγγικά σημεία και συμπτώματα, και μόνο στο 1/3 των περιπτώσεων αναπτύσσουν προέχουσα πρόσθια πηγή συνήθως αργότερα στην πορεία της νόσου. Συνήθως έχουν ασαφή μη ειδικά συμπτώματα, όπως ευερεθιστότητα, λήθαργο, διαταραχή του επιπέδου

συνείδησης, ανησυχία, εμέτους, μειωμένη σίτιση, και σπασμούς. Τα εστιακά νευρολογικά ελλείμματα είναι γενικά ασυνήθη. [2]

Η διάγνωση της μηνιγγίτιδας βασίζεται στη γενική εξέταση και στην καλλιέργεια του ΕΝΥ. Η πλειοκύττωση είναι παρούσα σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις στα παιδιά σχολικής ηλικίας. Κάποια βρέφη μπορεί να έχουν μικρή ή καθυστερημένη πλειοκύττωση. Αν και μερικοί ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν αρχικά υπεροχή των λεμφοκυττάρων, οι περισσότεροι (86%) θα εμφανίσουν στροφή προς τα ουδετερόφιλα μέσα σε 48 ώρες. Ο συνολικός αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων γενικά αυξάνεται τις πρώτες 24 με 48 ώρες από τη χορήγηση της αντιμικροβιακής αγωγής, και στην συνέχεια ελαττώνεται. Το λεύκωμα στο ΕΝΥ συνήθως είναι αρχικά αυξημένο (>100mg/dl) ακόμη και σε απουσία σημαντικής πλειοκύττωσης. Επίσης το χαμηλό σάκχαρο στο ΕΝΥ είναι συχνό εύρημα, αλλά λιγότερο αξιόπιστο. [2]

Χρησιμοποιώντας σύγχρονες εργαστηριακές τεχνικές για τη φυγοκέντρηση των δειγμάτων, η εξέταση ενός δείγματος ΕΝΥ με Gram χρώση παρέχει τη σωστή διάγνωση σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός εάν έχουν παρέλθει 3 έως 6 ώρες από τη χορήγηση ενός δραστικού αντιμικροβιακού. Σε αυτή την περίπτωση ο αριθμός των βακτηρίων μπορεί να ελαττωθεί σε μεγάλο βαθμό και η καλλιέργεια του ΕΝΥ να είναι στείρα. [1]

Σε μία ανασκόπηση μελετών [111], που διενεργήθηκαν μετά το 1955 και αφορούσαν την πρόγνωση της βακτηριακής μηνιγγίτιδας σε παιδιά ηλικίας 2 μηνών έως 19 ετών, βρέθηκε ότι η θνητότητα από βακτηριακή μηνιγγίτιδα στις αναπτυγμένες χώρες (19 μελέτες) σχετίζεται περισσότερο με την πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα (15,3%, έναντι 3,8% για την μηνιγγίτιδα από *Haemophilus influenzae* και 7,5% από *Neisseria meningitidis*). Επιπλέον η

πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα σχετίζεται πιο συχνά με νευρολογικά υπολείμματα, επακόλουθη νοητική υστέρηση, σπαστικότητα και κώφωση.

Οι συμπληρωματικές θεραπείες, όπως είναι η χορήγηση στεροειδών και η υποστηρικτική αγωγή για τη διατήρηση ικανοποιητικής εγκεφαλικής αιματικής ροής, κατευθύνονται προς τη διακοπή ή την αντιστροφή των παθοφυσιολογικών απαντήσεων του ξενιστή. Η δεξαμεθαζόνη που δίνεται πριν από ή τη στιγμή της χορήγησης των αντιμικροβιακών ελαττώνει την απελευθέρωση στο ΕΝΥ της IL-1 αλλά όχι του TNF. Μη-στεροειδικά αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως είναι η ινδομεθακίνη, ελαττώνουν το εγκεφαλικό οίδημα αλλά όχι τη φλεγμονή.

#### **8.4. Μικροβαιμία και σηψαιμία**

Η μικροβαιμία, δηλαδή η εύρεση μικροοργανισμών στην κυκλοφορία του αίματος, μπορεί να σχετίζεται τυχαία με ήπια νόσο ή μπορεί να αντανakλά σοβαρή ανεξέλεγκτη λοίμωξη. Η σηψαιμία αποτελεί σοβαρή νόσο που επηρεάζει πολλαπλά όργανα. Η μικροβαιμία και η σηψαιμία είναι αναλογικά πιο συχνές και πιο θανατηφόρες σε ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα. Σε αλλιώς υγιή παιδιά δεν ανευρίσκεται η εστία της λοίμωξης στα μισά παιδιά με μικροβαιμία. Περίπου το 1/4 των περιστατικών μικροβαιμίας σχετίζεται με την μέση ωτίτιδα. Άλλο 1/3 απαντάται σε συνδυασμό με πνευμονία ή άλλες εστιακές λοιμώξεις, όπως αρθρίτιδα, κυτταρίτιδα ή περιτονίτιδα. [2]

Παραμένει ασαφές με ποιο τρόπο οι πνευμονιόκοκκοι διεισδύουν στην κυκλοφορία του αίματος και προκαλούν μικροβαιμία. Σε μελέτες που έγιναν τη δεκαετία του 1930, πειραματόζωα έπαθαν βακτηριαιμία μέσα σε λεπτά μετά από ενδορρινική έγχυση, υποδηλώνοντας ότι οι οργανισμοί μπορούν να

εισβάλλουν κατευθείαν μέσω του οσφρητικού βλεννογόνου. Άλλα πειράματα πρότειναν ότι οι πνευμονιόκοκκοι από τον ρινοφάρυγγα αρχικά εισέρχονται στον υποβλεννογόνο και μεταφέρονται στα τραχηλικά λεμφαγγεία, όπου πολλαπλασιάζονται, και τελικά εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος. Σε πειραματική πνευμονία οι πνευμονιόκοκκοι πολύ γρήγορα απομακρύνονται από τον φυσιολογικό πνεύμονα, αλλά οι μικροοργανισμοί οι οποίοι διαφεύγουν τη φαγοκυττάρωση μπορούν να περάσουν από τις κυψελίδες στα επιχώρια λεμφαγγεία και να εμφανιστούν στο αίμα μετά από 6 ως 24 ώρες. Μόλις διεισδύσουν στην κυκλοφορία οι πνευμονιόκοκκοι διηθούνται μέσω του σπληνός και του ήπατος.

Τα κύρια χαρακτηριστικά της πνευμονιοκοκκικής μικροβαιμίας στην πλειονότητα των παιδιών είναι η ηλικία μικρότερη των 24 μηνών και η θερμοκρασία σώματος πάνω από 39°C. Η κλινική εικόνα αρχικά μπορεί να περιλαμβάνει ιογενή συμπτώματα, πυρετό χωρίς εστία, αναπνευστική δυσχέρεια, φαρυγγίτιδα, εκδηλώσεις γαστρεντερίτιδας. Από τον εργαστηριακό έλεγχο έχουμε αυξημένο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων (ή αυξημένο απόλυτο αριθμό ουδετεροφίλων) και αυξημένη ταχύτητα καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων.

## **8.5. Πνευμονία**

### **8.5.1. Παθογένεση**

Η πνευμονία εμφανίζεται όταν οι προστατευτικοί μηχανισμοί αποτύχουν να εμποδίσουν την είσοδο των πνευμονιόκοκκων στις κυψελίδες και την επακόλουθη αντιγραφή τους. Τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται στα κυψελιδικά διαστήματα και μεταφέρονται κατά μήκος των κυψελιδικών

διαφραγματίων, όπου ενεργοποιούν το συμπλήρωμα, προκαλούν την παραγωγή κυτταροκινών και υπερ-ρυθμίζουν τους υποδοχείς του αγγειακού ενδοθηλίου. Εξιδρωματικό υγρό και λευκά αιμοσφαίρια συναθροίζονται στα διαφραγμάτια και τις κυψελίδες και εκτείνονται σε άλλες περιοχές μέσω των πόρων του Kohn. Αυτή η πλήρωση των κυψελίδων με μικροοργανισμούς και το φλεγμονώδες εξίδρωμα καθορίζει την ύπαρξη πνευμονίας, και η κλινική διάγνωση γίνεται όταν η συσσώρευση υγρού είναι αρκετά μεγάλη ώστε να είναι ορατή ακτινολογικά ως μια αδιαφανής ή «πυκνωτική» περιοχή.

#### 8.5.2. Συμπτώματα και Κλινικά Ευρήματα

Οι ασθενείς με πνευμονιοκοκκική πνευμονία συνήθως εμφανίζονται με όψη πάσχοντος με συνοδό πυρετό και παραγωγικό βήχα. Τα πιο συχνά συμπτώματα της πνευμονίας είναι βήχας, κόπωση, πυρετός, ρίγος, εφίδρωση, και δύσπνοια. Η υπεροξεία εμφάνιση με ένα επεισόδιο ρίγους που ακολουθείται αργότερα από πυρετό, βήχα και παραγωγή πτυέλων είναι τυπική στα μεγαλύτερα παιδιά και τους νέους ενήλικες με λοβώδη πύκνωση. Το πλευριτικό άλγος μπορεί να υποδηλώνει εμπύημα ή επέκταση της λοίμωξης στον σπλαγχνικό υπεζωκότα. Οι πνευμονίες που είναι κοντά στο διάφραγμα μπορεί να εκδηλώνονται με εμέτους και κοιλιακό άλγος πριν να εμφανιστούν τα συμπτώματα από το αναπνευστικό.

Η κλινική εξέταση μπορεί να αποκαλύψει μειωμένες αναπνευστικές κινήσεις στην πάσχουσα πλευρά λόγω του άλγους. Η αμβλύτητα κατά την επίκρουση είναι παρούσα περίπου στις μισές περιπτώσεις, ενώ η αμβλύτητα στις πνευμονικές βάσεις μπορεί να υποδηλώνει την ύπαρξη πλευριτικού υγρού. Κατά την προσεκτική ακρόαση των πνευμόνων ακούγονται τρίζοντες

σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Βρογχική αναπνοή ή σωληνώδες φύσημα μπορούν να ακουστούν αν έχει σχηματιστεί πύκνωση. [1, 2]

#### 8.5.3. Ακτινολογικά Ευρήματα

Στις περισσότερες περιπτώσεις πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας, η ακτινογραφία θώρακα αποκαλύπτει μια πυκνωτική περιοχή που καταλαμβάνει ένα ή περισσότερα τμήματα ενός λοβού. Οι λοβώδεις ή τμηματικές πυκνώσεις σχετίζονται πιο συχνά με βακτηριαιμία. Οι πνευμονιοκοκκικές διηθήσεις είναι χαρακτηριστικά ετερόπλευρες και καταλαμβάνουν γειτονικές κυψελιδικές περιοχές με μικρή αλλαγή στον συνολικό όγκο του πνεύμονα. Σπάνια, η λοίμωξη από πνευμονιόκοκκο προκαλεί πνευμονικό απόστημα. Εάν παρατηρείται απόστημα, τότε πρέπει να υποπτευόμαστε παράλληλη αναερόβια λοίμωξη ή μια ανατομική ανωμαλία. Αν και υπεζωκοτική συλλογή μπορεί να βρεθεί σε 40% των ασθενών με πνευμονιοκοκκική πνευμονία, μόνο στο 10% υπάρχει επαρκής ποσότητα υγρού για αναρρόφηση, και σε ακόμη λιγότερους, πιθανόν 2% του συνόλου, θα αναπτυχθεί εμπύημα. Η παρουσία πλευριτικού υγρού μπορεί να επιβεβαιωθεί με υπερηχογράφημα. [1, 2]

#### 8.5.4. Γενικά Εργαστηριακά Ευρήματα

25% των ασθενών με πνευμονιοκοκκική πνευμονία έχουν επίπεδα αιμοσφαιρίνης 10mg/dL ή λιγότερο. Αν και η πλειονότητα των ασθενών έχει λευκοκυττάρωση (αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων  $>12000/\text{mm}^3$ ), ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών μπορεί να έχει φυσιολογικό αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων, τουλάχιστον κατά την εισαγωγή. Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων μικρότερος από  $6000/\text{mm}^3$  απαντάται στο 5% έως 10% των ασθενών που νοσηλεύονται για πνευμονιοκοκκική πνευμονία και υποδηλώνει



πολύ φτωχή πρόγνωση. Η χαμηλή λευκωματίνη ορού, που είναι συχνά παρούσα, μπορεί να οφείλεται σε κακή θρέψη, και επομένως υποδηλώνει μια προδιαθετική κατάσταση, ή να αντανάκλα τον καταβολισμό και την μετακίνηση υγρών που συμβαίνει στη σηψαιμία. Η χολερυθρίνη του ορού μπορεί να αυξηθεί έως 3 με 4 mg/dL. Η παθογένεια αυτής της ανωμαλίας είναι πολυπαραγοντική, με την υποξία, τη φλεγμονή του ήπατος, και τη διάσπαση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στους πνεύμονες να συμβάλλουν. Τα επίπεδα της γαλακτικής δεϋδρογενάσης (LDH) μπορεί να είναι αυξημένα. [1]

#### 8.5.5. Διάγνωση

Ο αιτιολογικός ρόλος του πνευμονιόκοκκου σε ασθενή με πνευμονία υποδηλώνεται από την ανεύρεση σε δείγμα πτυέλων με Gram χρώση μεγάλου αριθμού πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, πολύ λίγων επιθηλιακών κυττάρων (λόγος πολυμορφοπύρηνων/επιθηλιακά κύτταρα, περίπου 10:1 έως 20:1), και πολυάριθμων, ελαφρά επιμηκυσμένων Gram-θετικών κόκκων σε ζεύγη και αλυσίδες. Μια υποθετική διάγνωση της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας γίνεται εάν ο πνευμονιόκοκκος ταυτοποιηθεί σε καλλιέργεια πτυέλων και η διάγνωση επιβεβαιώνεται εάν ο πνευμονιόκοκκος ταυτοποιηθεί σε καλλιέργεια αίματος. Εάν ένας ασθενής έχει λάβει δραστική αντιμικροβιακή αγωγή για περισσότερες από 6 έως 12 ώρες, η Gram χρώση είναι πιθανό να μην είναι αποκαλυπτική, ενώ μετά από 12 έως 24 ώρες η καλλιέργεια επίσης θα αποτύχει να αποκαλύψει τους πνευμονιόκοκκους. [1]

Σημαντικό ρόλο στη διάγνωση παίζει η ποιότητα των πτυέλων διότι εάν το δείγμα πτυέλων δεν είναι αντιπροσωπευτικό, ακόμη και δοκιμασίες όπως η

αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης θα αποβούν ψευδώς αρνητικές. Άλλες διαγνωστικές τεχνικές εστιάζονται στην ανίχνευση ειδικού πνευμονιοκοκκικού αντιγόνου στα ούρα. Ο πολυσακχαρίτης του κυτταρικού τοιχώματος του πνευμονιόκοκκου μπορεί να ανιχνευτεί στα ούρα σε περίπου 2/3 των ασθενών με πνευμονιοκοκκική πνευμονία έναντι του 10%-15% των ασθενών με μη πνευμονιοκοκκική πνευμονία. Στα παιδιά, η δοκιμασία είναι θετική και σε αποικισμό του φάρυγγα, και δεν είναι χρήσιμη διαγνωστικά. [1]

#### 8.5.6. Επιπλοκές

Οι πνευμονιοκοκκικές πνευμονίες συχνά εμφανίζονται με πλευριτική συλλογή, αλλά μόνο 1 στις 10 συλλογές είναι μεγάλη και χρειάζεται παροχέτευση και λιγότερες ακόμη θα εξελιχθούν σε εμπύημα. Το πλευριτικό υγρό είναι συνήθως αντιδραστικό. Όταν τα βακτήρια φτάνουν στον πλευριτικό χώρο, είτε αιματογενώς είτε ως αποτέλεσμα επέκτασης της πνευμονίας στον σπλαγχνικό υπεζωκότα με διασπορά μέσω των λεμφαγγείων, προκύπτει εμπύημα. Το πνευμονιοκοκκικό εμπύημα, είναι μια ασυνήθιστη αλλά σοβαρή επιπλοκή σε ενήλικες και παιδιά. Ο ορότυπος 1 αναγνωρίζεται πιο συχνά μεταξύ των παιδιών με εμπύημα τόσο πριν όσο και μετά την εφαρμογή του επταδύναμου συζευγμένου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου [112]. Ο ορότυπος 1 είναι καθολικά ευαίσθητος στην πενικιλίνη, όπου έχει ταυτοποιηθεί. Η επιμονή του πυρετού, ακόμη κι εάν είναι χαμηλού βαθμού, και η λευκοκυττάρωση μετά από 4 έως 5 ημέρες κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας είναι ενδεικτικά εμπυήματος, και αυτή η διάγνωση είναι ακόμη πιο πιθανή εάν η ακτινογραφία δείχνει επιμονή του πλευριτικού υγρού. Επίσης, η παρουσία θωρακικού άλγους και/ή δύσπνοιας διαφοροδιαγιγνώσκει το εμπύημα από την πνευμονία. Συνήθως

ένα παιδί με εμπύημα είναι μεγαλύτερης ηλικίας (περίπου 6 ετών) συγκριτικά με την ηλικία αιχμής της πνευμονίας. Η διαφορική διάγνωση από την πάχυνση του υπεζωκότα και το πνευμονικό απόστημα έχει διευκολυνθεί από το υπερηχογράφημα και την αξονική τομογραφία. Τα εμπύεμα σπάνια λύνονται χωρίς αντιμικροβιακή αγωγή και χειρουργική παρέμβαση. Η παροχέτευση με θωρακικό σωλήνα είναι η βάση της θεραπείας του εμπύματος. Η παρουσία εμπύματος, μια θετική Gram χρώση, ή πλευριτικό υγρό με pH  $\leq 7.1$  είναι όλα ενδείξεις για επιθετική και πλήρη παροχέτευση του πύου με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση με βελόνα ή με εισαγωγή ενός θωρακικού σωλήνα. Η νεκρωτική πνευμονιοκοκκική πνευμονία είναι δύσκολο να ανιχνευτεί ακτινολογικά αλλά διαγιγνώσκεται εύκολα με αξονική τομογραφία. Σε αντίθεση με την υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα στους ενήλικες, στα παιδιά με νεκρωτική πνευμονιοκοκκική πνευμονία αναμένεται πλήρης ανάρρωση. [1, 2]

## **8.6. Άλλες λοιμώξεις**

Η ικανότητα του πνευμονιόκοκκου να προσβάλλει σχεδόν κάθε ιστό ή όργανο είχε παρατηρηθεί από την εποχή πριν από τη χρήση των αντιμικροβιακών. Τα περισσότερα μεγάλα ιατρικά κέντρα θα αντιμετωπίσουν κάποια στιγμή ένα περιστατικό πνευμονιοκοκκικής ενδοκαρδίτιδας, περικαρδίτιδας, ενδοφθαλμίτιδας, επιγλωττίτιδας ή λοίμωξης μαλακών ιστών. Η μεμονωμένη ή επιδημική επιπεφυκίτιδα προκαλείται από πνευμονιόκοκκους χωρίς έλυτρο [79, 80]. Οι λοιμώξεις μαλακών ιστών απαντώνται, ειδικά σε άτομα που έχουν παθήσεις του συνδετικού ιστού ή HIV λοίμωξη. Αν και αυτές οι λοιμώξεις απαντώνται και σε υγιείς ξενιστές, οι ασυνήθεις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις συχνά συσχετίζονται με συνθήκες

ανοσοανεπάρκειας, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η κακοήθεια και η HIV λοίμωξη. Η οστεομυελίτιδα και η σηπτική αρθρίτιδα παραμένουν σχετικά συχνές λοιμώξεις στα παιδιά [113]. Η περιτονίτιδα στα παιδιά σχετίζεται συνήθως με το νεφρωσικό σύνδρομο, ενώ στους ενήλικες με παθήσεις του ήπατος. Η περιτονίτιδα μπορεί επίσης να σχετίζεται με λοιμώξεις των γυναικείων αναπαραγωγικών οργάνων. Τα επισκληρίδια και τα εγκεφαλικά αποστήματα περιγράφονται σπάνια. Μια σπάνια αλλά σοβαρή επιπλοκή της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης είναι μια μορφή του ουραιμικού αιμολυτικού συνδρόμου [114].

### **8.7. Κλινικές εκδηλώσεις στα νεογνά**

Οι κλινικές εκδηλώσεις των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων στα νεογνά και μικρά βρέφη είναι σοβαρές και περιλαμβάνουν την μηνιγγίτιδα, τη σηψαιμία, την μικροβαιμία, την πνευμονία, την οξεία μέση ωτίτιδα, τα αποστήματα, και λοιμώξεις των οστών και των αρθρώσεων. Οι πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις στα νεογνά είναι σχετικά σπάνιες αλλά σχετίζονται με σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα (περίπου 10% για όλες τις λοιμώξεις και 14% για τις διεισδυτικές λοιμώξεις) [115].

## **9. ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

### **9.1. Δραστικότητα με βάση την *in vitro* ευαισθησία**

Η δραστικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων έναντι συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών βασίζεται στην ερμηνεία των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) για κάθε αντιμικροβιακό

παράγοντα με βάση κριτήρια που έχουν θεσπιστεί [116]. Η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC), μια μονάδα μέτρησης της ευαισθησίας σε τεχνητό περιβάλλον (*in vitro*), είναι η συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα που απαιτείται για την αναστολή της *in vitro* ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού. Συνήθως χρησιμοποιούνται οι όροι MIC<sub>50</sub> και MIC<sub>90</sub>, που περιγράφουν την MIC στην οποία αναστέλλεται το 50% και το 90% αντίστοιχα των στελεχών. Η τιμή της MIC αντανakλά την *in vitro* δραστικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων, αλλά παρέχει περιορισμένη πληροφορία για την *in vivo* (εντός ζωντανού οργανισμού) δραστικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων. Επιπλέον, έχουν προταθεί από την Εθνική Επιτροπή για τις Σταθερές των Κλινικών Εργαστηρίων (NCCLS) κριτήρια χρησιμοποιώντας δεδομένα από *in vivo* λοιμώξεις σε διαφορετικές περιοχές του σώματος. Έτσι, τα κριτήρια ευαισθησίας σε πολλά β-λακταμικά αντιμικροβιακά για στελέχη πνευμονιόκοκκου που απομονώνονται από ασθενή με μηνιγγίτιδα και από ασθενή με λοιμώξεις εκτός της μηνιγγίτιδας είναι διαφορετικά (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2.** Κριτήρια ευαισθησίας στην πενικιλίνη για κλινική χρήση, ανάλογα με τον τύπο του φαρμάκου (Dagan and Klugman. Lancet 2008; 8: 785-795)

	Ευαίσθητα	Ενδιάμεση αντοχή	Πλήρης αντοχή
Παρεντερική, λοιμώξεις εκτός μηνιγγίτιδας	≤ 2	4	≥ 8
Παρεντερική, μηνιγγίτιδα	≤ 0.06	-	≥ 0.12
Από το στόμα (πενικιλίνη V)	≤ 0.06	0.12 – 1	≥ 2
Από το στόμα αμοξυκιλλίνη	≤ 2	4	≥ 8

Τα δεδομένα είναι οι τιμές για τις ελάχιστες ανασταλτικές πυκνότητες (μg/mL).

Δεδομένα από το Ινστιτούτο για τις Σταθερές των Κλινικών Εργαστηρίων (2008).

**Πίνακας 3.** Δραστικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων έναντι των στελεχών πνευμονιόκοκκου με ευαισθησία στην πενικιλίνη, με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη και με πλήρη αντοχή στην πενικιλίνη (Jacobs and Dagan. Sem Pediatr Infect Dis 2004; 15: 5-20)

Ομάδα αντιμικροβιακών παραγόντων	Αντιμικροβιακός παράγοντας	MIC <sub>90</sub> (g/mL)		
		Ευαίσθητα στην πενικιλίνη (MIC στην πενικιλίνη ≤0.06 g/mL)	Ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη (MIC στην πενικιλίνη 0.12-1 g/mL)	Πλήρης αντοχή στην πενικιλίνη (MIC στην πενικιλίνη ≥2 g/mL)
Πενικιλίνες	Πενικιλίνη G	0.015-0.06	0.5-1	2-4
	Αμοξυκιλλίνη	0.015-0.03	0.12-1	2
	Αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ	0.015-0.05	0.12-1	2
	Αμπικιλίνη	0.015-0.06	0.5-2	2-4
	Τικαρκιλίνη	1-2	64	64-128
Κεφαλοσπορίνες από το στόμα	Πιπερακιλλίνη	≤0.06	1-2	4-8
	Κεφδιρίνη	0.06-0.125	1-4	8
	Κεφποδοξίμη	0.06-0.025	1-4	4
	Κεφουροξίμη αξετίλ	0.03-0.125	1-4	4-8
	Κεφακλόρη	0.5-2	8-16	16->32
	Κεφιξίμη	0.25-1	8-32	>32
	Κεφεταμέτη	0.25-1	4-8	>32
	Κεφπροζίλη	0.25-1	4-8	>32
	Κεφουροξίμη	0.03-0.125	1-4	4-8
Παρεντερικές κεφαλοσπορίνες	Κεφτριαξόνη	0.01-0.06	0.5-1	1-2
	Κεφταζιδίμη	0.25-0.5	16-32	>32
	Κεφοταξίμη	0.01-0.12	0.25-0.5	1-4
	Κεφεπίμη	0.06-0.12	0.5-1	1-2
	Καρμπαπενέμες	≤0.008-0.015	0.12-0.25	0.25
Μακρολίδες, λινκοσαμίδες, αζαλίδες, κετολίδες, στρεπτογραμίνες	Ιμιπενέμη	0.015-0.03	0.5	1
	Μεροπενέμη	0.03	0.5	1
	Ερυθρομυκίνη A	0.06-0.12	16->64	>64
	Αζιθρομυκίνη	0.12-0.25	16->64	>64
	Κλαριθρομυκίνη	0.03-0.06	8->64	>64
Κινολόνες	Κλινδαμυκίνη	0.03	0.12	>64
	Τελιθρομυκίνη	0.03	0.25	0.25
	Κινουπριστίνη/δαλφοπριστίνη	0.5-1	0.5-1	0.5-1
	Λεβοφλοξασίνη	2	2	2
	Γατιφλοξασίνη	0.5	0.5	0.5
Άλλοι παράγοντες	Μοξιφλοξασίνη\	0.25	0.25	0.25
	Τετρακυκλίνη	≤2	>32	>32
	Βανκομυκίνη	0.12-0.5	0.12-0.5	0.12-0.5
	ΡΙφαμπικίνη	≤0.12	≤0.12	≤0.12
	Τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη	>4	>4	>4

ΣΗΜΕΙΩΣΗ. Παρουσιάζονται οι τιμές της MIC σε µg/mL που αναστέλλουν το 90% ή περισσότερο των στελεχών (MIC<sub>90</sub>). Οι τιμές MIC των β-λακταμών είναι αυξημένες για τις ομάδες με ενδιάμεση και πλήρη αντοχή στην πενικιλίνη, καθώς ο μηχανισμός αντοχής που εμπλέκεται αφορά όλες τις β-λακτάμες. Οι τιμές MIC των άλλων ομάδων αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως οι μακρολίδες, οι αζαλίδες, οι λινκοσαμίδες, η τετρακυκλίνη και η τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, είναι υψηλότερες για τις ομάδες με ενδιάμεση και πλήρη αντοχή στην πενικιλίνη επειδή πολλά στελέχη σε αυτές τις ομάδες είναι ανθεκτικά σε πολλαπλές ομάδες αντιμικροβιακών παραγόντων.

## 9.2. Δραστικότητα με βάση τη φαρμακοκινητική/φαρμακοδυναμική

Η αδυναμία των τρεχόντων κριτηρίων ευαισθησίας για τους περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες που χορηγούνται από το στόμα να ανταποκρίνονται στα πιο πρόσφατα κλινικά, μικροβιολογικά, φαρμακοκινητικά δεδομένα, οδήγησε σε μια πιο σύγχρονη προσέγγιση για τη θέσπιση κριτηρίων ευαισθησίας. Η σύγχρονη προσέγγιση βασίζεται στο μοντέλο της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής (PK/PD), καθώς και σε κλινικές μελέτες που έχουν μετρήσει το βακτηριολογικό αποτέλεσμα σε σχέση με τη φαρμακοκινητική του αντιμικροβιακού παράγοντα και την ευαισθησία των παθογόνων μικροοργανισμών [117, 118]. Ως φαρμακοκινητική ορίζεται η απορρόφηση, η κατανομή στους διάφορους ιστούς, ο μεταβολισμός και η απέκκριση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα από τον οργανισμό, ενώ η φαρμακοδυναμική περιγράφει την επίδραση του φαρμάκου στη βιοχημεία και τη φυσιολογία, καθώς και τον μηχανισμό δράσης του φαρμάκου. Οι παράμετροι της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής συσχετίζονται καλά με τη μικροβιακή εκρίζωση και το κλινικό αποτέλεσμα, και προσφέρουν μια λογική προσέγγιση στην πρόγνωση της αποτελεσματικότητας των αντιμικροβιακών παραγόντων και στον καθορισμό κριτηρίων ευαισθησίας σχετικών με κλινικά δεδομένα [116].

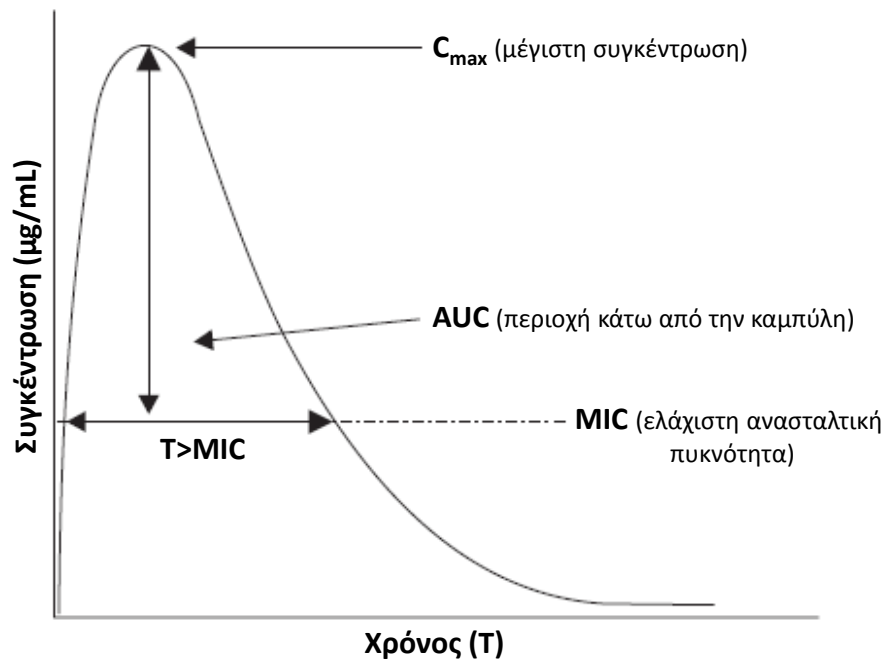
Κάποιοι αντιμικροβιακοί παράγοντες θεωρείται ότι έχουν χρονοεξαρτώμενη δράση, επειδή η κλινική τους επιτυχία εξαρτάται από το χρονικό διάστημα κατά το οποίο η συγκέντρωση υπερβαίνει την MIC του παθογόνου μικροοργανισμού. Αντιμικροβιακοί παράγοντες με χρονοεξαρτώμενη δράση είναι οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι μακρολίδες με εξαίρεση τις αζαλίδες, οι καρβαπενέμες, η αζτρεονάμη και η

κλινδαμυκίνη [119]. Η δραστηριότητα των β-λακταμών και της ερυθρομυκίνης έχει αποδειχτεί ότι εξαρτάται από το χρονικό διάστημα για το οποίο η συγκέντρωση στον ορό υπερβαίνει την MIC του αντιμικροβιακού παράγοντα, με κλινική επιτυχία σε πάνω από 80% των περιπτώσεων στις οποίες η ελεύθερη συγκέντρωση του παράγοντα υπερβαίνει την MIC για το λοιμογόνο στέλεχος για περισσότερο από 40% έως 50% του μεσοδιαστήματος μεταξύ των δόσεων. Χρησιμοποιώντας τα συνήθη δοσολογικά σχήματα και τη φαρμακοκινητική αυτών των παραγόντων στον ορό, οι ελεύθερες συγκεντρώσεις στον ορό που διατηρούνται για τουλάχιστον 40% έως 50% του μεσοδιαστήματος των δόσεων μπορούν να καθοριστούν και να χρησιμοποιηθούν ως PK/PD κριτήρια [116-118, 120]. Αυτά τα PK/PD κριτήρια βασίζονται στην συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα στον ορό και δεν έχουν εφαρμογή σε περιοχές του σώματος όπου η διείσδυση του φαρμάκου είναι περιορισμένη, όπως είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα [119].

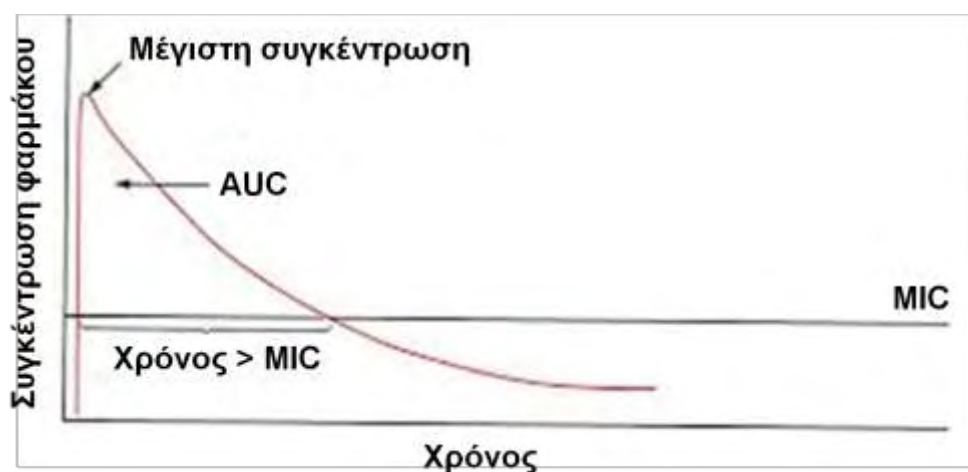
Άλλοι αντιμικροβιακοί παράγοντες θεωρείται ότι έχουν δοσοεξαρτώμενη δράση, επειδή η κλινική τους επιτυχία συσχετίζεται με διαφορετικές PK/PD παραμέτρους που περιλαμβάνουν την συγκέντρωση του παράγοντα στον ορό και την MIC [119]. Έτσι, διαφορετικοί PK/PD παράμετροι συσχετίζονται με το κλινικό αποτέλεσμα για τις κινολόνες και τις νεώτερες μακρολίδες/αζαλίδες, όπως η αζιθρομυκίνη και η κλαριθρομυκίνη, και τα κριτήρια μπορούν να προέρχονται από έναν από τους δύο λόγους: 1) η μέγιστη ελεύθερη συγκέντρωση στον ορό προς την MIC ή 2) το εμβαδόν της περιοχής κάτω από την καμπύλη της 24ώρης ελεύθερης συγκέντρωσης στον ορό (AUC) προς την MIC. Η κλινική θεραπεία συσχετίζεται καλύτερα με τον λόγο AUC/MIC όταν υπερβαίνει το 25 έως 30 για αυτούς τους παράγοντες σε



μοντέλα με ανοσοϊκανά ζώα και σε μελέτες με ανθρώπους, και τα MIC κριτήρια για την αντοχή μπορούν επομένως να προέρχονται από τον τύπο  $AUC/25$  [117, 118].



**Σχήμα 2.** Παράμετροι φαρμακοκινητικής/φαρμακοδυναμικής των αντιμικροβιακών παραγόντων που χορηγούνται από το στόμα.



**Σχήμα 3.** Παράμετροι φαρμακοκινητικής/φαρμακοδυναμικής των αντιμικροβιακών παραγόντων μετά από ενδοφλέβια χορήγηση.

Χρησιμοποιώντας τα PK/PD κριτήρια αναγνωρίστηκε ότι η αμοξυκιλλίνη με ή χωρίς κλαβουλανικό οξύ είναι δραστική σε πάνω από 90% των στελεχών πνευμονιόκοκκου [116, 118, 121-123]. Η κεφουροξίμη και η κεφπροξίλη είναι δραστικές έναντι των ευαίσθητων στην πενικιλλίνη πνευμονιόκοκκων ενώ διατηρούν κάποια δραστικότητα έναντι των στελεχών με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλλίνη [120]. Η κεφουροξίμη είναι ο επόμενος πιο δραστικός παράγοντας έναντι του πνευμονιόκοκκου, με 63% των στελεχών πνευμονιόκοκκου να είναι ευαίσθητα με βάση τα PK/PD κριτήρια. Η κεφπροξίλη έχει παρόμοια δραστικότητα με την κεφουροξίμη έναντι του πνευμονιόκοκκου (62.6% των στελεχών είναι ευαίσθητα). Η κεφακλόρη [120] και η λορακαρμπέφη έχουν περιορισμένη δραστικότητα έναντι του πνευμονιόκοκκου με 22% και 11% αντίστοιχα των στελεχών πνευμονιόκοκκου να είναι ευαίσθητα. Το 69% των στελεχών πνευμονιόκοκκου ήταν ευαίσθητα στην κλαριθρομυκίνη και την αζιθρομυκίνη. (Πίνακας 4) [117]

Η λινεζολίδη και η βανκομυκίνη έχουν καλή δραστικότητα έναντι των στελεχών πνευμονιόκοκκου, αλλά είναι παράγοντες που δεν χρησιμοποιούνται για την από του στόματος θεραπεία λοιμώξεων εκτός νοσοκομείου. Τα ποσοστά ευαισθησίας του πνευμονιόκοκκου στην τετρακυκλίνη και την τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη είναι ιδιαίτερα χαμηλά. Από τις κετολίδες, η τελιθρομυκίνη παρουσιάζει υψηλή δραστικότητα *in vitro* έναντι των στελεχών πνευμονιόκοκκου. [122]

**Πίνακας 4.** Ποσοστά αντοχής στους αντιμικροβιακούς παράγοντες των στελεχών πνευμονιόκοκκου με βάση τα κριτήρια του NCCLS και τα PK/PD κριτήρια (Jacobs et al. AAC 1999)

Αντιμικροβιακοί παράγοντες	% των ευαίσθητων στελεχών									
	Κριτήρια αντοχής (μg/ml)		Ευαίσθητα στην πενικιλίνη στελέχη <sup>α</sup>		Στελέχη με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη <sup>β</sup>		Ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη <sup>γ</sup>		Όλα τα στελέχη <sup>δ</sup>	
	NCCLS	PK/PD	NCCLS	PK/PD	NCCLS	PK/PD	NCCLS	PK/PD	NCCLS	PK/PD
Πενικιλίνη	0.06, 1 <sup>ε</sup>	NA <sup>στ</sup>	100,0		0, 100		0, 0		49.6, 67.5	
Αμοξικιλίνη	0.5	2	100	100	83.0	100	3.3	80.2	63.5	93.5
Αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ	0.5	2	100	100	83.0	100	4	80.8	65.8	93.9
Κεφακλόρη		0.5		43.7		3.8		0		22.4
Λορακαρμπέφη		0.5		20.4		3.4		0		10.7
Κεφπροξίλη		1		100		72.0		0.4		62.6
Κεφουροξίμη	0.5	1	98.9	99.7	61.7	71.2	0.2	0.4	60.7	62.9
Κεφιξίμη		1		95.2		21.7		0		52.1
Κεφτριαξόνη	0.5 <sup>ζ</sup>	NA	100		90.5		6.7		68.0	
Κλαριθρομυκίνη	0.25	0.25	95.2	95.2	65.5	65.5	33.3	33.3	69.8	69.8
Αζιθρομυκίνη	0.5	0.12	95.2	94.7	65.5	64.8	33.3	32.9	69.8	69.2
Σιπροφλοξασίνη		1		85.7		80.3		82.9		83.8

<sup>α</sup><sub>N</sub> = 732, <sup>β</sup><sub>N</sub> = 264, <sup>γ</sup><sub>N</sub> = 480, <sup>δ</sup><sub>N</sub> = 1476

<sup>ε</sup>Κριτήρια για ευαισθησία και ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη

<sup>στ</sup>NA, μη εφαρμόσιμο

<sup>ζ</sup>Κριτήρια για τη μηνιγγίτιδα

## **10. ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ**

Οι βασικές αρχές για τη θεραπεία των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων είναι: 1) χορήγηση αντιμικροβιακού σε επαρκή επίπεδα για να αναστείλει ή να σκοτώσει τον λοιμογόνο οργανισμό, 2) συνέχιση της θεραπείας για το κατάλληλο χρονικό διάστημα ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία της θεραπείας και ανάρρωσης, 3) παροχέτευση λοιμώξεων που αφορούν κλειστούς χώρους εάν είναι απαραίτητο, 4) να γνωρίζουμε τι ανταπόκριση στη θεραπεία περιμένουμε, και 5) να είμαστε προετοιμασμένοι για επανεκτίμηση εάν δεν παρατηρείται αυτή η ανταπόκριση. Η εφαρμογή αυτών των αρχών δεν είναι πάντα εύκολη, καθώς 1) για τις περισσότερες λοιμώξεις που προκαλούνται από τον πνευμονιόκοκκο, όταν αρχίζει η θεραπεία ο αιτιολογικός παράγοντας δεν είναι γνωστός, 2) ακόμη και εάν ο πνευμονιόκοκκος θεωρείται το αίτιο, η ευαισθησία στα αντιμικροβιακά δεν είναι γνωστή όταν αρχίζει η θεραπεία, 3) για πολλές συνηθισμένες λοιμώξεις, η κατάλληλη διάρκεια της θεραπείας δεν έχει καθοριστεί από επιστημονική μελέτη, 4) στην μέση ωτίτιδα και την ρινοκολπίτιδα, τις πιο συχνές λοιμώξεις που προκαλούνται από τον πνευμονιόκοκκο, δεν γίνεται συνήθως παροχέτευση, και 5) πολλοί ιατροί δεν κατανοούν πλήρως την ανταπόκριση που πρέπει να περιμένουν αφού έχει αρχίσει η θεραπεία. [1]

Οι πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις ταξινομούνται σε επιπολείς (μέση ωτίτιδα, ρινοκολπίτιδα, παρόξυνση χρόνιας βρογχίτιδας) και διεισδυτικές λοιμώξεις (μικροβαιμία, μηνιγγίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα). Η πνευμονία διακρίνεται σε βακτηριαιμική με συνοδό μικροβαιμία και σε μη βακτηριαιμική που συμβαίνει μέσω άμεσης διασποράς των μικροοργανισμών από το σημείο

αποικισμού στον ρινοφάρυγγα. Οι πιο συχνές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις, η πνευμονία και η μέση ωτίτιδα, αντιμετωπίζονται συνήθως εμπειρικά, εκτός από τις περιπτώσεις που υπάρχει θετική καλλιέργεια αίματος ή ωτικού εκκρίματος.

Στις επιπολείς πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις, όπως είναι η μέση ωτίτιδα και η ρινοκολπίτιδα, ο αντιμικροβιακός παράγοντας εκλογής είναι η αμοξυκιλλίνη. Εάν δεν υπάρχει ανταπόκριση στην αγωγή σε 24-48 ώρες, τότε είναι πιθανό η λοίμωξη να οφείλεται σε πνευμονιόκοκκο με υψηλή αντοχή στην πενικιλίνη ή σε μικρόβια που παράγουν β-λακταμάση. Η αμοξυκιλλίνη σε συνδυασμό με κλαβουλανικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση των μικροβίων που παράγουν β-λακταμάση. Οι κεφαλοσπορίνες β' γενιάς χορηγούμενες από το στόμα, όπως είναι η κεφουροξίμη-αξετίλ και η κεφπροζίλη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις αποτυχίας της αγωγής με αμοξυκιλλίνη καθώς μπορεί να είναι δραστικές έναντι κάποιων πνευμονιόκοκκων με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη. Σε ακόμη πιο ανθεκτικά περιστατικά συστήνεται η παρεντερική χορήγηση τριών έως πέντε ημερήσιων δόσεων κεφτριαξόνης (κεφαλοσπορίνη γ' γενιάς). Οι μακρολίδες (ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη) μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά στην αρχική θεραπεία με αμοξυκιλλίνη σε ασθενείς με ιστορικό τύπου I αλλεργικής αντίδρασης στην πενικιλίνη.

Στις διεισδυτικές λοιμώξεις, όπως είναι η μηνιγγίτιδα, θεραπεία εκλογής αποτελεί η παρεντερική χορήγηση κεφαλοσπορινών γ' γενιάς, όπως είναι η κεφτριαξόνη και η κεφοταξίμη. Εάν το στέλεχος πνευμονιόκοκκου έχει αντοχή στις κεφαλοσπορίνες γ' γενιάς ή ο ασθενής εμφανίζει σοβαρού βαθμού

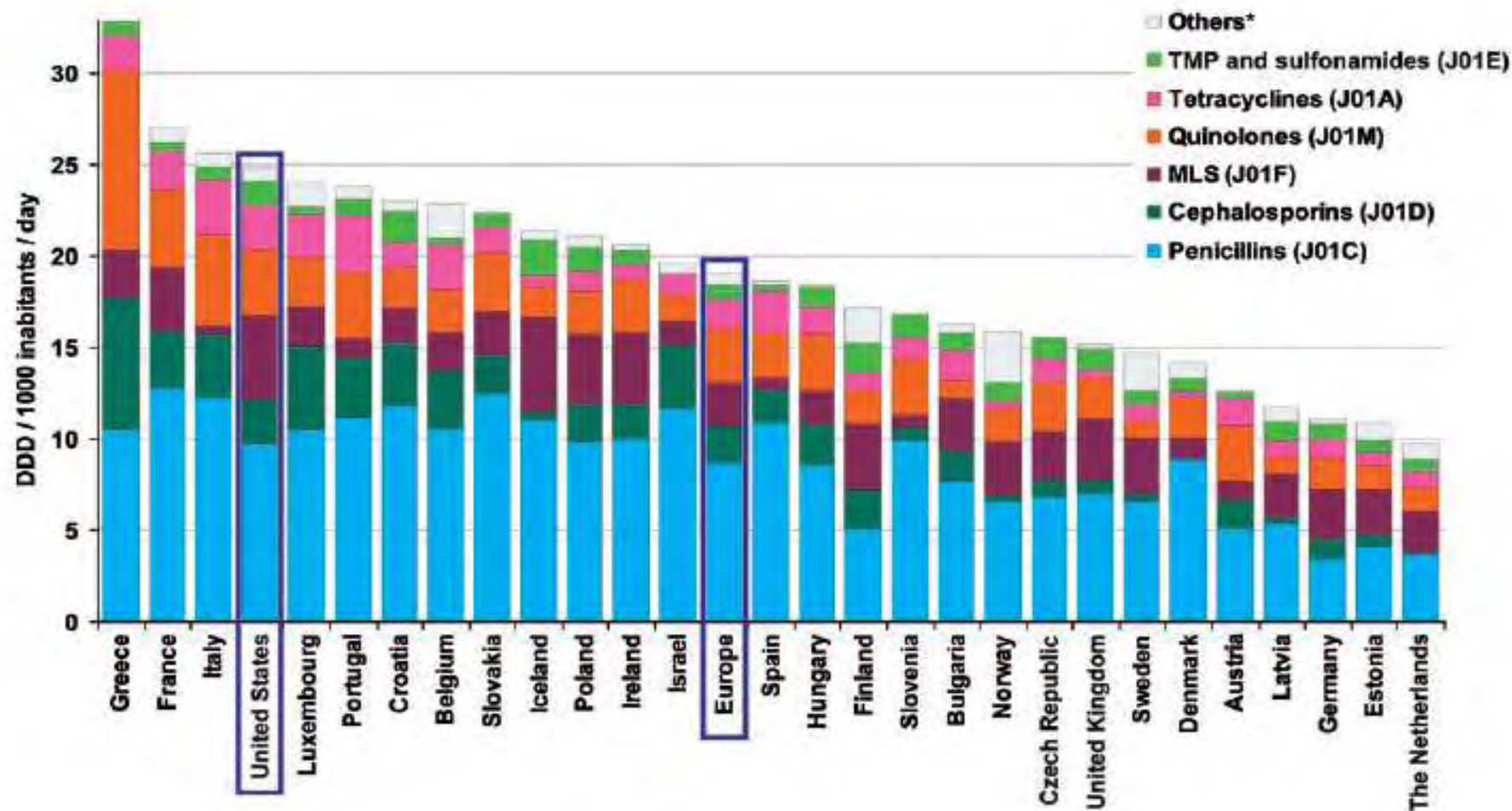
αλλεργία στις κεφαλοσπορίνες, τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί βανκομυκίνη ή μεροπενέμη.

Όσον αφορά την πνευμονία, μπορεί να αντιμετωπιστεί με αντιμικροβιακή αγωγή από το στόμα ή σε βαρύτερες περιπτώσεις με παρεντερική αγωγή στο νοσοκομείο. Για την αντιμετώπιση της πνευμονίας εκτός νοσοκομείου μπορεί να χορηγηθεί αμοξυκιλλίνη (μόνη ή σε συνδυασμό με κλαβουλανικό οξύ), μακρολίδες ή κινολόνες από το στόμα. Σε βαρύτερες περιπτώσεις που απαιτείται νοσηλεία σε νοσοκομείο χορηγείται παρεντερικά αμπικιλλίνη ή κεφαλοσπορίνη γ' γενιάς. Λόγω της εμφάνισης στελεχών πνευμονιόκοκκου με υψηλού βαθμού αντοχή καθώς και πολλαπλή αντοχή συστήνεται η χορήγηση μιας κεφαλοσπορίνης γ' γενιάς ή μιας β-λακτάμης με αναστολέα της β-λακταμάσης σε συνδυασμό με μακρολίδη ή κινολόνη ή μιας κινολόνης ως μοναδική θεραπεία.

Η κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων αναγνωρίζεται ως η κύρια αιτία ανάπτυξης αντοχής στα αντιμικροβιακά. Ο μεγαλύτερος όγκος αντιμικροβιακών παραγόντων χορηγείται στην πρωτοβάθμια φροντίδα και οι λοιμώξεις του αναπνευστικού είναι η πιο συχνή ένδειξη. Στο σχήμα 3 [124] παρουσιάζεται η κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων εκτός νοσοκομείου στις ΗΠΑ και σε 27 χώρες της Ευρώπης το 2004. Στις ΗΠΑ η κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων σε εξωτερική βάση είναι υψηλή σε σύγκριση με την Ευρώπη, και η κατανάλωση είναι υψηλότερη μόνο στην Ελλάδα, τη Γαλλία και την Ιταλία.

Σε αυτούς τους αντιμικροβιακούς παράγοντες ανήκουν κυρίως οι πενικιλλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι κινολόνες, η τετρακυκλίνη και οι

μακρολίδες. Στην Ελλάδα οι από του στόματος διαθέσιμες κεφαλοσπορίνες είναι: 1) από τις κεφαλοσπορίνες α' γενιάς, η κεφαδροξίλη, 2) από τις κεφαλοσπορίνες β' γενιάς, η κεφατριζίνη, η κεφπροξίλη, η κεφακλόρη, η λορακαρμπέφη, η κεφουροξίμη αξετίλ, και 3) από τις κεφαλοσπορίνες γ' γενιάς, η κεφιξίμη, η κεφποδοξίμη προξετίλ, η κεφντιτορένη, η κεφτιμπουτένη.



**Σχήμα 4.** Συνολική χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων εκτός νοσοκομείου στις ΗΠΑ και σε 27 χώρες της Ευρώπης το 2004 (συνολική χρήση για την Ελλάδα, την Ισλανδία και τη Βουλγαρία, δεδομένα από το 2002 για την Πολωνία, και δεδομένα από το 2003 για την Ιταλία). DDD, ορισμένη ημερήσια δόση; MLS, μακρολίδες, λινκοσαμίδες, και στρεπτογραμμίνες; TMP, τριμεθοπρίμη. \*Περιλαμβάνει τις αμφενικόλες (J01B), τις αμινογλυκοσίδες (J01G), συνδυασμό αντιμικροβιακών παραγόντων (J01R), και άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες (J01X).



## 11. ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Μέχρι τα μέσα του 1970, οι πνευμονιόκοκκοι αναστέλλονταν ή σκοτώνονταν από εύκολα επιτυγχανόμενα επίπεδα όλων των σχετικών αντιμικροβιακών παραγόντων, με πιθανή εξαίρεση την τετρακυκλίνη στην οποία ποικίλος αριθμός στελεχών εμφάνιζε αντοχή. Αντοχή στην πενικιλίνη κλινικών στελεχών πνευμονιόκοκκου αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1965, αλλά δεν απασχόλησε μέχρι τα μέσα της δεκαετίας 1990. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1990, οι πνευμονιόκοκκοι ανέπτυξαν προοδευτικά αυξανόμενη αντοχή στην πενικιλίνη και σε άλλα αντιμικροβιακά.

Μέχρι σήμερα δεν έχουν ανιχνευτεί πλασμίδια σε κανένα στέλεχος πνευμονιόκοκκου με αντοχή στα αντιμικροβιακά και επομένως οι γενετικές αλλαγές που προσδίδουν αντοχή είναι όλες χρωμοσωμικές. Οι πνευμονιόκοκκοι έχουν την ικανότητα να αποκτούν γονίδια αντοχής μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων, διαμέσου της μεταμόρφωσης. Οι πνευμονιόκοκκοι μπορούν να δεσμεύουν, να εσωτερικεύουν και να ενσωματώνουν DNA μέσω ανασυνδυασμού γονιδίων. Η προέλευση αυτού του γενετικού υλικού για την μεταμόρφωση μπορεί να προέρχεται από το ίδιο ή διαφορετικό (αλλά στενά συγγενικό) είδος. Το αποτέλεσμα του ανασυνδυασμού μεταξύ διαφορετικών ειδών είναι τα μωσαϊκά γονίδια, τα οποία είναι γονίδια που αποτελούνται από πνευμονιοκοκκικές αλληλουχίες και αλληλουχίες από άλλα είδη. Οι πρασινίζοντες στρεπτόκοκκοι έχουν αναφερθεί συχνά ως οι δότες για την μεταφορά γενετικών καθοριστικών παραγόντων αντοχής στον πνευμονιόκοκκο. Οι πρασινίζοντες στρεπτόκοκκοι ανήκουν στη χλωρίδα και εκτίθενται στα αντιμικροβιακά που χορηγούνται στον ξενιστή, οπότε εύκολα επιλέγονται ανθεκτικά στελέχη. Είναι σε μεγάλο βαθμό

ομόλογοι με τον πνευμονιόκοκκο, οπότε ο ανασυνδυασμός μεταξύ των δύο ειδών έχει υψηλά ποσοστά επιτυχίας. Επιπλέον, και τα δύο είδη αποικίζουν τον ρινοφάρυγγα του ανθρώπου και η επαφή μεταξύ των δύο ειδών είναι απαραίτητη για την ανταλλαγή γενετικού υλικού. [125]

### **11.1. Αντοχή στις β-λακτάμες**

Οι β-λακτάμες σκοτώνουν τους πνευμονιόκοκκους αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και προάγοντας την αυτολυτική δράση της αμιδάσης. Οι β-λακτάμες δεσμεύουν και αδρανοποιούν τις πενικιλλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (penicillin-binding proteins, PBPs). Αυτές οι πρωτεΐνες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν τα τελικά στάδια σύνθεσης της μуреΐνης, η οποία αποτελεί κύριο συστατικό του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Η δράση αυτή των β-λακταμών οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, είναι δηλαδή βακτηριοκτόνος. Ο μηχανισμός αντοχής του πνευμονιόκοκκου στις β-λακτάμες περιλαμβάνει σημειακές ή πολλαπλές μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πενικιλλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες, ενώ δεν έχει αναφερθεί παραγωγή β-λακταμάσης ως μηχανισμός αντοχής. Οι μεταλλάξεις στις PBPs οδηγούν σε αλλαγές στη δομή των πενικιλλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα ελαττωμένη χημική συγγένεια αυτών με τις β-λακτάμες. Έχουν αναγνωριστεί στους πνευμονιόκοκκους 6 τύποι πενικιλλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών: PBP 1a, PBP 1b, PBP 2a, PBP 2b, PBP 2x, και PBP 3. Στα πλήρως ευαίσθητα στελέχη πνευμονιόκοκκου, αυτά τα 6 ένζυμα είναι αναγνωρίσιμα μετά από επώαση με χαμηλές συγκεντρώσεις πενικιλλίνης. Τα ανθεκτικά στελέχη έχουν πενικιλλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες με ελαττωμένη χημική συγγένεια (affinity) με την πενικιλλίνη. Έχει παρατηρηθεί ότι μεταβολές στην πενικιλλινοδεσμευτική πρωτεΐνη 2b σχετίζονται με χαμηλού βαθμού

αντοχή, ενώ μεταλλάξεις στην πενικιλλινοδεσμευτική πρωτεΐνη 2x σχετίζονται με υψηλού βαθμού αντοχή στην πενικιλίνη [126, 127]. Υψηλού βαθμού αντοχή στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς συσχετίζεται κυρίως με μεταλλάξεις στις πενικιλλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες 1a και 2x [128, 129]. Τα περισσότερα στελέχη με υψηλού βαθμού αντοχή στην πενικιλίνη έχουν πιο πολλές αλλαγές στις πενικιλλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες από ότι τα στελέχη με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη [123]. Η ανάπτυξη της αντοχής υπήρξε μια αργή διαδικασία που περιλάμβανε πολλαπλά γεγονότα μεταμόρφωσης και ανασυνδυασμού. Αυτός ο τύπος αντοχής μπορεί να ξεπεραστεί εάν η συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα στην εστία λοίμωξης είναι υψηλότερη από την MIC του αντιμικροβιακού παράγοντα έναντι του στελέχους του πνευμονιόκοκκου για επαρκές χρονικό διάστημα [116, 121, 123, 130].

Οι πνευμονιόκοκκοι έχουν γίνει ανθεκτικοί αποκτώντας γενετικό υλικό από άλλα βακτήρια με τα οποία συνυπάρχουν – όπως οι πρασινίζοντες στρεπτόκοκκοι στον ρινοφάρυγγα. Στην πραγματικότητα, η αλλαγμένη ακολουθία στο γονίδιο για την πενικιλλινοδεσμευτική πρωτεΐνη 2b σε πολλά ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη φαίνεται να προέρχεται από τον *Streptococcus mitis* [131]. Η μοναδική ικανότητα του πνευμονιόκοκκου να μεταμορφώνεται είναι μείζων καθοριστικός παράγοντας αυτής της διαδικασίας. Η εκτεταμένη ποικιλία μεταξύ των στελεχών ή εντός της περιοχής στο γονιδίωμα του πνευμονιόκοκκου που κωδικοποιεί τις πενικιλλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες υποδηλώνει ότι πολλά ξεχωριστά γεγονότα μετάλλαξης έχουν συμβεί, κάποια από τα οποία εκφράζουν απόκτηση γενετικού υλικού και άλλα εκφράζουν αναταξινόμηση του DNA.

Ωστόσο, η κύρια πηγή της αντοχής παγκοσμίως υπήρξε η γεωγραφική διάδοση κάποιων κλώνων που φαίνεται ότι έχουν ειδική ικανότητα να εξαπλώνονται και να αποικίζουν. Ένα καλά τεκμηριωμένο παράδειγμα ήταν η εισαγωγή στην Ισλανδία ενός στελέχους που ήταν διαδεδομένο στην Ισπανία κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών αγώνων του 1992 [132]. Αυτό το στέλεχος γρήγορα εξαπλώθηκε παντού στην μικρή χώρα. Στις ΗΠΑ κατά τη δεκαετία του 1990, ο κυρίαρχος παράγοντας για την εμφάνιση πνευμονιόκοκκων ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά υπήρξε η μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο σχετικά λίγων κλώνων οι οποίοι περιέχουν αντοχή σε πολλαπλές ομάδες αντιμικροβιακών. Αυτοί οι ίδιοι κλώνοι φαίνεται ότι έχουν επεκταθεί παγκοσμίως και μπορούν να βρεθούν για παράδειγμα στην Κορέα ή την Ταϊλάνδη, όπως και στην Ευρώπη. Η γεωγραφική επέκταση διευκολύνεται σημαντικά από την πίεση που δημιουργείται από τη χρήση των αντιμικροβιακών. Μια χαρακτηριστική θέση αυτής της επιλογής είναι οι παιδικοί σταθμοί. Μελέτες στις ΗΠΑ έχουν δείξει ότι σε κάθε δεδομένη στιγμή, ένα σημαντικά υψηλό ποσοστό παιδιών στους παιδικούς σταθμούς λαμβάνουν αντιμικροβιακά. Αυτές οι καταστάσεις (1) εξαφανίζουν την ευαίσθητη χλωρίδα δημιουργώντας έτσι μια θέση για τους ανθεκτικούς μικροοργανισμούς, (2) αφήνουν ελεύθερους τους ανθεκτικούς στα αντιμικροβιακά πνευμονιόκοκκους, (3) αυξάνουν τη συχνότητα των ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά πρασινίζοντων στρεπτόκοκκων και έτσι παρέχουν τη βάση για περαιτέρω μεταμόρφωση των πνευμονιόκοκκων για αντοχή στα αντιμικροβιακά, και (4) παρέχουν στενή επαφή μεταξύ των μικρών παιδιών το οποίο επιτρέπει τη διάδοση των μικροοργανισμών.

Από τον Ιούλιο του 2003 στις ΗΠΑ περίπου το 60% των στελεχών πνευμονιόκοκκου παραμένουν πλήρως ευαίσθητα στην πενικιλίνη. Διαφορές απαντώνται από πόλη σε πόλη και εντός τμημάτων του πληθυσμού ή ακόμη και μέσα σε ιδρύματα σε μια πόλη. Τα ποσοστά αντοχής είναι υψηλότερα στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες, με αξιοσημείωτη εξαίρεση την Ολλανδία και τη Γερμανία όπου αποδεκτά πρότυπα ιατρικής άσκησης έχουν περιορίσει αυστηρά τη χρήση αντιμικροβιακών, και είναι ακόμη μεγαλύτερα σε Κορέα, Χονγκ-Κονγκ και Ταϊλάνδη. Σε συγκεκριμένες περιοχές του κόσμου, όπως η Ισπανία (το 1989, 44% των στελεχών πνευμονιόκοκκου εμφάνιζαν αντοχή στην πενικιλίνη) [133], η Ουγγαρία (58% όλων των στελεχών πνευμονιόκοκκου εμφάνιζαν αντοχή στην πενικιλίνη, και το 70% των στελεχών που απονώθηκαν από παιδιά) [134] και η Νότια Αφρική [135], έχουν αναφερθεί ποσοστά μειωμένης ευαισθησίας του πνευμονιόκοκκου στην πενικιλίνη μέχρι 40-70%. Οι πνευμονιόκοκκοι που δεν είναι ανθεκτικοί στην πενικιλίνη παραμένουν ευαίσθητοι στα περισσότερα άλλα αντιμικροβιακά. Καθώς η αντοχή στην πενικιλίνη αυξάνεται, οι μικροοργανισμοί είναι προοδευτικά πιο πιθανό να εμφανίζουν αντοχή σχεδόν σε όλα τα άλλα συνήθη χρησιμοποιούμενα αντιμικροβιακά. Η επίπτωση της αντοχής στα αντιμικροβιακά φαίνεται να ελαττώνεται κάπως, ίσως λόγω της εκτεταμένης χρήσης του συνδυασμένου εμβολίου έναντι των στελεχών με την υψηλότερη αντοχή στα αντιμικροβιακά.

### **11.2. Αντοχή στις μακρολίδες**

Οι μακρολίδες εισέρχονται στο 23S rRNA της 50S υπομονάδας του ριβοσώματος του βακτηρίου και συγκεκριμένα στην περιοχή V της αγκύλης της πεπτιδυλ-τρανσφεράσης, και έτσι εμποδίζουν τη φάση επιμήκυνσης της

πρωτεϊνικής σύνθεσης. Οι μακρολίδες θεωρούνται γενικά βακτηριοστατικά φάρμακα έναντι των Gram θετικών βακτηρίων όπως ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος, αλλά είναι βακτηριοκτόνα έναντι του πνευμονιόκοκκου. Υπάρχουν δύο κύριοι μηχανισμοί για την ανάπτυξη αντοχής στις μακρολίδες: η τροποποίηση του στόχου δράσης των μακρολιδών και η ενεργοποίηση μια αντλίας εκροής. (1) Η τροποποίηση του στόχου δράσης στο ριβόσωμα γίνεται μέσω μιας μεθυλάσης, η οποία κωδικοποιείται από το *ermB* γονίδιο. Συγκεκριμένα, το *ermB* γονίδιο κωδικοποιεί μια ριβοσωμική μεθυλάση, η οποία μεθυλιώνει ένα υπόλειμμα αδερίνης στην περιοχή V του 23S rRNA (A2058). Η μεθυλίωση αυτή ελαττώνει σημαντικά τη χημική συγγένεια των μακρολιδών με τη θέση στόχο. Αυτός ο μηχανισμός έχει ως αποτέλεσμα υψηλού βαθμού αντοχή στις μακρολίδες και τα στελέχη με τον συγκεκριμένο μηχανισμό αντοχής έχουν ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) ερυθρομυκίνης  $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ . Η μεθυλίωση αυτή επηρεάζει όχι μόνο τις μακρολίδες, αλλά και τις λινκοσαμίδες (όπως είναι η κλινδαμυκίνη) και τις στρεπτογραμμίνες A. Έτσι τα στελέχη *ermB*(+) εκφράζουν διασταυρούμενη αντοχή σε μακρολίδες, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμμίνες A και ο εν λόγω φαινότυπος χαρακτηρίζεται ως MLS αντίστοιχα. (2) Η αντλία εκροής στους πνευμονιόκοκκους κωδικοποιείται από το *mefA* γονίδιο και η αντοχή εμφανίζεται λόγω μειωμένης εισόδου των μακρολιδών στο βακτηριακό κύτταρο. Η αντλία προσφέρει αντοχή στις 14-μελείς (ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη) και στις 15-μελείς (αζιθρομυκίνη) μακρολίδες, αλλά όχι στις 16-μελείς μακρολίδες, τις λινκοσαμίδες και τις στρεπτογραμμίνες. Υψηλές συγκεντρώσεις του αντιμικροβιακού μπορεί να ξεπεράσουν την ικανότητα της αντλίας και να ασκήσουν αντιβακτηριδιακή δράση. Η σχετιζόμενη με αντλία

αντοχή είναι μικρότερου βαθμού με ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) ερυθρομυκίνης 1-32μg/ml και χαρακτηρίζεται ως M φαινότυπος. Ένας τρίτος, πρόσφατα αναγνωρισμένος, μηχανισμός αντοχής προκαλείται από αντικαταστάσεις αμινοξέων στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L4 και L22, ή μεταλλάξεις στο 23S rRNA μεταβάλλοντας έτσι τη θέση σύνδεσης των μακρολιδών. [136] Οι κετολίδες, μια νέα ομάδα μακρολιδών, που προέρχονται από τον 14-μελή δακτύλιο των μακρολιδών, είναι ημισυνθετικά παράγωγα της ερυθρομυκίνης, με κύριο εκπρόσωπο την τελιθρομυκίνη. Έχουν αναφερθεί στελέχη πνευμονιόκοκκου με αντοχή στις κετολίδες, τα οποία φέρουν το *ermB* γονίδιο και επιπλέον έχουν μεταλλάξεις στο 23S rRNA ή αλλαγές στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L4 και L22 [137]. Τέλος, έχουν αναφερθεί στελέχη πνευμονιόκοκκου με αντοχή στις μακρολίδες που φέρουν ταυτόχρονα και το *ermB* και το *mefA* γονίδιο [138], και αυτά τα στελέχη είναι συνήθως πολυανθεκτικά [139].

Αντοχή στις μακρολίδες εμφανίζεται περίπου στο 1/3 των πνευμονιοκοκκικών στελεχών, ενώ περισσότερο από 50% των στελεχών με αντοχή στην ερυθρομυκίνη εμφανίζουν ταυτόχρονα αντοχή στην πενικιλίνη [122]. Στις ΗΠΑ περίπου 28-30% των στελεχών πνευμονιόκοκκου εμφανίζουν αντοχή στις μακρολίδες [140, 141]. Το 1/3 αυτών των στελεχών έχουν το γονίδιο *ermB* και είναι επίσης ανθεκτικά στην κλινδαμυκίνη, ενώ τα 2/3 αυτών των ανθεκτικών στελεχών φέρουν το *mefA* γονίδιο. Η δραματική αύξηση της αντοχής στις μακρολίδες στις ΗΠΑ οφείλεται κυρίως στον μηχανισμό της αντλίας εκροής που κωδικοποιείται από το *mefA* γονίδιο, ενώ παρατηρήθηκε και μικρή αύξηση της MIC αυτών των στελεχών [142, 143]. Στην Ευρώπη, μεγαλύτερο ποσοστό πνευμονιόκοκκων παρουσιάζει κάποιο βαθμό αντοχής

στις μακρολίδες και το γονίδιο *ermB* είναι υπεύθυνο στην πλειονότητα των στελεχών. Εξαιρετικά υψηλά ποσοστά έχουν αναφερθεί σε χώρες της Ευρώπης, Ασίας και Νότιας Αφρικής.

### 11.3. Αντοχή σε άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες

Η αντοχή των πνευμονιόκοκκων στη χλωραμφενικόλη αποδίδεται σε μια επαγόμενη ακετυλτρανσφεράση. Μεταβολές στον μεταβολισμό του δεϋδροφολικού οξέος προκαλούν αντοχή στις σουλφοναμίδες και στην τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (TMP-SMX).

Η τετρακυκλίνη αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση του βακτηρίου εμποδίζοντας τη σύνδεση του αμινο-ακυλ-tRNA στο ριβόσωμα. Η αντοχή του πνευμονιόκοκκου στην τετρακυκλίνη οφείλεται στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες Tet(M) και Tet(O) που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *tet(M)* και *tet(O)* τα οποία εντοπίζονται σε ένα τρανσποσόνιο.

Η αντοχή των πνευμονιόκοκκων στις κινολόνες οφείλεται σε δύο μηχανισμούς: (1) ενεργός εκροή του αντιμικροβιακού μέσω του μεταφορέα *pmrA* και/ή (2) διαδοχική συσσώρευση χρωμοσωμικών μεταλλάξεων στις καθοριστικές για αντοχή στις κινολόνες περιοχές (quinolone resistance determining regions, QRDRs) των γονιδίων της DNA γυράσης (*gyrA*) ή της τοποϊσομεράσης IV (*parC* και *parE*) που κωδικοποιούν τα αντίστοιχα ένζυμα. Υψηλού βαθμού αντοχή στις κινολόνες συσχετίζεται με μεταλλάξεις και στα δύο γονίδια, *parC* και *gyrA* [130]. Ένας τρίτος μηχανισμός αντοχής στις κινολόνες περιλαμβάνει αλλαγές στις πορίνες ή τις αντλίες της κυτταρικής μεμβράνης [123]. Στις ΗΠΑ τα ποσοστά αντοχής στις κινολόνες υπολογίζονται



στο 2-3%. Υψηλότερα ποσοστά έχουν καταγραφεί σε περιοχές της Ασίας, όπως το Χονγκ-Κονγκ με ποσοστά αντοχής  $\approx 14\%$  [144-146].

Η βανκομυκίνη, η τεϊκοπλανίνη, και σχετιζόμενα γλυκοπεπτίδια έχουν δύο τελείως διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, ο συνδυασμός των οποίων κάνει την ανάπτυξη αντοχής εξαιρετικά δύσκολη. Η βανκομυκίνη συνδέεται αντιστρεπτά αλλά με υψηλή συγγένεια στα στελεχιαία πεπτίδια. Έτσι αναστέλλει την τρανσγλυκοσυλάση η οποία φυσιολογικά συνδέει υπομονάδες GlcNAc-MurNAc δισακχαρίτη, εμποδίζοντας την επιμήκυνση της πεπτιδογλυκάνης. Αντοχή στη βανκομυκίνη δεν έχει ακόμη αναφερθεί. Έχουν όμως περιγραφεί στελέχη πνευμονιόκοκκου με ανοχή στη βανκομυκίνη (vancomycin-tolerance) [147, 148].

Πρόσφατα, αναγνωρίστηκαν δύο κλινικά στελέχη πνευμονιόκοκκου με ελαττωμένη ευαισθησία στη λινεζολίδη, τα οποία ήταν επίσης ανθεκτικά στις μακρολίδες και στη χλωραμφενικόλη. Τα στελέχη αυτά περιείχαν απώλεια 6bp στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη ριβοσωμική πρωτεΐνη L4. [149] Επίσης, έχουν περιγραφεί στελέχη πνευμονιόκοκκου με αντοχή στην στρεπτογραμμίνη (quinupristin-dalfopristin) μετά από μετάλλαξη στη ριβοσωμική πρωτεΐνη L22 [150].

Η πρώτη αναφορά στελέχους πνευμονιόκοκκου με πολλαπλή αντοχή στα αντιμικροβιακά (MDR), που ορίζεται ως η αντοχή σε τρεις ή περισσότερες ομάδες αντιμικροβιακών παραγόντων, έγινε το 1977 στην Νότια Αφρική [130].

#### **11.4. Παράγοντες που σχετίζονται με αποικισμό ή λοίμωξη από ανθεκτικό στα αντιμικροβιακά πνευμονιόκοκκο**

Οι παράγοντες κινδύνου που συσχετίζονται με φορεία ή λοίμωξη από ανθεκτικό στα αντιμικροβιακά πνευμονιόκοκκο στα παιδιά περιλαμβάνουν την μικρή ηλικία, την προηγηθείσα λήψη αντιμικροβιακής αγωγής [49, 54], τη νοσηλεία σε νοσοκομείο (υπάρχει επίσης συσχέτιση με τη διάρκεια νοσηλείας), την πρόσφατη λοίμωξη της αναπνευστικής οδού, καθώς και την παρακολούθηση παιδικού σταθμού. [151-158] Τα στελέχη πνευμονιόκοκκου που απομονώνονται από την ανώτερη αναπνευστική οδό, τους παραρρίνιους κόλπους ή το μέσο ους έχουν υψηλότερο κίνδυνο αντοχής συγκριτικά με στελέχη από το αίμα ή την κατώτερη αναπνευστική οδό [123]. Η συχνότητα αντοχής στην πενικιλίνη ή τις μακρολίδες είναι χαμηλή μεταξύ των στελεχών που απομονώνονται από το αίμα συγκριτικά με τα στελέχη από μη διεισδυτικές πηγές. Τα στελέχη πνευμονιόκοκκου που απομονώνονται από το μέσο ους και τον ρινοφάρυγγα εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα αντοχής [122]. Η συχνότητα ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκων ήταν υψηλότερη μεταξύ των στελεχών από το μέσο ους και τους κόλπους [117].

Σε μια μελέτη [151] που διενεργήθηκε σε παιδιά με οξεία μέση ωτίτιδα, οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου ήταν η μικρή ηλικία (<2 ετών), η παρακολούθηση παιδικού σταθμού, η πρόσφατη λήψη αντιμικροβιακής αγωγής (<90 ημέρες), ο αριθμός των χορηγούμενων αντιμικροβιακών σχημάτων και μια κατάσταση που προδιαθέτει σε ωτίτιδα. Μια μεγάλη εθνική ανασκόπηση στη Γαλλία [152] εξέτασε τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά και τους παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη από πνευμονιόκοκκο με ελαττωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη. Η

πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε ως παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη από ανθεκτικό στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκο την ηλικία <15 ετών, την αγωγή με β-λακτάμες τους τελευταίους 6 μήνες, τη νοσηλεία σε νοσοκομείο, την λοίμωξη από HIV και την απομόνωση του βακτηρίου από την ανώτερη αναπνευστική οδό. Η προηγούμενη αγωγή με β-λακτάμες συσχετιζόταν με μη-διδυμική λοίμωξη από πνευμονιόκοκκο, ενώ η λοίμωξη από HIV συσχετιζόταν με διδυμική λοίμωξη. Η μετάδοση των πνευμονιόκοκκων συμβαίνει εύκολα στο περιβάλλον ενός παιδικού σταθμού, ευνοώντας με αυτόν τον τρόπο και τη διάδοση ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά πνευμονιόκοκκων μεταξύ των παιδιών που παρακολουθούν παιδικούς σταθμούς. Επίσης, εντός του παιδικού σταθμού τα παιδιά που λαμβάνουν προφυλακτική χημειοθεραπεία με αντιμικροβιακά ή συχνά σχήματα αντιμικροβιακών αποικίζονται πιο συχνά με πνευμονιόκοκκους με αντοχή στην πενικιλίνη [153].

Η πρόσφατη αγωγή με β-λακτάμες (εντός 3 μηνών) έχει αναγνωριστεί ως μείζων παράγοντας κινδύνου για φορεία και λοίμωξη από ανθεκτικό στις β-λακτάμες πνευμονιόκοκκο [152, 154]. Σε μια μελέτη που διενεργήθηκε στη Γαλλία μεταξύ παιδιών που παρακολουθούσαν σχολείο, η προηγούμενη αγωγή με β-λακτάμες αποτελούσε παράγοντα κινδύνου για φορεία πνευμονιόκοκκου με αντοχή στην πενικιλίνη. Πιο συγκεκριμένα η χαμηλή ημερήσια δόση β-λακταμών (σε σχέση με τη συνιστώμενη) και η μακρά διάρκεια αγωγής με β-λακτάμες (>5 ημέρες) συσχετιζόταν με αυξημένη φορεία ανθεκτικού στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκου. [159]

Η προηγούμενη χρήση αντιμικροβιακών είναι ο κύριος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση αντοχής στις μακρολίδες. Ως αποτέλεσμα, το

ποσοστό αντοχής είναι υψηλότερο στα παιδιά (ειδικά σε αυτά με υποτροπιάζοντα επεισόδια ωτίτιδας ή που παρακολουθούν παιδικό σταθμό), στους πρόσφατα νοσηλευόμενους ασθενείς και στους ασθενείς με ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη. Η αυξημένη χρήση των νεότερων, μακρύτερης δράσης, μακρολιδών έχει συσχετιστεί ισχυρά με αυξανόμενα ποσοστά αντοχής στις μακρολίδες [143, 160]. Έχει προταθεί ότι οι μακράς δράσης μακρολίδες είναι πιο πιθανό να οδηγήσουν στην ανάπτυξη αντοχής λόγω χαμηλότερων συγκεντρώσεων στον ορό και μακρύτερων περιόδων με υπό-MIC επίπεδα. Η χρήση της αζιθρομυκίνης έχει επανειλημμένα συσχετιστεί με ρινοφαρυγγική φορεία ανθεκτικών πνευμονιόκοκκων [161]. Θεωρείται ότι ο μεγάλος χρόνος ημίσειας ζωής της αζιθρομυκίνης εκθέτει τα βακτήρια που αποικίζουν τον ρινοφάρυγγα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τις ανασταλτικές για αρκετές εβδομάδες μετά το πέρας της χορήγησης του φαρμάκου, και με αυτόν τον τρόπο οδηγεί σε αύξηση της αντοχής στις μακρολίδες [116].

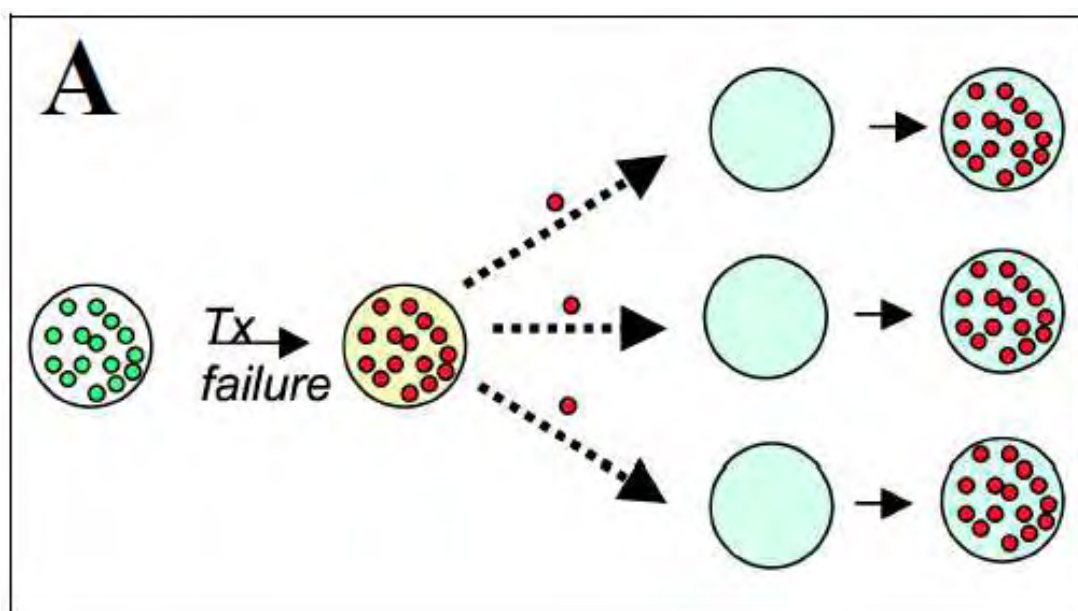
Σε μια μελέτη με παιδιά με οξεία μέση ωτίτιδα, συσχετίστηκαν τα ποσοστά συνταγογράφησης αντιμικροβιακών παραγόντων από το στόμα σε παιδιά κάτω των 5 ετών με το ποσοστό αντοχής των πνευμονιόκοκκων στα αντιμικροβιακά. Η ετήσια ελάττωση συνταγογραφήσεων αντιμικροβιακών κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών συσχετίζεται σημαντικά με αξιοσημείωτη ελάττωση του ποσοστού αντοχής στα αντιμικροβιακά μεταξύ των πνευμονιοκοκκικών στελεχών [162].

Παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με εμφάνιση αντοχής των πνευμονιόκοκκων σε πολλαπλές ομάδες αντιμικροβιακών παραγόντων είναι η

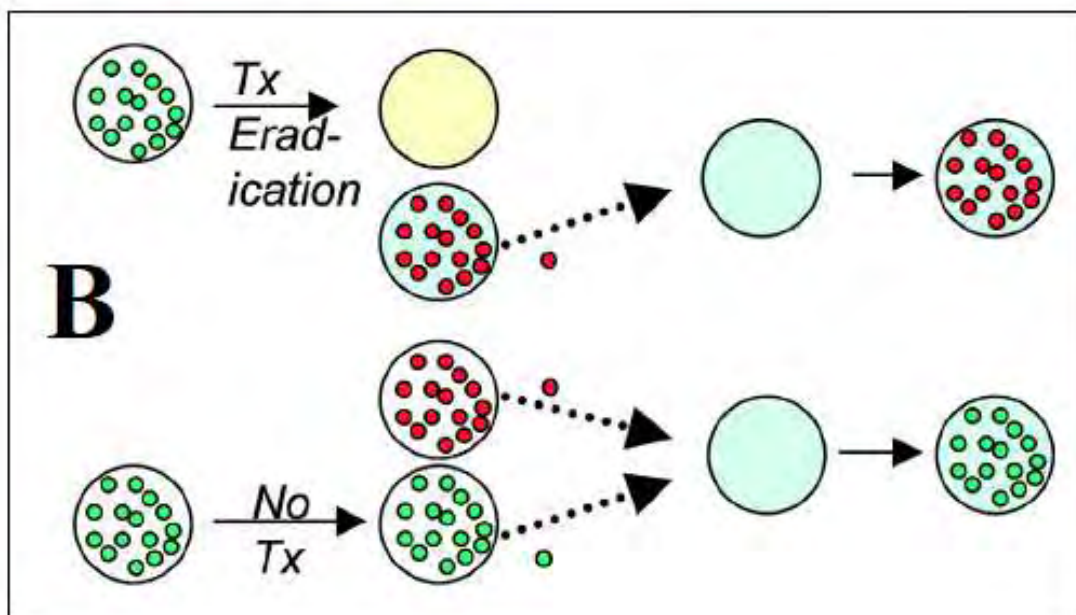
ηλικία <5 ετών ή >65 ετών και η προηγηθείσα χρήση β-λακταμικών αντιμικροβιακών από ασθενείς με μη διεισδυτική νόσο [154].

### 11.5. Επίδραση της αντιμικροβιακής αγωγής στη φορεία ή λοίμωξη με ανθεκτικά στελέχη πνευμονιόκοκκου

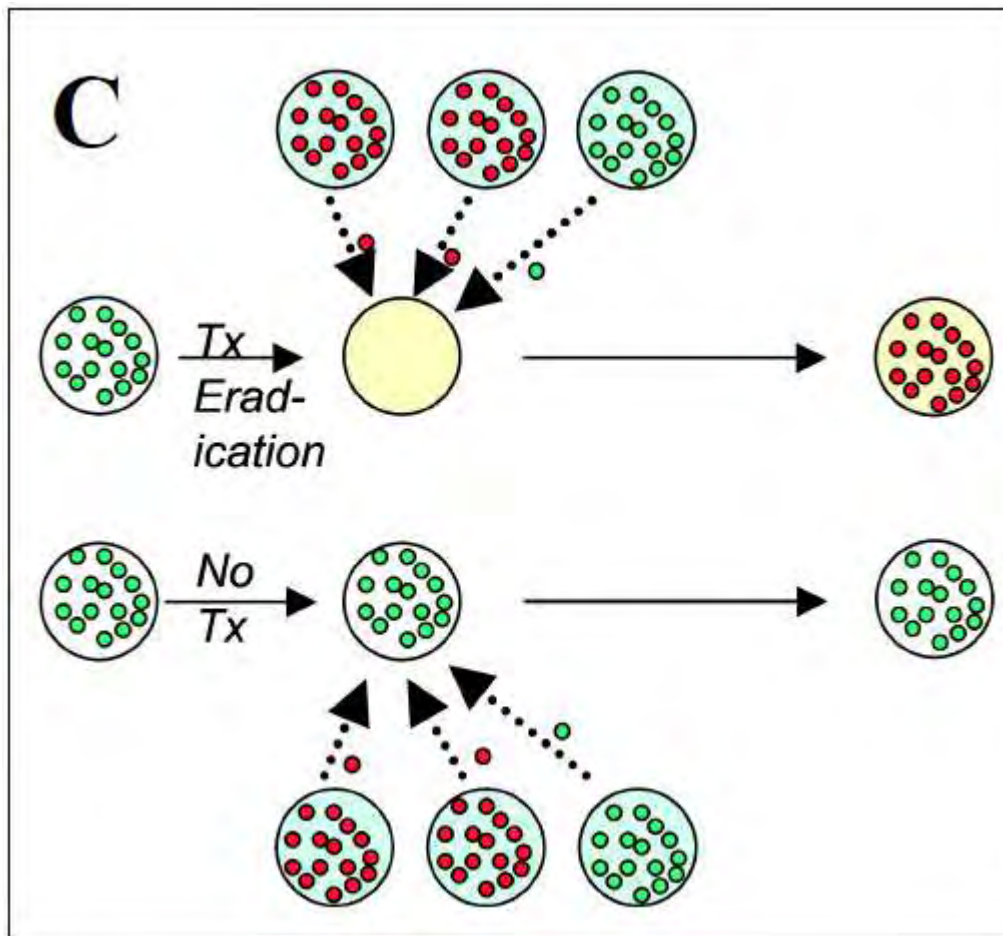
Στα παρακάτω σχήματα [163] παρουσιάζονται 4 μηχανισμοί με τους οποίους η αντιμικροβιακή αγωγή μπορεί να προκαλέσει την επιλογή ανθεκτικών μικροοργανισμών σε έναν πληθυσμό. Η επίδραση μπορεί να είναι άμεση με αυξημένη αντοχή στους ξενιστές που είχαν λάβει θεραπεία (κίτρινο χρώμα) σε αντίθεση με τους ξενιστές που δεν είχαν λάβει θεραπεία (άσπρο χρώμα), καθώς και έμμεση με αυξημένη αντοχή σε άλλους (τουρκουάζ χρώμα) εξαιτίας της θεραπείας συγκεκριμένων ξενιστών.



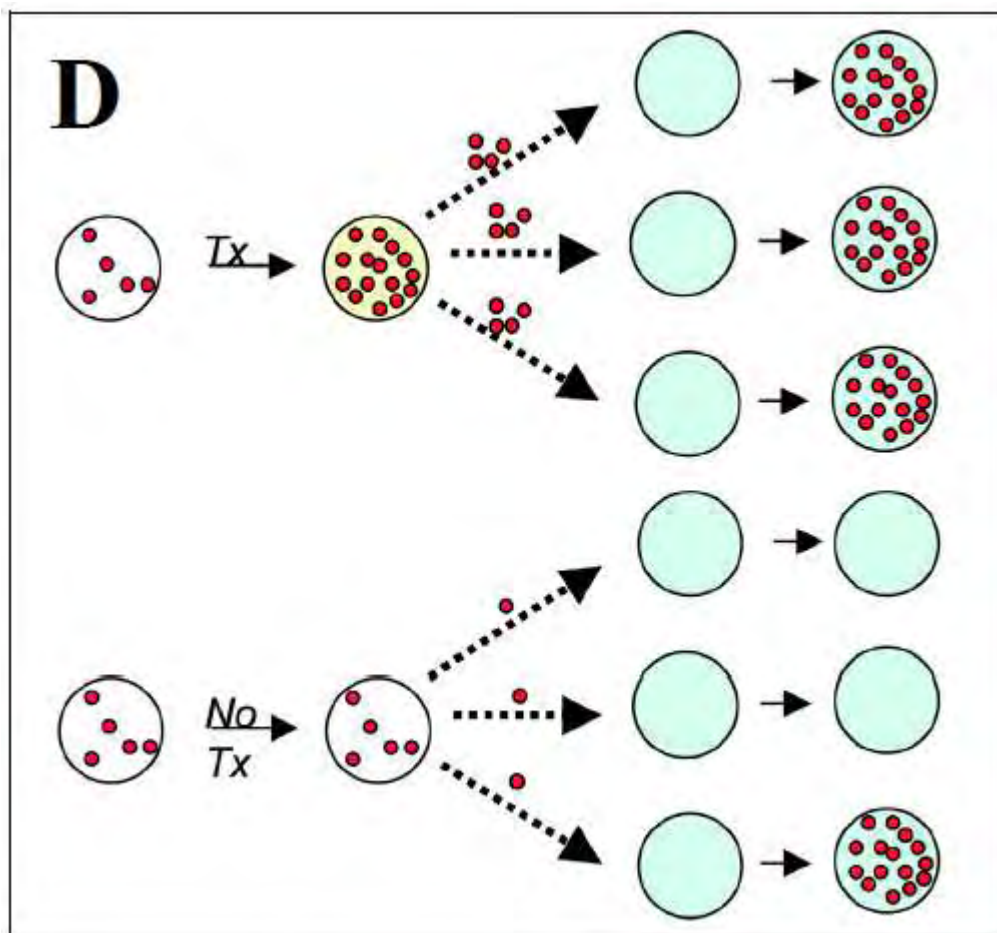
**Σχήμα (Α).** Υποπληθυσμοί (συνήθως μεταλλάκτες) ανθεκτικών (κόκκινο χρώμα) βακτηρίων υπάρχουν σε έναν ξενιστή που έχει προσβληθεί κυρίως από ευαίσθητα (πράσινο χρώμα) στελέχη. Όταν η αγωγή αποτύχει, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ανθεκτικού υποπληθυσμού ο οποίος μπορεί να μεταδοθεί σε άλλους ευαίσθητους ξενιστές (τουρκουάζ χρώμα).



**Σχήμα (B).** Επιτυχημένη θεραπεία ενός ατόμου που έχει προσβληθεί από ένα ευαίσθητο στέλεχος ελαττώνει την ικανότητα αυτού του ξενιστή να μεταδίδει τη λοίμωξη σε άλλους ευαίσθητους ξενιστές, αυξάνοντας την πιθανότητα αυτοί οι ξενιστές να προσβληθούν από ανθεκτικά στελέχη, και μετατοπίζοντας την ισορροπία προς τις ανθεκτικές λοιμώξεις.



**Σχήμα (C).** Η θεραπεία μιας λοίμωξης εκριζώνει τον πληθυσμό των ευαίσθητων βακτηρίων που αποικίζουν (συνήθως συμβιωτικά) ένα ξενιστή, καθιστώντας τον ξενιστή πιο ευπαθή στην απόκτηση νέου στελέχους. Εάν το νεοαποκτηθέν στέλεχος έχει υψηλή πιθανότητα να είναι ανθεκτικό (όπως στο πλαίσιο εξάπλωσης ενός ανθεκτικού στελέχους), αυτό μπορεί να αυξήσει σημαντικά τον κίνδυνο του ατόμου που έχει λάβει θεραπεία να αποικιστεί με ανθεκτικό στέλεχος, συγκριτικά με κάποιο που δεν έχει λάβει θεραπεία.



**Σχήμα (D).** Η θεραπεία μιας λοίμωξης σε ένα άτομο που ήδη είναι αποικισμένο (συμβιωτικά) με ανθεκτικούς οργανισμούς μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του φορτίου αυτών των οργανισμών, εάν η ανταγωνιστική χλωρίδα (πιθανόν από άλλα είδη οργανισμών) έχει ανασταλεί – οδηγώντας σε αυξημένη διασπορά των ανθεκτικών οργανισμών και πιθανόν σε αυξημένο κίνδυνο του ατόμου για λοίμωξη με ανθεκτικό οργανισμό.

Στην μελέτη του Samore [164] παρουσιάζονται οι μηχανισμοί με τους οποίους οι αντιμικροβιακοί παράγοντες συμβάλλουν στη διασπορά των ανθεκτικών πνευμονιόκοκκων στον πληθυσμό. Η χρήση των κεφαλοσπορινών αυξάνει τον κίνδυνο του ατόμου για αποικισμό με ανθεκτικά στελέχη πνευμονιόκοκκου, προάγοντας την απόκτηση νέων ανθεκτικών στελεχών πνευμονιόκοκκου κατά τη διάρκεια ή σύντομα μετά τη θεραπεία. Σε αντίθεση, οι πενικιλίνες δεν προάγουν τον κίνδυνο του ατόμου για αποικισμό



με ανθεκτικά στελέχη πνευμονιόκοκκου. Αντιθέτως, οι πενικιλλίνες επιταχύνουν σημαντικά την απομάκρυνση των ευαίσθητων πνευμονιόκοκκων, και αυτός ο μηχανισμός δίνει στους ανθεκτικούς πνευμονιόκοκκους ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στο επίπεδο του πληθυσμού. Και οι δύο ομάδες αντιμικροβιακών παραγόντων προάγουν τη διασπορά των ανθεκτικών πνευμονιόκοκκων, αλλά στην περίπτωση των πενικιλλινών ο αυξημένος κίνδυνος αποικισμού με ανθεκτικά στελέχη μοιράζεται εξίσου στα άτομα του πληθυσμού που είχαν λάβει θεραπεία και στα άτομα που δεν είχαν λάβει θεραπεία. Οι κεφαλοσπορίνες και όχι οι πενικιλλίνες συσχετίζονται με αυξημένη φορεία ανθεκτικών στις β-λακτάμες πνευμονιόκοκκων, ενώ οι πενικιλλίνες συσχετίζονται με ελαττωμένη φορεία ευαίσθητων στις β-λακτάμες πνευμονιόκοκκων. Η μεγαλύτερη επίδραση των αντιμικροβιακών παραγόντων στη φορεία ανθεκτικών και ευαίσθητων πνευμονιόκοκκων παρατηρήθηκε όταν οι καλλιέργειες είχαν ληφθεί μέσα σε 10 ημέρες από την έναρξη της θεραπείας. Η πρόσφατη αγωγή με μακρολίδες συσχετίζεται με ελαττωμένη φορεία ευαίσθητων στις μακρολίδες πνευμονιόκοκκων και με μη σημαντικά αυξημένη φορεία ανθεκτικών στις μακρολίδες πνευμονιόκοκκων. Επίσης, η πρόσφατη αγωγή με μακρολίδες συσχετίζεται με ελαττωμένη φορεία ευαίσθητων στις πενικιλλίνες πνευμονιόκοκκων αλλά δεν συσχετίζεται με αυξημένη φορεία ανθεκτικών στις πενικιλλίνες πνευμονιόκοκκων. Η πρόσφατη θεραπεία με κεφαλοσπορίνες, πενικιλλίνες, και μακρολίδες ήταν πιο συχνή μεταξύ των φορέων ανθεκτικών στελεχών παρά μεταξύ των φορέων ευαίσθητων στελεχών.

## 12. ΑΝΟΣΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ – ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ

Η πρώτη κλινική δοκιμή για παρασκευή πνευμονιοκοκκικού εμβολίου διενεργήθηκε το 1911 μεταξύ των εργατών στα ορυχεία χρυσού και διαμαντιού στη Νότια Αφρική. Τα πρώτα αυτά εμβόλια αποτελούνταν από νεκρούς μικροοργανισμούς και χορηγούνταν υποδόρια σε δύο δόσεις με μεσοδιάστημα μίας εβδομάδας. Τα ολοκυτταρικά εμβόλια χρησιμοποιήθηκαν σε μεγάλο βαθμό στις ένοπλες δυνάμεις των Ηνωμένων Πολιτειών το 1918 και 1919, καθώς και στα ορυχεία της Νότιας Αφρικής. Τη δεκαετία του 1940, τα εμβόλια αυτά αντικαταστάθηκαν από τη νέα γενιά πνευμονιοκοκκικών εμβολίων που αποτελούνταν από κεκαθαμένους πολυσακχαρίτες του ελύτρου των βακτηρίων. Το 1946, μετά από δοκιμή σε στρατιωτικό πληθυσμό αναπτύχθηκαν και κυκλοφόρησαν στις Ηνωμένες Πολιτείες δύο εξαδύναμα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια από τους Squibb και Sons. Δυστυχώς, αυτά τα εμβόλια παρουσιάστηκαν όταν έγιναν διαθέσιμα τα νέα αντιμικροβιακά φάρμακα. Η εκπληκτική αποτελεσματικότητα των νέων φαρμάκων στη θεραπεία της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας οδήγησε στην πεποίθηση ότι οι πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις ήταν πλέον ιάσιμες. Ως αποτέλεσμα, το ενδιαφέρον για την πρόληψη της πνευμονιοκοκκικής νόσου με ενεργητική ανοσοποίηση ελαττώθηκε, και αυτά τα εμβόλια δεν χρησιμοποιήθηκαν ποτέ ευρέως και τελικά αποσύρθηκαν το 1954. Νέο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη εμβολίων για την πρόληψη των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων τις δεκαετίες 1960 και 1970 είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του 23-δύναμου πολυσακχαριδικού εμβολίου, το οποίο εγκρίθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες και στον Καναδά το 1983. Η μεγάλη αδυναμία του πολυσακχαριδικού εμβολίου υπήρξε η έλλειψη αποτελεσματικότητας για τα βρέφη και μικρά παιδιά. Αυτό

αντιμετωπίστηκε με τη χημική σύνδεση (σύζευξη) του πολυσακχαρίτη με έναν πρωτεϊνικό φορέα. Το πρώτο πνευμονιοκοκκικό συζευγμένο εμβόλιο πήρε έγκριση το 2000.

### **12.1. Απλά πολυσακχαριδικά εμβόλια**

Ο πολυσακχαρίτης του ελύτρου είναι ο μείζων λοιμογόνος παράγοντας του πνευμονιόκοκκου, κυρίως μέσω της ικανότητάς του να ελαττώνει τη φαγοκυττάρωση των βακτηρίων από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα. Τα αντισώματα έναντι του πολυσακχαρίτη μπορούν να παρέχουν προστασία έναντι του πνευμονιόκοκκου μέσω της σύνδεσής τους στο έλυτρο, δρώντας ως υποδοχείς για τα συστατικά του συμπληρώματος και συνεπώς προάγοντας την οψωνοφαγοκυττάρωση.

Το 1977 εγκρίθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες και στον Καναδά το 14-δύναμο πολυσακχαριδικό πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (PNEUMOVAX) του Merck. Παρόμοια 14-δύναμα εμβόλια παρασκευάστηκαν διαδοχικά από τον Lederle και τον Pasteur Mérieux. Τα 14-δύναμα εμβόλια εγκρίθηκαν και σε άλλες χώρες, όπως την Ολλανδία το 1978, το Ηνωμένο Βασίλειο και τη Νορβηγία το 1979, τη Γαλλία και τη Γερμανία το 1980, την Αυστραλία και τη Σουηδία το 1981, και την Ιταλία το 1982. Τα εμβόλια αυτά περιείχαν κεκαθαρμένους πολυσακχαρίτες από στελέχη πνευμονιόκοκκου με ορότυπο 1, 2, 3, 4, 6A, 7F, 8, 9N, 12F, 14, 18C, 19F, 23F, και 25F. Οι ορότυποι που περιλαμβάνονταν σε αυτά τα εμβόλια αποτελούσαν το 68,2% των στελεχών πνευμονιόκοκκου που απομονώθηκαν από φυσιολογικά στείρες περιοχές μέσω ενός εθνικού προγράμματος επιτήρησης στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1978 και 1979, και οι ορολογικά σχετιζόμενοι με τους ορότυπους του εμβολίου

ορότυποι το 16,2% [165]. Το 14-δύναμο εμβόλιο αναπροσαρμόστηκε μετά την εμφάνιση επιπλέον δεδομένων για την κατανομή των ορότυπων που προκαλούν νόσο και για τις βιοχημικές και ανοσολογικές ιδιότητες του πολυσακχαρίτη του ελύτρου [166].

Νέα 23-δύναμα εμβόλια παρασκευάστηκαν από τον Merck (PNEUMOVAX-23) και από τον Lederle (Pru-Immune 23) και εγκρίθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες και τον Καναδά το 1983. Το 23-δύναμο εμβόλιο αποτελείται από τους κεκαθαρμένους πολυσακχαρίτες του ελύτρου 23 πνευμονιοκοκκικών ορότυπων. Ο ορότυπος 25F παραλείφθηκε και 10 επιπλέον ορότυποι προστέθηκαν για να δώσουν το 23-δύναμο εμβόλιο. Οι ορότυποι που προστέθηκαν ήταν οι 5, 9V, 10A, 11A, 15B, 17F, 19A, 20, 22F, και 33. Ο ορότυπος 6A αντικαταστάθηκε από τον 6B, του οποίου ο πολυσακχαρίτης είναι πιο σταθερός χημικά και διεγείρει την παραγωγή αντισωμάτων διασταυρούμενα και για τους δύο ορότυπους. Το 1981 η σύσταση για τη χρήση του εμβολίου στόχευε στα άτομα ηλικίας άνω των 2 ετών με δυσλειτουργία του σπληνός, με ανατομική ασπληνία ή χρόνια πάθηση που σχετίζονταν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πνευμονιοκοκκικής νόσου. Στην συνέχεια περιλήφθηκαν όλα τα άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών και αργότερα περιλήφθηκαν κατευθυντήριες οδηγίες για τον εμβολιασμό των ασθενών με λοίμωξη από τον HIV.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το εμβόλιο συστήνεται από το CDC (Centers for Disease Control and Prevention) για εμβολιασμό όλων των ενηλίκων ηλικίας άνω των 65 ετών και των ατόμων με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πνευμονιοκοκκικής νόσου. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το 23-δύναμο εμβόλιο συστήνεται για χρήση σε ενήλικες ηλικίας άνω των 60 ετών, καθώς και σε

άτομα ηλικίας άνω των 2 ετών με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πνευμονιοκοκκικής νόσου. Το εμβόλιο αυτό είναι ελάχιστα ανοσογονικό για τα παιδιά ηλικίας κάτω των 2 ετών, και γ'αυτό δεν συστήνεται για αυτή την ηλικιακή ομάδα.

Το 23-δύναμο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο δεν παρέχει επαρκή προστασία σε παιδιά ηλικίας κάτω των 2 ετών, τα οποία είναι σε αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη πνευμονιοκοκκικής νόσου, καθώς και σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς και στους εξαιρετικά ηλικιωμένους. Αυτή η έλλειψη αποτελεσματικότητας μεταξύ των διάφορων ομάδων υψηλού κινδύνου οφείλεται στην ανικανότητά τους να προάγουν μια T εξαρτώμενη ανοσολογική απάντηση στα πολυσακχαριδικά αντιγόνα.

Ένα χρόνο μετά από ανοσοποίηση με μία δόση από το 23-δύναμο εμβόλιο μπορεί να ανιχνευτεί μια βαθμιαία ελάττωση των τίτλων των αντισωμάτων. Πέντε χρόνια μετά την ανοσοποίηση υγιών ενηλίκων, οι τίτλοι των αντισωμάτων είναι περίπου στα 3/4 από την υψηλότερη τιμή τους. Δέκα χρόνια μετά την ανοσοποίηση, τα αντισώματα έναντι του ελύτρου παραμένουν υψηλά μόνο για τους δύο από τους έξι τύπους που εξετάστηκαν. [167] Η προστασία έναντι της πνευμονιοκοκκικής μικροβιαιμίας που παρέχεται από το 23-δύναμο εμβόλιο ελαττώνεται σε μία περίοδο 3 έως 5 ετών [168].

Η πιο συχνή ανεπιθύμητη ενέργεια του εμβολίου είναι μία ήπια τοπική αντίδραση (ερύθημα ή οίδημα στην περιοχή της ένεσης) μέσα σε 48 ώρες από τον εμβολιασμό, η οποία παρατηρείται σε λιγότερο από το 1/3 των εμβολιασθέντων [169].

## 12.2. Συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια

Τα κεκαθαρμένα πολυσακχαριδικά αντιγόνα είναι ελάχιστα ανοσογονικά στα μικρά παιδιά. Η ομοιοπολική σύνδεση των πολυσακχαριδικών αντιγόνων με ανοσογονικές πρωτεΐνες ικανές να στρατολογούν CD4<sup>+</sup> T βοηθητικά κύτταρα παράγει τα συζευγμένα εμβόλια, που περιγράφηκαν αρχικά τη δεκαετία του 1930. Αυτή η σύνδεση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή προστατευτικών υψηλών τίτλων IgG αντιπολυσακχαριδικών αντισωμάτων και τη δημιουργία ανοσολογικής μνήμης, καθώς και ανοσογονικότητας στα βρέφη και μικρά παιδιά.

Οι πολυσακχαρίτες του ελύτρου του πνευμονιόκοκκου συζεύκτηκαν με πρωτεΐνες φορείς όπως είναι το τοξοειδές του τετάνου ή το τοξοειδές της διφθερίτιδας, μία γενετικά σχεδιασμένη πρωτεΐνη που μοιάζει πολύ με το τοξοειδές της διφθερίτιδας (CRM<sub>197</sub>), οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης της *Neisseria meningitidis*, η πνευμονολυσίνη, και η πρωτεΐνη A της επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου. Τα αντιγόνα που προκύπτουν από αυτή τη σύζευξη αναγνωρίζονται ως T εξαρτώμενα, οπότε προκαλούν καλή ανοσιακή απόκριση σε παιδιά ηλικίας κάτω των 2 ετών και επάγουν ανοσολογική μνήμη [170].

Τον Φεβρουάριο του 2000, ένα επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (PCV7, Prevenar) πήρε έγκριση στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Το εμβόλιο συστήνονταν για όλα τα παιδιά ηλικίας 2 έως 23 μηνών και για παιδιά ηλικίας 24 έως 59 μηνών με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πνευμονιοκοκκικής νόσου (δρεπανοκυτταρική αναιμία, HIV λοίμωξη, ή άλλη ανοσοκατασταλτική ή χρόνια πάθηση). Τα υγιή παιδιά

λάμβαναν μια αρχική σειρά από εμβολιασμούς σε ηλικία 2, 4 και 6 μηνών, που ακολουθούνταν από μια επαναληπτική δόση σε ηλικία 12 έως 15 μηνών. Το εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε πιο εκτεταμένα στις ΗΠΑ, αλλά εγκρίθηκε και προτάθηκε για καθολικό εμβολιασμό των βρεφών και σε πολλές άλλες χώρες, κυρίως της Βόρειας Αμερικής και της Δυτικής Ευρώπης. Στις ΗΠΑ, το PCV7 υιοθετήθηκε πολύ γρήγορα, και μέχρι το 2005 τα επίπεδα κάλυψης με τη λήψη τριών ή περισσότερων δόσεων μεταξύ των παιδιών ηλικίας 19 έως 35 μηνών ήταν μεγαλύτερα από 80%.

Το επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (PCV7) συγκροτείται από τους πολυσακχαρίτες του ελύτρου που προέρχονται από επτά πνευμονιοκοκκικούς ορότυπους (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) συνδεδεμένους σε ένα μη τοξικό μόριο, ανοσολογικά σχετιζόμενο και με διασταυρούμενη αντίδραση με το τοξοειδές της διφθερίτιδας (CRM<sub>197</sub>). Το CRM<sub>197</sub> είναι η πρωτεΐνη φορέας για το επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (Prevenar). Οι ορότυποι που περιέχονται στο επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο είναι αυτοί που σχετίζονται πιο συχνά με την εμφάνιση πνευμονιοκοκκικής νόσου. Στις Ηνωμένες Πολιτείες οι ορότυποι που ανήκαν στο εμβόλιο αποτελούσαν το 78% όλων των στελεχών που απομονώθηκαν από παιδιά ηλικίας κάτω των 6 ετών [171].

Η εισαγωγή αυτού του εμβολίου στις Ηνωμένες Πολιτείες οδήγησε σε δραστική μείωση της διεισδυτικής νόσου μεταξύ των παιδιών ηλικίας κάτω των 2 ετών [172, 173] και επίσης σε μείωση της επίπτωσης της πνευμονιοκοκκικής διεισδυτικής νόσου μεταξύ των ενηλίκων και των ηλικιωμένων [173, 174]. Σε μια μελέτη που διεξήχθη σε 8 νοσοκομεία παιδών

στις Ηνωμένες Πολιτείες παρατηρήθηκε μείωση κατά 75% του αριθμού των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων από στελέχη που ανήκουν στους ορότυπους του εμβολίου σε παιδιά ηλικίας  $\leq 24$  μηνών [175]. Επίσης, μετά την εισαγωγή του PCV7 τα ποσοστά διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου μεταξύ των νεογνών και μικρών βρεφών ηλικίας  $< 3$  μηνών ελαττώθηκαν σημαντικά [176]. Πιο συγκεκριμένα για την πνευμονία, παρατηρήθηκε μετά την εισαγωγή του PCV7 ελάττωση του ποσοστού εισαγωγής στο νοσοκομείο λόγω πνευμονίας κάθε αιτίας και λόγω πνευμονίας οφειλόμενης σε πνευμονιόκοκκο στα παιδιά ηλικίας κάτω των 2 ετών, καθώς και ελάττωση του ποσοστού εισαγωγής στο νοσοκομείο λόγω πνευμονίας κάθε αιτίας στους ενήλικες ηλικίας 18-39 ετών [177].

Σε μια άλλη μελέτη [178] που διενεργήθηκε σε παιδιά ηλικίας 3 έως 59 μηνών παρατηρήθηκε προστατευτική δράση του επταδύναμου συζευγμένου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου έναντι της διεισδυτικής νόσου μεταξύ των υγιών παιδιών και των παιδιών με χρόνιες παθήσεις. Αυτή η επίδραση αφορούσε νόσο οφειλόμενη σε στελέχη με ορότυπους του εμβολίου, νόσο οφειλόμενη σε στελέχη ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά και διεισδυτική νόσο ανεξαρτήτως ορότυπου. Η αποτελεσματικότητα του εμβολίου ήταν χαμηλότερη για τον ορότυπο 19F. Όσον αφορά τους ορότυπους που σχετίζονται με αυτούς του εμβολίου, η αποτελεσματικότητα για τον ορότυπο 6A ήταν αρκετά όμοια με αυτή για τους ορότυπους του εμβολίου, ενώ το εμβόλιο δεν παρείχε προστασία έναντι του ορότυπου 19A. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ακόμη και με ελλιπή σχήματα εμβολιασμού με το PCV7 παρέχεται προστασία έναντι της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου, που οφείλεται κυρίως σε στελέχη που ανήκουν στους ορότυπους του εμβολίου [178, 179]. Επίσης, φαίνεται ότι αυτή



η αποτελεσματικότητα έναντι της πνευμονιοκοκκικής διεισδυτικής νόσου έχει διατηρηθεί για τουλάχιστον επτά χρόνια μετά την έναρξη του καθολικού εμβολιασμού των παιδιών [180].

Σε μια κλινική μελέτη [181] σε παιδιά παρουσιάστηκε υψηλού βαθμού αποτελεσματικότητα του επταδύναμου συζευγμένου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου στην πρόληψη πνευμονιοκοκκικής διεισδυτικής νόσου που οφείλεται στους ορότυπους του εμβολίου, καθώς και σημαντική επίδραση στην οξεία μέση ωτίτιδα. Παρατηρήθηκε κυρίως προστατευτική δράση έναντι των συχνών επεισοδίων οξείας μέσης ωτίτιδας και των πιο σοβαρών περιστατικών μέσης ωτίτιδας [181, 182].

Ακόμη, σε μια άλλη τυχαιοποιημένη μελέτη [183] σε παιδιά, που διενεργήθηκε στη Φινλανδία, βρέθηκε ότι το επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο συσχετίζεται με ελάττωση κατά 6% του αριθμού των επεισοδίων οξείας μέσης ωτίτιδας οποιασδήποτε αιτιολογίας, καθώς και με 9% ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης υποτροπιάζουσας μέσης ωτίτιδας. Παρατηρήθηκε ελάττωση κατά 57% του αριθμού των επεισοδίων οξείας μέσης ωτίτιδας που οφείλονταν σε ορότυπους του εμβολίου, αλλά η αποτελεσματικότητα κυμαίνονταν ανάλογα με τον ορότυπο. Η αποτελεσματικότητα του εμβολίου για κάθε ορότυπο που περιλαμβάνεται στο εμβόλιο κυμαίνονταν από 25%, για τον ορότυπο 19F, έως 84%, για τον ορότυπο 6B. Επίσης, παρατηρήθηκε ελάττωση κατά 51% του αριθμού των επεισοδίων οξείας μέσης ωτίτιδας που οφείλονταν σε ορότυπους με διασταυρούμενη αντίδραση με αυτούς του εμβολίου (ορότυποι 6A, 9N, 18B, 19A, 23A). Πιο ειδικά, η αποτελεσματικότητα έναντι της οξείας μέσης ωτίτιδας από τον ορότυπο 6A ήταν στατιστικά σημαντική. Τέλος, παρατηρήθηκε μια

αύξηση κατά 33% των επεισοδίων οξείας μέσης ωτίτιδας που οφείλονταν σε όλους τους υπόλοιπους ορότυπους.

Η αποτελεσματικότητα αυτή των συζευγμένων πνευμονιοκοκκικών εμβολίων στην πρόληψη της πνευμονιοκοκκικής νόσου από ορότυπους που περιέχονται στο εμβόλιο οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ελάττωση του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με ορότυπους του εμβολίου στα εμβολιασμένα παιδιά. Αφού τα παιδιά αποτελούν την κύρια πηγή μετάδοσης των πνευμονιόκοκκων, ο εμβολιασμός τους με τα συζευγμένα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της φορέας και της πνευμονιοκοκκικής νόσου από ορότυπους του εμβολίου στα ανεμβολίαστα παιδιά και ενήλικες της κοινότητας (ανοσία της κοινότητας – herd immunity). [172-174, 178, 184-189]

Σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη [184] σε παιδιά ηλικίας 12 έως 18 μηνών που έλαβαν 1 ή 2 δόσεις του επταδύναμου συζευγμένου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου, ή 1 δόση του 23-δύναμου πολυσακχαριδικού εμβολίου παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση στη φορεία με στελέχη πνευμονιόκοκκου που ανήκαν στους ορότυπους του εμβολίου 3 μήνες μετά τη μία δόση και 1 μήνα μετά τη δεύτερη δόση του συζευγμένου εμβολίου. Ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση μετά τον εμβολιασμό με το μη συζευγμένο εμβόλιο. Ένα χρόνο μετά την ανοσοποίηση, η φορεία ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά πνευμονιόκοκκων που ανήκαν στους ορότυπους του εμβολίου ήταν χαμηλότερη στα παιδιά που έλαβαν το συζευγμένο εμβόλιο από ότι σε αυτά που έλαβαν το μη συζευγμένο εμβόλιο. Και σε μια άλλη μελέτη παρατηρήθηκε προστασία έναντι του αποικισμού με στελέχη πνευμονιόκοκκου που ανήκαν στους ορότυπους του εμβολίου μόνο 1 μήνα

μετά την αρχική σειρά εμβολιασμού (δηλαδή την 3<sup>η</sup> δόση του σχήματος εμβολιασμού), και αφορούσε κυρίως μειωμένο κίνδυνο αποικισμού από τους ορότυπους 6B και 23F [185]. Αυτή η προστασία του εμβολιασμού κατά τη διάρκεια της βρεφικής ηλικίας διατηρήθηκε και πέραν της άμεσης εμβολιαστικής περιόδου και επέμενε τουλάχιστον μέχρι την ηλικία των 3 ετών [186].

Σε δύο τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες [188, 190] που διεξάχθηκαν στα χωριά της Γκάμπια για τον εμβολιασμό με το PCV7 διαπιστώθηκε μείωση της φορέας με στελέχη πνευμονιόκοκκου που ανήκαν στους ορότυπους του εμβολίου σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, δηλαδή στα εμβολιασμένα παιδιά καθώς και στα ανεμβολίαστα μεγαλύτερα παιδιά και ενήλικες. Περιγράφηκε πιθανή ανάπτυξη ανοσίας της κοινότητας (herd immunity) όσον αφορά τον αποικισμό με στελέχη με ορότυπους του εμβολίου, η οποία μπορεί να ερμηνευτεί ως ανάπτυξη προστασίας από τη διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσο στους ενήλικες. Αυτή η επίδραση του PCV7 παρατηρήθηκε 6 μήνες μετά τον εμβολιασμό και διατηρήθηκε για τουλάχιστον 4 χρόνια μετά τον εμβολιασμό. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη φορεία με στελέχη πνευμονιόκοκκου που δεν ανήκαν στους ορότυπους του εμβολίου.

Σε αρκετές, όμως, άλλες μελέτες έχει περιγραφεί αύξηση στην συχνότητα της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου και του αποικισμού με στελέχη πνευμονιόκοκκου που δεν ανήκουν στους ορότυπους του εμβολίου, ένα φαινόμενο που έχει ονομαστεί αντικατάσταση ορότυπων (serotype replacement) [156, 172, 184, 185, 187, 191-196]. Οι παράγοντες που οδηγούν σε αυτή την αντικατάσταση ορότυπων, η οποία διαφέρει από κοινότητα σε κοινότητα, δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Είναι πιθανό ο

εμβολιασμός να διευκολύνει την αντικατάσταση ορότυπων επάγοντας τη χυμική και κυτταρική ανοσολογική απόκριση, και καθιστώντας έτσι πιο δύσκολο τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα από στελέχη πνευμονιόκοκκου που ανήκουν στους ορότυπους του εμβολίου και ανοίγοντας τον δρόμο για τον αποικισμό από στελέχη που δεν ανήκουν στους ορότυπους του εμβολίου, ίσως και από άλλα βακτήρια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η συνολική συχνότητα της πνευμονιοκοκκικής φορείας στα εμβολιασμένα παιδιά να μην έχει μεταβληθεί σημαντικά. Σε κάποιες μελέτες, όμως, έχει αναφερθεί ελάττωση της συνολικής φορείας με πνευμονιόκοκκο στον πληθυσμό παρά το φαινόμενο της αντικατάστασης ορότυπων [156, 172]. Ο ορότυπος 19A συσχετίζεται πιο συχνά με το φαινόμενο της αντικατάστασης ορότυπων [173, 192-195, 197, 198]. Σε μια μελέτη που διενεργήθηκε σε παιδιά με οξεία μέση ωτίτιδα παρατηρήθηκε αύξηση του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με *Moraxella catarrhalis* και μη τυποποιήσιμα στελέχη *Haemophilus influenzae* στα εμβολιασμένα παιδιά [199].

Στις ευρωπαϊκές χώρες, η επίπτωση των ορότυπων που περιλαμβάνονται στο εμβόλιο είναι γενικά χαμηλότερη από αυτή στις Ηνωμένες Πολιτείες, και γι' αυτό η επίδραση του επταδύναμου συζευγμένου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου εμφανίζει ετερογένεια με μικρότερο συνολικό όφελος εξαιτίας και της πιο αξιοσημείωτης αντικατάστασης ορότυπων. Στην Αγγλία [200], βρέθηκε σημαντική μείωση στη φορεία στελεχών πνευμονιόκοκκου με ορότυπους που ανήκουν στο εμβόλιο στα εμβολιασμένα παιδιά ηλικίας <5 ετών, αλλά όχι αλλαγή στη συνολική φορεία λόγω της αντικατάστασης με ορότυπους που δεν ανήκουν στο εμβόλιο. Στη Νορβηγία [201], παρατηρήθηκε ελάττωση της φορείας με ορότυπους του εμβολίου

μεταξύ των εμβολιασμένων και ανεμβολίαστων παιδιών, αλλά η συνολική συχνότητα της πνευμονιοκοκκικής φορέας παρέμεινε υψηλή (80.4%) μετά την εισαγωγή του PCV7, λόγω της πλήρους αντικατάστασης από αύξηση των ορότυπων που δεν ανήκουν στο εμβόλιο. Τα ποσοστά αντοχής στα αντιμικροβιακά μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν παρέμειναν σταθερά ή ελαττώθηκαν, και είναι αξιοσημείωτο ότι το ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών δεν αυξήθηκε μεταξύ των στελεχών με ορότυπους που δεν ανήκουν στο εμβόλιο. Στην Ολλανδία [202], παρατηρήθηκε μείωση της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου από ορότυπους του εμβολίου κατά 90% στην ομάδα των εμβολιασμένων παιδιών, με συνοδό αύξηση κατά 71% από ορότυπους που δεν περιλαμβάνονται στο PCV7 και αυτό είχε ως αποτέλεσμα μείωση κατά 44% της συνολικής διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου σε αυτά τα παιδιά. Στα παιδιά ηλικίας <2 ετών η συνολική συχνότητα της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου ελαττώθηκε κατά 35%, ενώ στις υπόλοιπες ηλικιακές ομάδες παρέμεινε σταθερή. Στην Ισπανία επίσης, παρατηρήθηκε μείωση της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου οφειλόμενης σε ορότυπους του εμβολίου μετά την εισαγωγή του PCV7 [203, 204], αλλά η διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσος από ορότυπους που δεν ανήκουν στο εμβόλιο αυξήθηκε [205]. Στη Γαλλία [206], 3 χρόνια μετά την εισαγωγή του PCV7, βρέθηκε ελάττωση της συνολικής συχνότητας της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου κατά 21% μεταξύ των παιδιών ηλικίας ≤2 ετών, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση της νόσου από ορότυπους που δεν περιλαμβάνονται στο εμβόλιο. Στην Πορτογαλία [207], διαπιστώθηκε επίσης το φαινόμενο της αντικατάστασης των ορότυπων που περιέχονται στο εμβόλιο από ορότυπους που δεν περιέχονται στο εμβόλιο και αυτό είχε ως

αποτέλεσμα να μην παρατηρηθεί σημαντική μείωση της συνολικής συχνότητας της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου στα παιδιά. Οι διαφορές στα συστήματα επιτήρησης, στις χρονικές διακυμάνσεις των ορότυπων που κυκλοφορούν, στην αντοχή στα αντιμικροβιακά φάρμακα, στην ευαισθησία στην πενικιλίνη των κυκλοφορούντων στελεχών πνευμονιόκοκκου, στα σχήματα εμβολιασμού και στην εμβολιαστική κάλυψη μπορούν να είναι υπεύθυνες για τις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των χωρών [208, 209].

Τα συζευγμένα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια αποτελούν αποτελεσματικά εφόδια για την ελάττωση της πνευμονιοκοκκικής νόσου από ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά στελέχη [156, 172, 173, 175, 198, 210-213]. Παγκοσμίως, οι περισσότερες ανθεκτικές στα αντιμικροβιακά πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις οφείλονται στους πέντε από τους ορότυπους που περιέχονται στα συζευγμένα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια (6B, 9V, 14, 19F, 23F). Το 1998, στις Ηνωμένες Πολιτείες το 24% των πνευμονιοκοκκικών διεισδυτικών λοιμώξεων οφείλονταν σε στελέχη με αντοχή στην πενικιλίνη, και αυτοί οι πέντε ορότυποι αποτελούσαν το 78% αυτών των ανθεκτικών στελεχών [214]. Το ποσοστό των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων από ανθεκτικούς στα αντιμικροβιακά πνευμονιόκοκκους έχει ελαττωθεί τόσο στα μικρά παιδιά όσο και στους ηλικιωμένους μετά την εισαγωγή των συζευγμένων εμβολίων [210]. Μεταξύ των παιδιών ηλικίας κάτω των 2 ετών, η συχνότητα της πνευμονιοκοκκικής νόσου από ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη μειώθηκε κατά 81%, και μεταξύ των ατόμων ηλικίας 65 ετών και άνω μειώθηκε κατά 49%. Επίσης η συχνότητα ανθεκτικής νόσου οφειλόμενης σε στελέχη που ανήκαν στους ορότυπους του εμβολίου μειώθηκε κατά 87%. Διαπιστώθηκε,

όμως, αύξηση ανθεκτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου οφειλόμενη σε στελέχη που δεν ανήκαν στους ορότυπους του εμβολίου, κυρίως λόγω της αύξησης του ορότυπου 19A. Επίσης, έχει παρατηρηθεί σημαντική ελάττωση του ποσοστού φορέας με ανθεκτικούς στα αντιμικροβιακά πνευμονιόκοκκους [156, 196]. Αυτή η ελάττωση της φορέας με ανθεκτικούς στα αντιμικροβιακά πνευμονιόκοκκους παρατηρήθηκε σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, αλλά ήταν μεγαλύτερη στην ηλικιακή ομάδα κάτω των 36 μηνών [211]. Παρατηρήθηκε ελάττωση των στελεχών πνευμονιόκοκκου με υψηλού βαθμού αντοχή στην πενικιλίνη και αντοχή στις 3<sup>ης</sup> γενιάς κεφαλοσπορίνες η οποία οφείλεται στην ελάττωση της φορέας με στελέχη με ορότυπους του εμβολίου. Αυτό, όμως, αντισταθμίστηκε από την αύξηση των στελεχών με ενδιάμεσου βαθμού αντοχή στην πενικιλίνη η οποία οφείλεται στην αύξηση της φορέας με στελέχη με ορότυπους που δεν ανήκουν στο εμβόλιο [215]. Διαπιστώθηκε, επίσης, αύξηση της αντοχής σε πολλαπλές ομάδες αντιμικροβιακών μεταξύ των στελεχών με ορότυπους που δεν ανήκουν στο εμβόλιο [215]. Σε μια μελέτη στη Γαλλία μεταξύ παιδιών με οξεία μέση ωτίτιδα [156] παρατηρήθηκε, παράλληλα με τη σημαντική ελάττωση των στελεχών με ορότυπους του εμβολίου, ελάττωση του ποσοστού των στελεχών πνευμονιόκοκκου με ελαττωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη, καθώς και σημαντική ελάττωση των ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκων η οποία φαίνεται ότι μπορεί να συσχετίζεται με την εισαγωγή του επταδύναμου συζευγμένου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου.

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες μετά από εμβολιασμό με το PCV7 είναι συνήθως ήπιες και αυτοπεριοριζόμενες. Οι περισσότερες μελέτες περιγράφουν ελάσσονες ανεπιθύμητες ενέργειες. Οι πιο συχνά

περιγραφόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες σε παιδιά είναι ο πυρετός, οι τοπικές αντιδράσεις στο σημείο της ένεσης, οι αλλεργικές αντιδράσεις, τα εξανθήματα (περιλαμβάνοντας την ουρτικάρια), και η ευερεθιστότητα ή ανησυχία.

Η συχνότητα της εμφάνισης ερυθρότητας στην περιοχή της ένεσης ή πυρετού μπορεί να αυξηθεί με τον αριθμό των δόσεων του PCV7, όσον αφορά τις τρεις αρχικές δόσεις [181, 183], και σε αρκετές μελέτες παρατηρήθηκε υψηλότερη συχνότητα τοπικών αντιδράσεων στο σημείο της ένεσης και πυρετού στην ηλικιακή ομάδα 12 έως 15 μηνών. Όταν, όμως, η ανάλυση περιοριζόταν σε πιο σοβαρές αντιδράσεις, τα ποσοστά ήταν σημαντικά χαμηλά και υπήρχε μικρή ένδειξη συσχέτισης με τον αριθμό των δόσεων ή την ηλικία. Στις μελέτες των Käyhty και Shao παρατηρήθηκαν συχνότερα τοπικές αντιδράσεις στο σημείο της ένεσης και πυρετός  $>38^{\circ}\text{C}$ , όσο ο αριθμός των δόσεων του PCV7 αυξάνονταν [216-218].

Εκτός από τις τοπικές αντιδράσεις στην περιοχή της ένεσης και τον πυρετό, οι περισσότερες ανεπιθύμητες ενέργειες απαντώνται σπάνια. Πιθανή εξαίρεση αποτελούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες από το αναπνευστικό. Η νοσηλεία λόγω κρίσης άσθματος μέσα σε 60 ημέρες από τον εμβολιασμό παρατηρήθηκε ότι είναι πιο συχνή στην ομάδα του PCV7, αλλά εκτός νοσοκομείου δεν παρατηρήθηκε αύξηση στα ποσοστά άσθματος που να σχετίζεται με το PCV7 [181]. Σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη [219] για το PCV7 που διενεργήθηκε στα παιδιά των αυτοχθόνων της Αμερικής περιγράφηκαν λίγα δεδομένα ανεπιθύμητων ενεργειών. Ένα σημαντικό εύρημα ήταν ότι η νοσηλεία λόγω οξείας μέσης ωτίτιδας απαντώνταν πιο συχνά στους αποδέκτες του PCV7, ενώ σε μια άλλη κλινική μελέτη στη Φινλανδία βρέθηκε ότι ο εμβολιασμός με το PCV7 ήταν αποτελεσματικός στην πρόληψη της



οξείας μέσης ωτίτιδας [183]. Δεν βρέθηκε αυξημένος κίνδυνος θανάτου μετά από εμβολιασμό με το PCV7 στην μελέτη από τη Βόρεια Καλιφόρνια ή σε κάποια άλλη μελέτη [181, 183, 219].

Το PCV7 και τα άλλα συζευγμένα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια έχει γενικά βρεθεί ότι έχουν αποδεκτή αντιδραστικότητα σε ειδικούς πληθυσμούς και ομάδες υψηλού κινδύνου, περιλαμβάνοντας τα πρόωρα βρέφη [220, 221] και τα άτομα με HIV λοίμωξη [222], δρεπανοκυτταρική αναιμία [223] ή μεταμόσχευση οργάνων, καθώς και τα βρέφη των αυτοχθόνων της Αμερικής [219]. Σε μια υποανάλυση της κλινικής μελέτης στη Βόρεια Καλιφόρνια, 1592 πρόωρα βρέφη συγκρίθηκαν με 10402 τελειόμηνα βρέφη και παρατηρήθηκαν παρόμοια ποσοστά τοπικών αντιδράσεων και πυρετού μετά από εμβολιασμό με το PCV7 [220]. Σε μια άλλη μελέτη συγκρίθηκαν 46 πρόωρα και 46 τελειόμηνα βρέφη που εμβολιάστηκαν με το PCV7, και παρατηρήθηκαν λίγα περιστατικά τοπικών αντιδράσεων και πυρετού  $>39^{\circ}\text{C}$  σε κάθε ομάδα [203]. Σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη για τον εμβολιασμό με το PCV7 σε 30 βρέφη και μικρά παιδιά προσβεβλημένα από τον HIV-1, ανιχνεύτηκαν λίγες σοβαρές τοπικές αντιδράσεις στο σημείο της ένεσης ή εμπύρετα περιστατικά [222]. Σε μια μελέτη με παιδιά με δρεπανοκυτταρική αναιμία που εμβολιάστηκαν με το PCV7, παρατηρήθηκαν μη ειδικές τοπικές αντιδράσεις κατά τη διάρκεια των τριών αρχικών δόσεων με παρόμοια συχνότητα στα παιδιά με (52%) και χωρίς (57%) τη νόσο [223].

Η μεγαλύτερη κλινική δοκιμή για συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο διεξήχθη στη Νότια Αφρική [224]. Περιλάμβανε 19922 βρέφη και παιδιά που είχαν εμβολιαστεί με το PCV9 σε ηλικία 6, 10 και 14 εβδομάδων και 19914 βρέφη και παιδιά που έλαβαν το placebo. Σπασμοί οποιασδήποτε αιτιολογίας

περιγράφηκαν με την ίδια συχνότητα και στις δύο ομάδες παιδιών. Μεταξύ των παιδιών με HIV λοίμωξη, η νοσηλεία για ιογενή πνευμονία μέσα σε 8 ημέρες από τον εμβολιασμό ήταν στατιστικά σημαντικά πιο συχνή μεταξύ των ληπτών του PCV9. Επιπλέον, 31 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, η νοσηλεία λόγω άσθματος ή αντιδραστικής αναπνευστικής νόσου ήταν πιο συχνή στην ομάδα του PCV9. Μια άλλη μεγάλη μελέτη για την αποτελεσματικότητα του PCV9 διεξήχθη στην Γκάμπια [225]. Περιλάμβανε 8718 βρέφη και παιδιά που είχαν εμβολιαστεί με το PCV9 και 8719 λήπτες placebo. Δεν υπήρχε διαφορά στη συχνότητα των τοπικών αντιδράσεων ή του πυρετού μεταξύ των δύο ομάδων. Και οι δύο αυτές μεγάλες μελέτες για το PCV9 παρουσίασαν ενδείξεις ότι οι επισκέψεις στο νοσοκομείο λόγω πνευμονίας αυξήθηκαν. Όμως στην μελέτη που διενεργήθηκε στη Γκάμπια δε βρέθηκε αύξηση των επεισοδίων άσθματος.

Η εκτεταμένη χρήση του επταδύναμου συζευγμένου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου (PCV7) συνοδεύτηκε από μια μικρή αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας της πνευμονιοκοκκικής νόσου οφειλόμενης σε ορότυπους που δεν ανήκαν στο εμβόλιο και στα παιδιά και στους ενήλικες. Συγκεκριμένα, μετά την εισαγωγή του PCV7, οι ορότυποι 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, και 33F απομονώθηκαν από ασθενείς με διεισδυτική ή μη διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσο πιο συχνά από πριν [195, 197, 226]. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το παγκόσμιο πρόβλημα της σοβαρής πνευμονιοκοκκικής νόσου από ορότυπους που δεν περιλαμβάνονται στο PCV7, αναπτύχθηκαν νέα συζευγμένα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια που περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό ορότυπων. Σε αυτά περιλαμβάνονται το 10-δύναμο εμβόλιο και το 13-δύναμο (PCV13) εμβόλιο. Το 10-δύναμο

συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο χρησιμοποιεί μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης του *H. influenzae*, την πρωτεΐνη D και καλύπτει επιπλέον τους ορότυπους 1, 5 και 7F. Ενώ, το 13-δύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο παρέχει επιπλέον προστασία έναντι των ορότυπων 3, 6A και 19A.

Το 13-δύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο εγκρίθηκε το Φεβρουάριο του 2010 στις Ηνωμένες Πολιτείες και σταδιακά αντικατέστησε το PCV7 στον καθολικό εμβολιασμό των βρεφών και παιδιών μέχρι την ηλικία των 5 ετών. Το PCV13 είναι μέχρι τώρα το εμβόλιο με τον μεγαλύτερο αριθμό ορότυπων και περιλαμβάνει τους επτά ορότυπους του PCV7 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) και επιπλέον άλλους 6 ορότυπους (1, 3, 5, 6A, 7F, 19A). Με βάση τα γνωστά ποσοστά των ορότυπων, 90% ή περισσότερο της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου στις περισσότερες περιοχές του κόσμου πρέπει να μπορούν να προληφθούν από τη χρήση του 13-δύναμου συζευγμένου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου (PCV13) [176, 195, 227].

Το 2011, μόνο 1 χρόνο μετά την εισαγωγή του PCV13, διαπιστώθηκε ελάττωση του ποσοστού αποικισμού από στελέχη πνευμονιόκοκκου με ορότυπους που ανήκουν στο PCV13 μεταξύ των παιδιών ηλικίας 6 έως 23 μηνών. Η συνολική συχνότητα του πνευμονιοκοκκικού αποικισμού δεν επηρεάστηκε, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση των στελεχών με ορότυπους που δεν ανήκουν στο PCV13 μεταξύ όλων των παιδιών. [228] Σε μια μελέτη μεταξύ παιδιών ηλικίας <2 ετών με οξεία μέση ωτίτιδα, παρατηρήθηκε ότι το PCV13 έχει επίδραση στη συνολική συχνότητα αποικισμού του ρινοφάρυγγα από πνευμονιόκοκκο, όπως και στον αποικισμό από τους ορότυπους 19A, 7F, 6A [229]. Επίσης, το PCV13 επάγει διασταυρούμενη προστασία έναντι

ορότυπων που δεν καλύπτονται άμεσα από το εμβόλιο, αλλά σχετίζονται με ορότυπους του εμβολίου. Έτσι, είναι πιθανό να παρέχει κάποιου βαθμού προστασία έναντι της νόσου από τον ορότυπο 6C και τον ορότυπο 7A λόγω αντισωμάτων με διασταυρούμενη δράση που επάγονται από τους σχετιζόμενους ορότυπους 6A και 7F αντίστοιχα. [230]

Οι περισσότερες από τις τοπικές αντιδράσεις στο σημείο της ένεσης είναι ήπιες και διαρκούν 1 ή 2 ημέρες. Οι τοπικές αντιδράσεις, κυρίως η ευαισθησία και η ερυθρότητα, είναι ελάχιστα πιο συχνές μετά την επαναληπτική δόση. Επίσης, αναφέρεται ευερεθιστότητα των βρεφών, κυρίως μετά την 1<sup>η</sup> δόση του εμβολίου. Οι περισσότερες περιπτώσεις πυρετού είναι ήπιες (θερμοκρασία  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  αλλά  $\leq 39^{\circ}\text{C}$ ). [231]

Το 13-δύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο μπορεί να χορηγείται ταυτόχρονα με άλλα εμβόλια χωρίς καμία ελάττωση της ανοσολογικής απόκρισης σε όλα τα αντιγόνα [231].

### **12.3. Πρωτεϊνικά εμβόλια**

Τα συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια μπορούν να περιέχουν περιορισμένο αριθμό ορότυπων λόγω της ανάγκης κάθε ορότυπος να συνδέεται ξεχωριστά στην πρωτεΐνη φορέα. Αυτό σε συνδυασμό με την αύξηση των λοιμώξεων και του αποικισμού από ορότυπους που δεν ανήκουν στα συζευγμένα εμβόλια οδήγησε στην ανάγκη παρασκευής νέων εμβολίων. Έτσι, πρωτεΐνες της επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου μελετήθηκαν για να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή εμβολίου. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η πρωτεΐνη A της επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου (PspA), η προσκολλητίνη A της επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου (PsaA) και η πνευμολυσίνη. [232, 233]

Επίσης, έχει προταθεί οι πρωτεΐνες αυτές να χρησιμοποιηθούν ως πρωτεΐνες φορείς σε συζευγμένο εμβόλιο ώστε και να παρέχεται προστασία έναντι των υπόλοιπων ορότυπων και να αποφεύγεται το φαινόμενο της αντικατάστασης ορότυπων.

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο πνευμονιόκοκκος αποτελεί σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα της βακτηριαιμίας, της μηνιγγίτιδας, της οξείας μέσης ωτίτιδας, της πνευμονίας και της ρινοκολπίτιδας στα παιδιά παγκοσμίως [38, 39]. Ο ρινοφάρυγγας είναι η κύρια φυσική δεξαμενή των στελεχών πνευμονιόκοκκου και ο αποικισμός του προηγείται της λοίμωξης [110, 41]. Στα περισσότερα άτομα ο αποικισμός είναι ασυμπτωματικός και δεν εξελίσσεται σε νόσο [41]. Ο ρινοφάρυγγας παίζει ρόλο κλειδί στην μετάδοση των πνευμονιόκοκκων μεταξύ παιδιών και ενηλίκων [37]. Στα παιδιά, οι πνευμονιόκοκκοι μπορούν να παραμένουν στον ρινοφάρυγγα για σχετικά μεγάλες περιόδους και να επηρεάζονται από την επαναλαμβανόμενη έκθεση στα αντιμικροβιακά φάρμακα. Επιπλέον, ο ρινοφάρυγγας των μικρών παιδιών αποτελεί ένα καλό περιβάλλον για την ενίσχυση της αντοχής και των παραγόντων διεισδυτικότητας της νέας γενιάς πνευμονιόκοκκων και είναι ο στόχος των συζευγμένων πνευμονιοκοκκικών εμβολίων [184].

Η μελέτη επιτήρησης των ρινοφαρυγγικών στελεχών των παιδιών αντανακλά την κατανομή των ορότυπων και την αντοχή των στελεχών που κυκλοφορούν στην κοινότητα και προκαλούν λοιμώξεις, ιδιαίτερα του αναπνευστικού συστήματος. Όταν το επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (PCV7) κυκλοφόρησε και ο εμβολιασμός με αυτό έγινε ευρέως διαδεδομένος, διεξήχθησαν μελέτες του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με πνευμονιόκοκκο σε επιλεγμένους πληθυσμούς υγιών ή με οξεία νόσο παιδιών στη Νότιο Αμερική [49, 157, 158, 173, 187, 194, 196, 215, 234, 235] και την Ευρώπη [156, 236]. Αυτές οι μελέτες είχαν ως σκοπό να

εκτιμήσουν την τάση της κατανομής των ορότυπων και της αντοχής στα αντιμικροβιακά που ακολούθησε την έναρξη του εμβολιασμού με το PCV7.

Στην Ελλάδα το PCV7 κυκλοφόρησε τον Οκτώβριο του 2004, ενσωματώθηκε στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμού για όλα τα παιδιά ηλικίας κάτω 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 μια ετήσια μελέτη επιτήρησης του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με πνευμονιόκοκκο σε παιδιά που παρακολουθούσαν παιδικό σταθμό στην Κεντρική Ελλάδα. Έχουμε πρόσφατα αναφέρει ότι η επέκταση του εμβολιασμού ανέκοψε την μετάδοση των στελεχών πνευμονιόκοκκου που ανήκαν στους ορότυπους του εμβολίου και είχαν υψηλού βαθμού αντοχή στην πενικιλίνη [236].

Ο εμβολιασμός με το επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (PCV7), όμως, έχει ως αποτέλεσμα μια αύξηση του ποσοστού των στελεχών που αποικίζουν τον ρινοφάρυγγα και δεν ανήκουν στους ορότυπους του PCV7 [184, 213, 237]. Έτσι, υπάρχει έντονη ανάγκη για παρακολούθηση του πνευμονιοκοκκικού αποικισμού χρησιμοποιώντας σειρά επιτηρήσεων σε διάφορες περιοχές, όπου διαφορετικά σχήματα εμβολιασμού έχουν εφαρμοστεί και διαφορετικοί ορότυποι μπορεί να κυκλοφορούν.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους κάθε ξεχωριστή ομάδα αντιμικροβιακών παραγόντων συμβάλλει στην επιλογή και μετάδοση, ειδικά σε επίπεδο πληθυσμού, των ανθεκτικών πνευμονιόκοκκων δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Πρόσφατα, έχει γίνει προσπάθεια για περαιτέρω διευκρίνιση αυτών των μηχανισμών [164].



Η αντοχή στην ερυθρομυκίνη και στην πενικιλλίνη είναι συνηθισμένη στα στελέχη πνευμονιόκοκκου που απομονώνονται από φορείς [52, 211, 238-240], όπως και από παιδιά και ενήλικες με πνευμονιοκοκκική νόσο [241-245] σε διάφορα μέρη του κόσμου. Τα στελέχη που είναι ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη είναι επίσης ανθεκτικά στην αζιθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη, και ροξιθρομυκίνη. Η αντοχή στην ερυθρομυκίνη και στην πενικιλλίνη είναι μείζονος ενδιαφέροντος, αφού οι μακρολίδες μαζί με τις πενικιλλίνες και τις κεφαλοσπορίνες είναι οι κύριες ομάδες αντιμικροβιακών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση των παιδιατρικών λοιμώξεων.

Η εκτεταμένη χρήση του PCV7 αναμένεται να συμβάλει στην ελαττωμένη κυκλοφορία ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά πνευμονιόκοκκων, αφού ένα σημαντικό ποσοστό αυτών ανήκει στους ορότυπους του εμβολίου [211, 239]. Υπάρχει περιορισμένη πληροφορία στη βιβλιογραφία όσον αφορά τη φορεία ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά πνευμονιόκοκκων μεταξύ των ληπτών του PCV7 από τότε που καθιερώθηκε ο εμβολιασμός με το PCV7 [173, 215].

Πρόσφατα, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για την ανάλυση της σύνθετης αλληλεπίδρασης του ευρέως διαδεδομένου εμβολιασμού με το PCV7 και της χρήσης διάφορων αντιμικροβιακών παραγόντων μεταξύ παιδιών, στον αποικισμό με πνευμονιόκοκκο και την αντοχή στα αντιμικροβιακά [156]. Αυτή η αλληλεπίδραση δεν έχει εκτιμηθεί εντός του πληθυσμού των παιδικών σταθμών.

Η Ελλάδα είναι μια χώρα με υψηλή κατανάλωση αντιμικροβιακών [246] και υψηλό ποσοστό στελεχών πνευμονιόκοκκου με μερική ή πλήρη αντοχή

στην πενικιλίνη, και αντοχή στην ερυθρομυκίνη. Η μελέτη του 2005-2007 μεταξύ των παιδιών που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς στην Κεντρική Ελλάδα είναι μια τριετής επιτήρηση της χλωρίδας του ρινοφάρυγγα των παιδιών της Ελλάδας. Διενεργήθηκε κατά τη διάρκεια της πρώιμης περιόδου μετά την εισαγωγή του PCV7 [236]. Η παρούσα έρευνα σκοπεύει να εκτιμήσει την επίδραση του PCV7, καθώς και των διάφορων ομάδων των αντιμικροβιακών παραγόντων στον αποικισμό του ρινοφάρυγγα με ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά στελέχη πνευμονιόκοκκου μεταξύ του πληθυσμού των παιδικών σταθμών.

## **2. ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1. Πληθυσμός μελέτης**

Στις 28 Φεβρουαρίου του 2005, η ομάδα μας ξεκίνησε μια ετήσια μελέτη επιτήρησης του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με πνευμονιόκοκκο μεταξύ παιδιών που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς στις κύριες αστικές περιοχές της Κεντρικής Ελλάδας (Λάρισα, Βόλος, Τρίκαλα, και Καρδίτσα). Κάθε χρόνο, η ετήσια μελέτη διεξάγονταν κατά τη διάρκεια μιας περιόδου περίπου 3 μηνών στο τέλος του χειμώνα και την άνοιξη. Συνολικά, το 95% των δειγμάτων ελήφθησαν μεταξύ της πρώτης εβδομάδας του Φεβρουαρίου και της τρίτης εβδομάδας του Μαΐου. Στην μελέτη επιτήρησης, ένα δείγμα λήφθηκε από κάθε παιδί.

Στις τέσσερις μεγαλύτερες πόλεις της Κεντρικής Ελλάδας υπάρχουν 43 δημοτικοί παιδικοί σταθμοί. Σε κάθε μία από τις τρεις ετήσιες μελέτες

επιτήρησης, 8 έως 13 παιδικοί σταθμοί από αυτούς τους 43 συμμετείχαν στην μελέτη. Κατά τη διάρκεια της τριετούς μελέτης, 32 ξεχωριστές επισκέψεις σε παιδικούς σταθμούς έλαβαν χώρα. Δεκαοκτώ παιδικοί σταθμοί συμμετείχαν σε μία μόνο ετήσια επιτήρηση, τέσσερις σε δύο, και δύο και στις τρεις επιτηρήσεις. Οι παιδικοί σταθμοί που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ετήσια επιτήρηση επιλέχθηκαν να είναι από διάφορες γεωγραφικές περιοχές και διάφορου μεγέθους, και να περιλαμβάνουν παιδιά από διαφορετικές κοινωνικές ομάδες. Όσον αφορά τον συνολικό αριθμό των παιδιών που παρακολουθούσαν αυτούς τους 43 παιδικούς σταθμούς κατά τη διάρκεια κάθε χρόνου της μελέτης, 28% (769 από 2751 παιδιά) το 2005, 17.1% (494 από 2881 παιδιά) το 2006, και 18.1% (566 από 3127 παιδιά) το 2007 καταχωρήθηκαν με τυχαίο τρόπο στην μελέτη επιτήρησης.

Το ερευνητικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Γραπτή συγκατάθεση δόθηκε από τον έναν από τους γονείς κάθε συμμετέχοντος. Οι γονείς απάντησαν σε ένα δομημένο ερωτηματολόγιο που συνέλεγε δεδομένα για δημογραφικά χαρακτηριστικά, τις ημερομηνίες του εμβολιασμού με το PCV7, όπως και τις ημερομηνίες, τον αριθμό, και το είδος των σχημάτων της αντιμικροβιακής αγωγής που χορηγήθηκαν τους προηγούμενους 3 μήνες. Οι ερωτήσεις για τη χρήση του αντιμικροβιακού φαρμάκου επικεντρώθηκαν στις χρονικές περιόδους 1-30 ημέρες, 31-60 ημέρες, και 61-90 ημέρες πριν από τη δειγματοληψία. 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 βιβλιário

υγείας που διαθέτει κάθε παιδί στην Ελλάδα. Οι απαντήσεις συμπληρώθηκαν σε ειδικά έντυπα.

## **2.2. Πρόγραμμα εμβολιασμού**

Η Εθνική Επιτροπή Εμβολιασμού της Ελλάδας συνιστά τη χορήγηση του PCV7 για τα βρέφη σε σχήμα 4 δόσεων σε ηλικίες 2, 4, 6, και 12-15 μηνών. Πρόγραμμα αναπλήρωσης (catch-up) συνιστάται για όλα τα παιδιά ηλικίας έως 59 μηνών [247]. Το πρόγραμμα αναπλήρωσης για τα βρέφη περιλαμβάνει 2 δόσεις σε ηλικία 7-11 μηνών και μία τρίτη δόση 12-15 μηνών, ενώ χορηγούνται 2 δόσεις σε νήπια ηλικίας 12-23 μηνών. Εάν ο εμβολιασμός αρχίσει μετά την ηλικία των 24 μηνών χορηγείται 1 δόση. Κατά τη δειγματοληψία, ένα παιδί θεωρήθηκε ως επαρκώς εμβολιασμένο για την ηλικία του εάν είχε λάβει όλες τις συνιστώμενες δόσεις του PCV7 για την ηλικία έναρξης του εμβολιασμού του [248, 249]. Ένα παιδί που είχε λάβει λιγότερες από τις συνιστώμενες δόσεις του PCV7 θεωρήθηκε μερικώς εμβολιασμένο. Μία δόση του PCV7 εμβολίου προσμετρούταν εάν είχε γίνει τουλάχιστον 30 ημέρες πριν από την ημερομηνία της δειγματοληψίας.

## **2.3. Εργαστηριακές μέθοδοι**

Τα δείγματα του ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος ελήφθησαν μέσω της ρινικής χοάνης με τη χρήση αποστειρωμένου εύκαμπτου βαμβακοφόρου στυλεού που έχει ειδικό άκρο με ίνες αλγινικού ασβεστίου (Fisher Scientific, Pittsburgh, Philadelphia, USA). 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 πνευμονιόκοκου. Η μέγιστη καθυστέρηση μεταξύ της συλλογής και της καλλιέργειας ήταν 7 ώρες. Οι βαμβακοφόροι στυλεοί τοποθετούνταν σε τριβλύα με Columbia agar εμπλουτισμένο με 5% αίμα αλόγου από το οποίο είχε αφαιρεθεί το ινωδογόνο, 10μg θειικής κολιστίνης, και 15μg 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 οπτοχίνη και τη διαλυτότητα των αποικιών στα χολικά άλατα.

Ο έλεγχος ευαισθησίας στους διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες που αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ομάδες αντιμικροβιακών παραγόντων γινόταν σε Mueller-Hinton άγαρ εμπλουτισμένο με 5% αίμα αλόγου από το οποίο είχε αφαιρεθεί το ινωδογόνο. Αρχικά τα στελέχη του πνευμονιόκοκου ελέγχονταν για αντοχή στην πενικιλίνη με τη χρήση δίσκων 1 μg οξακιλλίνης. Αν η ζώνη αναστολής γύρω από τον δίσκο της οξακιλλίνης ήταν <20mm, γινόταν προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) στην πενικιλίνη με τη μέθοδο του E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden). Επίσης, τα στελέχη του πνευμονιόκοκου ελέγχονταν για ευαισθησία στην ερυθρομυκίνη και την κλινδαμυκίνη και με τη μέθοδο της διάχυσης των δίσκων σε άγαρ και με τη μέθοδο του E-test. Η ευαισθησία στη χλωραμφενικόλη, τετρακυκλίνη, και τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (TMP-SMZ) καθοριζόταν με τη μέθοδο της διάχυσης των δίσκων σε άγαρ. Για τις δοκιμασίες ευαισθησίας, τα τρυβλία με τους δίσκους των αντιμικροβιακών και τις ταινίες των E-test επωάζονταν σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>. Τα κριτήρια ευαισθησίας που καθορίστηκαν το 2008 από την Εθνική Επιτροπή για τις Σταθερές των

Κλινικών Εργαστηρίων (CLSI) [250] χρησιμοποιήθηκαν για να ταξινομηθούν οι μικροοργανισμοί ως ευαίσθητοι, ενδιάμεσης αντοχής και πλήρως ανθεκτικοί στην πενικιλίνη, κεφοταξίμη, ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη, χλωραμφενικόλη, τετρακυκλίνη, και τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη. Οι τιμές των MIC ερμηνεύτηκαν ως ακολούθως (Πίνακας 1). Για την πενικιλίνη (από του στόματος χορήγηση πενικιλίνης V) στελέχη με MIC  $\leq 0.06$   $\mu\text{g/ml}$  θεωρούνταν ευαίσθητα, αυτά με MIC 0.12-1  $\mu\text{g/ml}$ , ενδιάμεσης αντοχής, και αυτά με MIC  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  πλήρως ανθεκτικά, για την πενικιλίνη (παρεντερική χορήγηση, μηνιγγίτιδα) στελέχη με MIC  $\leq 0.06$   $\mu\text{g/ml}$  θεωρούνταν ευαίσθητα και με MIC  $\geq 0.12$   $\mu\text{g/ml}$  ανθεκτικά, για την πενικιλίνη (παρεντερική χορήγηση, εκτός από μηνιγγίτιδα) στελέχη με MIC  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  θεωρούνταν ευαίσθητα, με MIC 4  $\mu\text{g/ml}$  ενδιάμεσης αντοχής, και με MIC  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$  πλήρως ανθεκτικά. Για την πενικιλίνη χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια που καθορίστηκαν για την από του στόματος χορήγηση πενικιλίνης V. Για την κεφοταξίμη (μηνιγγίτιδα) στελέχη με MIC  $\leq 0.5$   $\mu\text{g/ml}$  θεωρούνταν ευαίσθητα, αυτά με MIC 1  $\mu\text{g/ml}$  ενδιάμεσης αντοχής, και αυτά με MIC  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  πλήρως ανθεκτικά, για την κεφοταξίμη (εκτός από μηνιγγίτιδα) στελέχη με MIC  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$  θεωρούνταν ευαίσθητα, με MIC 2  $\mu\text{g/ml}$  ενδιάμεσης αντοχής, και με MIC  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$  ανθεκτικά. Για την ερυθρομυκίνη, στελέχη με MIC  $\leq 0.25$   $\mu\text{g/ml}$  θεωρούνταν ευαίσθητα, αυτά με MIC 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , ενδιάμεσα ανθεκτικά, και με MIC  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$ , πλήρως ανθεκτικά. Όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος του E-test και τα τρυβλία με τις ταινίες των E-test της ερυθρομυκίνης επωάζονται σε CO<sub>2</sub>, και συγκεκριμένα όταν τρυβλία με Mueller-Hinton άγαρ εμπλουτίζονται με αίμα προβάτου αντί για αίμα αλόγου, ο κατασκευαστής προτείνει τα όρια να προσαρμοστούν σε μία αραιώση υψηλότερα (π.χ. MIC  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$ , πλήρως ανθεκτικά). Και τα έξι στελέχη που

βρέθηκαν να έχουν MIC στην ερυθρομυκίνη 1 µg/ml στο εργαστήριό μας, ελέγχθηκαν επίσης και με την τεχνική της διάχυσης στο άγαρ στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Στρεπτόκοκκων στο Άαχεν στη Γερμανία (National Reference Center for Streptococci, Aachen, Germany) και επιβεβαιώθηκαν ως ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη με τα κριτήρια του CLSI. Ως πολλαπλή αντοχή στα αντιμικροβιακά ορίστηκε η αντοχή σε  $\geq 3$  ομάδες αντιμικροβιακών παραγόντων.

Τα ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη ελέγχονταν για την παρουσία επαγόμενης αντοχής στην κλινδαμυκίνη [251] με τη μέθοδο της διάχυσης των δύο δίσκων, χρησιμοποιώντας δίσκους ερυθρομυκίνης και κλινδαμυκίνης (BBL, Cockeysville, MD). Συγκεκριμένα, δίσκοι 15µg ερυθρομυκίνης και 2µg κλινδαμυκίνης τοποθετήθηκαν σε απόσταση 16mm. Επαγόμενη αντοχή εμφανίζονταν όταν υπήρχε σαφής ελάττωση της ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο της κλινδαμυκίνης στην πλευρά η οποία ήταν απέναντι από το δίσκο της ερυθρομυκίνης [52].

**Πίνακας 1.** Κριτήρια ευαισθησίας του πνευμονιόκοκκου στην πενικιλίνη, την κεφοταξίμη και την ερυθρομυκίνη ανάλογα και με την εστία της λοίμωξης

	Ευαίσθητα	Ενδιάμεση αντοχή	Πλήρης αντοχή
Από το στόμα (πενικιλίνη V)	$\leq 0.06$	0.12 – 1	$\geq 2$
Παρεντερική πενικιλίνη			
Λοιμώξεις εκτός μηνιγγίτιδας	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Μηνιγγίτιδα	$\leq 0.06$	-	$\geq 0.12$
Κεφοταξίμη			
Λοιμώξεις εκτός μηνιγγίτιδας	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Μηνιγγίτιδα	$\leq 0.5$	1	$\geq 2$
Ερυθρομυκίνη	$\leq 0.25$	0.5	$\geq 1$

Τα δεδομένα είναι οι τιμές για τις ελάχιστες ανασταλτικές πυκνότητες (µg/mL).

Δεδομένα από το Ινστιτούτο για τις Σταθερές των Κλινικών Εργαστηρίων (2008).

## **2.4. Οροτυπία με τη μέθοδο εξοίδησης του ελύτρου**

Ο καθορισμός των ορότυπων των πνευμονιόκοκκων έγινε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παιδιατρικών Λοιμώξεων της Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας με τη συγκολλητινοαντίδραση Latex χρησιμοποιώντας δεξαμενή αντιορών (Pneumotest-Latex), ενώ ο περαιτέρω καθορισμός του ορότυπου 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 πνευμονιόκοκκου που ανήκουν στους ορότυπους που περιλαμβάνονται στο PCV7 ταξινομήθηκαν ως ορότυποι του PCV7. Όλοι οι άλλοι ορότυποι, περιλαμβάνοντας τους μη τυποποιήσιμους πνευμονιόκοκκους, ταξινομήθηκαν ως ορότυποι που δεν έχουν σχέση με το PCV7. Τα παιδιά από τα οποία απομονώθηκαν πολλαπλοί ορότυποι ταξινομήθηκαν ως φορείς ορότυπου του PCV7, εάν το ένα τουλάχιστον στέλεχος ανήκε σε ορότυπο του PCV7. Για τους φορείς από τους οποίους απομονώθηκαν πολλαπλά στελέχη, τα δεδομένα για το στέλεχος με την υψηλότερη MIC χρησιμοποιήθηκαν στην καταγραφή της αντοχής στην πενικιλίνη και την ερυθρομυκίνη.

## **2.5. Στατιστική ανάλυση**

Για να εκτιμηθούν οι 3 ομάδες των παιδιών που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς και καταχωρήθηκαν στη μελέτη επιτήρησης 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. Ο ακριβής έλεγχος Fisher διπλής ουράς (two-sided Fisher's exact test) και το κριτήριο  $\chi^2$  - trend χρησιμοποιήθηκαν για τις στατιστικές συγκρίσεις των κατηγορικών παραμέτρων όταν αυτό ήταν απαραίτητο. Οι συσχετίσεις εκφράστηκαν μέσω του λόγου αναλογιών (OR). Η φορεία του πνευμονιόκοκκου, διαχωρισμένη με βάση την ευαισθησία στην ερυθρομυκίνη και την πενικιλίνη, αποτέλεσε το καταληκτικό σημείο της μελέτης. Ο αποικισμός εκτιμήθηκε με βάση την εμβολιαστική κατάσταση και τη θεραπεία με αντιμικροβιακά. Δύο τύποι του λόγου αναλογιών (ORs) εκτιμήθηκαν ανάλογα με το αν τα παιδιά ήταν αποικισμένα με ανθεκτικό στην ερυθρομυκίνη ή στην πενικιλίνη ( $OR_{res}$ ) ή με ευαίσθητο στην ερυθρομυκίνη ή στην πενικιλίνη ( $OR_{sus}$ ) πνευμονιόκοκκο, όπως έχει περιγραφθεί [164]. Το  $OR_{res}$  και το  $OR_{sus}$  υπολογίστηκαν με παρονομαστή το σύνολο του πληθυσμού που μελετήθηκε. Η χρήση αυτού του παρονομαστή οφείλεται επίσης και στο ζήτημα ότι ο εκτεταμένος εμβολιασμός με το PCV7 μπορεί να επηρεάσει το ποσοστό φορείας, την κατανομή των ορότυπων, και, επακόλουθα, την αντοχή στα αντιμικροβιακά σε έναν πληθυσμό. Επιπλέον, το «υποθετικό OR» ('conditional OR',  $OR_C$ ) υπολογίστηκε ως η πιθανότητα της έκθεσης των φορέων ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη ή πενικιλίνη πνευμονιόκοκκων στην αντιμικροβιακή αγωγή προς την πιθανότητα της έκθεσης των φορέων ευαίσθητων στην ερυθρομυκίνη ή πενικιλίνη αντίστοιχα πνευμονιόκοκκων στην αντιμικροβιακή αγωγή [252]. Όταν το  $OR_C$  για έναν αντιμικροβιακό παράγοντα είναι μεγαλύτερο του ένα, αυτό σημαίνει ότι, δεδομένης της κατάστασης πνευμονιοκοκκικής φορείας, το στέλεχος είναι πιο πιθανό να είναι ανθεκτικό εάν το άτομο εκτεθεί στον αντιμικροβιακό

παράγοντα. Οι συσχετίσεις μεταξύ του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη ή στην πενικιλίνη (ή ευαίσθητα στην ερυθρομυκίνη ή στην πενικιλίνη) στελέχη και της ηλικίας (στις ηλικιακές ομάδες  $\leq 23$  μηνών, 24-47 μηνών, και  $\geq 48$  μηνών), του εμβολιασμού με το PCV7, και της αντιμικροβιακής αγωγής ελέγχθηκαν με μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης. Παρουσιάζονται τα προσαρμοσμένα ORs.

Σε μια ξεχωριστή ανάλυση, ο πληθυσμός κάθε παιδικού σταθμού θεωρήθηκε ως σύνολο αντιπροσωπεύοντας μια ανεξάρτητη επιδημιολογική μονάδα. Ένα αποτέλεσμα θεωρούνταν στατιστικά σημαντικό όταν  $P < 0.05$ . Η στατιστική ανάλυση έγινε με το SPSS έκδοση 13.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **3.1. 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  $\pm$  σταθερή απόκλιση:  $46,6 \pm 11,8$  μήνες) (Πίνακας 2). Δεν υπήρχε κανένα παιδί με ηλικία μικρότερη των 13 μηνών που να παρακολουθεί κάποιον από τους παιδικούς σταθμούς που συμμετείχαν στην μελέτη.

Μεταξύ των παιδιών που μελετήθηκαν, το ποσοστό των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους παιδιών αυξήθηκε από 12% (92 από τα 769) το 2005, σε 30% (150 από τα 494) το 2006 και 62% (351 από τα 566) το

2007. Πεντακόσια ενενήντα τρία παιδιά ήταν επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους. Το 98% από τους λήπτες του PCV7 είχε εμβολιαστεί στο πλαίσιο προγράμματος αναπλήρωσης (catch-up). Συγκεκριμένα, 77 (13%) από αυτά τα 593 παιδιά είχαν λάβει 2 δόσεις μετά τα πρώτα τους γενέθλια και 504 (85%) είχαν λάβει μία μόνο δόση σε ηλικία  $\geq 24$  μηνών. Τελικά, 11 (1.8%) είχαν λάβει 2 δόσεις σε ηλικία 7-11 μηνών και μία αναμνηστική δόση μετά τα πρώτα τους γενέθλια, ενώ 1 παιδί (0.2%) είχε λάβει 3 δόσεις σε ηλικία 2-6 μηνών και μία αναμνηστική δόση σε ηλικία 12 μηνών. Εξήντα τέσσερα παιδιά ήταν μερικώς εμβολιασμένα.

Από τα 1829 παιδιά τα οποία καταχωρήθηκαν στη μελέτη, 862 (47.1%) (95% CI: 44.8%-49.4%) ήταν αποικισμένα με πνευμονιόκοκκο. Ένα στέλεχος πνευμονιόκοκκου απομονώθηκε από κάθε φορέα, με εξαίρεση 38 φορείς (4.4%), από τους οποίους απομονώθηκαν 2 διαφορετικά στελέχη. Αντοχή στην πενικιλίνη βρέθηκε σε 282 (31.3%) από τα 900 συνολικά στελέχη πνευμονιόκοκκου. Από τα 282 στελέχη, τα 73 (25.9%) είχαν πλήρη αντοχή στην πενικιλίνη με MIC  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$ . Οι 282 ανθεκτικοί στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκοι απομονώθηκαν από 275 παιδιά. Επτά φορείς ήταν αποικισμένοι από 2 διαφορετικά στελέχη ανθεκτικά στην πενικιλίνη. Αντοχή στην ερυθρομυκίνη βρέθηκε σε 277 (30.8%) από τα 900 συνολικά στελέχη πνευμονιόκοκκου (MICs 1 έως  $>128$   $\mu\text{g/ml}$ ). MIC στην ερυθρομυκίνη  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  παρατηρήθηκε σε 271 (97.8%) από τα 277 στελέχη. Οι 277 ανθεκτικοί στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκοι απομονώθηκαν από 272 παιδιά. Πέντε φορείς ήταν αποικισμένοι από 2 διαφορετικά στελέχη ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη.

### 3.2. Σχήματα εμβολιασμού με το PCV7

Η χρήση του PCV7 αυξήθηκε από 23.8% το 2005 σε 31.8% το 2006 και 53.8% το 2007 μεταξύ των παιδιών ηλικίας 13-23 μηνών, από 14.9% σε 43.5% και 75.8% μεταξύ των παιδιών ηλικίας 24-35 μηνών, από 14.7% σε 38.9% και 72.1% μεταξύ των παιδιών ηλικίας 36-47 μηνών, και από 10.6% σε 23.9% και 68.2% μεταξύ των παιδιών ηλικίας  $\geq 48$  μηνών.

Από το 2005 προς το 2007, η έναρξη του εμβολιασμού γίνονταν σε μικρότερη ηλικία. Στις δύο πρώτες επιτηρήσεις, το PCV7 χορηγούνταν στα παιδιά κυρίως ως δόση αναπλήρωσης (catch-up) μετά τα δεύτερα γενέθλιά τους (Πίνακας 2). Μετά την κάλυψη του PCV7 από τα ασφαλιστικά ταμεία τον Ιούνιο του 2006 και ανάλογα με την ηλικία του παιδιού εκείνη τη χρονική περίοδο, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της έναρξης του εμβολιασμού κατά τη διάρκεια του δεύτερου εξαμήνου ζωής ή του δεύτερου έτους ζωής.

**Πίνακας 2.** Χαρακτηριστικά των παιδιών κατά τη δειγματοληψία (N = 1829)

Χαρακτηριστικά	Έτος μελέτης			P
	2005	2006	2007	
Χρονική περίοδος δειγματοληψίας	28 Φεβρουαρίου έως 7 Ιουνίου	2 Φεβρουαρίου έως 13 Απριλίου	26 Φεβρουαρίου έως 17 Μαΐου	—
PCV7 στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμού	—	+	+	—
PCV7 καλύπτεται από ασφαλιστικά ταμεία	—	—	+	—
Αριθμός παιδιών	769	494	566	—
Ηλικία, μήνες				—
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*
13 – 23 μηνών	21 (2.7)	22 (4.5)	26 (4.6)	0.07
24 – 47 μηνών	352 (45.8)	254 (51.4)	282 (49.8)	0.11
≥ 48 μηνών	396 (51.5)	218 (44.1)	258 (45.6)	0.02
Αγόρια	417 (54.2)	248 (50.2)	297 (52.5)	0.76
Εμβολιασμένα με ≥1 δόση του PCV7	99 (12.9)	161 (32.6)	397 (70.1)	<0.001
Επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους	92 (12)	150 (30.4)	351 (62)	<0.001
Μερικώς εμβολιασμένα	7 (0.9)	11 (2.2)	46 (8.1)	<0.001
Ηλικία έναρξης του εμβολιασμού, μήνες				
2-6 μηνών	0	1 (0.2)	4 (0.7)	0.016
7-11 μηνών	0	3 (0.6)	21 (3.7)	<0.001
12-23 μηνών	8 (1)	16 (3.2)	100 (17.7)	<0.001
≥24 μηνών	91 (11.8)	141 (28.5)	272 (48.1)	<0.001
Χρήση αντιμικροβιακών τους προηγούμενους 3 μήνες	433/764 (56.7)	260/489 (53.2)	284/566 (50.2)	0.06
Φορεία πνευμονιόκοκκου	370 (48.1)	206 (41.7)	286 (50.5)	0.81

Ο αριθμός στην παρένθεση είναι ποσοστό, εκτός αν υποδεικνύεται διαφορετικά.

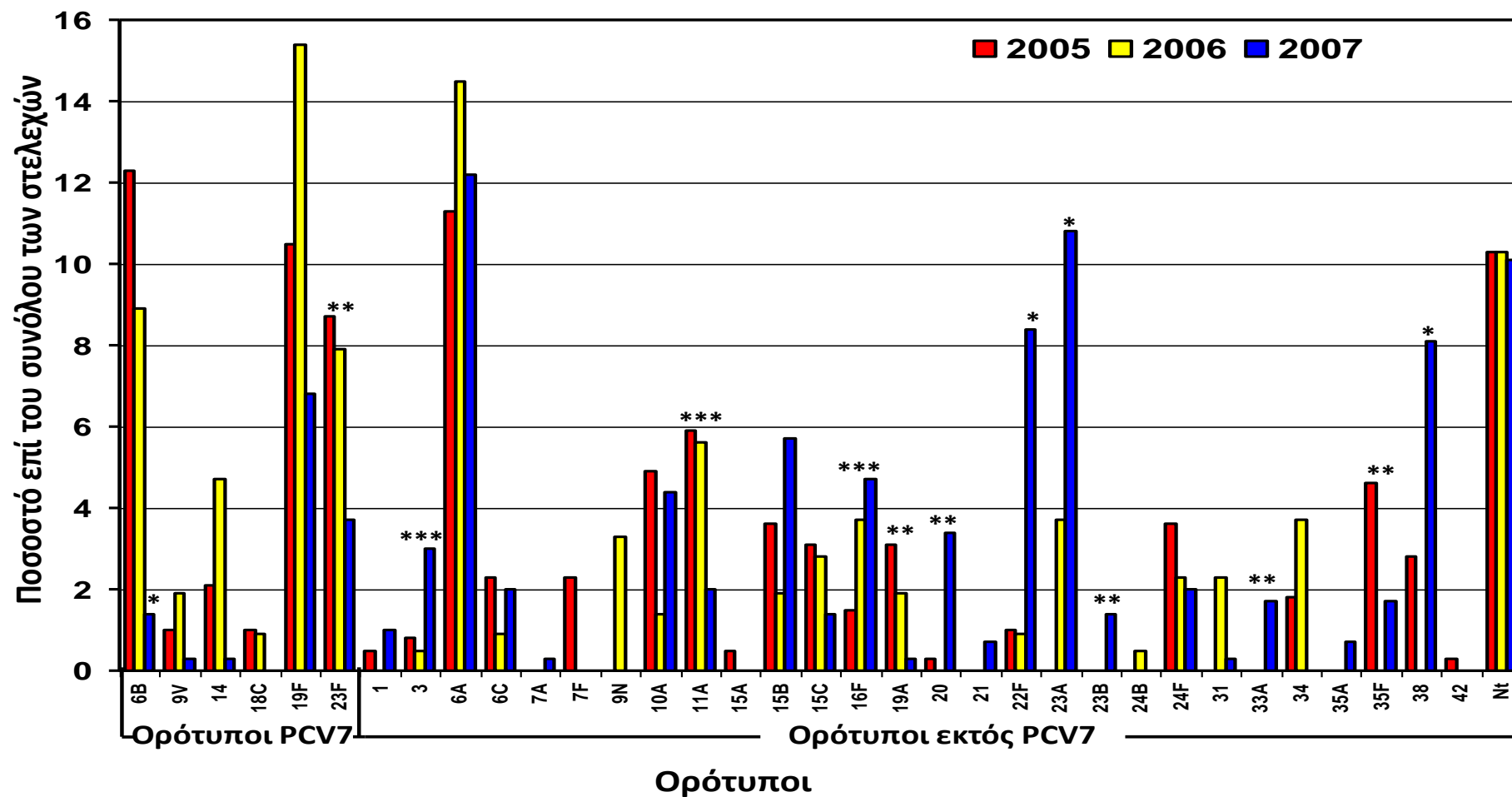
\*2005 vs 2006,  $P < 0.001$ ; 2005 vs 2007,  $P < 0.001$ ; και 2006 vs 2007,  $P = 0.999$ .

### 3.3. Φορεία ορότυπων του PCV7 και εμφάνιση ορότυπων που δεν ανήκουν στο PCV7

Το ποσοστό των στελεχών πνευμονιόκοκκου που ανήκουν στους ορότυπους του εμβολίου ελαττώθηκε από 35.6% το 2005 και 39.7% το 2006 σε 12.5% το 2007 ( $\chi^2$  for trend,  $P<0.001$ ) (Σχήμα 1).

Παράλληλα με την αύξηση του αριθμού των παιδιών που ήταν εμβολιασμένα με το PCV7, παρατηρήθηκε από το 2005 έως το 2007 μια αύξηση των ορότυπων που δεν ανήκουν στο PCV7 ( $P<0.001$ ) (Σχήμα 1). Σημαντική αύξηση κατά τη διάρκεια των 3 περιόδων δειγματοληψίας παρατηρήθηκε για τους ορότυπους 22F (από 1% σε 0.9% και 8.4%,  $P<0.001$ ), 23A (από 0% σε 3.7% και 10.8%,  $P<0.001$ ), 38 (από 2.8% σε 0% και 8.1%,  $P<0.001$ ), 20 (από 0.3% το 2005 και 0% το 2006 σε 3.4% το 2007,  $P=0.0004$ ), 23B (από 0% το 2005 και το 2006 σε 1.4% το 2007,  $P=0.01$ ), 33A (από 0% το 2005 και το 2006 σε 1.7% το 2007,  $P=0.004$ ) και 16F (από 1.5% σε 3.7% και 4.7%,  $P=0.016$ ).

Παρόλο που οι ορότυποι που δεν ανήκουν στο PCV7 αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά στο σύνολό τους, η ανάλυση κάθε ορότυπου ξεχωριστά έδειξε διαφορετική δυναμική κατά τη διάρκεια των 3 περιόδων δειγματοληψίας. Συνολικά, αναγνωρίστηκαν 28 ορότυποι που δεν ανήκουν στο PCV7. Δεκαεννιά (67.9%) από αυτούς τους ορότυπους απομονώθηκαν σε τουλάχιστον 2 ετήσιες μελέτες επιτήρησης.



**Σχήμα 1.** Κατανομή των ορότυπων ανάλογα με το έτος απομόνωσης.  $\chi^2$  for trend, \* $P < 0.001$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.05$ .

### **3.4. Μη τυποποιήσιμοι πνευμονιόκοκκοι**

Ενενήντα δύο (10.2%) από τα 900 συνολικά στελέχη πνευμονιόκοκκου ήταν μη τυποποιήσιμα. Είκοσι τρία (25%) από τα 92 μη τυποποιήσιμα στελέχη απομονώθηκαν από παιδιά που ήταν αποικισμένα με δύο διαφορετικά στελέχη. Η συχνότητα των μη τυποποιήσιμων πνευμονιόκοκκων κατά τη διάρκεια των 3 περιόδων δειγματοληψίας ήταν 10.3%, 10.3%, και 10.1% αντίστοιχα ( $\chi^2$  for trend,  $P=0.96$ ).

### **3.5. Ορότυποι των ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκων**

Τα 282 στελέχη πνευμονιόκοκκου με αντοχή στην πενικιλίνη ανήκαν στους ορότυπους 19F (30.5%), 6A (17%), 23F (11.7%), 19A (6%), 14 (3.5%), 15B (3.2%), 9V (2.8%), 23B (1.4%) και 35F (0.4%) ή ήταν μη τυποποιήσιμα (23.4%). Μεταξύ των 282 ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκων, 0%, και 23% των στελεχών είχαν ορότυπους που ανήκουν στα νέα 10- και 13-δύναμα συζευγμένα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, αυτοί ανήκαν στους ορότυπους 6A ( $n=48$ ) και 19A ( $n=17$ ).

### **3.6. Φαινότυποι αντοχής και ορότυποι των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκων**

Διακόσια εξήντα ένα (94.2%) από τα 277 ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη ήταν επίσης ανθεκτικά σε έναν ή περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες, συνιστώντας 15 διαφορετικά σχήματα αντοχής. Από αυτά τα 277 στελέχη, 85.2% ήταν ανθεκτικά (περιλαμβάνοντας την ενδιάμεση και την πλήρη αντοχή) στην πενικιλίνη, 76.2% στην TMP-SMZ, 64.34% στην τετρακυκλίνη, 64.3% στην κλινδαμυκίνη, και 14.4% στη χλωραμφενικόλη.



Διακόσια δεκαοκτώ (78.7%) από τα 277 στελέχη είχαν πολλαπλή αντοχή στα αντιμικροβιακά.

Τα 277 ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου ανήκαν στους ορότυπους 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%) ή ήταν μη τυποποιήσιμα (26.4%). Μεταξύ των 277 ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκων, 0%, και 18.8% των στελεχών είχαν οροτύπους που ανήκουν στα νέα 10- και 13-δύναμα συζευγμένα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, αυτοί ανήκαν στους ορότυπους 6A (n=50) και 19A (n=2).

### **3.7. Φορεία ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκων και εμβολιασμός με το PCV7**

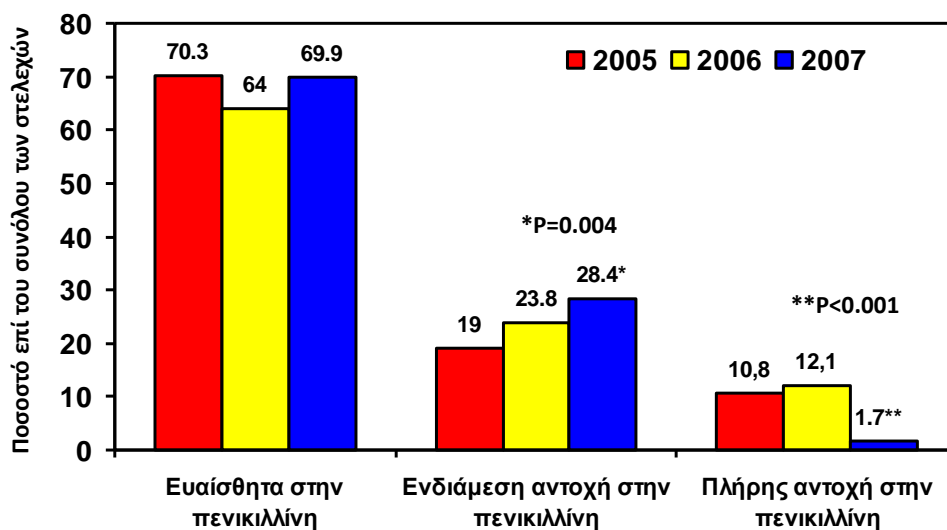
Κατά τη διάρκεια των 3 περιόδων επιτήρησης, το ποσοστό των στελεχών με ελαττωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη (κριτήρια για την από του στόματος χορήγηση πενικιλίνης V) δεν μεταβλήθηκε σημαντικά. Συγκεκριμένα, η συχνότητά τους ήταν 29.7% (116 από τα 390) το 2005, 36% (77 από τα 214) το 2006, και 30.1% (89 από τα 296) το 2007 ( $P=0.839$ ). Ωστόσο, στην ομάδα των στελεχών πνευμονιόκοκκου που ταξινομήθηκαν ως μη ευαίσθητα στην πενικιλίνη παρατηρήθηκαν δύο ξεχωριστές σημαντικές μεταβολές. Συγκεκριμένα, η συχνότητα των στελεχών με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη αυξήθηκε σημαντικά, αλλά την ίδια στιγμή το ποσοστό των στελεχών με υψηλού βαθμού αντοχή στην πενικιλίνη ελαττώθηκε.

Από το 2005 έως το 2007, το ποσοστό των πνευμονιόκοκκων με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη (κριτήρια για την από του στόματος

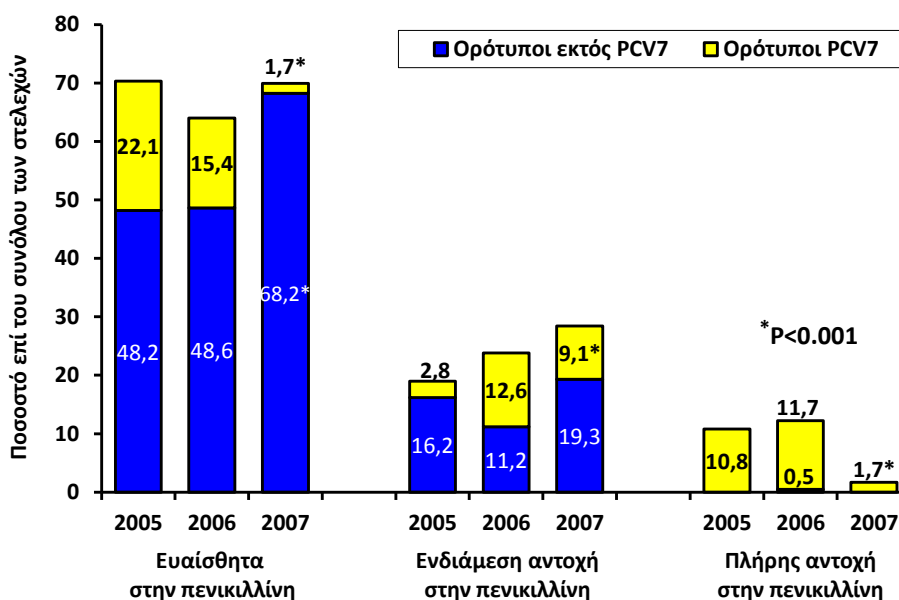
χορήγηση πενικιλλίνης V) αυξήθηκε από 19% σε 23.8% και 28.4% ( $\chi^2$  for trend,  $P=0.004$ ) (Σχήμα 2). Αντίθετα, η συχνότητα των ανθεκτικών στην πενικιλλίνη πνευμονιόκοκκων ελαττώθηκε από 10.8% και 12.1% σε 1.7% κατά τη διάρκεια των περιόδων δειγματοληψίας ( $\chi^2$  for trend,  $P<0.001$ ) (Σχήμα 2). Αυτή η ελάττωση οφείλεται συγκεκριμένα στην ελάττωση των στελεχών που ανήκουν στους ορότυπους του PCV7 (Σχήμα 3). Στην μελέτη επιτήρησης του 2007, υψηλού βαθμού αντοχή στην πενικιλλίνη ( $MIC \geq 2\mu g/ml$ ) παρατηρήθηκε σε 5 στελέχη, από τα οποία 4 (80%) ανήκαν στον ορότυπο 19F και 1 στον ορότυπο 23F.

Στην ομάδα των επαρκώς για την ηλικία τους εμβολιασμένων παιδιών, η συχνότητα των ανθεκτικών στην πενικιλλίνη στελεχών ήταν 23.9% το 2005, 30.8% το 2006 και 26.4% το 2007 ( $\chi^2$  for trend,  $P=0.941$ ). Παρατηρήθηκε όμως στατιστικά σημαντική ελάττωση του αποικισμού με στελέχη με πλήρη αντοχή στην πενικιλλίνη από 10.9% το 2005 σε 7.7% το 2006 και 0.6% το 2007 ( $P=0.0003$ ) (Σχήμα 4). Στην ίδια ομάδα η συχνότητα των ανθεκτικών στην πενικιλλίνη στελεχών που ανήκαν στους οροτύπους του PCV7 ήταν 15.2% το 2005, 21.5% το 2006 και 8% το 2007 ( $P=0.037$ ). Η ελάττωση των στελεχών με πλήρη αντοχή στην πενικιλλίνη μεταξύ των επαρκώς για την ηλικία τους εμβολιασμένων παιδιών οφείλεται κυρίως στην ελάττωση των στελεχών που ανήκουν στους ορότυπους του PCV7 (Σχήμα 5).

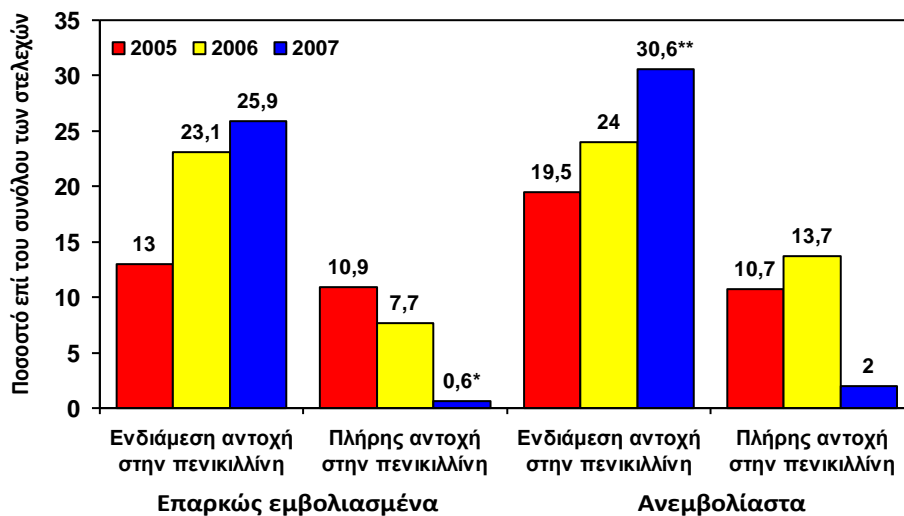
Στην ομάδα των ανεμβολίαστων παιδιών, η συχνότητα των ανθεκτικών στην πενικιλλίνη στελεχών ήταν 30.2% το 2005, 37.7% το 2006 και 32.7% το 2007 ( $P=0.356$ ). Παρατηρήθηκε όμως αύξηση του αποικισμού με στελέχη με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλλίνη από 19.5% το 2005 σε 24% το 2006 και 30.6% το 2007 ( $P=0.02$ ) (Σχήμα 4).



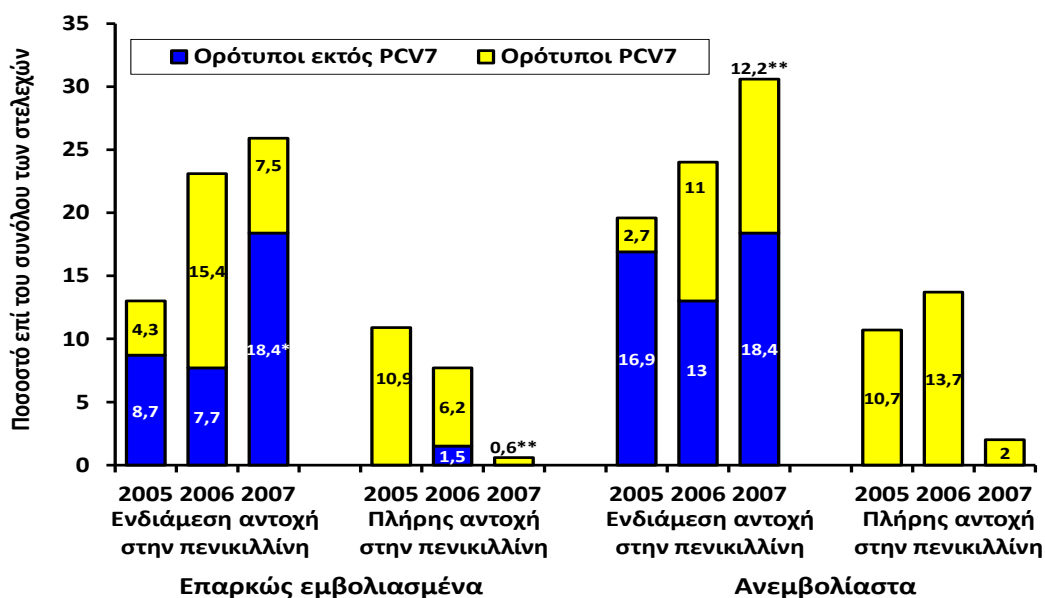
**Σχήμα 2.** Κατανομή των στελεχών πνευμονιόκοκκου ανάλογα με την ευαισθησία στην πενικιλίνη και το έτος της μελέτης.



**Σχήμα 3.** Κατανομή των ορότυπων των ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου ανάλογα με το έτος της μελέτης.



**Σχήμα 4.** Κατανομή των ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου ανάλογα με το έτος της μελέτης και την εμβολιαστική κάλυψη. \* $\chi^2$  for trend,  $P=0.0003$ ; \*\* $P=0.02$ .



**Σχήμα 5.** Κατανομή των ορότυπων των ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου ανάλογα με το έτος της μελέτης και την εμβολιαστική κάλυψη. \* $\chi^2$  for trend,  $P=0.03$ ; \*\* $P<0.001$ .

### 3.8. Φορεία ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκων και εμβολιασμός με το PCV7

Κατά τη διάρκεια της μελέτης δεν παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση του ποσοστού των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου. Συγκεκριμένα, η συχνότητά τους ήταν 29.5% (115 από τα 390) το 2005, 34.6% (74 από τα 214) το 2006, και 29.7% (88 από τα 296) το 2007 ( $P=0.872$ ). Στο σχήμα 6 παρουσιάζεται η κατανομή των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών ανάλογα με το έτος της μελέτης και την εμβολιαστική κάλυψη και στο σχήμα 7 παρουσιάζεται η κατανομή των ορότυπων των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών ανάλογα με το έτος της μελέτης.

Παράλληλα, όμως, με την αύξηση του αριθμού των παιδιών που ήταν εμβολιασμένα με το PCV7, από τον πρώτο στον τρίτο χρόνο της μελέτης, παρατηρήθηκε μείωση της συχνότητας των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών μεταξύ των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους παιδιών. Στην ομάδα των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους παιδιών, το ποσοστό φορείας ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου ελαττώθηκε από 16.3% (2005) σε 13.3% (2006) και 13.1% (2007). Αυτή η μείωση του 19.6% στη συχνότητα των πνευμονιόκοκκων να εμφανίζουν αντοχή στην ερυθρομυκίνη δεν έφτασε σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα ( $\chi^2$  for trend,  $P=0.48$ ). Ωστόσο, υπήρχε σημαντική ελάττωση στη φορεία ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών που ανήκουν στους ορότυπους του PCV7 μεταξύ των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους παιδιών (Σχήμα 8). Κατά τη διάρκεια της μελέτης, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της αντοχής στην ερυθρομυκίνη μεταξύ των στελεχών

πνευμονιόκοκκου με ορότυπο 23F. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών με ορότυπο 23F αυξήθηκε από 20% (1 από τα 5 στελέχη) το 2005 σε 100% (3 από τα 3 στελέχη) το 2006 και σε 100% (4 από τα 4 στελέχη) το 2007 ( $P=0.009$ ).

Στην ομάδα των ανεμβολίαστων παιδιών, το ποσοστό των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών ήταν 14.5% το 2005, 15.3% το 2006, και 18.9% το 2007 ( $\chi^2$  for trend,  $P=0.19$ ). Κατά τη διάρκεια της μελέτης, η φορεία ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών που ανήκουν στους ορότυπους του PCV7 μεταξύ των ανεμβολίαστων παιδιών δεν ελαττώθηκε στατιστικά σημαντικά ( $P=0.59$ ). Από τον πρώτο στον τρίτο χρόνο της μελέτης, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της αντοχής στην ερυθρομυκίνη μεταξύ των στελεχών πνευμονιόκοκκου με ορότυπους 6A και 23F. Το ποσοστό των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών με ορότυπο 6A αυξήθηκε από 14.9% (7 από τα 47 στελέχη) το 2005 σε 42.3% (11 από τα 26 στελέχη) το 2006 και σε 61.5% (8 από τα 13 στελέχη) το 2007 ( $P=0.0003$ ), ενώ μεταξύ των στελεχών πνευμονιόκοκκου με ορότυπο 23F υπήρχε μια αύξηση από 31% (9 από τα 29 στελέχη) το 2005 σε 50% (7 από τα 14 στελέχη) το 2006 και σε 100% (5 από τα 5 στελέχη) το 2007 ( $P=0.005$ ).

Η κατανομή των ορότυπων των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών ανάλογα με το έτος της επιτήρησης μεταξύ των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους φορέων και των ανεμβολίαστων φορέων παρουσιάζεται στο Σχήμα 9. Στην ομάδα των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους φορέων, το ποσοστό των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου που ανήκουν στους ορότυπους του PCV7 ελαττώθηκε κατά 56.1% το 2007 σε σύγκριση με τη μελέτη επιτήρησης του

2005. Το 2006 και το 2007, το ποσοστό των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκων που ανήκουν στους ορότυπους του PCV7 ήταν χαμηλότερο μεταξύ των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους φορέων παρά μεταξύ των ανεμβολίαστων. Η σχετική διαφορά των συχνοτήτων των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών που ανήκαν στους ορότυπους του PCV7 μεταξύ των δύο ομάδων ήταν -10.4% το 2006 και -35.3% το 2007.

Μεταξύ των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους φορέων, το ποσοστό των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκων που ανήκαν στους ορότυπους του PCV7 ήταν 19.6% το 2005, 21.5% το 2006, και 8.6% το 2007 ( $P=0.01$ ), ενώ το ποσοστό των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών που δεν έχουν σχέση με το PCV7 ήταν 13% το 2005, 9.2% το 2006 και 17.8% το 2007 ( $P=0.21$ ) (Σχήμα 9).

Η φορέα του ορότυπου 19F μεταξύ των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους φορέων μειώθηκε κατά 56.2% το 2007 σε σύγκριση με τη μελέτη του 2005, αλλά η μείωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $P=0.11$ ) (Σχήμα 10). Είκοσι τρεις (95.8%) από τους 24 πνευμονιόκοκκους με ορότυπο 19F που απομονώθηκαν από τα επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους παιδιά που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς ήταν ανθεκτικοί στην ερυθρομυκίνη.

Στην ομάδα των ανεμβολίαστων φορέων, το ποσοστό των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών ήταν 29.6% το 2005, 36.3% το 2006, και 32.6% το 2007 ( $\chi^2$  for trend,  $P=0.33$ ) (Σχήμα 6). Μεταξύ των ανεμβολίαστων φορέων, το ποσοστό των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκων που ανήκουν στους ορότυπους του PCV7 ήταν 15.4% το 2005, 24% το 2006,

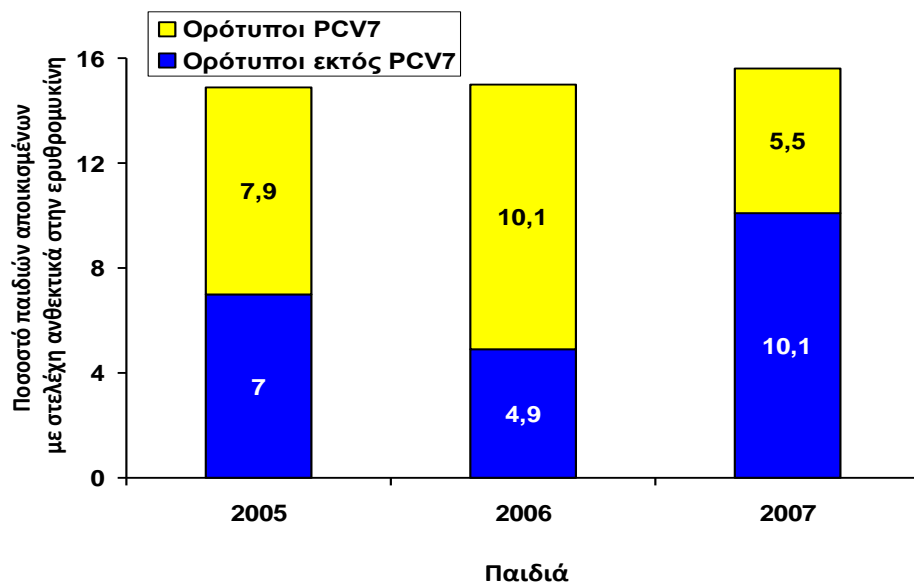
και 13.3% το 2007 ( $P=0.75$ ), και το ποσοστό των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών που δεν έχουν σχέση με το PCV7 ήταν 14.2% το 2005, 12.3% το 2006, και 19.4% το 2007 ( $P=0.35$ ) (Σχήμα 9).

Τον πρώτο και το δεύτερο χρόνο, ο μικρός αριθμός των μερικών εμβολιασμένων φορέων περιορίσε τη δυνατότητα στατιστικής ανάλυσης. Υπήρχαν 23 φορείς οι οποίοι ήταν μερικώς εμβολιασμένοι στη μελέτη του 2007. Δέκα (43.5%) από τους 23 φορείς ήταν αποικισμένοι με ανθεκτικούς στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκους. Αυτή η συχνότητα ήταν παρόμοια με αυτήν που παρατηρήθηκε μεταξύ των ανεμβολίαστων φορέων την ίδια περίοδο της μελέτης.

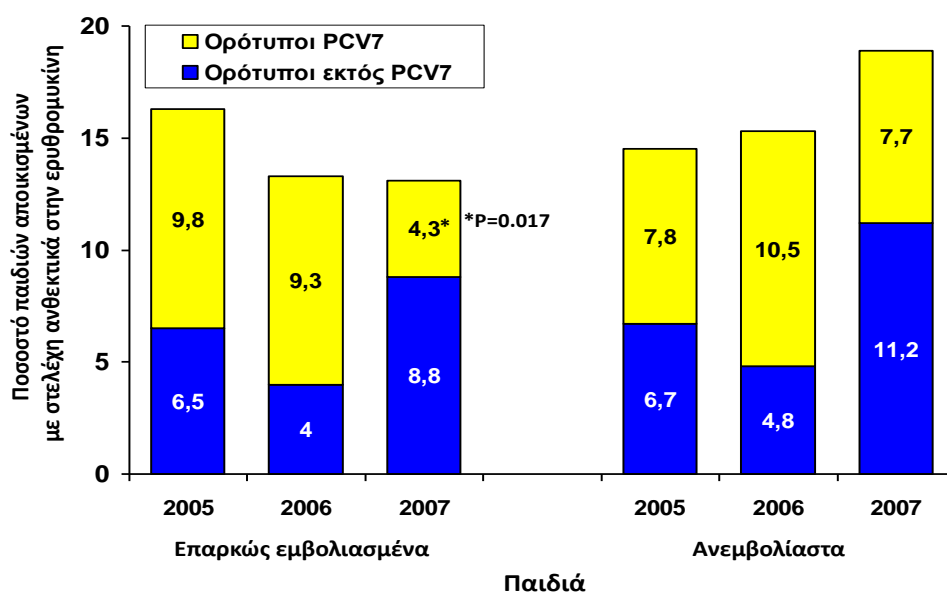


**Σχήμα 6.** Κατανομή των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου ανάλογα με το έτος της μελέτης και την εμβολιαστική κάλυψη.

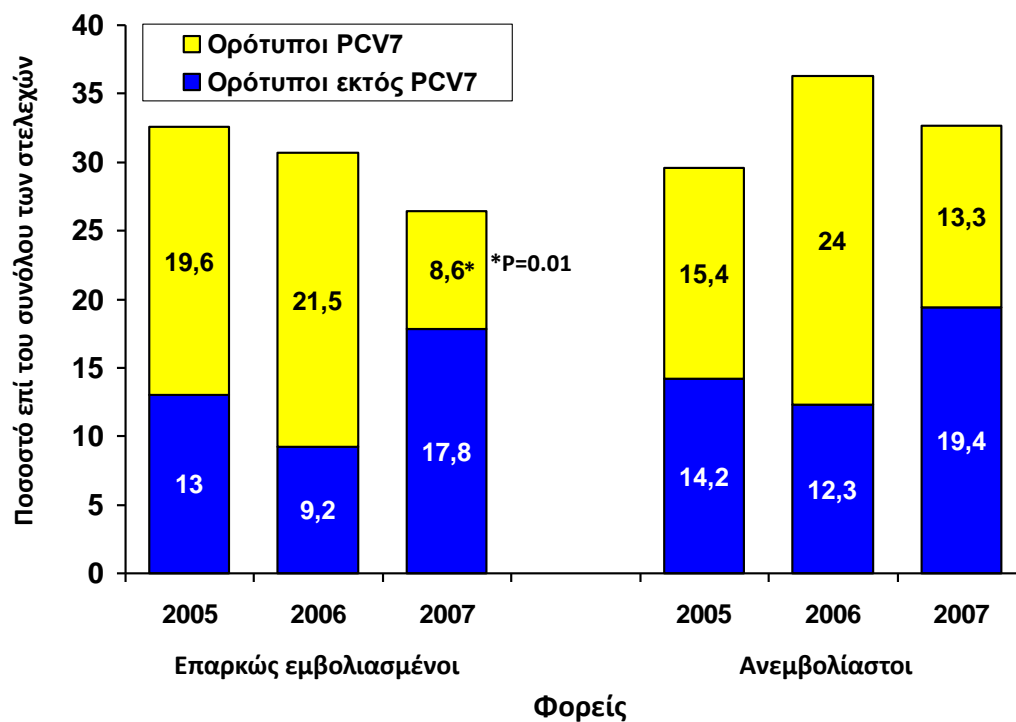




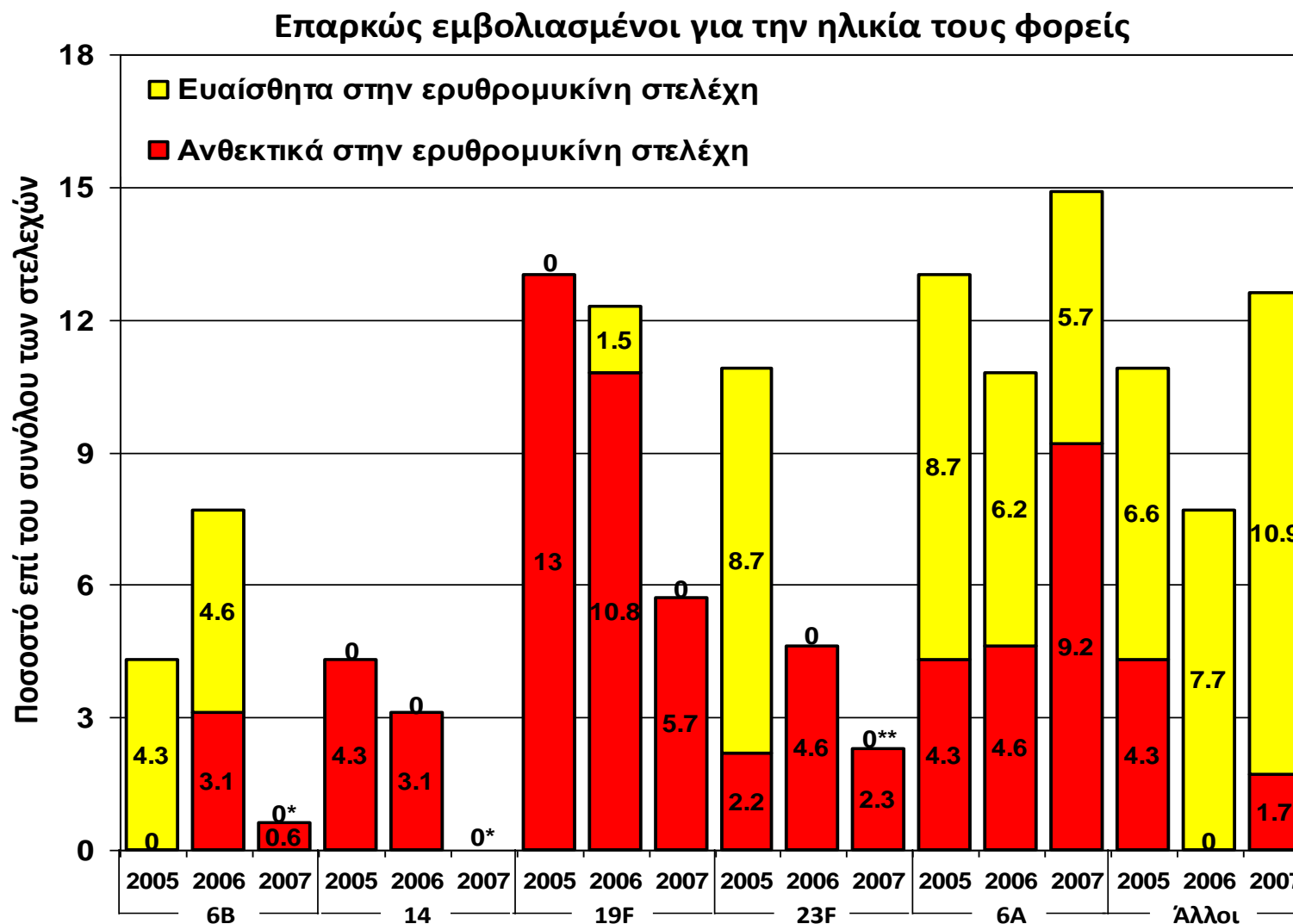
**Σχήμα 7.** Κατανομή των ορότυπων των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου ανάλογα με το έτος της μελέτης.



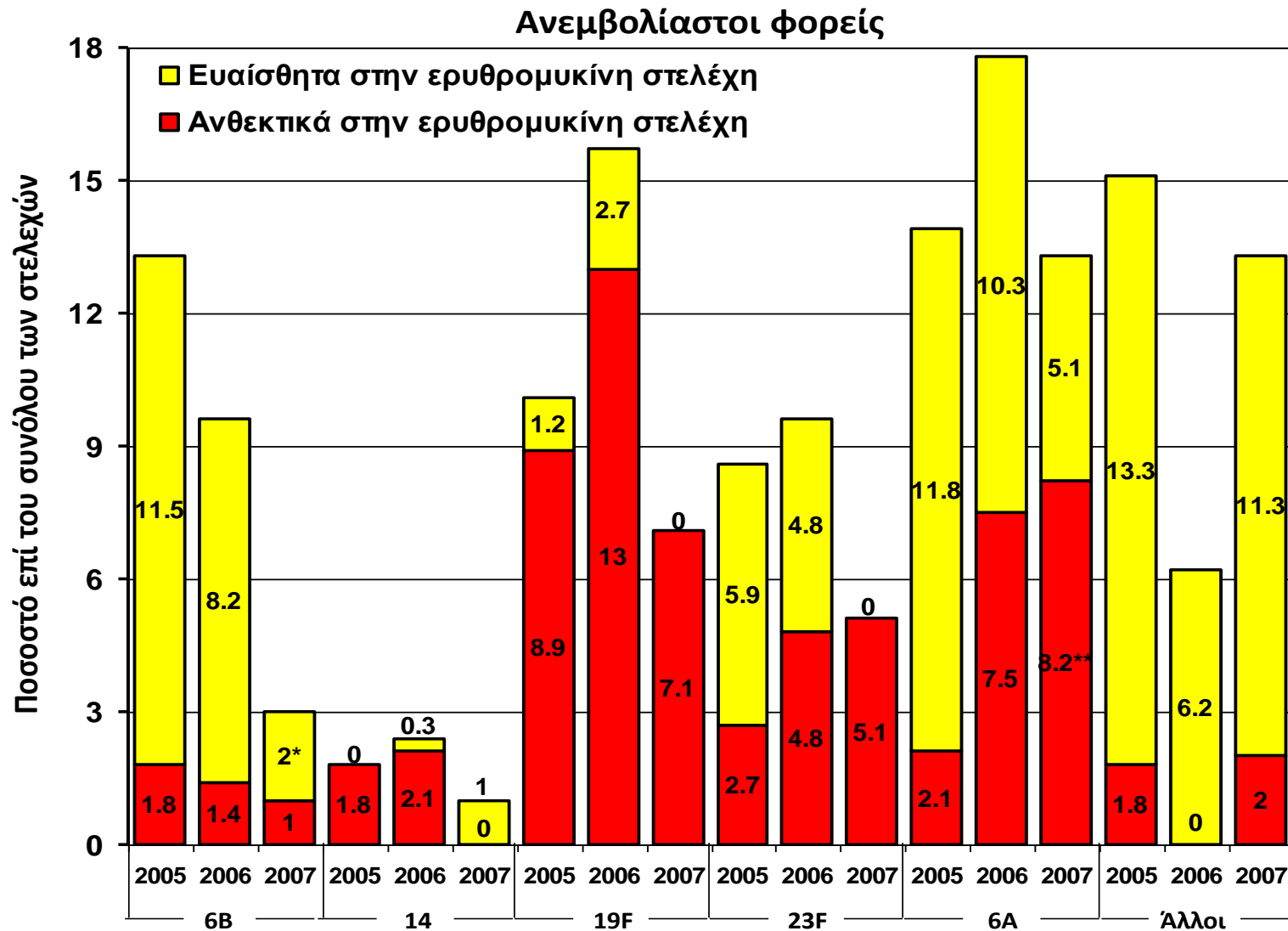
**Σχήμα 8.** Κατανομή των ορότυπων των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου ανάλογα με το έτος της μελέτης και την εμβολιαστική κάλυψη.



**Σχήμα 9.** Κατανομή των ορότυπων των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου ανάλογα με το έτος της μελέτης και την εμβολιαστική κάλυψη μεταξύ των αποικισμένων παιδιών.



**Σχήμα 10.** Επαρκώς εμβολιασμένοι για την ηλικία τους φορείς: οι 5 συχνότεροι ορότυποι των τυποποιήσιμων ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου ανάλογα με το έτος της μελέτης επιτήρησης. \* $\chi^2$  for trend,  $P=0.01$ ; \*\* $P=0.0001$ .



**Σχήμα 11.** Ανεμβολίαστοι φορείς: οι 5 συχνότεροι ορότυποι των τυποποιήσιμων ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου ανάλογα με το έτος της μελέτης επιτήρησης. \* $\chi^2$  for trend,  $P=0.004$ ; \*\* $P=0.0002$ .

### 3.9. Φορεία στελεχών πνευμονιόκοκκου με ταυτόχρονη αντοχή στην πενικιλίνη και την ερυθρομυκίνη

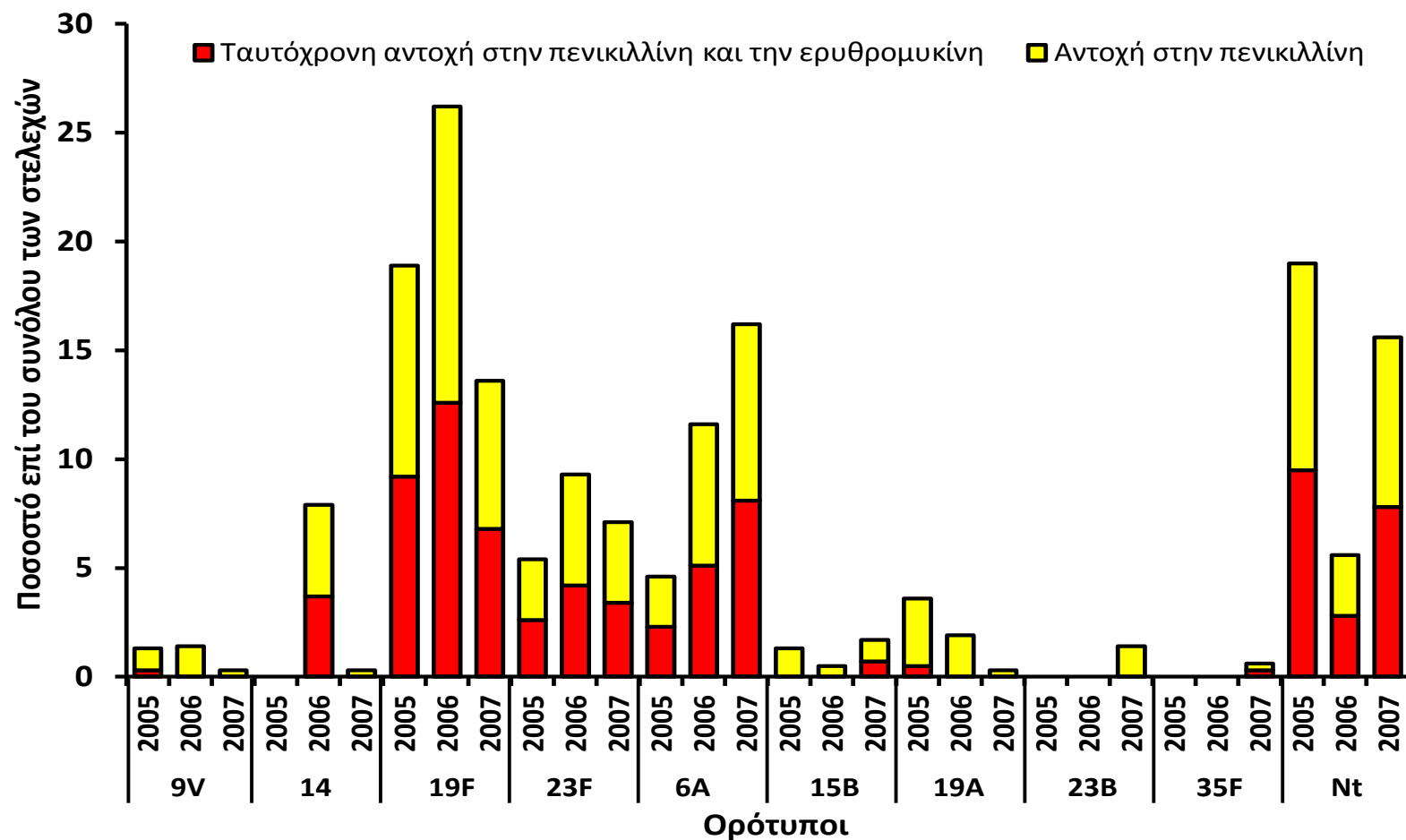
Ταυτόχρονη αντοχή στην πενικιλίνη και στην ερυθρομυκίνη παρατηρήθηκε σε 236 (26.2%) από τα 900 στελέχη πνευμονιόκοκκου. Από το 2005 έως το 2007, το ποσοστό των στελεχών πνευμονιόκοκκου με ταυτόχρονη αντοχή στην πενικιλίνη και στην ερυθρομυκίνη δεν μεταβλήθηκε σημαντικά (Πίνακας 3). Παρατηρήθηκε όμως στατιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ των στελεχών που δεν ανήκουν στους ορότυπους του PCV7 (εξαιρώντας τα μη τυποποιήσιμα στελέχη πνευμονιόκοκκου) ( $P=0.0003$ ), και συγκεκριμένα μεταξύ των πνευμονιόκοκκων με ορότυπο 6A ( $P=0.0005$ ). Όσον αφορά τη διασταυρούμενη αντοχή στην πενικιλίνη και την ερυθρομυκίνη, το 6.6% των ευαίσθητων στην πενικιλίνη στελεχών ήταν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη, ενώ το 81.8% των στελεχών με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη και το 89% των στελεχών με πλήρη αντοχή στην πενικιλίνη ήταν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη ( $P<0.001$ ) (Πίνακας 4). Στο σχήμα 12 παρουσιάζονται οι ορότυποι των στελεχών με ταυτόχρονη αντοχή στην πενικιλίνη και την ερυθρομυκίνη ανάλογα με το έτος της μελέτης. Επίσης, το ποσοστό των στελεχών πνευμονιόκοκκου με πολλαπλή αντοχή στα αντιμικροβιακά δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια της μελέτης επιτήρησης μεταξύ όλων των παιδιών (24.9% το 2005, 26.6% το 2006, και 21.6% το 2007), αλλά ούτε και στις επιμέρους ομάδες των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους παιδιών και των ανεμβολίαστων παιδιών.

**Πίνακας 3.** Ορότυποι των στελεχών με ταυτόχρονη αντοχή στην πενικιλίνη και την ερυθρομυκίνη ανάλογα με το έτος της μελέτης επιτήρησης

Ορότυποι	Έτος μελέτης			P
	2005	2006	2007	
	n = 390	n = 214	n = 296	
Ορότυποι του PCV7	47 (12.1)	44 (20.6)	30 (10.1)	0.623
9V	1 (0.3)	0	0	0.301
14	0	8 (3.7)	0	0.732
19F	36 (9.2)	27 (12.6)	20 (6.8)	0.330
23F	10 (2.6)	9 (4.2)	10 (3.4)	0.510
Ορότυποι εκτός PCV7	48 (12.3)	17 (7.9)	50 (16.9)	0.107
6A	9 (2.3)	11 (5.1)	24 (8.1)	<b>0.0005</b>
15B	0	0	2 (0.7)	0.071
19A	2 (0.5)	0	0	0.144
35F	0	0	1 (0.3)	0.202
Μη τυποποιήσιμοι	37 (9.5)	6 (2.8)	23 (7.8)	0.294
Σύνολο	95 (24.4)	61 (28.5)	80 (27)	0.399

**Πίνακας 4.** Στελέχη πνευμονιόκοκκου με διασταυρούμενη αντοχή στην πενικιλίνη και την ερυθρομυκίνη

Ευαισθησία στην ερυθρομυκίνη	% των στελεχών μεταξύ των		
	Ευαίσθητα στην πενικιλίνη στελέχη	Στελέχη με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη	Στελέχη με πλήρη αντοχή στην πενικιλίνη
Ευαίσθητα	93.4	18.2	11
Ανθεκτικά	6.6	81.8	89



**Σχήμα 12.** Κατανομή των ορότυπων των στελεχών πνευμονιόκοκκου με αντοχή στην πενικιλίνη, καθώς και με ταυτόχρονη αντοχή στην πενικιλίνη και την ερυθρομυκίνη ανάλογα με το έτος της μελέτης.

### **3.10. Φορείς ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου ανάλογα με την εμβολιαστική κάλυψη και τη χρήση αντιμικροβιακών**

Τα επαρκώς για την ηλικία τους εμβολιασμένα παιδιά που είχαν λάβει αντιμικροβιακά κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών είχαν αυξημένο κίνδυνο να είναι φορείς ανθεκτικού στην πενικιλίνη στελεχούς που ανήκει στους ορότυπους του PCV7 από ότι οι εμβολιασμένοι φορείς που δεν είχαν λάβει αντιμικροβιακά (OR=3.34, 95% διάστημα εμπιστοσύνης [CI] = 1.49-7.48;  $P=0.003$ ). Τα ανεμβολίαστα παιδιά που είχαν λάβει αντιμικροβιακά κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών είχαν αυξημένο κίνδυνο να είναι φορείς ανθεκτικού στην πενικιλίνη στελεχούς που δεν ανήκει στους ορότυπους του PCV7 από ότι οι ανεμβολίαστοι φορείς που δεν είχαν λάβει αντιμικροβιακά (OR=2.44, 95% διάστημα εμπιστοσύνης [CI] = 1.42-4.17;  $P=0.001$ ). Επίσης, τα παιδιά που είχαν λάβει αντιμικροβιακά κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών είχαν αυξημένο κίνδυνο να είναι φορείς ανθεκτικού στην πενικιλίνη στελεχούς από ότι τα παιδιά που δεν είχαν λάβει αντιμικροβιακά, ανεξάρτητα από την εμβολιαστική κάλυψη (Πίνακας 5).



**Πίνακας 5.** Συνολική φορεία πνευμονιόκοκκου και ευαισθησία στην πενικιλίνη ανάλογα με την εμβολιαστική κάλυψη και τη χρήση αντιμικροβιακών κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών

Δείκτης αποικισμού	Επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους παιδιά			Ανεμβολίαστα παιδιά		
	Αντιμικροβιακά (+),	Αντιμικροβιακά (-),	<i>P</i>	Αντιμικροβιακά (+),	Αντιμικροβιακά (-),	<i>P</i>
	<i>N</i> = 307 n (%)	<i>N</i> = 285 n (%)		<i>N</i> = 636 n (%)	<i>N</i> = 528 n (%)	
Φορεία πνευμονιόκοκκου	132 (43)	145 (50.9)	0.06	266 (41.8)	286 (54.2)	<0.001
Ευαίσθητα στην πενικιλίνη	84 (27.4)	117 (41.1)	0.001	153 (24.1)	216 (40.9)	<0.001
Ανθεκτικά στην πενικιλίνη	48 (15.6)	28 (9.8)	0.037	113 (17.8)	70 (13.3)	0.036
Ορότυποι του PCV7	27 (8.8)	8 (2.8)	0.003	60 (9.4)	51 (9.7)	0.92
Ορότυποι εκτός του PCV7	21 (6.8)	20 (7)	0.99	53 (8.3)	19 (3.6)	0.001

PCV7: επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο

### **3.11. Φορεία ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου ανάλογα με την εμβολιαστική κάλυψη και τη χρήση αντιμικροβιακών**

Τα επαρκώς για την ηλικία τους εμβολιασμένα παιδιά που είχαν λάβει αντιμικροβιακά κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών είχαν αυξημένο κίνδυνο να είναι φορείς ανθεκτικού στην ερυθρομυκίνη στελέχους που ανήκει στους ορότυπους του PCV7 από ότι οι εμβολιασμένοι φορείς που δεν είχαν λάβει αντιμικροβιακά (OR=3.20, 95% διάστημα εμπιστοσύνης [CI] = 1.49-6.88;  $P=0.002$ ) (Πίνακας 6).

**Πίνακας 6.** Συνολική φορεία πνευμονιόκοκκου και ευαισθησία στην ερυθρομυκίνη ανάλογα με την εμβολιαστική κάλυψη και τη χρήση αντιμικροβιακών κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών

Δείκτης αποικισμού	Επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους παιδιά			Ανεμβολίαστα παιδιά		
	Αντιμικροβιακά (+),	Αντιμικροβιακά (-),	<i>P</i>	Αντιμικροβιακά (+),	Αντιμικροβιακά (-),	<i>P</i>
	<i>N</i> = 307 n (%)	<i>N</i> = 285 n (%)		<i>N</i> = 636 n (%)	<i>N</i> = 528 n (%)	
Φορεία πνευμονιόκοκκου	132 (43)	145 (50.9)	0.06	266 (41.8)	286 (54.2)	<0.001
Ευαίσθητα στην ερυθρομυκίνη	82 (26.7)	114 (40)	0.001	159 (25)	213 (40.4)	<0.001
Ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη	50 (16.3)	31 (10.9)	0.07	107 (16.8)	73 (13.8)	0.17
Ορότυποι του PCV7	29 (9.5)	9 (3.2)	0.002	60 (9.4)	40 (7.6)	0.29
Ορότυποι εκτός του PCV7	21 (6.8)	22 (7.7)	0.75	47 (7.4)	33 (6.2)	0.49

PCV7: επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο

### **3.12. Επίδραση των αντιμικροβιακών στη φορεία ανθεκτικών στην πενικιλλίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου μεταξύ όλων των παιδιών**

Κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών από τη δειγματοληψία, χορηγήθηκαν από το στόμα συνολικά 1353 σχήματα αντιμικροβιακών στα παιδιά που συμμετείχαν στην μελέτη. Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν γνωστοί για τα 1329 (98.2%) από τα 1353 σχήματα (Πίνακας 7). Επιπλέον, πέντε παιδιά είχαν λάβει αμπικιλλίνη (n=1), κεφουροξίμη (n=1), κεφοξιπίνη (n=1), κεφορανίδη (n=1), και κεφτριαξόνη σε συνδυασμό με κλινδαμυκίνη (n=1) με παρεντερική χορήγηση. Τα από του στόματος χορηγούμενα αντιμικροβιακά συνταγογραφήθηκαν λόγω οξείας μέσης ωτίτιδας (30.8%), οξείας φαρυγγοαμυγδαλίτιδας (27.3%), λοίμωξης του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος (21.6%), και για διάφορες άλλες διαγνώσεις (20.3%).

Τα επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους παιδιά που είχαν λάβει θεραπεία με αντιμικροβιακά μέσα στους προηγούμενους 3 μήνες είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο να είναι αποικισμένα με ανθεκτικό στην πενικιλλίνη πνευμονιόκοκκο που ανήκει στους ορότυπους του PCV7 από τα εμβολιασμένα παιδιά που δεν είχαν λάβει θεραπεία (λόγος αναλογιών [OR]=3.34, 95% διαστήματα εμπιστοσύνης [CI]=1.49-7.48;  $P=0.003$ ).

Ο αποικισμός με ανθεκτικά στην πενικιλλίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου μεταξύ των 977 παιδιών που έλαβαν  $\geq 1$  σχήματα αντιμικροβιακών παραγόντων κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών παρουσιάζεται στον Πίνακα 8. Υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αποικισμού με ανθεκτικούς στην πενικιλλίνη πνευμονιόκοκκους και τη χρήση

κεφαλοσπορινών, εκτός της κεφπροξίλης και της κεφακλόρης, (προσαρμοσμένος λόγος αναλογιών [AOR]=2.59, 95% διάστημα εμπιστοσύνης [CI]=1.29-5.17), καθώς και τη χρήση μακρολιδών (AOR=2.03, 95% CI=1.34-3.08). Η χρήση πενικιλινών δεν είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη φορεία ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκων (AOR=1.14, 95% CI=0.77-1.68) (Πίνακας 8).

Η ανάλυση της επίδρασης των αντιμικροβιακών παραγόντων στη φορεία ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου πραγματοποιήθηκε και για τα χρονικά διαστήματα 0 έως 30 ημέρες, 31 έως 60 ημέρες και 0 έως 60 ημέρες πριν τη δειγματοληψία (Πίνακες 9-11). Η ανάλυση περιλαμβάνει παιδιά που είχαν λάβει αντιμικροβιακή αγωγή μόνο στο χρονικό διάστημα το οποίο μελετήθηκε και παιδιά που δεν είχαν λάβει καμία θεραπεία τους προηγούμενους 2 μήνες. Υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αποικισμού με ανθεκτικούς στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκους και τη χρήση μακρολιδών σε όλα τα χρονικά διαστήματα. Ενώ, η έκθεση στις κεφαλοσπορίνες, εκτός της κεφπροξίλης και της κεφακλόρης, συσχετιζόνταν είτε με μια τάση για αποικισμό με ανθεκτικούς στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκους ή με στατιστικά σημαντική αντοχή στην πενικιλίνη. Η συσχέτιση αυτή, μεταξύ της χρήσης από το στόμα κεφαλοσπορινών, εκτός της κεφακλόρης και της κεφπροξίλης, και του αποικισμού με ανθεκτικούς στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκους φαίνεται ότι αντικατοπτρίζει κυρίως την έκθεση στην κεφουροξίμη. Η χρήση πενικιλινών δεν είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη φορεία ανθεκτικών στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκων σε κανένα χρονικό διάστημα.

**Πίνακας 7.** Σχήματα από του στόματος χορηγούμενων αντιμικροβιακών παραγόντων που συνταγογραφήθηκαν στα παιδιά κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών

Αντιμικροβιακός παράγοντας	Αρ. σχημάτων	% του υποσυνόλου	% του συνόλου
<b>Κεφαλοσπορίνες</b>			
Κεφακλόρη	251	44.2	18.9
Κεφπροζίλη	228	40.1	17.2
Κεφουροξίμη αξετίλη	50	8.8	3.8
Λορακαρμπέφη	36	6.3	2.7
Κεφατριζίνη	2	0.4	0.1
Κεφιξίμη	1	0.2	0.1
Υποσύνολο	568		42.8
<b>Πενικιλίνες</b>			
Αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ	381	81.9	28.7
Αμοξυκιλλίνη	77	16.6	5.8
Πενικιλίνη V	7	1.5	0.5
Υποσύνολο	465		35
<b>Μακρολίδες</b>			
Κλαριθρομυκίνη	260	90	19.5
Ερυθρομυκίνη	13	4.5	1
Μιντεκαμυκίνη	9	3.1	0.7
Αζιθρομυκίνη	7	2.4	0.5
Υποσύνολο	289		21.7
Τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη	6		0.4
Φουσιδικό οξύ	1		0.1
<b>Σύνολο</b>	<b>1329</b>		

**Πίνακας 8.** Φορεία ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου (Pen-R SP) και χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων στο σύνολο του πληθυσμού των παιδιών που μελετήθηκαν και παρακολουθούσαν παιδικό σταθμό στην Κεντρική Ελλάδα (N=1829): πολυπαραγοντική ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης

	Pen-R SP (N = 275) n (%)	Pen-S SP και μη φορείς (N = 1554) n (%)	AOR <sub>res</sub> (95% CI)
Προβλεπτικός παράγοντας			
Ηλικία, μήνες			
≤ 23	19 (6.9)	47 (3)	Μεταβλητή αναφοράς
24 - 47	130 (47.3)	719 (46.3)	0.52 (0.29-0.96)
≥ 48	126 (45.8)	788 (50.7)	0.48 (0.26-0.88)
Εμβολιαστική κατάσταση			
Ανεμβολίαστα	183 (66.5)	989 (63.6)	Μεταβλητή αναφοράς
Επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους	76 (27.6)	517 (33.3)	0.80 (0.59-1.06)
Μερικώς εμβολιασμένα	16 (5.8)	48 (3.1)	1.44 (0.76-2.72)
Χρήση αντιμικροβιακών* τους προηγούμενους 3 μήνες			
Χωρίς θεραπεία	107 (38.9)	736 (47.4)	Μεταβλητή αναφοράς
Μακρολίδες	38 (13.8)	129 (8.3)	2.03 (1.34-3.08)
Κεφπροξίλη	17 (6.2)	100 (6.4)	1.15 (0.66-2.00)
Κεφακλόρη	21 (7.6)	133 (8.6)	1.04 (0.62-1.72)
Άλλες κεφαλοσπορίνες**	12 (4.4)	33 (2.1)	2.59 (1.29-5.17)
Πενικιλίνες	42 (15.3)	246 (15.8)	1.17 (0.80-1.73)
Μικτές ομάδες ή άλλοι παράγοντες	38 (13.8)	168 (10.8)	1.48 (0.98-2.24)

Pen-S SP: ευαίσθητα στην πενικιλίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου, AOR<sub>res</sub>: προσαρμοσμένος λόγος αναλογιών για τη φορεία Pen-R SP, 95% CIs: 95% διαστήματα εμπιστοσύνης

\* Ένας συγκεκριμένος παράγοντας ή μέλη μόνο μιας κατηγορίας αντιμικροβιακών χορηγήθηκαν από το στόμα σε κάθε ομάδα θεραπείας, εκτός από την τελευταία ομάδα. \*\*Στις άλλες κεφαλοσπορίνες ανήκουν η κεφουροξίμη αξετίλ (n=25), η λορακαρμπέφη (n=16), η κεφατριζίνη (n=1) και η κεφιξίμη (n=1).

**Πίνακας 9.** Φορεία ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου (Pen-R SP) και χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων κατά τη διάρκεια του προηγούμενου μήνα (0 – 30 ημέρες πριν τη δειγματοληψία) στο σύνολο των παιδιών

	Pen-R SP (N = 198) n (%)	Pen-S SP και μη φορείς (N = 1187) n (%)	OR <sub>res</sub> (95% CI)	P
Χωρίς θεραπεία τους προηγούμενους 2 μήνες	136	402 + 482	Μεταβλητή αναφοράς	
Μακρολίδες	17	13 + 48	1.81 (1.03-3.19)	<b>0.043</b>
Κεφπροζίλη	6	18 + 30	0.81 (0.34-1.94)	0.837
Κεφακλόρη	8	15 + 45	0.87 (0.41-1.85)	0.854
Άλλες κεφαλοσπορίνες	5	1 + 11	2.71 (0.94-7.81)	0.069
Κεφουροξίμη	2	0 + 6	2.17 (0.43-10.84)	0.293
Πενικιλίνες	22	13 + 83	1.49 (0.91-2.45)	0.122
Μικτές ομάδες ή άλλοι παράγοντες	4	4 + 22	1.00 (0.34-2.91)	0.999

Pen-S SP: ευαίσθητα στην πενικιλίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου, OR<sub>res</sub>: λόγος αναλογιών για τη φορεία Pen-R SP, 95% CIs: 95% διαστήματα εμπιστοσύνης

**Πίνακας 10.** Φορεία ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου (Pen-R SP) και χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων κατά το χρονικό διάστημα 31 – 60 ημέρες πριν τη δειγματοληψία στο σύνολο των παιδιών

	Pen-R SP (N = 189) n (%)	Pen-S SP και μη φορείς (N = 1145) n (%)	OR <sub>res</sub> (95% CI)	P
Χωρίς θεραπεία τους προηγούμενους 2 μήνες	136	402 + 482	Μεταβλητή αναφοράς	
Μακρολίδες	16	20 + 33	1.96 (1.09-3.53)	<b>0.030</b>
Κεφπροζίλη	6	10 + 26	1.08 (0.45-2.62)	0.817
Κεφακλόρη	7	17 + 22	1.17 (0.51-2.66)	0.660
Άλλες κεφαλοσπορίνες	5	3 + 10	2.50 (0.88-7.12)	0.085
Κεφουροξίμη	4	2 + 6	3.25 (0.97-10.94)	0.067
Πενικιλίνες	14	41 + 63	0.88 (0.49-1.57)	0.774
Μικτές ομάδες ή άλλοι παράγοντες	5	5 + 11	2.03 (0.73-5.64)	0.189

Pen-S SP: ευαίσθητα στην πενικιλίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου, OR<sub>res</sub>: λόγος αναλογιών για τη φορεία Pen-R SP, 95% CIs: 95% διαστήματα εμπιστοσύνης



**Πίνακας 11.** Φορεία ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου (Pen-R SP) και χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 2 μηνών (0 – 60 ημέρες πριν τη δειγματοληψία) στο σύνολο των παιδιών

	Pen-R SP (N = 275) n (%)	Pen-S SP και μη φορείς (N = 1545) n (%)	OR <sub>res</sub> (95% CI)	P
Χωρίς θεραπεία τους προηγούμενους 2 μήνες	136	402 + 482	Μεταβλητή αναφοράς	
Μακρολίδες	37	33 + 86	2.02 (1.34-3.05)	<b>0.001</b>
Κεφπροζίλη	14	30 + 65	0.96 (0.53-1.73)	0.999
Κεφακλόρη	16	36 + 70	0.98 (0.56-1.71)	0.999
Άλλες κεφαλοσπορίνες	14	5 + 23	3.25 (1.67-6.33)	<b>0.001</b>
Κεφουροξίμη	8	2 + 13	3.47 (1.44-8.33)	<b>0.009</b>
Πενικιλίνες	37	55 + 163	1.10 (0.74-1.63)	0.610
Μικτές ομάδες ή άλλοι παράγοντες	21	25 + 70	1.44 (0.87-2.38)	0.157

Pen-S SP: ευαίσθητα στην πενικιλίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου, OR<sub>res</sub>: λόγος αναλογιών για τη φορεία Pen-R SP, 95% CIs: 95% διαστήματα εμπιστοσύνης

### 3.13. Επίδραση των αντιμικροβιακών στη φορεία ευαίσθητων στην πενικιλίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου μεταξύ όλων των παιδιών

Και οι 3 ομάδες αντιμικροβιακών παραγόντων σχετίζονταν με ελαττωμένη φορεία ευαίσθητων στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκων (Πίνακας 12).

**Πίνακας 12.** Φορεία ευαίσθητων στην πενικιλίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου (Pen-S SP) και χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων στο σύνολο του πληθυσμού των παιδιών που μελετήθηκαν και παρακολουθούσαν παιδικό σταθμό στην Κεντρική Ελλάδα (N=1829): πολυπαραγοντική ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης

	Pen-S SP (N = 587) n (%)	Pen-R SP και μη φορείς (N = 1242) n (%)	AOR <sub>SUS</sub> (95% CI)
Προβλεπτικός παράγοντας			
Ηλικία, μήνες			
≤ 23	22 (3.7)	44 (3.5)	Μεταβλητή αναφοράς
24 - 47	300 (51.1)	549 (44.2)	0.83 (0.47-1.47)
≥ 48	265 (45.1)	649 (52.3)	0.59 (0.33-1.04)
Εμβολιαστική κατάσταση			
Ανεμβολίαστα	370 (63)	802 (64.6)	Μεταβλητή αναφοράς
Επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους	201 (34.2)	392 (31.6)	1.08 (0.87-1.34)
Μερικώς εμβολιασμένα	16 (2.7)	48 (3.9)	0.57 (0.31-1.05)
Χρήση αντιμικροβιακών* τους προηγούμενους 3 μήνες			
Χωρίς θεραπεία	342 (58.3)	501 (40.3)	Μεταβλητή αναφοράς
Μακρολίδες	40 (6.8)	127 (10.2)	0.45 (0.31-0.66)
Κεφπροξίλη	33 (5.6)	84 (6.8)	0.55 (0.36-0.85)
Κεφακλόρη	48 (8.2)	106 (8.5)	0.63 (0.43-0.91)
Άλλες κεφαλοσπορίνες**	8 (1.4)	37 (3)	0.31 (0.14-0.68)
Πενικιλίνες	71 (12.1)	217 (17.5)	0.48 (0.36-0.65)
Μικτές ομάδες ή άλλοι παράγοντες	44 (7.5)	162 (13)	0.37 (0.26-0.54)

Pen-R SP: ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου, AOR<sub>SUS</sub>: προσαρμοσμένος λόγος αναλογιών για τη φορεία Pen-S SP, 95% CIs: 95% διαστήματα εμπιστοσύνης

\* Ένας συγκεκριμένος παράγοντας ή μέλη μόνο μιας κατηγορίας αντιμικροβιακών χορηγήθηκαν από το στόμα σε κάθε ομάδα θεραπείας, εκτός από την τελευταία ομάδα. \*\*Στις άλλες κεφαλοσπορίνες ανήκουν η κεφουροξίμη αξετίλ (n=25), η λορακαρμπέφη (n=16), η κεφατριζίνη (n=1) και η κεφιξίμη (n=1).

### 3.14. Επίδραση των αντιμικροβιακών στη φορεία ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου μεταξύ όλων των παιδιών

Ο αποικισμός με ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου μεταξύ των 977 παιδιών που έλαβαν  $\geq 1$  σχήματα αντιμικροβιακών παραγόντων κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών παρουσιάζεται στον Πίνακα 13. Από αυτά τα 977 παιδιά, 771 (78.9%) είχαν λάβει από του στόματος χορηγούμενους αντιμικροβιακούς παράγοντες μιας μόνο συγκεκριμένης ομάδας και 206 (21.1%) κάποιον άλλο παράγοντα ή συνδυασμό αντιμικροβιακών που ανήκουν στις διάφορες ομάδες ή στους άλλους παράγοντες. Από αυτά τα 206 παιδιά, 88 (42.7%) είχαν λάβει πενικιλλίνες και κεφαλοσπορίνες, 83 (40.3%) μακρολίδες και κεφαλοσπορίνες ή πενικιλλίνες, και 35 (17%) άλλους παράγοντες ως μοναδική θεραπεία ή άλλους συνδυασμούς. Αυτά τα 206 παιδιά εκτιμήθηκαν ως μια ξεχωριστή ομάδα. Τελικά, εννιά παιδιά, όλα εκτός από ένα, ανεμβολίαστα και μη αποικισμένα με πνευμονιόκοκκο, αποκλείστηκαν από την ανάλυση της επίδρασης των αντιμικροβιακών, επειδή δεν ήταν γνωστό εάν είχαν λάβει αντιμικροβιακή αγωγή κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών.

Ελαττωμένη ευαισθησία στην πενικιλλίνη παρατηρήθηκε σε 35 (87.5%) από τα 40 ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου που απομονώθηκαν από τα παιδιά που είχαν λάβει μακρολίδες, σε 39 (88.6%) από τα 44 στελέχη των παιδιών που είχαν λάβει πενικιλλίνες, και στα 14 ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη που απομονώθηκαν από τα παιδιά που είχαν λάβει κεφπροζίλη, σε 15 (75%) από τα 20 στελέχη των παιδιών που είχαν λάβει κεφακλόρη, και στα 10 ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη που απομονώθηκαν από τα παιδιά που είχαν λάβει άλλες κεφαλοσπορίνες.

Η έκθεση στις μακρολίδες, 90% κλαριθρομυκίνη, είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την αντοχή στην ερυθρομυκίνη (προσαρμοσμένος λόγος αναλογιών [AOR]=2.08, 95% διάστημα εμπιστοσύνης [CI]=1.38-3.12). Επίσης υπήρχε μια τάση συσχέτισης μεταξύ της χρήσης από το στόμα κεφαλοσπορινών, εκτός της κεφακλόρης και της κεφπροζίλης, και του αποικισμού με ανθεκτικούς στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκους (AOR=1.91, 95% CI=0.92-3.96). Ενώ η χρήση πενικιλλινών δεν είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη φορεία ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκων (AOR=1.17, 95% CI=0.80-1.71).

### **3.15. Επίδραση των αντιμικροβιακών στη φορεία ευαίσθητων στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου μεταξύ όλων των παιδιών**

Και οι τρεις ομάδες των αντιμικροβιακών σχετίζονταν με ελαττωμένη φορεία ευαίσθητων στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκων (Πίνακας 14).

**Πίνακας 13.** Φορεία ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου (Ery-R SP) και χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων στο σύνολο του πληθυσμού των παιδιών που μελετήθηκαν και παρακολουθούσαν παιδικό σταθμό στην Κεντρική Ελλάδα (N=1829): πολυπαραγοντική ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης

Προβλεπτικός παράγοντας	Ery-R SP (N = 272) n (%)	Ery-S SP και μη φορείς (N = 1557) n (%)	AOR <sub>res</sub> (95% CI)
Ηλικία, μήνες			
≤ 23	13 (4.8)	53 (3.4)	Μεταβλητή αναφοράς
24 - 47	125 (45.9)	724 (46.5)	0.74 (0.38-1.44)
≥ 48	134 (49.3)	780 (50.1)	0.73 (0.37-1.45)
Εμβολιαστική κατάσταση			
Ανεμβολίαστα	180 (66.2)	992 (63.7)	Μεταβλητή αναφοράς
Επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους	81 (29.8)	512 (32.9)	0.87 (0.66-1.16)
Μερικώς εμβολιασμένα	11 (4)	53 (3.4)	1.06 (0.52-2.16)
Χρήση αντιμικροβιακών* τους προηγούμενους 3 μήνες			
Χωρίς θεραπεία	111 (40.8)	732 (47)	Μεταβλητή αναφοράς
Μακρολίδες	40 (14.7)	127 (8.2)	2.08 (1.38-3.12)
Κεφπροζίλη	14 (5.1)	103 (6.6)	0.89 (0.49-1.62)
Κεφακλόρη	20 (7.4)	134 (8.6)	0.97 (0.58-1.62)
Άλλες κεφαλοσπορίνες**	10 (3.7)	35 (2.2)	1.91 (0.92-3.96)
Πενικιλίνες	44 (16.2)	244 (15.7)	1.17 (0.80-1.71)
Μικτές ομάδες ή άλλοι παράγοντες	33 (12.1)	173 (11.1)	1.24 (0.81-1.90)

Ery-S SP: ευαίσθητα στην ερυθρομυκίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου, AOR<sub>res</sub>: προσαρμοσμένος λόγος αναλογιών για τη φορεία Ery-R SP, 95% CIs: 95% διαστήματα εμπιστοσύνης

\* Ένας συγκεκριμένος παράγοντας ή μέλη μόνο μιας ομάδας αντιμικροβιακών χορηγήθηκαν από το στόμα σε κάθε ομάδα θεραπείας, εκτός από την τελευταία ομάδα. \*\*Στις άλλες κεφαλοσπορίνες ανήκουν η κεφουροξίμη αξετίλ (n=25), η λορακαρμπέφη (n=16), η κεφατριζίνη (n=1) και η κεφιξίμη (n=1).

**Πίνακας 14.** Φορεία ευαίσθητων στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου (Ery-S SP) και χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων στο σύνολο του πληθυσμού των παιδιών που μελετήθηκαν και παρακολουθούσαν παιδικό σταθμό στην Κεντρική Ελλάδα (N=1829): πολυπαραγοντική ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης

Προβλεπτικός παράγοντας	Ery-S SP (N = 590) n (%)	Ery-R SP και μη φορείς (N = 1239) n (%)	AOR <sub>sus</sub> (95% CIs)
Ηλικία, μήνες			
≤ 23	28 (4.7)	38 (3.1)	Μεταβλητή αναφοράς
24 - 47	305 (51.7)	544 (43.9)	0.62 (0.36-1.08)
≥ 48	257 (43.6)	657 (53)	0.42 (0.24-0.72)
Εμβολιαστική κατάσταση			
Ανεμβολίαστα	373 (63.2)	799 (64.5)	Μεταβλητή αναφοράς
Επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους	196 (33.2)	397 (32)	1.03 (0.83-1.28)
Μερικώς εμβολιασμένα	21 (3.6)	43 (3.5)	0.75 (0.42-1.33)
Χρήση αντιμικροβιακών* τους προηγούμενους 3 μήνες			
Χωρίς θεραπεία	338 (57.3)	505 (40.8)	Μεταβλητή αναφοράς
Μακρολίδες	38 (6.4)	129 (10.4)	0.43 (0.29-0.63)
Κεφπροζίλη	36 (6.1)	81 (6.5)	0.63 (0.42-0.96)
Κεφακλόρη	49 (8.3)	105 (8.5)	0.65 (0.45-0.94)
Άλλες κεφαλοσπορίνες**	10 (1.7)	35 (2.8)	0.42 (0.21-0.87)
Πενικιλίνες	69 (11.7)	219 (17.7)	0.46 (0.34-0.63)
Μικτές ομάδες ή άλλοι παράγοντες	49 (8.3)	157 (12.7)	0.43 (0.30-0.61)

Ery-R SP: ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου, AOR<sub>sus</sub>: προσαρμοσμένος λόγος αναλογιών για τη φορεία Ery-S SP, 95% CIs: 95% διαστήματα εμπιστοσύνης

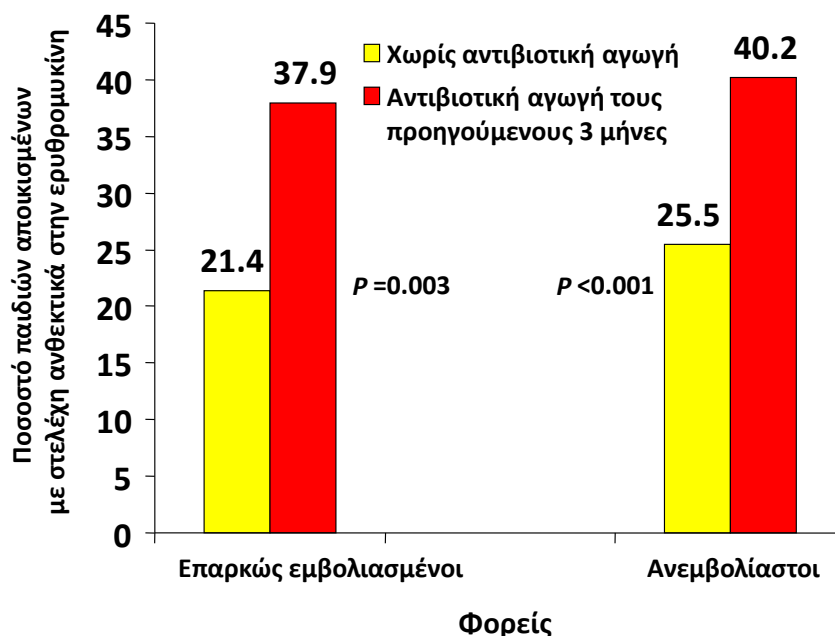
\* Ένας συγκεκριμένος παράγοντας ή μέλη μόνο μιας κατηγορίας αντιμικροβιακών χορηγήθηκαν από το στόμα σε κάθε ομάδα θεραπείας, εκτός από την τελευταία ομάδα. \*\*Στις άλλες κεφαλοσπορίνες ανήκουν κεφουροξίμη αζετίλ (n=25), η λορακαρμπέφη (n=16), η κεφατριζίνη (n=1) και η κεφιξίμη (n=1).

### 3.16. Επίδραση των αντιμικροβιακών στη φορεία ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου μεταξύ των φορέων

Στην ανάλυση που περιορίστηκε στην ομάδα των φορέων, η πρόσφατη θεραπεία με μακρολίδες, κεφαλοσπορίνες εκτός της κεφπροζίλης και της κεφακλόρης, ή πενικιλλίνες ήταν πιο συχνή μεταξύ των φορέων ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών από ότι μεταξύ των φορέων ευαίσθητων στην ερυθρομυκίνη στελεχών. Αυτή η συσχέτιση εκτιμήθηκε με το  $OR_C$  προσαρμοσμένο για την ηλικία και την εμβολιαστική κάλυψη με το PCV7. Το προσαρμοσμένο  $OR_C$  ( $AOR_C$ ) και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης ήταν 3.24 (1.97-5.31) για τις μακρολίδες, 3.13 (1.26-7.76) για τις κεφαλοσπορίνες εκτός της κεφπροζίλης και της κεφακλόρης, 1.21 (0.63-2.34) για την κεφπροζίλη, 1.28 (0.72-2.25) για την κεφακλόρη, 1.94 (1.26-3.00) για τις πενικιλλίνες, και 2.10 (1.27-3.48) για τις μικτές ομάδες αντιμικροβιακών ή τους άλλους παράγοντες.

Οι επαρκώς εμβολιασμένοι για την ηλικία τους φορείς που είχαν λάβει αντιμικροβιακά κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών είχαν 1.8 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να είναι φορείς ανθεκτικού στην ερυθρομυκίνη στελέχους από ότι οι εμβολιασμένοι φορείς που δεν είχαν λάβει αντιμικροβιακά. Μεταξύ των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους παιδιών, τα ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου απομονώθηκαν από 21.4% (31 από 145) των φορέων που δεν είχαν λάβει θεραπεία (95% CI: 14.7 έως 28.1%) και από 37.9% (50 από 132) των φορέων που είχαν λάβει θεραπεία με αντιμικροβιακά κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών (95% CI: 29.6 έως 46.2%) ( $OR=0.45$ ,  $CI=0.26-0.76$ ,  $P=0.003$ ). Μεταξύ των ανεμβολίαστων παιδιών, τα ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου

απομονώθηκαν από 25.5% (73 από 286) των φορέων που δεν είχαν λάβει θεραπεία (95% CI: 20.5 έως 30.6%) και από 40.2% (107 έως 266) των φορέων που είχαν λάβει θεραπεία με αντιμικροβιακά κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών (95% CI: 34.3 έως 46.1%) (OR=0.51, 95% CI=0.36-0.73,  $P<0.001$ ) (Σχήμα 13).



**Σχήμα 13.** Αποικισμός με ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου ανάλογα με την εμβολιαστική κάλυψη και την αντιμικροβιακή αγωγή κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών.



### **3.17. Ο παιδικός σταθμός ως μία ανεξάρτητη επιδημιολογική μονάδα**

Το ποσοστό αποικισμού με ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου μεταξύ των παιδιών ήταν  $\geq 15\%$  σε 9 (40.9%) από τους 22 παιδικούς σταθμούς, στους οποίους κατά τη διάρκεια της επίσκεψης  $< 40\%$  των παιδιών ήταν επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία τους και σε 5 (50%) από τους 10 παιδικούς σταθμούς, στους οποίους το αντίστοιχο ποσοστό εμβολιασμού ήταν  $\geq 40\%$  ( $P=0.71$ ). Επιπρόσθετα, το ποσοστό αποικισμού με ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου μεταξύ των παιδιών ήταν  $\geq 15\%$  σε 5 (35.7%) από τους 14 παιδικούς σταθμούς, στους οποίους κατά τη διάρκεια της ετήσιας επιτήρησης  $< 50\%$  των παιδιών είχαν λάβει αντιμικροβιακά τους προηγούμενους 3 μήνες σε σύγκριση με 9 (50%) από τους 18 παιδικούς σταθμούς, στους οποίους το αντίστοιχο ποσοστό κατανάλωσης αντιμικροβιακών παραγόντων ήταν  $\geq 50\%$  ( $P=0.49$ ).

### **3.18. Μεταβολές της αντοχής σε αντιμικροβιακούς παράγοντες μεταξύ των ορότυπων που δεν ανήκουν στο PCV7**

Από το 2005 έως το 2007, το ποσοστό των στελεχών με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη μεταξύ των ορότυπων που δεν ανήκουν στο PCV7 δεν μεταβλήθηκε σημαντικά (Πίνακας 15). Όλα τα στελέχη με ορότυπο 19A και 47 (42.7%) από τα 110 στελέχη με ορότυπο 6A είχαν ελαττωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη. Ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ των πνευμονιόκοκκων με ορότυπο 23B (100%, 4 από τα 4 στελέχη), 15B (25.7%, 9 από τα 35 στελέχη), και 35F (4.3%, 1 από τα 23 στελέχη). Επιπλέον, το ποσοστό των στελεχών με ελαττωμένη

ευαισθησία στην τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη ελαττώθηκε σημαντικά, ενώ για την ερυθρομυκίνη αυξήθηκε.

**Πίνακας 15.** Ελαττωμένη ευαισθησία στα αντιμικροβιακά μεταξύ των ορότυπων που δεν ανήκουν στο PCV7 ανάλογα με το έτος της μελέτης επιτήρησης

	Έτος μελέτης			
Ελαττωμένη ευαισθησία στα αντιμικροβιακά	2005	2006	2007	P
	n = 211	n = 107	n = 228	
Από του στόματος πενικιλίνη V				
Ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη	26 (12.3) <sup>a</sup>	18 (16.8)	33 (14.5)	0.528
Πλήρης αντοχή στην πενικιλίνη	0	1 (0.9)	0	0.972
Παρεντερική πενικιλίνη (μηνιγγίτιδα)	26 (12.3)	19 (17.8)	33 (14.5)	0.533
Παρεντερική πενικιλίνη (εκτός μηνιγγίτιδας)	0	0	0	
Κεφοταξίμη (μηνιγγίτιδα)				
Ενδιάμεση αντοχή στην κεφοταξίμη	9 (4.3)	10 (9.3)	0	0.012
Πλήρης αντοχή στην κεφοταξίμη	0	0	0	
Ενδιάμεση αντοχή στην κεφοταξίμη (εκτός μηνιγγίτιδας)	0	0	0	
Ελαττωμένη ευαισθησία στην ερυθρομυκίνη	16 (7.6)	14 (13.1)	31 (13.6)	0.047
Ελαττωμένη ευαισθησία στην κλινδαμυκίνη	7 (3.3)	0	3 (1.3)	0.125
Ελαττωμένη ευαισθησία στην τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη	47 (22.3)	16 (15)	32 (14)	0.024
Ελαττωμένη ευαισθησία στη χλωραμφενικόλη	1 (0.5)	0	0	0.249
Ελαττωμένη ευαισθησία στην τετρακυκλίνη	7 (3.3)	3 (2.8)	9 (3.9)	0.714
Πολλαπλή αντοχή στα αντιμικροβιακά	6 (2.8)	3 (2.8)	11 (4.8)	0.266

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη του 2005-2007 σε παιδιά που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς στην Κεντρική Ελλάδα [236] είχε ως σκοπό να παρουσιάσει τα αποτελέσματα της επέκτασης του εμβολιασμού με το PCV7. Είναι μια μελέτη επιτήρησης σε παιδιά που ήταν σχεδόν αποκλειστικά εμβολιασμένα στο πλαίσιο προγραμμάτων αναπλήρωσης (catch-up). Αυτή η εργασία αντιπροσωπεύει μια από τις πρώτες ευρωπαϊκές μελέτες επιτήρησης της πνευμονιοκοκκικής φορέας σε παιδιά από τη στιγμή της ενσωμάτωσης του PCV7 στα εθνικά προγράμματα γενικευμένου εμβολιασμού και τονίζει την ανάγκη εκτίμησης της επίδρασής του στην καθημερινή πράξη.

Στην Ελλάδα, η πλειονότητα των εμβολιασμών διενεργείται από τους παιδίατρους στα ιδιωτικά τους ιατρεία. Από την εισαγωγή του PCV7 στη χώρα μας, υπάρχουν δύο ξεχωριστές χρονικές περίοδοι που αντανakλούν διαφορετικές τακτικές για τον εμβολιασμό με το PCV7. Κατά τη διάρκεια της πρώτης περιόδου, μεταξύ Οκτωβρίου 2004 και Ιουνίου 2006, ο εμβολιασμός αφορούσε κυρίως τη χορήγηση 1 ή 2 δόσεων του PCV7 σε νήπια με προγράμματα αναπλήρωσης (catch-up) και πολύ χαμηλό ποσοστό εμβολιασμού των βρεφών. Στο τέλος του 1<sup>ου</sup> εξαμήνου του 2006, άρχισε η κάλυψη του PCV7 από τα ασφαλιστικά ταμεία. Αυτό οδήγησε στη δεύτερη χρονική περίοδο, όπου υπήρχε μια βαθμιαία αύξηση της έναρξης του εμβολιασμού με το PCV7 στην πρώιμη βρεφική ηλικία. Τα σχήματα εμβολιασμού διαφέρουν σε σύγκριση με αυτά άλλων χωρών [178, 253-255].

Παράλληλα με μία αύξηση στον αριθμό των παιδιών που ήταν εμβολιασμένα με το PCV7, αυτή η μελέτη παρουσίασε σημαντικές μεταβολές

στην κατανομή των ορότυπων. Οι ορότυποι που δεν ανήκουν στο PCV7 αντικατέστησαν αυτούς που ανήκουν στο PCV7 με την εξαίρεση του ορότυπου 19F. Στην Κεντρική Ελλάδα, ο ορότυπος 6A αντιπροσώπευε περισσότερο από το 10% των στελεχών πνευμονιόκοκκου κατά τη διάρκεια των 3 περιόδων δειγματοληψίας.

Στην μελέτη μας, η συχνότητα των περισσότερων ορότυπων που δεν ανήκουν στο PCV7 ποικίλλει σημαντικά κάθε χρόνο. Φαίνεται ότι αρκετοί ορότυποι που δεν ανήκουν στο PCV7 μπορούν να αποικίζουν τα παιδιά στην μετά το PCV7 περίοδο, αλλά η παρουσία τους εμφανίζει διακύμανση. Αυτό το εύρημα δεν πρέπει σε καμία περίπτωση να υποτιμάται. Καθώς παρακολουθούμε τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα στην μετά το PCV7 περίοδο, είναι απαραίτητο να εκτιμήσουμε τα αποτελέσματα από μια σειρά επιτηρήσεων επειδή μια μελέτη επιπολασμού σε μια δεδομένη στιγμή μπορεί απλά να αποκαλύψει παροδικές τάσεις.

Αντοχή στην πενικιλίνη βρέθηκε σε 282 (31.3%) από τα 900 συνολικά στελέχη πνευμονιόκοκκου. Μέχρι το 2007, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση του ποσοστού των στελεχών πνευμονιόκοκκου με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη (χρησιμοποιώντας τα κριτήρια για την από του στόματος χορηγούμενη πενικιλίνη), η οποία αποδίδεται κυρίως στην αυξημένη κυκλοφορία συγκεκριμένων ορότυπων που δεν ανήκουν στο PCV7 και έχουν ελαττωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με πρόσφατες μελέτες από τη Γαλλία, την Πορτογαλία και τις Ηνωμένες Πολιτείες [253, 254, 256]. Η αύξηση των στελεχών με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη συμπίπτει με μια ελάττωση των στελεχών με υψηλού βαθμού αντοχή στην πενικιλίνη. Την παρούσα στιγμή, αυτό εξηγείται καθώς τα

στελέχη που αντικαθιστούν δεν εμφανίζουν τιμές MIC στην πενικιλίνη τόσο υψηλές όσο αυτές που είχαν παρατηρηθεί μεταξύ των ορότυπων που ανήκουν στο PCV7. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με μια 5ετή μελέτη του πνευμονιοκοκκικού αποικισμού του ρινοφάρυγγα στη Γαλλία μεταξύ παιδιών ηλικίας κάτω των 24 μηνών με οξεία μέση ωτίτιδα [254].

Υπήρχαν μελέτες του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με πνευμονιόκοκκο σε επιλεγμένους πληθυσμούς υγιών ή με οξεία νόσο παιδιών από την έναρξη της διάδοσης του εμβολιασμού με το PCV7 στις Ηνωμένες Πολιτείες [49, 157, 158, 173, 194, 196, 215, 234, 235], στον Καναδά [187], και στη Γαλλία [156]. Η πλειονότητα αυτών των μελετών έχει επικεντρωθεί στην τάση της κατανομής των ορότυπων των πνευμονιόκοκκων, όπως και στη φορεία ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά γενικά, ή ανθεκτικών στην πενικιλίνη ειδικά, στελεχών πνευμονιόκοκκου.

Υπάρχουν λίγες πληροφορίες στη βιβλιογραφία σχετικά με τη φορεία ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκων μεταξύ των εμβολιασμένων με το PCV7 παιδιών από την έναρξη της διάδοσης του εμβολιασμού με το PCV7. Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά που ζούσαν σε 16 κοινότητες της Μασαχουσέτης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στον αποικισμό με ανθεκτικούς στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκους μετά από την εκτεταμένη χρήση του PCV7 [215]. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μείωση του αποικισμού με ανθεκτικούς στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκους σε γηγενή παιδιά στην Αλάσκα [173]. Σε αυτές τις πρόσφατες μελέτες δεν υπάρχει καμία αναφορά σε κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αποικισμού με ανθεκτικούς στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκους και της χρήσης μιας

συγκεκριμένης ομάδας ή μιας μεγάλης υποομάδας αντιμικροβιακών παραγόντων που χορηγούνται από το στόμα.

Η ανάλυση των 900 πνευμονιοκοκκικών στελεχών, αποκάλυψε υψηλό ποσοστό (30.8%) ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών που ανήκαν σε 15 διαφορετικά σχήματα αντοχής. Παράλληλα με μία αύξηση στον αριθμό των παιδιών που ήταν εμβολιασμένα με το PCV7, αυτή η μελέτη παρουσίασε μια σημαντική ελάττωση της φορέας ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών που ανήκουν στους ορότυπους του PCV7, αλλά χωρίς συνολική ελάττωση της φορέας των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών μεταξύ των επαρκώς εμβολιασμένων για την ηλικία τους παιδιών. Δεν μπορέσαμε να βρούμε παρόμοια σημαντική ελάττωση της φορέας ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών που ανήκουν στους ορότυπους του PCV7 μεταξύ των ανεμβολίαστων παιδιών.

Η μεγαλύτερη ελάττωση της φορέας ανθεκτικών στην πενικιλίνη και την ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκων, συγκεκριμένα αυτών που ανήκουν στους ορότυπους του PCV7, παρατηρήθηκε μεταξύ των εμβολιασμένων παιδιών που είχαν πρόσφατα εκτεθεί σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Επομένως, για να πετύχουμε και να διατηρήσουμε την μεγαλύτερη ελάττωση του ποσοστού αποικισμού με ανθεκτικούς στην πενικιλίνη ή την ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκους από την εισαγωγή του PCV7, ο εμβολιασμός πρέπει να ενισχυθεί με επιπρόσθετη ελάττωση της αντιμικροβιακής χρήσης. Η παρούσα μελέτη συμπληρώνει αυτή του Cohen και συνεργατών [156], στην οποία εκτιμήθηκε η φορεία στελεχών πνευμονιόκοκκου με ελαττωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη. Σ'αυτή την μελέτη, η εισαγωγή του PCV7 σε συνδυασμό με την ελάττωση της χρήσης

αντιμικροβιακών είχε ισχυρή επίδραση στον αποικισμό με στελέχη πνευμονιόκοκκου με ελαττωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη σε παιδιά με οξεία μέση ωτίτιδα στη Γαλλία.

Η πιθανότητα της φορείας ανθεκτικών στελεχών μεταξύ όλων των παιδιών, παρά η πιθανότητα ανθεκτικών στελεχών μεταξύ των φορέων πνευμονιόκοκκου, έχει χρησιμοποιηθεί σε πρόσφατες μελέτες [156, 158], καθώς θεωρείται ότι παρέχει πιο χρήσιμες πληροφορίες για τη διασπορά των ανθεκτικών στελεχών σε επίπεδο πληθυσμού. Επίσης, επιλέξαμε αυτόν τον τύπο ανάλυσης ως τη βάση για την παρούσα έρευνα, καθώς εμφανίζεται να αντιπροσωπεύει μια πιο σχετική προσέγγιση στην εκτίμηση των άμεσων και έμμεσων επιδράσεων των παραγόντων, όπως ο εμβολιασμός με το PCV7 και η χρήση αντιμικροβιακών, στη διασπορά των ανθεκτικών στην πενικιλίνη ή την ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου σε ολόκληρο τον πληθυσμό των παιδικών σταθμών που μελετήθηκε. Συμπληρωματική πληροφορία παρέχεται από μια δευτερεύουσα ανάλυση που περιορίστηκε στην ομάδα των φορέων.

Σ'αυτή την μελέτη, υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αποικισμού με ανθεκτικούς στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκους και τη χρήση κεφαλοσπορινών, εκτός της κεφπροξίλης και της κεφακλόρης, καθώς και τη χρήση μακρολιδών. Επίσης, η χρήση των μακρολιδών κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών προβλέπει την αντοχή στην ερυθρομυκίνη. Η ανάλυση σε ολόκληρο τον πληθυσμό που μελετήθηκε έδειξε ότι υπάρχει μία τάση, παρόλο που δεν έφτασε σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο, για εμφάνιση συσχέτισης ανάμεσα στη χρήση κεφαλοσπορινών, εκτός της κεφπροξίλης και της κεφακλόρης, και της φορείας ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών

πνευμονιόκοκκου. Η έκθεση στις πενικιλλίνες είχε μία ακόμη πιο ασθενή συσχέτιση από ότι αυτή που παρατηρήθηκε με τη χρήση κεφαλοσπορινών. Πρέπει να υπογραμμιστεί ότι οι κεφαλοσπορίνες και οι πενικιλλίνες επιλέγουν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου, όταν αυτά τα στελέχη εμφανίζουν και μειωμένη ευαισθησία στην πενικιλλίνη.

Οι επιδράσεις της αγωγής με μακρολίδες αντανakλούν κυρίως τη χρήση της κλαριθρομυκίνης, αφού σε 90% των σχημάτων με μακρολίδες, είχε χορηγηθεί κλαριθρομυκίνη. Η μορφή της αζιθρομυκίνης για τα παιδιά κυκλοφόρησε στην Ελλάδα μετά τον Ιούνιο του 2006. Η παρούσα μελέτη συμπληρώνει την υπάρχουσα βιβλιογραφία όσον αφορά την επίδραση των μακρολιδών στην πνευμονιοκοκκική φορεία, καθώς η αζιθρομυκίνη υπήρξε η συχνότερα χορηγούμενη μακρολίδη [164, 257-259]. Σε μια πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη πριν από την έναρξη του εμβολιασμού με το PCV7, παρουσιάστηκε μια συσχέτιση ανάμεσα στη χρήση αντιμικροβιακών στην κοινότητα και στη φορεία ανθεκτικών στις μακρολίδες ή πολυανθεκτικών στελεχών πνευμονιόκοκκου [259].

Οι από του στόματος χορηγούμενες κεφαλοσπορίνες, εκτός της κεφπροξίλης και της κεφακλόρης, μπορούν να προάγουν τη φορεία ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου, κυρίως με ελαττωμένη ευαισθησία και στην πενικιλλίνη. Η επίδρασή τους αντανakλά κυρίως την κεφουροξίμη αξετίλ, μια δεύτερης γενιάς κεφαλοσπορίνη. Σε αντίθεση, η κεφπροξίλη και η κεφακλόρη είχαν μια μη σημαντική επίδραση στο ποσοστό φορείας ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου. Αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες [257, 260], αλλά η παρούσα μελέτη παρατήρησης παρέχει την ευκαιρία να συγκρίνουμε την



επίδραση της κεφπροξίλης και της κεφακλόρης, καθώς και των άλλων κεφαλοσπορινών, στο ίδιο περιβάλλον και χρησιμοποιώντας ένα χρονικό διάστημα 3 μηνών. Σε μια προσπάθεια να προωθήσει τη συνετή χρήση των αντιμικροβιακών, η ελληνική κυβέρνηση έχει περιορίσει τη συνταγογράφηση των από του στόματος χορηγούμενων, ευρέως φάσματος, τρίτης γενιάς κεφαλοσπορινών, όπως η κεφιξίμη. Στη χώρα μας, η κεφδινίρη και η κεφτιμπουτένη δεν είναι επί του παρόντος διαθέσιμες. Η διαφορά στην επίδραση των ξεχωριστών κεφαλοσπορινών στη χλωρίδα του ρινοφάρυγγα αντανakλά κυρίως τις διαφορετικές τους MIC και το φαρμακοκινητικό/φαρμακοδυναμικό προφίλ [118].

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες μπορούν να ενισχύσουν το ποσοστό φορέας ανθεκτικών πνευμονιόκοκκων είτε εξαφανίζοντας τους ευαίσθητους μικροοργανισμούς είτε αυξάνοντας την απόκτηση ανθεκτικών στελεχών ή έχοντας συνδυασμένη ενέργεια. Αυτή η διπλή επίδραση των αντιμικροβιακών πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν παρουσιάζονται αναλύσεις για τους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη αντοχής στα αντιμικροβιακά [226]. Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στην εξαφάνιση των ευαίσθητων μικροοργανισμών. Βρήκαμε ότι και οι τρεις ομάδες αντιμικροβιακών παραγόντων που μελετήθηκαν (μακρολίδες, πενικιλίνες, και κεφαλοσπορίνες) σχετίζονταν με ελαττωμένη φορεία ευαίσθητων στην πενικιλίνη ή την ερυθρομυκίνη μικροοργανισμών. Η συμβολή της κεφπροξίλης και της κεφακλόρης στην κάθαρση των ευαίσθητων μικροοργανισμών ήταν σημαντική, αλλά ο βαθμός της επίδρασης ήταν μικρότερος από ότι των άλλων αντιμικροβιακών παραγόντων. Η ικανότητα να εξαφανίζουν τους ευαίσθητους μικροοργανισμούς έχει αναφερθεί κυρίως για

τις πενικιλλίνες και τις μακρολίδες [164, 261]. Για τις κεφαλοσπορίνες, αυτή η ικανότητα δεν παρουσιάζεται όμως συνέχεια [164, 260, 261].

Συνοπτικά, η μεγαλύτερη ελάττωση στη φορεία ανθεκτικών στην πενικιλλίνη ή την ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιόκοκκου, κυρίως αυτών που ανήκουν στους ορότυπους του PCV7, παρατηρήθηκε μεταξύ των εμβολιασμένων παιδιών που δεν είχαν εκτεθεί πρόσφατα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της φορείας ανθεκτικών στην πενικιλλίνη πνευμονιόκοκκων και της χρήσης κεφαλοσπορινών, εκτός της κεφπροξίλης και της κεφακλόρης, και μακρολιδών κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών. Επίσης, θετική συσχέτιση υπήρχε μεταξύ της φορείας ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκων και της χρήσης μακρολιδών κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 3 μηνών. Μία τάση υπήρχε, αν και μη σημαντική, υποδηλώνοντας ότι οι από του στόματος χορηγούμενες κεφαλοσπορίνες, εκτός της κεφπροξίλης και της κεφακλόρης, μπορούν επίσης να προάγουν τη φορεία ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη, πιο συχνά και με ελαττωμένη ευαισθησία στην πενικιλλίνη, πνευμονιόκοκκων.

Συμπερασματικά, η σειρά επιτηρήσεων μεταξύ παιδιών που παρακολουθούν παιδικούς σταθμούς στην Κεντρική Ελλάδα έδειξε ότι συμβαίνουν σημαντικές μεταβολές στην κατανομή των ορότυπων μετά την υψηλή εμβολιαστική κάλυψη με το PCV7. Οι ορότυποι που δεν ανήκουν στο PCV7 αντικατέστησαν αυτούς που ανήκουν στο PCV7. Η συχνότητα των ορότυπων που δεν ανήκουν στο PCV7 ποικίλλει σημαντικά από το ένα έτος στο άλλο. Επίσης, μια σημαντική αύξηση των στελεχών με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλλίνη συμπίπτει με σημαντική ελάττωση των στελεχών με υψηλού βαθμού αντοχή στην πενικιλλίνη. Τα επόμενα χρόνια, περαιτέρω μελέτες

επιτήρησης είναι απαραίτητες για να κατανοήσουμε πλήρως την επίδραση των συζευγμένων εμβολίων στην οικολογία του πνευμονιόκοκκου γενικά και στην αντοχή στα αντιμικροβιακά φάρμακα ειδικά και για να εξερευνήσουμε τη διαφορετική εμπλοκή τους στην ανάπτυξη νόσου. Συμπεραίνουμε ότι, για να αντιμετωπίσουμε τη φορεία και τη νόσο ανθεκτικών στην πενικιλίνη ή την ερυθρομυκίνη, συχνά πολυανθεκτικών, πνευμονιόκοκκων, ενέργειες για να ξεπεραστεί το ζήτημα της υψηλής κατανάλωσης αντιμικροβιακών, κυρίως των μακρολιδών, είναι κρίσιμες για την εισαγωγή βελτιωμένων στρατηγικών εμβολιασμού.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη των στελεχών πνευμονιόκοκκου που απομονώνονται από το ρινοφάρυγγα των παιδιών αντισταθμίζει την κατανομή των ορότυπων και την αντοχή των στελεχών που κυκλοφορούν στην κοινότητα και προκαλούν λοιμώξεις, ιδιαίτερα του αναπνευστικού συστήματος. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να εκτιμήσει την σύνθετη επίδραση του επταδύναμου συζευγμένου εμβολίου (PCV7) και των διάφορων ομάδων αντιμικροβιακών παραγόντων στον αποικισμό του ρινοφάρυγγα με ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά στελέχη πνευμονιόκοκκου μεταξύ του πληθυσμού των παιδικών σταθμών. Το PCV7 κυκλοφόρησε στην Ελλάδα τον Οκτώβριο του 2004, ενώ η Ελλάδα είναι μια χώρα με υψηλή κατανάλωση αντιμικροβιακών και υψηλό ποσοστό ανθεκτικών στελεχών πνευμονιόκοκκου. Μεταξύ Φεβρουαρίου του 2005 και Μαΐου του 2007, ελήφθη καλλιέργεια ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος από 1829 παιδιά ηλικίας 13-76 μηνών που παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς στην Κεντρική Ελλάδα. Το ποσοστό των παιδιών που παρακολουθούσαν παιδικό σταθμό και ήταν εμβολιασμένα με  $\geq 1$  δόσεις του συζευγμένου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου αυξήθηκε από 12.9% (2005) σε 32.6% (2006) και 70.1% (2007). Το 98% είχε εμβολιαστεί στο πλαίσιο προγράμματος αναπλήρωσης (catch-up). Από τα 1829 παιδιά τα οποία καταχωρήθηκαν στη μελέτη, 862 (47.1%) ήταν αποικισμένα με πνευμονιόκοκκο. Ένα στέλεχος πνευμονιόκοκκου απομονώθηκε από κάθε φορέα, με εξαίρεση 38 (4.4%) φορείς από τους οποίους απομονώθηκαν 2 διαφορετικά στελέχη. Αντοχή στην πενικιλίνη βρέθηκε σε 282 (31.3%) και αντοχή στην ερυθρομυκίνη σε 277 (30.8%) από τα 900 συνολικά στελέχη πνευμονιόκοκκου. Ταυτόχρονη αντοχή στην πενικιλίνη και στην

ερυθρομυκίνη παρατηρήθηκε σε 236 (26.2%) από τα 900 στελέχη πνευμονιόκοκκου. Ο εμβολιασμός με το PCV7 συσχετίστηκε με ελαττωμένη φορεία στελεχών πνευμονιόκοκκου με πλήρη αντοχή στην πενικιλίνη. Επίσης, συσχετίστηκε με ελαττωμένη φορεία ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών που ανήκαν στους ορότυπους του εμβολίου, αλλά όχι με συνολική ελάττωση του αποικισμού με ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου. Η μεγαλύτερη ελάττωση του αποικισμού με ανθεκτικά στελέχη πνευμονιόκοκκου, ιδιαίτερα αυτών που ανήκαν στους ορότυπους του PCV7, παρατηρήθηκε μεταξύ των εμβολιασμένων παιδιών που δεν είχαν εκτεθεί σε αντιμικροβιακά φάρμακα τους προηγούμενους 3 μήνες. Υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αποικισμού με ανθεκτικούς στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκους και τη χρήση κεφαλοσπορινών, εκτός της κεφπροζίλης και της κεφακλόρης, (προσαρμοσμένος λόγος αναλογιών [AOR]=2.59, 95% διάστημα εμπιστοσύνης [CI]=1.29-5.17), καθώς και τη χρήση μακρολιδών (AOR=2.03, 95% CI=1.34-3.08). Η έκθεση στις μακρολίδες, 90% κλαριθρομυκίνη, είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την αντοχή στην ερυθρομυκίνη (προσαρμοσμένος λόγος αναλογιών [AOR]=2.08, 95% διάστημα εμπιστοσύνης [CI]=1.38-3.12). Και οι τρεις ομάδες αντιμικροβιακών παραγόντων σχετίζονταν με ελαττωμένη φορεία ευαίσθητων στην πενικιλίνη και την ερυθρομυκίνη πνευμονιόκοκκων. Παρά τον αυξημένο εμβολιασμό με το PCV7, η χρήση των αντιμικροβιακών παραγόντων συνεχίζει να οδηγεί σε διασπορά ανθεκτικών πνευμονιόκοκκων στον πληθυσμό των παιδικών σταθμών.

## SUMMARY

Surveillance of nasopharyngeal isolates from children reflects the serotype distribution and resistance of strains circulating in the community and causing infections, particularly those of the respiratory system. The purpose of this study was to assess the complex interaction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) and individual classes of antimicrobial agents on the nasopharyngeal carriage of resistant pneumococci within the day-care center population. PCV7 became available in Greece in October 2004, whereas Greece is a country with high antibiotic consumption and high prevalence of resistant *Streptococcus pneumoniae*. Between February 2005 and May 2007, nasopharyngeal cultures were obtained from 1829 day-care center attendees, aged 13-76 months, in Central Greece. The proportion of attendees vaccinated with  $\geq 1$  doses of PCV7 increased from 12.9% (2005) to 32.6% (2006) and to 70.1% (2007); 98% had been immunized on toddler catch-up schedules. Of the 1829 children enrolled on the study, 862 (47.1%) were colonized with *S. pneumoniae*. A single pneumococcal isolate was recovered from each carrier, with the exception of 38 (4.4%) carriers, from whom two different isolates were recovered. Resistance to penicillin was found in 282 (31.3%) and resistance to erythromycin in 277 (30.8%) of a total of 900 *S. pneumoniae* isolates. Dual resistance to penicillin and erythromycin was observed in 236 (26.2%) of total isolates. PCV7 immunization was associated with decreased carriage of isolates with high resistance to penicillin and with decreased carriage of erythromycin-resistant PCV7 serotypes, but not with an overall decrease in erythromycin-resistant *S. pneumoniae* colonization. The largest decline in the carriage of resistant

pneumococci, particularly of PCV7 serotypes, was observed among vaccinated attendees who had not been exposed to antimicrobials within the preceding 3 months. A significant relationship existed between carriage of penicillin-resistant *S. pneumoniae* and the use of oral cephalosporins, other than cefprozil and cefaclor, (adjusted odds ratio [AOR]=2.59, 95% confidence interval [CI]=1.29-5.17), and the use of macrolides (AOR=2.03, 95% CI=1.34-3.08). Exposure to macrolides, 90% clarithromycin, significantly correlated with erythromycin resistance (AOR=2.08, 95% CI=1.38-3.12). All three classes of antibiotics were associated with reduced carriage of penicillin- and erythromycin-susceptible pneumococci. Despite the widespread PCV7 immunization, the antibiotic pressure continues to cause dissemination of resistant, commonly multidrug-resistant, pneumococci within the day-care center population.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Musher DM: *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases, 6th ed. New York, NY: Churchill Livingstone 2005; 2392-2407.
2. Gray BM: *Streptococcus pneumoniae* infections. In: Stevens DL, Kaplan EL, eds. Streptococcal infections: clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis, ed. 2000; 302-332.
3. Gray BM, Musher DM: The history of pneumococcal disease. In: Siber GR et al, eds. Pneumococcal vaccines: the impact of conjugate vaccine, ed. Washington, DC: ASM Press 2008; 3-17.
4. Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of discovery. Clin Infect Dis 1993; 17: 913-924.
5. Austrian R. Pneumococcus: the first one hundred years. Rev Infect Dis 1981; 3: 183-189.
6. Watson DA, Kapur V, Musher DM, Jacobson JW, Musser JM. Identification, cloning, and sequencing of DNA essential for encapsulation of *Streptococcus pneumoniae*. Curr Microbiol 1995; 31: 251-259.
7. Lomholt H. Evidence of recombination and an antigenically diverse immunoglobulin A1 protease among strains of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 1995; 63: 4238-4243.
8. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 1995; 33: 2759-2762.



9. Park IH, Pritchard DG, Cartee R, Brandao A, Brandileone MC, Nahm MH. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 2007; 45: 1225-1233.
10. Park IH, Park S, Hollingshead SK, Nahm MH. Genetic basis for the new pneumococcal serotype, 6C. Infect Immun 2007; 75: 4482-4489.
11. Jacobs MR, Bajaksouzian S, Bonomo RA, Good CE, Windau AR, Hujer AM, Massire C, Melton R, Blyn LB, Ecker DJ, Sampath R. Occurrence, distribution, and origins of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6C, a recently recognized serotype. J Clin Microbiol 2009; 47: 64-72.
12. Nunes S, Valente C, Sá-Leão R, de Lencastre H. Temporal trends and molecular epidemiology of recently described serotype 6C of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 2009; 47: 472-474.
13. Hermans PW, Blommaert M, Park IH, Nahm MH, Bogaert D. Low prevalence of recently discovered pneumococcal serotype 6C isolates among healthy Dutch children in the pre-vaccination era. Vaccine 2008; 26: 449-450.
14. Bratcher PE, Park IH, Hollingshead SK, Nahm MH. Production of a unique pneumococcal capsule serotype belonging to serogroup 6. Microbiology 2009; 155: 576-583.
15. Jin P, Kong F, Xiao M, Oftadeh S, Zhou F, Liu C, Russell F, Gilbert GL. First report of putative *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D among nasopharyngeal isolates from Fijian children. J Infect Dis 2009; 200: 1375-1380.
16. Bratcher PE, Kim K-H, Kang JH, Hong JY, Nahm MH. Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6D by genetics,

- biochemical and serological characterization. Microbiology 2010; 156: 555-560.
17. Satzke C, Ortika BD, Oftadeh S, Russell FM, Robins-Browne RM, Mulholland EK, Gilbert GL. Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* serogroup 6 isolates from Fijian children, including newly identified serotypes 6C and 6D. J Clin Microbiol 2010; 48: 4298-4300.
  18. Nahm MH, Oliver MB, Siira L, Kaijalainen T, Lambertsen LM, Virolainen A. A report of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D in Europe. J Med Microbiol 2011; 60: 46-48.
  19. Choi EH, Lee HJ, Cho EY, Oh CE, Eun BW, Lee J, Kim MJ. Prevalence and genetic structures of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D, South Korea. Emerg Infect Dis 2010; 16: 1751-1753.
  20. Mercado E, Srinivasan V, Hawkins P, Chochua S, Ochoa T, Beall B, McGee L. First report of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D in South America. J Clin Microbiol 2011; 49: 2080-2081.
  21. McEllistrem MC, Nahm MH. Novel pneumococcal serotypes 6C and 6D: anomaly or harbinger. Clin Infect Dis 2012; 1-8.
  22. Calix JJ, Nahm MH. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. J Infect Dis 2010; 202: 29-38.
  23. Sá-Leão R, Simões 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.

24. Bowers EF, Jeffries LR. Optochin in the identification of *Str. Pneumoniae*. J Clin Path 1955; 8: 58-60.
25. Kreger AS, Olsen RH, Talmadge MB. Altered diaphorase activity in optochin-resistant pneumococci. J Bacteriol 1968; 96: 1021-1028.
26. Kontiainen S, Sivonen A. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from blood and middle ear fluid. Eur J Clin Microbiol 1987; 6: 422-424.
27. Muñoz R, Fenoll A, Vicioso D, Casal J. Optochin-resistant variants of *Streptococcus pneumoniae*. Diagn Microbiol Infect Dis 1990; 13: 63-66.
28. Pikis A, Campos JM, Rodriguez WJ, Keith JM. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance, and clinical implications. J Infect Dis 2001; 184: 582-590.
29. Aguiar SI, Frias MJ, Santos L, Melo-Cristino J, Ramirez M, and the Portuguese surveillance group for the study of respiratory pathogens. Emergence of optochin resistance among *Streptococcus pneumoniae* in Portugal. Microbial Drug Resistance 2006; 12: 239-245.
30. Dias CA, Agnes G, Frazzon APG, Kruger FD, d'Azevedo PA, Carvalho MDGS, Facklam RR, Teixeira LM. Diversity of mutations in the *atpC* gene coding for the c subunit of F0F1 ATPase in clinical isolates of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Brazil. J Clin Microbiol 2007; 45: 3065-3067.
31. Nunes S, Sá-Leão R, de Lencastre H. Optochin resistance among *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing healthy children in Portugal. J Clin Microbiol 2008; 46: 321-324.

32. Cortes PR, Orio AGA, Regueira M, Piñas GE, Echenique J. Characterization of in vitro-generated and clinical optochin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Argentina. J Clin Microbiol 2008; 46: 1930-1934.
33. Austrian R. The quellung reaction, a neglected microbiologic technique. Mt Sinai J Med 1976; 43: 699-709.
34. Slotved HC, Kaltoft M, Skovsted IC, Kern MB, Espersen F. Simple, rapid latex agglutination test for serotyping of pneumococci (Pneumotest-Latex). J Clin Microbiol 2004; 31: 2097-2100.
35. Swenson JM, Hill BC, Thornsberry C. Screening pneumococci for penicillin resistance. J Clin Microbiol 1986; 24: 749-752.
36. Jacobs MR, Bajaksouzian S, Appelbaum PC, Bolmström A. Evaluation of the E-test for susceptibility testing of pneumococci. Diagn Microbiol Infect Dis 1992; 15: 473-478.
37. Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. Lancet Infect Dis 2004; 4: 144-154.
38. Gray BM, Converse GM III, Dillon HC Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of live. J Infect Dis 1980; 33: 2759-2762.
39. Klein JO. The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. Rev Infect Dis 1981; 3: 246-253.
40. Gray BM, Turner ME, Dillon HC Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: the effects of season and age on

pneumococcal acquisition and carriage in the first 24 months of live. Am J Epidemiol 1982; 116: 692-703.

41. Sleeman KL, Griffiths D, Shackley F, Diggle L, Gupta S, Maiden MC, Moxon ER, Crook DW, Peto TEA. Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. J Infect Dis 2006; 194: 682-688.
42. Melegaro A, Gay NJ, Medley GF. Estimating the transmission parameters of pneumococcal carriage in households. Epidemiol Infect 2004; 132: 433-441.
43. Gray BM, Dillon HC Jr. Epidemiologic 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: 948-955.
44. Ekdahl K, Ahlinder I, Hansson HB, Melander E, Mölsted S, Söderström M, Persson K. Duration of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: experiences from the South Swedish Pneumococcal Intervention Project. Clin Infect Dis 1997; 25: 1113-1117.
45. Greenberg D, Givon-Lavi N, Broides A, Blancovich I, Peled N, Dagan R. The contribution of smoking and exposure to tobacco smoke to *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* carriage in children and their mothers. Clin Infect Dis 2006; 42: 897-903.
46. Bogaert D, Engelen MN, Timmers-Reker AJM, Elzenaar KP, Peerbooms PGH, Coutinho RA, De Groot R, Hermans PWM. Pneumococcal carriage in children in The Netherlands: a molecular epidemiological study. J Clin Microbiol 2001; 39: 3316-3320.

47. Givon-Lavi N, Fraser D, Porat N, Dagan R. Spread of *Streptococcus pneumoniae* and antibiotic-resistant *S. pneumoniae* from day-care center attendees to their younger siblings. J Infect Dis 2002; 186: 1608-1614.
48. Shimada J, Yamanaka N, Hotomi M, Suzumoto M, Sakai A, Ubukata K, Mitsuda T, Yokota S, Faden H. Household transmission of *Streptococcus pneumoniae* among siblings with acute otitis media. J Clin Microbiol 2002; 40: 1851-1853.
49. Moore MR, Hyde TB, Hennessy TW, Parks DJ, Reasonover AL, Harker-Jones M, Gove J, Bruden DL, Rudolph K, Parkinson A, Butler JC, Schuchat A. Impact of a conjugate vaccine on community-wide carriage of nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in Alaska. J Infect Dis 2004; 190: 2031-2038.
50. Cardozo DM, Nascimento-Carvalho CM, Andrade ASS, Silvany-Neto AM, Daltro CHC, Brandão AP, Brandileone MC. Prevalence and risk factors for nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among adolescents. J Med Microbiol 2008; 57: 185-189.
51. McCormick AW, Whitney CG, Farley MM, Lynfield R, Harrison LH, Bennett NM, Schaffner W, Reingold A, Hadler J, Cieslak P, Samore MH, Lipsitch M. Geographic diversity and temporal trends of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States. Nat Med 2003; 9: 424-430.
52. Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, Davies TA, Katopodis GD, Appelbaum PC, Beratis NG. Antimicrobial use and colonization with erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Greece during the first 2 years of life. Clin Infect Dis 2000; 31: 887-893.

53. Syrjanen RK, Kilpi TM, Kaijalainen TH, Herva EE, Takala AK. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Finnish children younger than 2 years old. J Infect Dis 2001; 184: 451-459.
54. Levine OS, Farley M, Harrison LH, Lefkowitz L, McGeer A, Schwartz B and for the Active Bacterial Core Surveillance Team. Risk factors for invasive pneumococcal disease in children: a population-based case-control study in North America. Pediatrics 1999; 103: e28.
55. Yagupsky P, Porat N, Fraser D, Prajgrod F, Merires M, McGee L, Klugman KP, Dagan R. 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: 1003-1012.
56. Kim PE, Musher MD, Glezen WP, Rodriguez-Barradas MC, Nahm WK, Wright CE. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution and isolation of respiratory viruses. Clin Infect Dis 1996; 22: 100-106.
57. Gray BM, Dillon HC Jr. Clinical and epidemiologic studies of pneumococcal infection in children. Pediatr Infect Dis J 1986; 5: 201-207.
58. Wong WY, Overturf GD, Powars DR. Infection caused by *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease: epidemiology, immunologic mechanisms, prophylaxis, and vaccination. Clin Infect Dis 1992; 14: 1124-1136.
59. Mao C, Harper M, McIntosh K, Reddington C, Cohen JR, Caldwell B, Hsu HW. Invasive pneumococcal infections in human immunodeficiency virus-infected children. J Infect Dis 1995; 173: 870-876.

60. Davidson M, Parkinson AJ, Bulkow LR, Fitzgerald MA, Peters HV, Parks DJ. The epidemiology of invasive pneumococcal disease in Alaska, 1986-1990 – ethnic differences and opportunities for prevention. *J Infect Dis* 1994; 170: 368-376.
61. Torzillo P, Hanna JN, Morey F, Gratten M, Dixon J, Erlich J. Invasive pneumococcal disease in central Australia. *Med J Aust* 1995; 162: 182-186.
62. Trotman J, Hughes B, Mollison L. Invasive pneumococcal disease in central Australia. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1553-1556.
63. Burman LA, Norrby R, Trollfors B. Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors, and prognosis. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 133-142.
64. Breiman RF, Spika JS, Navarro VJ, Darden PM, Darby CP. Pneumococcal bacteremia in Charleston County, South Carolina: a decade later. *Arch Intern Med* 1990; 150: 1401-1405.
65. Venetz I, Schopfer K, Mühlemann K, Swiss pneumococcal study group. Paediatric invasive pneumococcal disease in Switzerland, 1985-1994. *Int J Epidemiol* 1998; 27: 1101-1104.
66. Rendi-Wagner P, Georgopoulos A, Kundi M, Mutz I, Mattauch M, Nowak J, Mikolasek A, Vecsei A, Kollaritsch H. Prospective surveillance of incidence, serotypes and antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* among hospitalized children in Austria. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 826-831.
67. Díez-Domingo J, Pereiró I, Gimeno C, Lerma M, Oyagüez I, González A, Group for the study of invasive diseases. Epidemiology of invasive



- Streptococcus pneumoniae* infections in children in Spain, 1996-1998. J Infect Dis 2002; 45: 139-143.
68. Kyaw MH, Clarke S, Jones IG, Campbell H. Incidence of invasive pneumococcal disease in Scotland, 1988-99. Epidemiol Infect 2002; 128: 139-147.
69. Eskola J, Takala AK, Kela E, Pekkanen E, Kalliokoski R, Leinonen M. Epidemiology of invasive pneumococcal infections in children in Finland. JAMA 1992; 268: 3323-3327.
70. Vergison A, Tuerlinckx D, Verhaegen J, Malfroot A. Epidemiologic features of invasive pneumococcal disease in Belgian children: passive surveillance is not enough. Pediatrics 2006; 118: e801-e809.
71. Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, Barrett NL, Pass M, Lexau C, Damaske B, Stefonek K, Barnes B, Patterson J, Zell ER, Schuchat A, Whitney CG. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. JAMA 2001; 285: 1729-1735.
72. Zangwill KM, Vadheim CM, Vannier AM, Hemenway LS, Greenberg DP, Ward JI. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in southern California: implications for the design and conduct of a pneumococcal conjugate vaccine efficacy trial. J Infect Dis 1996; 174: 752-759.
73. O'Brien KL, Shaw J, Weatherholtz R, Reid R, Watt J, Croll J, Dagan R, Parkinson AJ, Santosham M. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* among Navajo children in the era before use of conjugate pneumococcal vaccines, 1989-1996. Am J Epidemiol 2004; 160: 270-278.

74. Bennett NM, Buffington J, LaForce FM. Pneumococcal bacteremia in Monroe County, New York. *Am J Public Health* 1992; 82: 1513-1516.
75. Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 83-93.
76. Orange M, Gray BM. Pneumococcal serotypes causing disease in children in Alabama. *Pediatr Infect Dis J* 1993; 12: 244-246.
77. Porat N, Greenberg D, Givon-Lavi N, Shuval DS, Trefler R, Segev O, Hanage WP, Dagan R. The important role of nontypable *Streptococcus pneumoniae* international clones in acute conjunctivitis. *J Infect Dis* 2006; 194: 689-696.
78. Carvalho MGS, Steigerwalt AG, Thompson T, Jackson D, Facklam RR. Confirmation of nontypeable *Streptococcus pneumoniae*-like organisms isolated from outbreaks of epidemic conjunctivitis as *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4415-4417.
79. Krivan HC, Roberts DD, Ginsberg V. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc $\beta$ 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6157-6161.
80. Sundberg-Kövamees M, Holme T, Sjögren A. Interaction of the C-polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* with the receptor asialo-GM1. *Microb Pathog* 1996; 21: 223-234.
81. Weiser JN, Markiewicz Z, Tuomanen EI, Wani JH. Relationship between phase variation in colony morphology, intrastrain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1996; 64: 2240-2245.

82. Cundell DR, Weiser JN, Shen J, Young A, Tuomanen EI. Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 1995; 63: 757-761.
83. Andersson B, Eriksson B, Falsen E, Fogh A, Hanson LA, Nylen O, Peterson H, Svanborg Eden C. Adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal epithelial cells *in vitro*: differences in adhesive capacity among strains isolated from subjects with otitis media, septicemia, or meningitis or from healthy carriers. Infect Immun 1981; 32: 311-317.
84. Boulnois GJ. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. J Gen Microbiol 1992; 138: 249-259.
85. Paton JC, Berry AM, Lock RA. Molecular analysis of putative pneumococcal virulence proteins. Microb Drug Resist 1997; 3: 1-10.
86. Rubins JB, Duane PG, Charboneau D, Janoff EN. Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells *in vitro*. Infect Immun 1992; 60: 1740-1746.
87. Paton JC, Rowan-Kelly B, Ferrante A. Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. Infect Immun 1984; 43: 1085-1087.
88. Houldsworth S, Andrew PW, Mitchell TJ. Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 $\beta$  by human mononuclear phagocytes. Infect Immun 1994; 62: 1501-1503.
89. Jedrzejewski MJ. Pneumococcal virulence factors: structure and function. Microbiol Mol Biol Rev 2001; 65: 187-207.

90. Boulnois GJ, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew PW. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 1991; 5: 2611-2616.
91. Paton JC. The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. Trends in Microbiology 1996; 4: 103-106.
92. Rubins JB, Janoff EN. Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. J Lab Clin Med 1998; 131: 21-27.
93. Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, Mitchell TJ. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: The role of pneumococcal proteins. Annu Rev Microbiol 1993; 47: 89-115.
94. Crain MJ, Waltman WD, Turner JS II, Yother J, Talkington DE, McDaniel LM, Gray BM, Briles DE. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immunol 1990; 58: 3293-3299.
95. Talkington DF, Crimmins DL, Voellinger DC, Yother J, Briles DE. A 43-kilodalton pneumococcal surface protein, PspA: Isolation, protective abilities and structural analysis of the amino terminal sequence. Infect Immun 1991; 59: 1285-1289.
96. 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 capsular type. Infect Immunol 1991; 59: 222-228.

97. Berry AM, Lock RA, Hansman D, Paton JC. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 1989; 57: 2324-2330.
98. Jedrzejewski MJ, Mello LV, de Groot BL, Li S. Mechanism of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. Structures of complexes with the substrate. J Biol Chem 2002; 277: 28287-28297.
99. Winkelstein JA, Tomasz A. Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal cell wall teichoic acid. J Immunol 1978; 120: 174-178.
100. Hummell DS, Swift AJ, Tomasz A, Winkelstein JA. Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal lipoteichoic acid. Infect Immun 1985; 47: 384-387.
101. Winkelstein JA, Bocchini JA Jr, Schiffman G. The role of the capsular polysaccharide in the activation of the alternative pathway by the pneumococcus. J Immunol 1976; 116: 367-370.
102. Bruyn GAW, Zegers BJM, van Furth R. Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. Clin Infect Dis 1992; 14: 251-262.
103. Musher DM, Chapman AJ, Goree A, Jonsson S, Briles D, Baughn RE. Natural and vaccine-related immunity to *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1986; 154: 245-256.
104. Musher DM, Groover JE, Watson DA, Pandey JP, Rodriguez-Barradas MC, Baughn RE, Pollack MS, Graviss EA, de Andrade M, Amos CI. Genetic regulation of the capacity to make immunoglobulin G to pneumococcal capsular polysaccharides. J Invest Med 1997; 45: 57-68.

105. Gray BM, Polhill RB, Reynolds DW. Antibodies to *Streptococcus pneumoniae* in sera and secretions of mothers and their infants. *Adv Exp Med Biol* 1991; 310: 331-341.
106. Andersson I, Rosen V, Håkansson A, Aniansson G, Hansson C, Anderson B, Nylén O, Sabharwal H, Svanborg C. Antibodies to pneumococcal polysaccharides in human milk: lack of relationship to colonization and acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 498-507.
107. Nieminen T, Virolainen A, Käyhty H, Jero J, Karma P, Leinonen M, Eskola J. Antibody-secreting cell and their relation to humoral antibodies in serum and in nasopharyngeal aspirates in children with pneumococcal acute otitis media. *J Infect Dis* 1995; 173: 136-141.
108. Janoff EN, O'Brien J, Thompson P, Ehret J, Meiklejohn G, Duvall G, Douglas JM Jr. *Streptococcus pneumoniae* colonization, bacteremia, and immune response among persons with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1993; 167: 49-56.
109. Block S, Harrison CJ, Hedrick J, Tyler RD, Smith RA, Keegan E, Chartrand SA. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in acute otitis media: risk factors, susceptibility patterns and antimicrobial management. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 751-759.
110. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y, and Tonawanda/Williamsville Pediatrics. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *J Infect Dis* 1997; 175: 1440-1445.

111. Baraff LJ, Lee SI, Schriger DL. Outcomes of bacterial meningitis in children: a meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J* 1993; 12: 389-394.
112. Byington CL, Korgenski K, Daly J, Ampofo K, Pavia A, Mason EO. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal parapneumopnic empyema. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: 250-254.
113. Jacobs NM. Pneumococcal osteomyelitis and arthritis in children. *Am J Dis Child* 1991; 145: 70-74.
114. Feld LG, Springate JE Jr, Darraugh R, Fildes RD. Pneumococcal pneumonia and hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 1987; 6: 693-695.
115. Hoffman JA, Mason EO, Schutze GE, Tan TQ, Barson WJ, Givner LB, Wald ER, Bradley JS, Yogev R, Kaplan SL. *Streptococcus pneumoniae* infections in the neonate. *Pediatrics* 2003; 112: 1095-1102.
116. Jacobs MR, Dagan R. Antimicrobial resistance among pediatric respiratory tract infections: clinical challenges. *Sem Pediatr Infect Dis* 2004; 15: 5-20.
117. Jacobs MR, Bajaksouzian S, Zilles A, Lin G, Pankuch GA, Appelbaum PC. Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacodynamic parameters: 1997 U.S. surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1901-1908.
118. Jacobs MR, Bajaksouzian S, Windau A, Good CE, Lin G, Pankuch GA, Appelbaum PC. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* to 17 oral antimicrobial

- agents based on pharmacodynamic parameters: 1998-2001 U.S. surveillance study. *Clin Lab Med* 2004; 24: 503-530.
119. Peric M, Browne FA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Activity of nine oral agents against gram-positive and gram-negative bacteria encountered in community-acquired infections: use of pharmacokinetic/pharmacodynamic breakpoints in the comparative assessment of beta-lactam and macrolide antimicrobial agents. *Clinical Therapeutics* 2002; 169-177.
120. Sader HS, Jacobs MR, Fritsche TR. Review of the spectrum and potency of orally administered cephalosporins and amoxicillin/clavulanate. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 5S-12S.
121. Jacobs MR. Increasing antibiotic resistance among otitis media pathogens and their susceptibility to oral agents based on pharmacodynamic parameters. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: S47-S56.
122. Felmingham D, Farrell DJ, Reinert RR, Morrissey I. Antibacterial resistance among children with community-acquired respiratory tract infections (PROTEKT 1999-2000). *J Infect* 2004; 48: 39-55.
123. Jacobs MR. Worldwide trends in antimicrobial resistance among common respiratory tract pathogens in children. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: S109-S119.
124. Goossens H, Ferech M, Coenen S, Stephens P, and the European Surveillance of Antimicrobial Consumption Project Group. Comparison of outpatient systemic antibacterial use in 2004 in the United States and 27 European countries. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1091-1095.



125. Pletz MWR, McGee L, Welte T: Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. In: Suttorp N, Welte T, Marre R, eds. Community-acquired pneumonia, ed. 2007; 57-72.
126. Smith AM, Klugman KP. Alterations in penicillin-binding protein 2B from penicillin-resistant wild-type strains of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 859-867.
127. Smith AM, Klugman KP, Coffey TJ, Spratt BG. Genetic diversity of penicillin-binding protein 2B and 2X genes from *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 1938-1944.
128. Coffey TJ, Dowson CG, Daniels M, Spratt BG. Genetics and molecular biology of beta-lactam-resistant pneumococci. Microb Drug Resist 1995; 1: 29-34.
129. McDougal LK, Rasheed JK, Biddle JW, Tenover FC. Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2282-2288.
130. Jones RN, Jacobs MR, Sader HS. Evolving trends in *Streptococcus pneumoniae* resistance: implications for therapy of community-acquired bacterial pneumonia. International J Antimicrobial Agents 2010; 36: 197-204.
131. Dowson CG, Coffey TJ, Kell C, Whiley RA. 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: 635-643.

132. Soares S, Kristinsson KG, Musser JM, Tomasz A. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. J Infect Dis 1993; 168: 158-163.
133. Fenoll A, Martín Bourgon C, Muñóz R, Vicioso D, Casal J. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989. Rev Infect Dis 1991; 13: 56-60.
134. Marton A, Gulyas M, Muñóz R, Tomasz A. Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. J Infect Dis 1991; 163: 542-548.
135. Friedland IR, Klugman KP. Antibiotic-resistant pneumococcal disease in South African children. Am J Dis Child 1992; 146: 920-923.
136. Edelstein PH. Pneumococcal resistance to macrolides, lincosamides, ketolides, and streptogramin B agents: molecular mechanisms and resistance phenotypes. Clin Infect Dis 2004; 38 (Suppl 4): S322-327.
137. Al-Lahham A, Appelbaum PC, van der Linden M, Reinert RR. Telithromycin-nonsusceptible clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from Europe. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 3897-3900.
138. McGee L, Klugman KP, Wasas A, Capper T, Brink A. Serotype 19F multiresistant pneumococcal clone harboring two erythromycin resistance determinants (erm(B) and mef(A)) in South Africa. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1595-1598.

139. Farrell DJ, Jenkins SG, Brown SD, Patel M, Lavin BS, Klugman KP. Emergence and spread of *Streptococcus pneumoniae* with *erm*(B) and *mef*(A) resistance. *Emerging Infect Dis* 2005; 11: 851-858.
140. Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US years 1-4. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008; 7: 1-11.
141. Farrell DJ, Jenkins SG. Distribution across the USA of macrolide resistance and macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolates collected from patients with respiratory tract infections: PROTEKT US 2001-2002. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54 Suppl: i17-22.
142. Gay K, Baughman W, Miller Y, Jackson D, Whitney CG, Schuchat A, Farley MM, Tenover F, Stephens DS. The emergence of *Streptococcus pneumoniae* resistant to macrolide antimicrobial agents: a 6-year population-based assessment. *J Infect Dis* 2000; 182: 1417-1424.
143. Hyde TB, Gay K, Stephens DS, Vugia DJ, Pass M, Johnson S, Barrett NL, Schaffner W, Cieslak PR, Maupin PS, Zell ER, Jorgensen JH, Facklam RR, Whitney CG; Active Bacterial Core Surveillance/Emerging Infections Program Network. Macrolide resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates. *JAMA* 2001; 286: 1857-1862.
144. Canton R, Morosini M, Enright MC, Morrissey I. Worldwide incidence, molecular epidemiology and mutations implicated in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from the global PROTEKT surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 944-952.

145. Chen DK, McGeer A, de Azavedo JC, Low DE. Canadian Bacterial Surveillance Network. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. N Engl J Med 1999; 341: 233-239.
146. Ho PL, Yung RWH, Tsang DNC, Que TL, Ho M, Seto WH, Ng TK, Yan WC, Ng WWS. Increasing resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones: results of a Hong-Kong multicentre study in 2000. J Antimicrob Chemother 2001; 48: 659-665.
147. Gillis LM, White HD, Whitehurst A, Sullivan DC. Vancomycin-tolerance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Mississippi during 1999-2001. Am J Med Sci 2005; 330: 65-68.
148. Sung H, Shin HB, Kim M-N, Lee K, Kim E-C, Song W, Jeong SH, Lee W-G, Park Y-J, Eliopoulos GM. Vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* in Korea. J Clin Microbiol 2006; 44: 3524-3528.
149. Wolter N, Smith AM, Farrell DJ, Schaffner W, Moore M, Whitney CG, Jorgensen JH, Klugman KP. Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3554-3557.
150. Jones RN, Farrell DJ, Morrissey I. Quinupristin-dalfopristin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: novel L22 ribosomal protein mutation in two clinical isolates from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2696-2698.
151. Block SL, Harrison CJ, Hedrick JA, Tyler RD, Smith RA, Keegan E, Chartrand SA. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in acute

- otitis media: risk factors, susceptibility patterns and antimicrobial management. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 751-759.
152. Bédos J-P, Chevret S, Chastang C, Geslin P, Régnier B; French Cooperative Pneumococcus Study Group. Epidemiological features and risk factors for infection by *Streptococcus pneumoniae* strains with diminished susceptibility to penicillin: findings of a French survey. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 63-72.
153. Reichler MR, Allphin AA, Breiman RF, Schreiber JR, Arnold JE, McDougal LK, Facklam RR, Boxerbaum B, May D, Walton RO, Jacobs MR. The spread of multiply resistant *Streptococcus pneumoniae* at a day care center in Ohio. *J Infect Dis* 1992; 166: 1346-1353.
154. Clavo-Sánchez AJ, Girón-González JA, López-Prieto D, Canueto-Quintero J, Sánchez-Porto A, Vergara-Campos A, Marín-Casanova P, Córdoba-Doña JA. Multivariate analysis of risk factors for infection due to penicillin-resistant and multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: a multicenter study. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1052-1059.
155. De Lencastre H, Tomasz A. From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centres and drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 75-81.
156. Cohen R, Levy C, de la Rocque F, Gelbert N, Wollner A, Fritzell B, Bonnet E, Tetelboum R, Varon E. 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.

157. Hanage WP, Huang SS, Lipsitch M. Diversity and antibiotic resistance among nonvaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* carriage in the post-heptavalent conjugate vaccine era. *J Infect Dis* 2007; 195: 347-352.
158. Finkelstein JA, Huang SS, Daniel J, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Goldmann D, Pelton SI, DeMaria A, Platt R. Antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine era: predictors of carriage in a multicomunity sample. *Pediatrics* 2003; 112: 862-869.
159. Guillemot D, Carbon C, Balkau B, Geslin P, Lecoœur H, Vauzelle-Kervroëdan F, Bouvenot G, Eschwège E. Low dosage and long treatment duration of b-lactam. Risk factors for carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *JAMA* 1998; 279: 365-370.
160. Bergman M, Huikko S, Huovinen P, Paakkari P, Seppälä H; Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance (FiRe Network). Macrolide and azithromycin use are linked to increased macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3646-3650.
161. Dagan R, Givon-Lavi N, Leibovitz E, Greenberg D, Porat N. Introduction and proliferation of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A clones that cause acute otitis media in an unvaccinated population. *J Infect Dis* 2009; 199: 776-785.
162. Dagan R, Barkai G, Givon-Lavi N, Sharf AZ, Vardy D, Cohen T, Lipsitch M, Greenberg D. Seasonality of antibiotic-resistant *Streptococcus*

- pneumoniae* that causes acute otitis media: a clue for an antibiotic-restriction policy? J Infect Dis 2008; 197: 1094-1102.
163. Lipsitch M, Samore MH. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. Emerg Infect Dis 2002; 8: 347-354.
  164. Samore MH, Lipsitch M, Alder SC, Haddadin B, Stoddard G, Williamson J, Sebastian K, Carroll K, Ergonul O, Carmeli Y, Sande MA. Mechanisms by which antibiotics promote dissemination of resistant pneumococci in human populations. Am J Epidemiol 2006; 163: 160-170.
  165. Broome CV, Facklam RR. Epidemiology of clinically significant isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. Rev Infect Dis 1981; 3: 277-281.
  166. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, Rastogi SC, Schiffman G, Henrichsen J, Mäkelä PH, Broome CV, Facklam RR, Tiesjema RH, Parke JC Jr. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. J Infect Dis 1983; 148: 1136-1159.
  167. Mufson M, Krause H, Schiffman G, Hughey DF. Pneumococcal antibody levels one decade after immunization of healthy adults. Am J Med Sci 1987; 293: 279-284.
  168. Shapiro ED, Berg AT, Austrian R, Schroeder D, Parcells V, Margolis A, Adair RK, Clemens JD. The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. N Engl J Med 1991; 325: 1453-1460.
  169. Fine MJ, Smith MA, Carson CA, Meffe F, Sankey SS, Weissfeld LA, Detsky AS, Kapoor WN. Efficacy of pneumococcal vaccination in adults. A

meta-analysis of randomized controlled trials. Arch Intern Med 1994; 154: 2666-2677.

170. Ahman H, Käyhty H, Lehtonen H, Leroy O, Froeschle J, Eskola J. *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine is immunogenic in early infancy and able to induce immunologic memory. Pediatr Infect Dis J 1998; 17: 211-216.
171. Butler JC, Breiman RF, Lipman HB, Hofmann J, Facklam RR. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* among preschool children in the United States, 1978-1994: implications for development of a conjugate vaccine. J Infect Dis 1995; 171: 885-889.
172. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, Reingold A, Cieslak PR, Pilishvili T, Jackson D, Facklam RR, Jorgenson JH, Schuchat A. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. N Engl J Med 2003; 348: 1737-1746.
173. Hennessy TW, Singleton RJ, Bulkow LR, Bruden DL, Hurlburt DA, Parks D, Moore M, Parkinson AJ, Schuchat A, Butler JC. Impact of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on invasive disease, antimicrobial resistance and colonization in Alaska Natives: progress towards elimination of a healthy disparity. Vaccine 2005; 23: 5464-5473.
174. Lexau CA, Lynfield R, Danila R, Pilishvili T, Facklam R, Farley MM, Harrison LH, Schaffner W, Reingold A, Bennett NM, Hadler J, Cieslak PR, Whitney CG; Active Bacterial Core Surveillance Team. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease among older adults in



- the era of pediatric pneumococcal conjugate vaccine. *JAMA* 2005; 294: 2043-2051.
175. Kaplan SL, Mason EO Jr, Wald ER, Schutze GE, Bradley JS, Tan TQ, Hoffman JA, Givner LB, Yogev R, Barson WJ. Decrease of invasive pneumococcal infections among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* 2004; 113: 443-449.
176. Poehling KA, Talbot TR, Griffin MR, Craig AS, Whitney CG, Zell E, Lexau CA, Thomas AR, Harrison LH, Reingold AL, Hadler JL, Farley MM, Anderson BJ, Schaffner W. Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *JAMA* 2006; 295: 1668-1674.
177. Grijalva CG, Nuorti JP, Arbogast PG, Martin SW, Edwards KM, Griffin MR. Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunization with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis. *Lancet* 2007; 369: 1179-1186.
178. Whitney CG, Pilishvili T, Farley MM, Schaffner W, Craig AS, Lynfield R, Nyquist A, Gershman KA, Vazquez M, Bennett NM, Reingold A, Thomas A, Glode MP, Zell ER, Jorgensen JH, Beall B, Schuchat A. Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case-control study. *Lancet* 2006; 368:1495-1502.
179. Rückinger S, van der Linden M, Reinert RR, von Kries R. Efficacy of 7-valent pneumococcal conjugate vaccination in Germany: an analysis using the indirect cohort method. *Vaccine* 2010; 28: 5012-5016.

180. Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Reingold A, Thomas A, Schaffner W, Craig AS, Smith PJ, Beall BW, Whitney GC, Moore MR, for the Active Bacterial Core Surveillance/Emerging Infections Program Network. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis* 2010; 201: 32-41.
181. Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, Elvin L, Ensor KM, Hackell J, Siber G, Malinoski F, Madore D, Chang I, Kohberger R, Watson W, Austrian R, Edwards K, and the Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 16: 187-195.
182. Fireman B, Black SB, Shinefield HR, Lee J, Lewis E, Ray P. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 10-16.
183. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, Jokinen J, Haapakoski J, Herva E, Takala A, Käyhty H, Karma P, Kohberger R, Siber G, Mäkelä H; for the Finnish Otitis Media Study Group. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001; 344: 403-409.
184. Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Greenberg D, Abramson O, Mendelman PM, Bohidar N, Yagupsky P. Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. *J Infect Dis* 1996; 174: 1271-1278.

185. O'Brien KL, Millar EV, Zell ER, Bronsdon M, Weatherholtz R, Reid R, Becenti J, Kvamme S, Whitney CG, Santosham M. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization among immunized and unimmunized children in a community-randomized trial. *J Infect Dis* 2007; 196: 1211-1220.
186. Millar EV, O'Brien KL, Watt JP, Bronsdon MA, Dallas J, Whitney CG, Reid R, Santosham M. Effect of community-wide conjugate pneumococcal vaccine use in infancy on nasopharyngeal carriage through 3 years of age: a cross-sectional study in a high-risk population. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 8-15.
187. Kellner J, Scheifele D, Vanderkooi OG, MacDonald J, Church DL, Tyrrell GJ. Effects of routine infant vaccination with the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* in children in Calgary, Canada. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27: 526-532.
188. Roca A, Hill P, Townend J, Egere U, Antonio M, Bojang A, Akisanya A, Litchfield T, Nsekpong DE, Oluwalana C, Howle SRC, Greenwood B, Adegbola RA. Effects of community-wide vaccination with PCV-7 on pneumococcal nasopharyngeal carriage in the Gambia: a cluster-randomized trial. *PLoS Med* 2011; 8: e1001107.
189. Kellner JD, Vanderkooi OG, MacDonald J, Church DL, Tyrrell GJ, Scheifele DW. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease in Canada, 1998-2007: update from the Calgary-Area *Streptococcus pneumoniae* Research (CASPER) study. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 205-212.

190. Roca A, Dione MM, Bojang A, Townend J, Egere U, Darboe O, Howle SRC, Hill PC, Adegbola RA, Greenwood BM, Antonio M. Nasopharyngeal carriage of pneumococci four years after community-wide vaccination with PCV-7 in the Gambia: long-term evaluation of a cluster randomized trial. *PLoS Med* 2013; 8: e72198.
191. Cheung YB, Zaman SM, Nsekpong ED, Van Beneden CA, Adegbola RA, Greenwood B, Cutts FT. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian children who participated in a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine trial and in their younger siblings. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28: 990-995.
192. Hanage WP, Finkelstein JA, Huang SS, Pelton SI, Stevenson AE, Kleinman K, Hinrichsen VL, Fraser C. Evidence that pneumococcal serotype replacement in Massachusetts following conjugate vaccination is now complete. *Epidemics* 2010; 2: 80-84.
193. van Gils EJ, Veenhoven RH, Hak E, Rodenburg GD, Keijzers WC, Bogaert D, Trzcinski K, Bruin JP, van Alphen L, van der Ende A, Sanders EAM. Pneumococcal conjugate vaccination and nasopharyngeal acquisition of pneumococcal serotype 19A strains. *JAMA* 2010; 304: 1099-1106.
194. Singleton RJ, Hennessy TW, Bulkow LR, Hammitt LL, Zulz T, Hurlburt DA, Butler JC, Rudolph K, Parkinson A. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among Alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. *JAMA* 2007; 297: 1784-1792.

195. Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS, Jackson D, Thomas A, Beall B, Lynfield R, Reingold A, Farley MM, Whitney CG, for the Active Bacterial Core Surveillance Program of the Emerging Infections Program Network. 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.
196. Ghaffar F, Barton T, Lozano J, Muniz LS, Hicks P, Gan V, Ahmad N, McCracken GH Jr. Effect of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in the first 2 years of life. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 930-938.
197. Messina AF, Katz-Gaynor K, Barton T, Ahmad N, Ghaffar F, Rasko D, McCracken GH Jr. 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.
198. Pelton SI, Huot H, Finkelstein JA, Bishop CJ, Hsu KK, Kellenberg J, Huang SS, Goldstein R, Hanage HP. 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.
199. Revai K, McCormick DP, Patel J, Grady JJ, Saeed K, Chonmaitree T. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal bacterial colonization during acute otitis media. *Pediatrics* 2006; 117: 1823-1829.

200. Flasche S, Van Hoek AJ, Sheasby E, Waight P, Andrews N, Sheppard C, George R, Miller E. Effect of pneumococcal conjugate vaccination on serotype-specific carriage and invasive disease in England: a cross-sectional study. *PLoS Med* 2011; 8: e1001017.
201. Vestrheim DF, Høiby EA, Aaberge IS, Caugant DA. Impact of a pneumococcal conjugate vaccination program on carriage among children in Norway. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 325-334.
202. Rodenburg GD, de Greeff SC, Jansen AGCS, de Melker HE, Schouls LM, Hak E, Spanjaard L, Sanders EAM, van der Ende A. Effects of pneumococcal conjugate vaccine 2 years after its introduction, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 816-823.
203. Aristegui J, Bernaola E, Pocheville I, García C, Arranz L, Durán G, Pérez L, Bastida M, Canduela C, Herranz Aguirre M, Garrote E, Fletcher MA, Pérez C. Reduction in pediatric invasive pneumococcal disease in the Basque Country and Navarre, Spain, after introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 303-310.
204. Pérez-Trallero E, Marimon JM, Ercibengoa M, Vicente D, Pérez-Yarza EG. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in children and older adults in the north of Spain before and after the introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 731-738.
205. Muñoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, Latorre C, Garcia-Garcia JJ, Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by

- nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. Clin Infect Dis 2008; 46: 174-182.
206. Lepoutre A, Varon E, Georges S, Gutmann L, Lévy-Bruhl D. Impact of infant pneumococcal vaccination on invasive pneumococcal diseases in France, 2001-2006. Euro Surveill 2008; 13: pii: 18962.
207. Dias R, Caniça M. Invasive pneumococcal disease in Portugal prior to and after the introduction of pneumococcal heptavalent conjugate vaccine. Immunol Med Microbiol 2007; 51: 35-42.
208. DeCarvalho Gomes H, Muscat M, Monnet DL, Giesecke J, Lopalco PL. Use of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) in Europe, 2001-2007. Euro Surveill 2009; 14: pii: 19159.
209. Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, Giménez MJ, Aragonese-Fenoll L, Hanquet G, Casal J, Tarragó D. Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. J Clin Microbiol 2009; 47: 1012-1020.
210. Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, Craig AS, Hadler J, Reingold A, Thomas AR, Harrison LH, Bennett NM, Farley MM, Facklam RR, Jorgensen JH, Besser J, Zell ER, Schuchat A, Whitney CG, for Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. N Engl J Med 2006; 354: 1455-1463.

211. 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: 532-539.
212. Talbot TR, Poehling KA, Hartert TV, Arbogast PG, Halasa NB, Ed M, Schaffner W, Craig AS, Edwards KM, Griffin MR. Reduction in high rates of antibiotic-nonsusceptible invasive pneumococcal disease in Tennessee after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 641-648.
213. Mbelle N, Huebner RE, Wasas AD, Kimura A, Chang I, Klugman KP. Immunogenicity and impact on nasopharyngeal carriage of a nonavalent pneumococcal conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1999; 180: 1171-1176.
214. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Lexau C, Reingold A, Lefkowitz L, Cieslak PR, Cetron M, Zell ER, Jorgensen JH, Schuchat A, for the Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000; 343: 1917-1924.
215. 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: e408-413.
216. Käyhty H, Ahman H, Eriksson K, Sörberg M, Nilsson L. Immunogenicity and tolerability of a heptavalent pneumococcal conjugate vaccine administered at 3, 5 and 12 months of age. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 108-114.



217. Shao PL, Lu CY, Chang LY, Huang FY, Lee CY, Hsueh PR, Huang LM. Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine booster in Taiwanese toddlers. *J Formos Med Assoc* 2006; 105: 542-549.
218. Shao PL, Lu CY, Chang LY, Huang FY, Wang CY, Yang CY, Wu TZ, Lee CY, Huang LM. Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in Taiwanese infants. *J Formos Med Assoc* 2004; 103: 613-617.
219. O'Brien KL, Moulton LH, Reid R, Weatherholtz R, Oski J, Brown L, Kumar G, Parkinson A, Hu D, Hackell J, Chang I, Kohberger R, Siber G, Santosham M. Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal vaccine in American Indian children: group randomized trial. *Lancet* 2003; 362: 356-361.
220. Shinefield H, Black S, Ray P, Fireman B, Schwalbe J, Lewis E. Efficacy, immunogenicity and safety of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in low birth weight and preterm infants. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 182-186.
221. Esposito S, Pugni L, Bosis S, Proto A, Cesati L, Bianchi C, Cimino C, Mosca F, Principi N. Immunogenicity, safety and tolerability of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine administered at 3, 5 and 11 months post-natally to pre- and full-term infants. *Vaccine* 2005; 23: 1703-1708.
222. Nachman S, Kim S, King J, Abrams EJ, Margolis D, Petru A, Shearer W, Smith E, Moye J, Blanchard S, Hawkins E, Bouquin P, Vink P, Benson M, Estep S, Malinoski F; Pediatric AIDS Clinical Trials Group Study 292 Team. Safety and immunogenicity of a heptavalent pneumococcal

- conjugate vaccine in infants with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatrics* 2003; 112: 66-73.
223. O'Brien KL, Swift AJ, Winkelstein JA, Santosham M, Stover B, Luddy R, Gootenberg JE, Nold JT, Eskenazi A, Snader SJ, Lederman HM. Safety and immunogenicity of a heptavalent pneumococcal vaccine conjugated to CRM(197) among infants with sickle-cell disease. Pneumococcal Conjugate Vaccine Study Group. *Pediatrics* 2000; 106: 965-972.
224. Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N; Vaccine Trialists Group. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med* 2003; 349: 1341-1348.
225. Cutts FT, Zaman SM, Enwere G, Jaffar S, Levine OS, Okoko JB, Oluwalava C, Vaughan A, Obaro SK, Leach A, McAdam KP, Biney E, Saaka M, Onwuchekwa U, Yallop F, Pierce NF, Greenwood BM, Adegbola RA; Gambian Pneumococcal Vaccine Trial Group. Efficacy of nine-valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and invasive pneumococcal disease in The Gambia: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2005; 365: 1139-1146.
226. Hausdorff WP. The roles of pneumococcal serotypes 1 and 5 in paediatric invasive disease. *Vaccine* 2007; 25: 2406-2412.
227. World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccines for childhood immunization – WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2007; 82: 93-104.

228. Lee GM, Kleinman K, Pelton SI, Hanage W, Huang SS, Lakoma M, Dutta-Linn M, Croucher NJ, Stevenson A, Finkelstein JA. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination on *Streptococcus pneumoniae* carriage in young children in Massachusetts. J Pediatr Infect Dis Soc 2013; 3: 23-32.
229. Cohen R, Levy C, Bingen E, Koskas M, Naye I, Varon E. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal nasopharyngeal carriage in children with acute otitis media. Pediatr Infect Dis J 2012; 31: 297-301.
230. Cooper D, Yu X, Sidhu M, Nahm MH, Fernsten P, Jansen KU. The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) elicits cross-functional opsonophagocytic killing responses in humans to *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6C and 7A. Vaccine 2011; 29: 7207-7211.
231. Esposito S, Tansey S, Thompson A, Razmpour A, Liang J, Jones TR, Ferrera G, Maida A, Bona G, Sabatini C, Pugni L, Emini EA, Gruber WC, Scott DA, Principi N. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to those of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine given as a three-dose series with routine vaccines in healthy infants and toddlers. Clin Vaccine Immunol 2010; 17: 1017-1026.
232. Briles DE, Hollingshead SK, Nabors GS, Paton JC, Brooks-Walter A. The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. Vaccine 2000; 19(Suppl 1): S89-95.

233. Briles DE, Tart RC, Swiatlo E, Dillard JP, Smith P, Benton KA, Ralph BA, Brooks-Walter A, Crain MJ, Hollingshead SK, McDaniel LS. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). Clin Microbiol Rev 1998; 11: 645-657.
234. Pelton SI, Loughlin AM, Marchant CD. Seven valent pneumococcal conjugate vaccine immunization in two Boston communities: changes in serotypes and antimicrobial susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates. Pediatr Infect Dis J 2004; 23: 1015-1022.
235. Jones VF, Harrison C, Stout GG, Hopkins J. Nasopharyngeal colonization with heptavalent pneumococcal conjugate vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with prolonged vaccine dosing intervals. Pediatr Infect Dis J 2005; 24: 969-973.
236. Grivea IN, Panagiotou M, Tsantouli AG, Syrogiannopoulos GA. Impact of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among day-care center attendees in Central Greece. Pediatr Infect Dis J 2008; 27: 519-525.
237. Dagan R, Givon-Lavi N, Zamir O, Sikuler-Cohen M, Guy L, Janco J, Yagupsky P, Fraser D. 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: 927-936.
238. Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, Beratis NG, Spiliopoulou AE, Fasola EL, Bajaksouzian S, Appelbaum PC, Jacobs MR. Resistance patterns of

- Streptococcus pneumoniae* from carriers attending day-care centers in southwestern Greece. Clin Infect Dis 1997; 25 : 188-194.
239. 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: 1174-1182.
240. Nunes S, Sá-Leão R, Carriço J, Alves CR, Mato R, Avô AB, Saldanha J, Almeida JS, Sanches IS, de Lencastre H. 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.
241. Van Eldere J, Meekers E, Lagrou K, Massonet C, Canu A, Devenyns I, Verhaegen J, Syrogiannopoulos G, Leclercq R. Macrolide-resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from Belgium. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 332-334.
242. Jacobs MR, Good CE, Beall B, Bajaksouzian S, Windau AR, Whitney CG. Changes in serotypes and antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* strains in Cleveland: a quarter century of experience. J Clin Microbiol 2008; 46: 982-990.
243. Farrell DJ, Klugman KP, Pichichero M. Increased antimicrobial resistance among nonvaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in the pediatric population after the introduction of 7-valent pneumococcal vaccine in the United States. Pediatr Infect Dis J 2007; 26: 123-128.

244. Inoue M, Farrell DJ, Kaneko K, Akizawa K, Fujita S, Kaku M, Igari J, Yamaguchi K, Yamanaka K, Murase M, Asari S, Hirakata Y, Baba H, Itaha H. Antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens in Japan during PROTEKT years 1-5 (1999-2004). *Microb Drug Resist* 2008; 14: 109-117.
245. Yang F, Xu XG, Yang MJ, Zhang YY, Klugman KP, McGee L. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Shanghai, China. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 386-391.
246. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 2005; 365: 579-587.
247. Hellenic National Committee for Immunizations. National Immunization Program. *Paediatrici* 2006; 69: 78-82.
248. 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 (RR-9): 1-35.
249. American Academy of Pediatrics. Pneumococcal infections. In: Pickering LK, Baker CJ, Long SS, McMillan JA, eds. *Red Book 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases*. 27th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics 2006: 525-537.
250. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth informational

supplement M100-S18. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

251. Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, Tait-Kamradt A, Katopodis GD, Beratis NG, Sutcliffe J, Appelbaum PC, Davies TA. Identification of an erm(A) erythromycin resistance methylase gene in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 342-344.
252. Lipsitch M. Measuring and interpreting associations between antibiotic use and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1044-1054.
253. Huang SS, Hinrichsen VL, Stevenson AE, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Pelton SI, Lipsitch M, Hanage WP, Lee GM, Finkelstein JA. Continued impact of pneumococcal conjugate vaccine in young children. *Pediatrics* 2009; 124: e1-11.
254. Cohen R, Levy C, Bonnet E, Grondin S, Desvignes V, Lecuyer A, Fritzell B, Varon E. Dynamic of pneumococcal nasopharyngeal carriage in children with acute otitis media following PCV7 introduction in France. *Vaccine* 2010; 28: 6114-6121.
255. Spijkerman J, van Gils EJ, Veenhoven RH, Hak E, Yzerman EP, van der Ende A, Wijmenga-Monsuur AJ, van den Dobbelsteen G, Sanders E. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* 3 years after start of vaccination program, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 584-591.
256. Rodrigues F, Nunes S, Sá-Leão R, Gonçalves G, Lemos L, de Lencastre H. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in children attending day-care centers in the central region of Portugal, in the

- era of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Microb Drug Resist* 2009; 15: 269-277.
257. Dagan R, Leibovitz E, Greenberg D, Yagupsky P, Fliss DM, Leiberman A. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal colonization during the first days of antibiotic treatment in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 880-885.
258. Ghaffar F, Muniz LS, Katz K, Reynolds J, Smith JL, Davis P, Friedland IR, McCracken GH Jr. Effects of amoxicillin/clavulanate or azithromycin on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in children with acute otitis media. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 875-880.
259. Greenberg D, Givon-Lavi N, Sharf AZ, Vardy D, Dagan R. The association between antibiotic use in the community and nasopharyngeal carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Bedouin children. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27: 776-782.
260. Toltzis P, Dul M, O'Riordan MA, Toltzis H, Blumer JL. Impact of amoxicillin on pneumococcal colonization compared with other therapies for acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 24-28.
261. Varon E, Levy C, de La Rocque F, Boucherat M, Deforche D, Podglajen I, Navel M, Cohen R. Impact of antimicrobial therapy on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Branhamella catarrhalis* in children with respiratory tract infections. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 447-481.