



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**Φαινοτυπική και γονιδιακή μελέτη της αντοχής στις μακρολίδες
στελεχών *Streptococcus pneumoniae*
από αποικισμένα παιδιά
κατά την περίοδο της επέκτασης της εμβολιαστικής κάλυψης με
το επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
Αλεξία Ι. Σούρλα

Λάρισα, Ιούνιος 2014

© 2014 Αλεξία Σούρλα

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

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (6^η/28-5-2014 ΓΣΕΣ):

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Δρ. Γεώργιος Α. Συρογιαννόπουλος
Καθηγητής Παιδιατρικής,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Δρ. Ιωάννα Γριβέα,
Επίκουρος Καθηγήτρια Παιδιατρικής,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου,
Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

4^{ος} Εξεταστής

Δρ. Νταλέκος Γεώργιος
Καθηγητής Παθολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής

Δρ. Σκεντέρης Νικόλαος
Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής

Δρ. Ραχιώτης Γεώργιος
Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής

Δρ. Μίχος Αθανάσιος
Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου
Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην παρουσία και υποστήριξη κάποιων ανθρώπων, οφείλω την υλοποίηση και ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Στον Καθηγητή Παιδιατρικής και Διευθυντή της Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κύριο Γεώργιο Συρογιαννόπουλο οφείλω πολλά. Τον ευχαριστώ καταρχήν για την τιμή που μου έκανε επιλέγοντάς με ως συνεργάτη του και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση του θέματος. Η επιστημονική του καθοδήγησή και η συνεχής υποστήριξή του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής ήταν για μένα πολύτιμα. Οφείλω ένα μεγάλο Ευχαριστώ για το πρότυπο Ανθρώπου, Συνεργάτη και Επιστήμονα, που αντιπροσωπεύει. Καταθέτω το σεβασμό μου και ένα κομμάτι θαυμασμού στην επιστημονική του αρτιότητα και προσωπική απλότητα που τον χαρακτηρίζει.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στην κυρία Ιωάννα Γριβέα, Επίκουρο Καθηγήτρια Παιδιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Της οφείλω την εκπαίδευσή μου σε σύγχρονες και απαιτητικές εργαστηριακές μεθόδους, αλλά και πολλά κομμάτια αυτής της διδακτορικής διατριβής. Με καθοδήγησε όλα αυτά τα χρόνια με γνώση, αγάπη, υπομονή και επιμονή. Στάθηκε δίπλα μου, περήφανη σε κάθε μου βήμα προς τα εμπρός και γονεϊκά αυστηρή σε κάθε μικρό μου βήμα προς τα πίσω. Της οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ και μία μη κοινοποιήσιμη υπόσχεση.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Χρήστο Χατζηχριστοδούλου, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τη συνεργασία και την προθυμία του για βοήθεια οποιαδήποτε στιγμή.

Ευχαριστώ για τη συμμετοχή τους στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή, τον κύριο Νταλέκο Γεώργιο, Καθηγητή Παθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τον κύριο Νικόλαο Σκεντέρη, Επίκουρο Καθηγητή Παιδιατρικής και Δάσκαλό μου στα χρόνια της ειδικότητάς μου στην Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τον κύριο Ραχιώτη Γεώργιο, Επίκουρο Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και τον κύριο Μίχο Αθανάσιο Επίκουρο Καθηγητή Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ερευνητές και υποψήφιους διδάκτορες με τους οποίους συνεργάστηκα όλα αυτά τα χρόνια, υπογραμμίζοντας τη αξία της συλλογικής δουλειάς σε κάθε βήμα αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Στους αγαπημένους μου γονείς, Γιάννη και Μαρία, στην αδερφή μου Αναστασία και στην νέα της οικογένεια (Στέλιο, μπέμπη), οφείλω ένα συγγνώμη για όσες φορές δεν είχα χρόνο να μοιραστώ στιγμές μαζί τους και ένα μεγάλο ευχαριστώ, που είναι δίπλα μου και με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια.

Σούρλα Αλεξία

*Στους αγαπημένους μου γονείς,
Γιάννη και Μαρία*

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Αλεξία Σούρλα
Ημερομηνία γέννησης: 5 Απριλίου 1981
Καταγωγή: Φάρσαλα Θεσσαλίας
Διεύθυνση κατοικίας: Λαμίας 158, ΤΚ 40300, Φάρσαλα
Τηλέφωνο: 6937471416
e-mail: alexia.sourla@gmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

1999:
Απολυτήριο Λυκείου, 2^ο Γυμνάσιο Φαρσάλων

Οκτώβριος 2006:
Πτυχίο ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Βαθμός «Λίαν καλώς».

Φεβρουάριος 2009:
Υποψήφια διδάκτορας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: Certificate of Proficiency in English, Cambridge University (1996)
Certificate of Proficiency in English, Michigan University (1997)
Γαλλικά: Certificat de langue française (1996)
Σουηδικά: Επίπεδο B2

ΛΟΙΠΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μουσικές Σπουδές: Πτυχίο Αρμονίας (1995)
Σπουδές στο κλασικό πιάνο για 11 έτη
Σπουδές κλασικής μονωδίας για 4 έτη
Γνώσεις Πληροφορικής: Πιστοποίηση i-skills (2008) για Internet, PowerPoint, Excel, Word

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2007-2008
Ιατρός Υπηρεσίας Υπαίθρου, Π.Ι. Σκοτούσης, Κ.Υ. Φαρσάλων

2010-2012
Ειδικευόμενη Παιδιατρικής Κλινικής Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

2012-σήμερα
Ειδικευόμενη Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 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. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy and the Infectious Diseases Society of America, San Francisco, California, USA, 2009.
- Grivea I, Tsantouli A, Sourla A, Syrogiannopoulos G. Temporal trends of nasopharyngeal carriage of serotype 6C *Streptococcus pneumoniae* in Greece. 7th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, Tel Aviv, Israel, 2010.
- Grivea IN, Sourla A, Ntokou E, Syrogiannopoulos GA. Macrolide resistance determinants among *Streptococcus pneumoniae* isolated from carriers in central Greece. 30th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Thessaloniki, Greece, May 2012.
- Μονήρης νεφρός σε παιδί με ετερόπλευρη κρυφορχία. Αγγελική Σούμπαλη, Αλεξία Σούρλα, Ελένη Γιάννη, Γεωργία Κατσαμάκα, Άννα Καλαϊτζή, Σοφία Αλευρά, Γεωργία Βανιώτη, Παιδιατρική Κλινική Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, 49ο πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 2011
- Συριγγομυελία στα παιδιά. Περιγραφή τριών περιστατικών. Βιβλιογραφική ανασκόπηση. Ελένη Γιάννη¹, Αλεξία Σούρλα¹, Αγγελική Σούμπαλη¹, Τατιάνα Τουμαγγέλοβα¹, Σοφία Αλευρά¹, Μαρία Κατσαβάκη², Γεωργία Βανιώτη¹, 49ο πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 2011
1 Παιδιατρική Κλινική Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας
2 Νευρολογικό Τμήμα Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας
- Αναδρομική μελέτη παιδιών με αιμορραγικό εγκεφαλικό επεισόδιο κατά τα έτη 2000-2012. Αλεξία Σούρλα, Ελένη Γιάννη, Αγγελική Σούμπαλη, Γεωργία Στεφανή, Σοφία Αλευρά, Γεωργία Βανιώτη-Παπασάβα. Παιδιατρική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο, 50^ο πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 2012
- Σύνδρομο Wolf-Parkinson-White σε παιδί με επανειλημμένα λιποθυμικά επεισόδια. Παρουσίαση περιστατικού. Σοφία Αλευρά, Αλεξία Σούρλα, Αγγελική Κωτούλα, Αγγελική Σούμπαλη, Γεωργία Βανιώτη-Παπασάβα. Παιδιατρική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. 50^ο πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Γεώργιος Συρογιαννόπουλος**, Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας **(Επιβλέπων)**
2. **Δρ. Ιωάννα Γριβέα**, Επίκουρος Καθηγήτρια Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου**, Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

2. Ιστορική αναδρομή

3. Μικροβιολογία

3.1 Γενικά

3.2 Καλλιέργεια

3.3 Αναγνώριση και απομόνωση

3.4 Οροτυπία

3.5 Μορφολογία και αντιγονική δομή

3.6 Γονιδίωμα

3.7 Βιολογία των αποικιών

4. Επιδημιολογία

4.1 Φορεία

4.2 Πνευμονιοκοκκική λοίμωξη

5. Πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις

5.1 Λοιμογόνοι παράγοντες του πνευμονιοκόκκου

5.2 Προδιαθεσικοί παράγοντες του ξενιστή στην πρόκληση πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης

5.3 Από τον αποικισμό στην λοίμωξη

5.4 Κλινικά σύνδρομα

6. Ενεργητική ανοσοποίηση

6.1 Κυκλοφορούντα εμβόλια έναντι πνευμονιοκόκκου

6.2 Η ανοσογονικότητα και αποτελεσματικότητα του εμβολίου

6.3 Χρονοδιάγραμμα βασικού εμβολιασμού

6.4 Επανεμβολιασμός

6.5 Αντενδείξεις και προφυλάξεις στον εμβολιασμό

6.6 Ανεπιθύμητες ενέργειες

7. Αντοχή του πνευμονιοκόκκου στα αντιβιοτικά

7.1 Αντοχή στην πενικιλίνη

7.2 Αντοχή στις μακρολίδες

7.3 Αντοχή σε άλλα αντιβιοτικά

7.4 Ορότυποι με αντοχή στα αντιβιοτικά

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

2. Υλικό και μέθοδοι

- 2.1 Πρωτόκολλο μελέτης
- 2.2 Πληθυσμός της μελέτης
- 2.3 Δειγματοληψία
- 2.4 Καθεστώς εμβολιασμού συμμετεχόντων
- 2.5 Εργαστηριακός έλεγχος
- 2.6 Στατιστική ανάλυση

3. Αποτελέσματα

4. Συζήτηση

5. Συμπεράσματα

6. Περίληψη / Summary

7. Βιβλιογραφία

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Ο πνευμονιόκοκκος είναι ένα Gram θετικό μικρόβιο του γένους των στρεπτοκόκκων, με σημαντικό ρόλο ως παθογόνος μικροοργανισμός για τον άνθρωπο. Από την ανακάλυψή του τυχαία τον 19^ο αιώνα ως αίτιο της πνευμονίας, απ' όπου και έλαβε την ονομασία του, έως και σήμερα αποτελεί αντικείμενο ευρύτατης έρευνας σε όλους τους τομείς των επιστημών υγείας.

Ο *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus), όπως είναι η αγγλική ονομασία του βακτηρίου, αποικίζει το ρινοφάρυγγα ασυμπτωματικών φορέων της κοινότητας, με ιδιαίτερη προτίμηση σε παιδιά νηπιακής ηλικίας. Σε συνθήκες «ευάλωτης» ανοσιακής άμυνας, όπως σε ανοσοκατεσταλμένους ή άτομα τρίτης ηλικίας, ο πνευμονιόκοκκος μπορεί να γίνει παθογόνος και να μεταφερθεί σε άλλες περιοχές του ανθρώπινου οργανισμού προκαλώντας νόσο. Οι κλινικές οντότητες της οξείας μέσης ωτίτιδας, της πνευμονίας της κοινότητας και της μηνιγγίτιδας είναι οι συχνότερες σχετιζόμενες με το βακτήριο λοιμώξεις. Ωστόσο, πιο σπάνια, ο πνευμονιόκοκκος μπορεί να ευθύνεται για περιστατικά μεταξύ άλλων βακτηριαμίας, σήψης, οστεομυελίτιδας και σηπτικής αρθρίτιδας.

Η νοσηρότητα και η θνητότητα από πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις ήταν ένα σημαντικό πρόβλημα του αιώνα μας πριν την έναρξη του μαζικού αντιπνευμονιοκοκκικού εμβολιασμού. Οι αριθμοί είναι χαρακτηριστικοί. Ένα εκατομμύριο παιδιά κάτω των 5 ετών πεθαίνουν κάθε χρόνο παγκοσμίως από πνευμονία και άλλες διεισδυτικές λοιμώξεις οφειλόμενες στον πνευμονιόκοκκο. Η δε μηνιγγίτιδα από το εν λόγω παθογόνο, πέραν της μεγάλης θνητότητας, εγκαταλείπει σημαντικά νευρολογικά υπολείμματα στους επιζώντες σε ποσοστό 30-60%, μεταξύ των οποίων απώλεια ακοής και νευροψυχολογικές διαταραχές.

Η ένταξη στο πρόγραμμα εμβολιασμών, τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες, του εμβολίου έναντι του πνευμονιοκόκκου κατέχει σημαντικό ρόλο στην αλλαγή της νοσηρότητας και των επιδημιολογικών χαρακτήρων των πνευμονιοκοκκικών και όχι μόνο διεισδυτικών λοιμώξεων.

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα, που έχουν κυριαρχήσει στη μάχη έναντι των βακτηριακών λοιμώξεων έχοντας την ταχέως εξελισσόμενη επιστήμη της βιοτεχνολογίας και φαρμακολογίας ως σύμμαχο, βρήκαν στην περίπτωση του πνευμονιοκόκκου έναν ακόμη δύσκολο αντίπαλο, καθώς τα ιδιαίτερα μορφολογικά, βιοχημικά και γενετικά εξελισσόμενα χαρακτηριστικά του τελευταίου έχουν προβληματίσει ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, με την εμφάνιση όχι μόνο αντοχής στα αντιμικροβιακά φάρμακα αλλά και πολυανθεκτικών στελεχών.

2. Ιστορική αναδρομή

Η απομόνωση και μελέτη του πνευμονιοκόκκου έπαιξε σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των επιστημών της μικροβιολογίας και ανοσολογίας, αποτελώντας το πρότυπο ελυτροφόρου εξωκυττάριου παθογόνου βακτηρίου.

Το **1881** δύο μικροβιολόγοι, ο Louis Pasteur [1,2] στη Γαλλία και ο George M. Stenberg [3,4] στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ανεξάρτητα και σχεδόν ταυτόχρονα, περιέγραψαν τον διπλόκοκκο στην ανθρώπινη σίελο.

Και οι δύο ενίεσαν σίελο σε κουνέλι και απομόνωσαν έπειτα στο αίμα αυτού το διπλόκοκκο. Ο μιν Pasteur χρησιμοποίησε σίελο προερχόμενη από παιδί που είχε καταλήξει από λύσσα και ονόμασε το απομονωθέν μικρόβιο *Microbe Septicemique du saliva* [5]. Ο δε Stenberg χρησιμοποίησε δική του σίελο και ονόμασε το μικρόβιο *Micrococcus pasteurii* [6].

Υπήρχαν ήδη από το **1875** βιβλιογραφικές αναφορές με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ελαφρώς επιμηκυμένου διπλοκόκκου [7,8], ωστόσο μόνο οι Pasteur και Stenberg ανέδειξαν την παθογονικότητα του μικροβίου στα ζώα.

Στις αρχές της δεκαετίας του **1880** αναγνωρίστηκε ο εν λόγω διπλόκοκκος ως συχνό αίτιο λοβώδους πνευμονίας στον άνθρωπο [9, 10, 11, 12] ενώ προς το τέλος αυτής αναγνωρίστηκε επιπλέον ως αίτιο μηνιγγίτιδας [13] και οξείας μέσης ωτίτιδας [14].

Το **1884** ο Christian Gram εφάρμοσε και ανέπτυξε την τεχνική της χρώσης κατά Gram σε ιστούς λοβώδους πνευμονίας ασθενών που είχαν καταλήξει και αποκαλούσε το μικρόβιο που προσλάμβανε τη χρωστική «the cocci of croupous pneumonia». Η ευρεία εφαρμογή της χρώσης κατά Gram βοήθησε να διαχωριστούν οι πνευμονίες σε προκαλούμενες ή μη από το συγκεκριμένο παθογόνο.

Το **1886** ο Fraenkel [15] έδωσε την ονομασία του πνευμονιοκόκκου στο βακτήριο λόγω της αναγνώρισής του ως συχνό αίτιο λοβώδους πνευμονίας.

Το **1902** ο Neufeld [16] χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο αντιορό έναντι του στρεπτοκόκκου της πνευμονίας, παρατήρησε εξοίδηση του ελύτρου, μια ανακάλυψη που έπειτα βοήθησε στην ταυτοποίηση των οροτύπων με τη χρήση ειδικών αντιορών.

Ο στρεπτόκοκκος της πνευμονίας, όπως αναφέρθηκε αποτέλεσε το πρότυπο εξωκυττάρου ελυτροφόρου παθογόνου μικροοργανισμού. Στην απουσία αντισώματος, ανθίσταται στη φαγοκυττάρωση και πολλαπλασιάζεται στους ιστούς. Στις αρχές της δεκαετίας του **1890**, οι Felix και Klempner έδειξαν πως η ένεση νεκρών πνευμονιοκόκκων σε πειραματόζωα προστατεύει έναντι του συγκεκριμένου παθογόνου. Επιπλέον, η προστασία αυτή δύναται να μεταφερθεί από νοσούντες σε υγιείς επίμυες ενίοντας ορό των πρώτων στους δεύτερους. Η ίδια προστασία περιέχεται και σε ορό ασθενών που ανέκυψαν από πνευμονιοκοκκική πνευμονία. Στο ερώτημα του τι στοιχεία εμπεριέχονται στον ορό και ευθύνονται για αυτή τη «μεταφορά προστασίας» απάντησαν οι Neufeld και Rimpau το **1904**, θεωρώντας πως υπάρχουν χυμικοί παράγοντες στον ορό οι οποίοι διευκολύνουν τη φαγοκυττάρωση του πνευμονιοκόκκου από τα λευκά αιμοσφαίρια, με μία διαδικασία που αποκαλείται οψωνινοποίηση και προέρχεται από την αρχαία λέξη «όψων», που σημαίνει παρασκευή εδέσματος. Οι παρατηρήσεις των ερευνητών έθεσαν τη βάση της χυμικής ανοσίας, που σήμερα γνωρίζουμε πως οφείλεται στα παραγόμενα και κυκλοφορούντα αντισώματα στον ορό (ειδικές ανοσοσφαιρίνες IgA, IgM, IgG έναντι συγκεκριμένου αντιγόνου).

Οι ίδιες παρατηρήσεις βοήθησαν αργότερα, το **1913** τον Lister [17], στην ταυτοποίηση των οροτύπων του πνευμονιοκόκκου, καθώς ενοφθαλμισμός διαφορετικού στελέχους σε πειραματόζωο, προκάλούσε προστασία, δηλαδή παραγωγή ειδικών αντισωμάτων μόνο για το συγκεκριμένο στέλεχος και όχι για τα υπόλοιπα.

Την **1^η δεκαετία του 20^{ου} αιώνα** οι Maynard, Lister και Wright άρχισαν να εφαρμόζουν τις βασικές αρχές της χυμικής ανοσίας για την αντιμετώπιση της

επιδημίας λοβώδους πνευμονίας που κάθε χρόνο προσέβαλε αρκετούς Αφρικανούς μεταλλωρύχους. Ο εμβολιασμός τους με νεκρούς πνευμονιοκόκκους προκάλεσε σημαντική μείωση της επίπτωσης της νόσου [18]. Τη δεκαετία του **1920** οι Heidelberg και Avery απέδειξαν ότι το αντίσωμα που προκαλεί ανοσία, αντιδρούσε με επιφανειακά πολυσακχαριδικά αντιγόνα.

Το **1920** εισήχθη η ονομασία diplococcus pneumoniae, λόγω της μορφολογικής του ιδιαιτερότητας και της πρόκλησης συχνά πνευμονίας.

Σημαντικός ήταν ο ρόλος του μικροβίου στην ανακάλυψη του DNA. Το **1928**, ο Griffith ανέφερε με πειράματα σε επίμυες, μεταφορά «πληροφορίας» από νεκρούς μη λοιμογόνους πνευμονιοκόκκους (φέροντες κάψα) σε ζώντες μη λοιμογόνους (χωρίς κάψα) και μετατροπή των τελευταίων σε λοιμογόνους με κάψα [19]. Ουσιαστικά, πρόκειται για την πρώτη αναφορά μεταφοράς της άγνωστης ως τότε γενετικής πληροφορίας, με μία διαδικασία που αργότερα ονομάστηκε «μετασχηματισμός». Η παρατήρηση του Griffith επιβεβαίωσε τη λοιμογονικότητα της πνευμονιοκοκκικής κάψας. Οι Avery, MacLeod και McCarty στη συνέχεια προσδιόρισαν πως η μεταβιβαζόμενη πληροφορία στα πειράματα του Griffith δεν ήταν παρά το τμήμα του DNA που έφερε τη γενετική πληροφορία της πνευμονιοκοκκικής κάψας [20].

Το **1930** ο Francis με τα πειράματά του ανέδειξε την ανοσογονικότητα του πολυσακχαριδικού ελύτρου του πνευμονιοκόκκου.

Το **1938** ο Felton παρακέρυασε ένα πνευμονιοκοκκικό κεκαθαρμένο πολυσακχαρίτη, που χρησιμοποιήθηκε στη Μασαχουσέτη για ανοσοποίηση, προκειμένου να αποτρέψει επιδημία πνευμονίας [21]. Μετά από αυτή την εφαρμογή, οι ερευνητές της εποχής θεώρησαν πως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένα πνευμονιοκοκκικό πολυσακχαριδικό αντιγόνο ως ανοσογόνος διεγέρτης για την παραγωγή αντισωμάτων, που θα προστάτευαν από επιδημίες πνευμονιοκοκκικής νόσου. Πράγματι, κατά τη διάρκεια του Β' Παγκόσμιου Πολέμου, έγινε εμβολιασμός στρατιωτών με υλικό του πνευμονιοκοκκικού ελύτρου, που μείωσε τη συχνότητα της πνευμονίας από συγκεκριμένους ορότυπους, που εμπεριέχονταν στο εμβόλιο [22].

Από το **1974** αναφέρεται στη βιβλιογραφία η σημερινή του ονομασία, ως στρεπτόκοκκος της πνευμονίας (*Streptococcus pneumoniae*), λόγω της χαρακτηριστικής διάταξης των κόκκων σε υγρή καλλιέργεια.

Οι προσπάθειες για την ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων έναντι πνευμονιόκοκκου είχαν ξεκινήσει ήδη από το 1911. Ωστόσο, με την έλευση της πενικιλίνης τη δεκαετία του 1940, το ενδιαφέρον για το εμβόλιο μειώθηκε, έως ότου παρατηρήθηκε ότι πολλοί ασθενείς εξακολουθούν να πεθαίνουν παρά τη θεραπεία με αντιβιοτικά. Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1960, έγιναν και πάλι προσπάθειες για την ανάπτυξη ενός πολυδύναμου εμβολίου κατά του πνευμονιόκοκκου. Το πρώτο εμβόλιο κατά του πνευμονιόκοκκου πήρε άδεια στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1977, ενώ το πρώτο συζευγμένο εμβόλιο πήρε άδεια κυκλοφορίας το 2000. Σήμερα σε πολλές χώρες ανά τον κόσμο, μεταξύ αυτών και στην Ελλάδα το αντιπνευμονιοκοκκικό εμβόλιο έχει ενταχθεί στο βασικό πρόγραμμα εμβολιασμού.

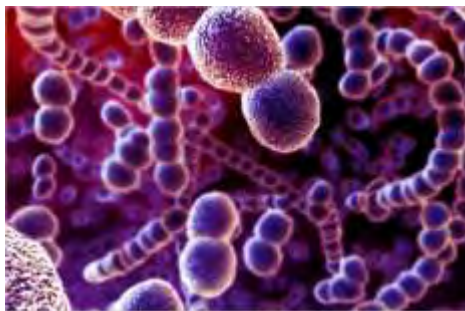
Πίνακας 1. Η ιστορία του πνευμονιοκόκκου

- **1881:** Πρώτη απομόνωση του διπλόκοκκου
- **1880s:** Αναγνώρισή του ως το κύριο αίτιο λοβώδους πνευμονίας
- **1884:** Ανάπτυξη τεχνικής Gram χρώσης και διαχωρισμός πνευμονίας οφειλόμενη σε πνευμονιόκοκκο και άλλα παθογόνα
- **1902:** Ο Neufeld περιγράφει το φαινόμενο της εξοίδησης του ελύτρου χρησιμοποιώντας ειδικό αντιορό
- **1904:** Οι Neufeld και Rimpau περιγράφουν το φαινόμενο της οψωνινοποίησης
- **1913:** Ο Lister περιγράφει την παραγωγή ειδικών για κάθε στέλεχος αντισωμάτων
- **Δεκαετία 1910:** Πρώτος εμβολιασμός με νεκρούς πνευμονιοκόκκους σε μεταλλωρύχους
- **1920:** Ονομασία ως διπλόκοκκος της πνευμονίας
- **1928:** Ο Griffith διαπιστώνει την ανταλλαγή «πληροφορίας» μεταξύ στελεχών πνευμονιοκόκκου in vivo (transformation). Πρώτο βήμα για την ανακάλυψη του DNA
- **1930:** Ο Francis αναδεικνύει την ανοσογονικότητα του πολυσακχαριδικού ελύτρου του πνευμονιοκόκκου για τον άνθρωπο
- **1938:** Ο Felton παρασκευάζει το πρώτο εμβόλιο από πολυσακχαρίτη
- **Β' Παγκόσμιος Πόλεμος:** Χρήση τμήματος ελύτρου για εμβολιασμό στρατιωτών.
- **1974:** Εισάγεται στη βιβλιογραφία η σημερινή ονομασία του βακτηρίου ως *Στρεπτόκοκκου της πνευμονίας*
- **1977:** ΗΠΑ. Δίνεται άδεια κυκλοφορίας σε εμβόλιο πνευμονιοκόκκου.
- **2000:** ΗΠΑ. Κυκλοφορεί το πρώτο συζευγμένο επταδύναμο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο

3. Μικροβιολογία

3.1 Γενικά

Ο Στρεπτόκοκκος της πνευμονίας είναι Gram θετικός κόκκος, προαιρετικά αναερόβιος, που ανήκει στο είδος του γένους *Streptococcus* της οικογένειας *Streptococcaceae*. Συνήθως η διάταξή του είναι κατά ζεύγη στρεπτών κόκκων με χαρακτηριστικό σχήμα λόγχης. Εκτός από τη διάταξή του ως διπλόκοκκος, μπορεί να εμφανίζεται και ως μονήρης κόκκος ή διατεταγμένος σε κοντές αλύσους. Τα κύτταρα του πνευμονιοκόκκου έχουν μέγεθος μεταξύ 0,5 και 1,25μm σε διάμετρο. Δε δημιουργούν σπόρια και είναι ακίνητα (Εικ 1).



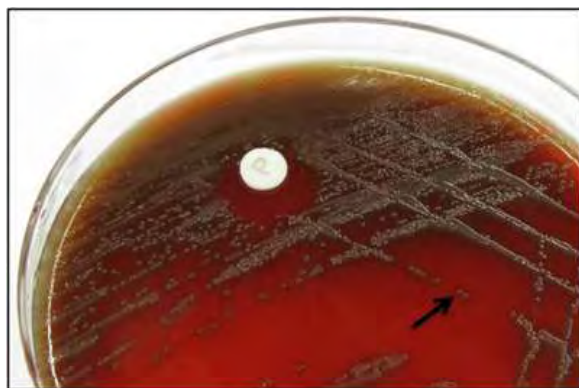
Εικ1. Η μορφολογία του πνευμονιοκόκκου

3.2 Καλλιέργεια

Ο Στρεπτόκοκκος της πνευμονίας είναι ένα απαιτητικό βακτήριο, που αναπτύσσεται βέλτιστα σε παρουσία 5% διοξειδίου του άνθρακα. Σχεδόν 20% των κλινικών δειγμάτων που λαμβάνονται απαιτούν πλήρως αναερόβιες συνθήκες. Σε όλες τις περιπτώσεις, απαιτείται παρουσία πηγής καταλάσης (π.χ. αίμα) για να εξουδετερώσει τις μεγάλες ποσότητες υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγουν τα βακτήρια. Η δοκιμασία καταλάσης είναι αρνητική για τον πνευμονιοκόκκο.

Ο πνευμονιόκοκκος είναι ένας προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός. Συνήθως καλλιεργείται σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν αίμα. Σε εμπλουτισμένα θρεπτικά υλικά που περιέχουν αίμα και στους 37°C, το βακτήριο έχει χρόνο υποδιπλασιασμού 20-30 λεπτά. Σε τρυβλία με αιματούχο άγαρ, οι αποικίες του χαρακτηριστικά παράγουν μια πράσινη ζώνη αιμόλυσης γύρω από τις αποικίες, η οποία διαφοροποιεί τον πνευμονιόκοκκο από τον β-αιμολυτικό στρεπτόκοκκο της ομάδος A, όχι όμως και από τον α-αιμολυτικό στρεπτόκοκκο (*S.viridans*), που αποικίζει κι αυτός την ανώτερη αναπνευστική οδό. Ειδικές δοκιμασίες όπως η διάσπαση της ινουλίνης, η διαλυτότητα στα χολικά άλατα και η ευαισθησία στην οπτοχίνη χρησιμοποιούνται ευρέως για το διαχωρισμό του *Streptococcus pneumoniae* από τον *Streptococcus viridans*.

Σε αιματούχο άγαρ, ο πνευμονιόκοκκος αναπτύσσεται εύκολα και δημιουργεί λείες αποικίες, διαμέτρου περίπου 1mm. Υπάρχουν διαφορές στη μορφολογία των αποικιών ανάλογα με τον ορότυπο του μικροβίου. Αποικίες των οροτύπων 3, 19 και 37 είναι χαρακτηριστικά βλενώδεις. Οι αποικίες που ανήκουν στον ορότυπο 3 είναι πολύ μεγάλες (διάμετρος >3mm) ενώ αυτές των οροτύπων 1 και 14 συνήθως πολύ μικρές (διάμετρος <1mm).



Εικ. 2 Διαφορετικοί ορότυποι πνευμονιοκόκκου προσδίδουν διαφορετική μορφολογία στις αποικίες

Με μηχανισμό που δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως αλλά είναι γενετικά καθορισμένος, 1 στις 10^5 αποικίες περνούν από τη λεία-διαφανή μορφή στην αδρή-αδιαφανή. Ο διαφανής φαινότυπος αποικίζει συνήθως το ρινοφάρυγγα ενώ ο αδιαφανής επιβιώνει κυρίως στο αίμα.

Ο πνευμονιόκοκκος είναι ένα πολύ ευαίσθητο βακτήριο που έχει την ενζυματική ικανότητα να αυτολύεται. Το υπεύθυνο ένζυμο είναι η αυτολυσίνη, οποία σε καλλιέργεια πνευμονιοκόκκου σε στερεό θρεπτικό υλικό και μετά από την παρέλευση 18-24 ωρών (σε βέλτιστες συνθήκες επώασης), προκαλεί αυτόλυση των αποικιών καθώς και αλλαγή της μορφολογίας τους. Αρχικά οι αποικίες εμφανίζουν μορφολογία τύπου «πλατώ», ενώ με την έναρξη της δράσης της αυτολυσίνης, αρχίζει το κέντρο να κοιλαίνει και έτσι οι αποικίες παίρνουν την χαρακτηριστική μορφή τους σαν «πιατάκια». Η χαρακτηριστική αυτή μορφολογία διαχωρίζει μικροσκοπικά τους πνευμονιοκόκκους από το *S. viridans* (Εικ.3).



Εικ.3 Μικροσκοπική διάκριση αποικιών *S. pneumoniae* και *S. viridans*

3.3 Αναγνώριση και απομόνωση

Ο πνευμονιόκοκκος απομονώνεται στο εργαστήριο με βάση τις εξής ιδιότητες:

α. Θετική Gram χρώση.

β. Δημιουργία ζώνης α-αιμόλυσης σε καλλιέργεια με αιματούχο άγαρ, που περιέχει ερυθροκύτταρα ανθρώπου, κόνικλου ή προβάτου.

γ. Αρνητική δοκιμασία καταλάσης. Η καταλάση είναι ένζυμο που διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) σε H_2O και O_2 . Η δοκιμή καταλάσης χρησιμοποιείται κυρίως για τη διαφοροποίηση μεταξύ gram-θετικών κόκκων. Τα μέλη του γένους *Staphylococcus* είναι καταλάση-θετικά, και τα μέλη των γενών *Streptococcus* και *Enterococcus* είναι καταλάση-αρνητικά.

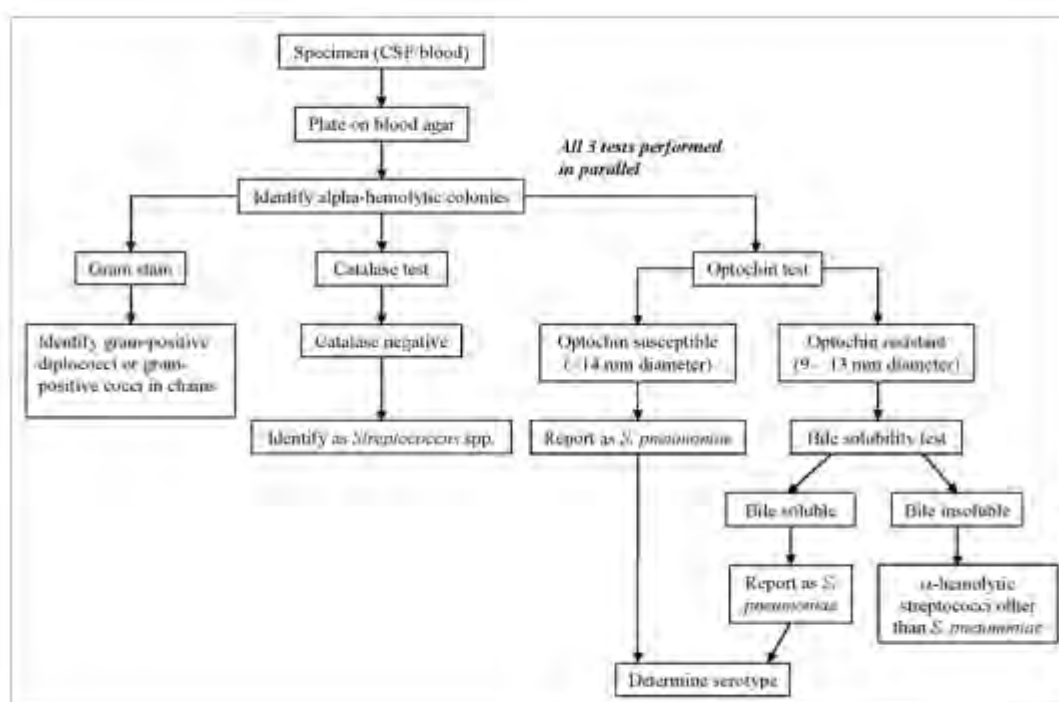
δ. Ευαισθησία στην οπτοχίνη (ethylhydrocupreine hydrochloride), με δημιουργία τυπικά ζώνης περίπου διαμέτρου 16mm πέριξ δίσκου οπτοχίνης των 5mg.

ε. Διαλυτότητα στα χολικά άλατα. Χαρακτηριστικά προσθήκη σε καλλιέργεια πνευμονιοκόκκου λίγων σταγόνων διαλύματος 10% δεοξυχολικού οξέος στους $37^\circ C$ προκαλεί λύση ολόκληρης της αποικίας σε λίγα λεπτά. Η ικανότητα του δεοξυχολικού οξέος να διαλύει το κυτταρικό τοίχωμα του πνευμονιοκόκκου οφείλεται στην ύπαρξη του αυτολυτικού ενζύμου LytA.

Ο *Streptococcus pneumoniae* μπορεί να ταυτοποιηθεί σε τρυβλία με αιματούχο άγαρ ταυτόχρονα με τη χρήση της Gram χρώσης, την αρνητική δοκιμασία καταλάσης και την ευαισθησία στο δίσκο οπτοχίνης και ως επιβεβαιωτική δοκιμή με τη δοκιμασία διαλυτότητας των χολικών αλάτων (Σχ. 1). Εάν αυτές οι δοκιμές υποδεικνύουν ότι το προϊόν απομόνωσης είναι *S. pneumoniae*, μπορεί να ακολουθήσουν ορολογικές δοκιμές για τον προσδιορισμό του οροτύπου, είτε με τη δοκιμασία εξοίδησης του ελύτρου είτε χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές.

Πρέπει να σημειωθεί εδώ πως πριν τις διαδικασίες ταυτοποίησης, το υλικό καλλιέργειας θα πρέπει πάντα να επιθεωρείται για την πιθανότητα

επιμόλυνσης και μια ενιαία αποικία θα πρέπει να λαμβάνεται, όταν είναι απαραίτητο, για να προκύψει μια καθαρή καλλιέργεια. Για τις διαδικασίες ταυτοποίησης είναι ουσιώδες να χρησιμοποιούνται α-αιμολυτικές αποικίες που είναι λιγότερες των 24 ωρών και τυπικά αναπτύχθηκαν επί μία νύχτα στους 35-37° C σε συνθήκες 5% CO₂.



Σχ.1 Στάδια απομόνωσης-ταυτοποίησης στελεχών πνευμονιοκόκκου

Διατίθενται σήμερα στο εμπόριο συστήματα (kits) ταυτοποίησης, που χρησιμοποιούν δοκιμασίες συγκόλλησης και είναι διαθέσιμα για την ταυτοποίηση αποικιών σε καλλιέργειες από αιματούχο άγαρ, όπως του *S. pneumoniae*. Αυτά τα kits χρησιμοποιούν έτοιμο εναιώρημα latex επικαλυμμένο με αντίσωμα κουνελιού ειδικό για τα αντιγόνα του ελύτρου του *S. pneumoniae*. Ορατή συγκόλληση συμβαίνει όταν το καψικό αντιγόνο *S. pneumoniae* αντιδρά με τα σφαιρίδια latex επικαλυμμένα με το αντίσωμα. Οι οδηγίες του κατασκευαστή πρέπει να ακολουθούνται με ακρίβεια όταν γίνεται χρήση αυτών των kits, καθώς η παρατεταμένη αποθήκευση συνδυάζεται με αυξημένη πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης.

3.4 Οροτυπία

Ο ορότυπος του στελέχους του πνευμονιοκόκκου, που απομονώνεται στο εργαστήριο, καθορίζεται από τη σύσταση του καψιδικού αντιγόνου, όπως έχει αναφερθεί. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν τόσο ορολογικές όσο και σύγχρονες μοριακές μέθοδοι για να προσδιορίσουν τους μέχρι τώρα 93 γνωστούς οροτύπους του *Streptococcus pneumoniae*.

Ορολογικές μέθοδοι

i. Η δοκιμασία εξοίδησης του ελύτρου (Quellung). Είναι η βάση της οροτυπίας και συνίσταται στη διόγκωση της κάψας του βακτηρίου όταν χρησιμοποιηθεί ειδικός αντιορός συγκεκριμένης οροομάδας. Ειδική σειρά αντιορών διατίθεται στο εμπόριο από το Statens Serum Institut της Δανίας. (<http://www.ssi.dk/English.aspx>). Συγκεκριμένα γίνεται ανάμειξη μίας μικρής ποσότητας αποικίας με ίση ποσότητα συγκεκριμένου αντιορού και εξέταση έπειτα σε μικροσκόπιο (1000X) της διόγκωσης της κάψας. Μια αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος προκαλεί αλλαγή στο δείκτη διάθλασης του ελύτρου, έτσι ώστε να φαίνεται «οιδηματώδες» και πιο εύκολα ορατό. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται αντιορός συγκεκριμένου οροτύπου και έτσι προσδιορίζεται σε ποιον από τους 93 έως σήμερα γνωστούς οροτύπους ανήκει το συγκεκριμένο στέλεχος.

Αν και πρόκειται για υψηλής ειδικότητας δοκιμασία, έχει αναφερθεί διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ των οροομάδων 2 και 5,3 και των 8,7 και 18,13 και 39 όπως και με τα στελέχη *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Haemophilus influenzae type b* και συγκεκριμένα στελέχη *Streptococcus viridans*.

ii. Latex δοκιμασία συγκόλλησης

Η πρότυπη δοκιμασία αντίδρασης Quellung είναι συνήθως χρονοβόρα και απαιτεί ένα ορισμένο επίπεδο εμπειρίας, για τη σωστή εφαρμογή της. Μία μέθοδος συγκόλλησης χρησιμοποιώντας σωματίδια latex επικαλυμμένα με IgG αντισώματα κουνελιού ομαδοποιημένα, περιλαμβάνοντας π.χ. οροτύπους

του επταδύναμου εμβολίου PCV7: 4 , 6B, 9V , 14 , 18C, 19F , 23F έχει αναπτυχθεί και ήδη αντίστοιχα kits είναι διαθέσιμα στο εμπόριο. Η μέθοδος συγκόλλησης με latex είναι απλούστερη και ταχύτερη από την αντίδραση Quellung , αλλά προορίζεται μόνο για το μερικό προσδιορισμό του οροτύπου. Η αντίδραση Quellung θα πρέπει να εκτελείται στην συνέχεια, χρησιμοποιώντας μεμονωμένα ειδικούς για τον ορότυπο αντιορούς.

Μέθοδοι που βασίζονται στην PCR (αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης)

Το υψηλό κόστος των αντιορών, η υποκειμενικότητα στην ερμηνεία και οι τεχνικές απαιτήσεις των ορολογικών μεθόδων [23], είχαν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη τεχνικών προσδιορισμού του οροτύπου που βασίζονται στην PCR. Οι μέθοδοι αυτοί επιτρέπουν σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα προσδιορισμό του οροτύπου [24, 25].

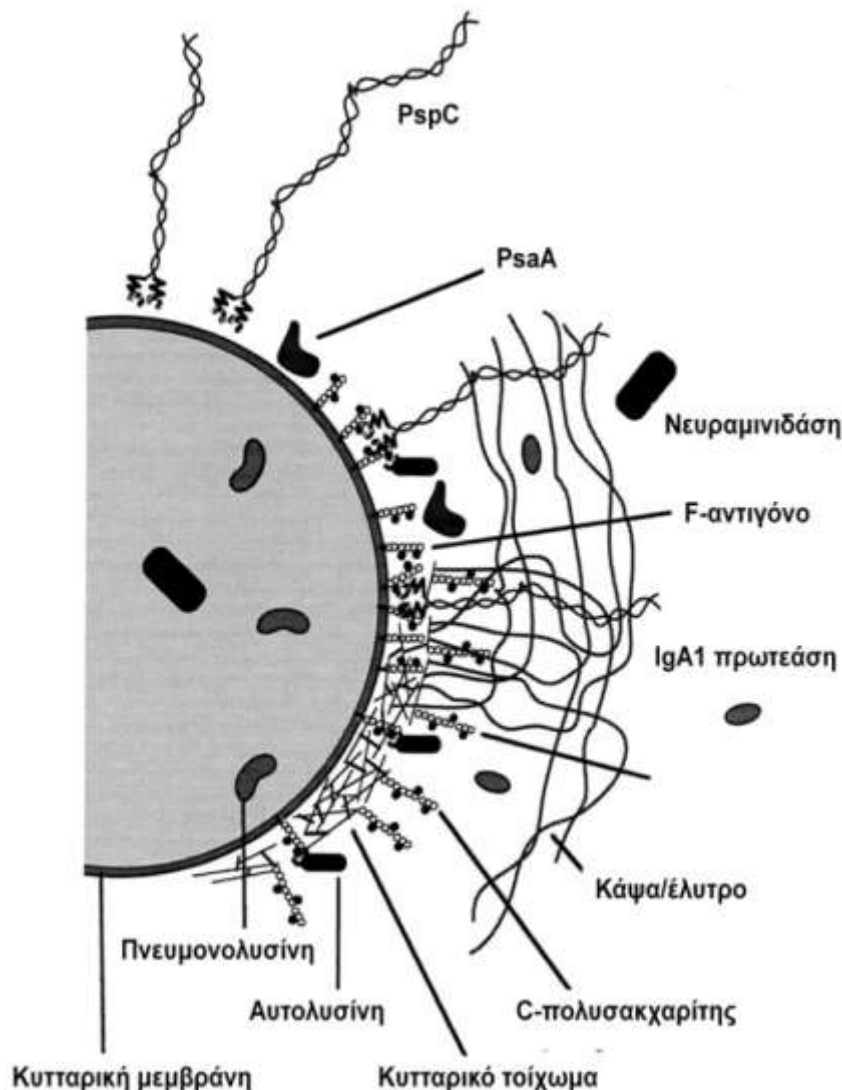
Χρήση της multiplex PCR γίνεται για την ανίχνευση 40 από τους 93 οροτύπους του πνευμονιοκόκκου. Αρχικά, η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σε μελέτη δεισδυτικών λοιμώξεων, ενώ τα τελευταία χρόνια άρχισε να χρησιμοποιείται η μέθοδος πειραματικά σε οροτύπους που αφορούν στη φορεία του πνευμονιοκόκκου [26, 27, 25]. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι η αδυναμία διάκρισης των οροτύπων με υψηλή συγγένεια όπως του 6A από τον 6B, του 7F από τον 7A, του 33A, 37, 35A, 35C και 42.

Η Real Time-PCR έχει εφαρμογή σε αρκετούς κοινούς οροτύπους, χωρίς όμως ευρεία χρήση ως μέθοδος καθορισμού του οροτύπου έως σήμερα.

3.5 Μορφολογία και αντιγονική δομή

Ο ρόλος της δομής στην παθογένεια της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης.

Το κύτταρο του πνευμονιοκόκκου περιβάλλεται από λιποπολυσακχαριδική κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία με τη σειρά της περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα. Το όλο σύνολο καλύπτεται από μία πολυσακχαριδική κάψα (έλυτρο), που σχετίζεται με την παθογόνο δράση του και την εμφάνιση των αποικιών. Οι αντιγονικές ουσίες βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, το κυτταρικό τοίχωμα και το έλυτρο, που αποτελεί και το ισχυρότερο αντιγόνο του πνευμονιοκόκκου (Εικ.4).



Εικ. 4 Σχηματική απεικόνιση των συστατικών επιφανείας του πνευμονιοκόκκου

A. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη έχει τρεις στιβάδες και αποτελείται από μόρια φωσφολιπιδίων, πρωτεϊνών και τειχοϊκού οξέος. Τα φωσφολιπίδια διατάσσονται σε δύο στιβάδες έχοντας τις υδρόφοβες ομάδες προς τα έσω και τις υδρόφιλες προς τα έξω (προς το κυτταρόπλασμα και το κυτταρικό τοίχωμα). Οι πρωτεΐνες κατανέμονται μεταξύ των μορίων των φωσφολιπιδίων.

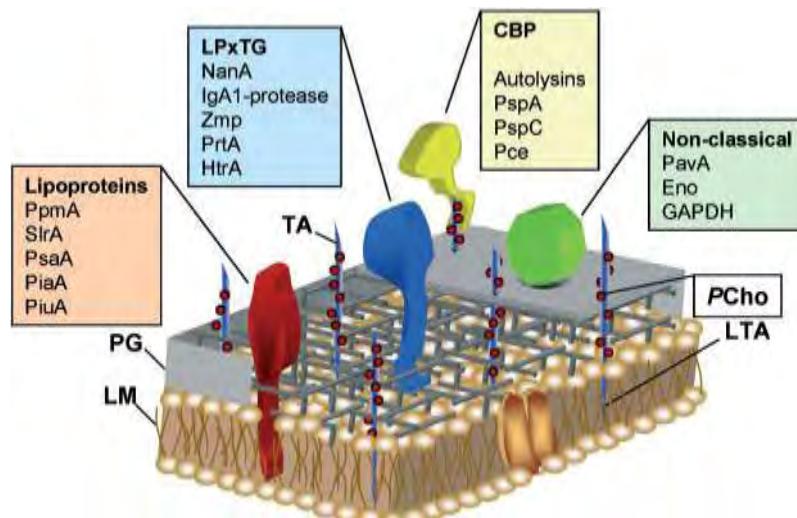
B. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη, λιποτειχοϊκό οξύ, τειχοϊκό οξύ και πρωτεΐνες συνδεδεμένες με χολίνη (CBPs). Προκαλεί ισχυρή φλεγμονώδη αντίδραση που συνοδεύει την πνευμονιοκοκκική λοίμωξη, διεγείροντας τη συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων και ενεργοποιώντας το συμπλήρωμα και την παραγωγή κυτοκινών. Η επιφάνεια του πνευμονιοκοκκικού κυτταρικού τοιχώματος καλύπτεται από την πολυσακχαριδική κάψα. Η χολίνη του πνευμονιοκόκκου έχει ιδιαίτερη διατροφική απαίτηση και χρησιμεύει ως ένα σταθμός σύνδεσης για μη ομοιοπολική σύνδεση πολλών πνευμονοκοκκικών πρωτεϊνών στη βακτηριακή επιφάνεια [28].

- Η πεπτιδογλυκάνη έχει την κλασσική Gram-θετική δομή, αποτελούμενη από N-acetylmuramic acid και N-acetylglucosamine, που συνδέονται μεταξύ τους εναλλάξ με 1,4 β-γλυκοσιδικό δεσμό. Με το καρβοξυλικό τμήμα του N-ακετυλμουραμικού οξέος ενώνονται τα αμινοξέα D-γλουταμινικό, D- και L-αλανίνη και η λυσίνη.

-Το λιποτειχοϊκό οξύ είναι γνωστό και ως αντιγόνο F (Forssman).

-Το τειχοϊκό οξύ έχει μια ασυνήθιστη δομή και περιέχει μία «ραχοκοκκαλιά» φωσφορικής ριβιτόλης και ομοιοπολικά συνδεδεμένης φωσφορυλοχολίνης (PCho) [29]. Συνδέεται στερεά με την πεπτιδογλυκάνη στην εξωτερική επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος δημιουργώντας το πολυσακχαρίδιο C που είναι χαρακτηριστικό για όλους τους πνευμονιοκόκκους. Πρόκειται επομένως για το αντιγόνο του είδους.

-Οι πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος έχουν σημαντικό παθογενετικό ρόλο και εκφράζονται στην επιφάνεια αυτού. Ακολουθούν τρία δομικά πρότυπα, τα εξής (Εικ.5):



Εικ.5 Πρωτεϊνική δομή επιφάνειας του πνευμονιοκόκκου

I. Πρωτεΐνες δομής LPxTG.

Οι πρωτεΐνες επιφάνειας των Gram θετικών μικροβίων, που φέρουν το δομικό μοτίβο LPxTG (Leu-Pro-οποιοδήποτε-Thr-Gly), αναγνωρίζονται από σορτάσες (τρανσπεπτιδάσες) οι οποίες τις δεσμεύουν ομοιοπολικά με την πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος. Διαφορετικές σορτάσες αναγνωρίζουν διαφορετικά εκτεθειμένες στην επιφάνεια του βακτηρίου πρωτεΐνες και παίζουν ρόλο στην παθογένεια της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης. Ο πνευμονιόκοκκος περιέχει δύο τουλάχιστον γονίδια NanA και NanB, που κωδικοποιούν νευραμινιδάση. Η **Νευραμινιδάση A** (NanA) φέρει το μοτίβο LPxTG και φαίνεται από μελέτες πως επηρεάζει τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα και του μέσου ωτός [30, 31] και την παθογένεση της οξείας μέσης ωτίτιδας [32]. Οι νευραμινιδάσες έχουν δύο ρόλους στην παθογένεση της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης: Πρώτον, διασπούν τα τελικά σιαλικά οξέα των ολιγοσακχαριτών των *Haemophilus influenzae* και *Neisseria meningitides*, προκαλώντας απώλεια της «προστασίας» αυτών των μικροβίων και φαγοκυττάρωση και δίνοντας πλεονέκτημα στον αποικισμό από πνευμονιόκοκκο του αναπνευστικού επιθηλίου [33]. Δεύτερον, διασπούν τα σιαλικά οξέα εκκρινόμενων ουσιών του ανοσιακού συστήματος, όπως η λακτοφερρίνη και η εκκριτική IgA2, διευκολύνοντας τον αποικισμό της αναπνευστικής οδού [34]. Ο πνευμονιόκοκκος με την ιδιότητα του γενετικού ανασυνδυασμού και την ποικιλομορφία του γονιδιακού προϊόντος

νευραμινιδάσης, έχει σημαντικό πλεονέκτημα στην αποφυγή της ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού [35].

Η **υαλουρονική λυάση (Hyl)**, είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο χωρίς σαφή ρόλο στην διάρκεια της παθογένεσης.

Η **πρωτεάση HtrA** (high-temperature requirement A), απαιτεί υψηλή θερμοκρασία για τη δράση της και έχει δείχθει ότι εμπλέκεται στην αντίσταση σε οξειδωτικό στρες, στον αποικισμό του ρινοφάρυγγα των επίμυων και στην πνευμονιοκοκκική πνευμονία. Επιπλέον, φαίνεται πως η αδρανοποίηση της λειτουργικότητας του αντίστοιχου γονιδίου, έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερα επίπεδα παραγωγής των φλεγμονωδών κυτοκινών IL-6 και TNF-α στους πνεύμονες κατά τη διάρκεια της πνευμονίας [36, 37, 38].

Στελέχη *S. pneumoniae* παράγουν έως και τέσσερις μεταλλοπρωτεάσες ψευδαργύρου, τις IgA1 - πρωτεάση, ZmpB, ZmpC και ZmpD, οι οποίες αγκυρώνονται στο κυτταρικό τοίχωμα χρησιμοποιώντας τη δομή LPxTG. Η **IgA1 πρωτεάση** παράγεται από το σύνολο σχεδόν των στελεχών και παίζει σημαντικό ρόλο σε πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις και ιδιαίτερα στην πνευμονιοκοκκική βακτηριαιμία [39]. Διασπώντας την IgA1 πρωτεΐνη, συμβάλουν στην προσκόλληση του βακτηρίου στα κύτταρα του ξενιστή [40]. Και οι υπόλοιπες μεταλλοπρωτεάσες με την ενζυμική τους δράση συμβάλουν στη λοιμογονικότητα του πνευμονιοκόκκου.

Η **PrtA** είναι μια άλλη επιφανειακή πρωτεάση του αμινοξέος σερίνη και από πειράματα φαίνεται πως η αδρανοποίηση του αντίστοιχου γονιδίου, μειώνει τη λοιμογονικότητα του πνευμονιοκόκκου σε πειραματόζωα [41].

Ινίδια (φίμπριες) Πρόκειται για λεπτά και βραχεία ινίδια πολυμερισμένων μονάδων πρωτεΐνης, που ακολουθούν το δομικό μοτίβο αμινοξέων LPxTG, που αναγνωρίζονται από σορτάσες (τρανσπεπτιδάσες) του τοιχώματος και είναι προσκολλημένες στο κυτταρικό τοίχωμα. Δύο ινίδια τα PI-1 και PI-2 έχουν παθογενετική σημασία [42]. Το PI-1 κωδικοποιείται από το γονίδιο *rlrA* και θεωρείται πως σχετίζεται με την αποικισμό, τη λοιμογόνο δράση και την φλεγμονώδη απάντηση στον πνευμονιόκοκκο με βάση πειράματα σε

επίμυες. Αυτό το ινίδιο αποτελείται από τρεις ομοιοπολικά συνδεδεμένες μεταξύ τους πρωτεϊνικές υπομονάδες, τις RgrA, RgrB και RgrC [43,44]. Ο ρόλος των αντίστοιχων σορτάσων σχετιζόμενων με τα ινίδια Rgr έχει μελετηθεί και θεωρείται πως οι σορτάσες B και C λειτουργούν ως ένζυμα-πολυμεράσες των υπομονάδων των ινιδίων, ενώ η σορτάση D έχει ρόλο στην αντιγονοπαρουσίαση του ινιδίου στην κυτταρική επιφάνεια στις αδιαφανείς αποικίες [45].

II. Δεσμευτικές της χολίνης πρωτεΐνες επιφανείας (Cbps)

Η οικογένεια αυτών των πρωτεϊνών είναι μοναδικό δομικό χαρακτηριστικό του πνευμονιοκόκκου και τα έως τώρα γνωστά 12 μέλη αυτής φέρουν στο καρβοξυτελικό άκρο μία αλληλουχία 20 αμινοξέων επαναλαμβανόμενων 3-9 φορές, στην οποία συνδέεται η χολίνη [28]. Η χολίνη είναι ένα στοιχείο του κυτταρικού τοιχώματος με σημαίνοντα ρόλο, καθώς αναγνωρίζεται από στοιχεία του ανοσιακού συστήματος του ξενιστή όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και στον υποδοχέα του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAFr), όπως αναφέρεται στην παθογένεια της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης παρακάτω [46-49].

Κυριότερες πρωτεΐνες είναι:

Η **πρωτεΐνη A** (Psp A), η οποία εμποδίζει την εναπόθεση και ενεργοποίηση του συμπληρώματος, δεσμεύει τη λακτοφερρίνη και παρεμβαίνει στη φαγοκυττάρωση.

Η **συνδεδεμένη με χολίνη πρωτεΐνη A** (CbpA ή PspC ή SpsA). Πρόκειται για μία προσκολλητίνη επιφανείας που παρουσιάζει ένα ειδικό μοτίβο για πρόσδεση στον πολυμερικό υποδοχέα των ανοσοσφαιρινών στο ρινοφαρυγγικό βλεννογόνο και ένα δεύτερο μοτίβο για πρόσδεση στον υποδοχέα λαμινίνης στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Και οι δύο αλληλεπιδράσεις επιτρέπουν βακτηριακή μετακίνηση κατά μήκος των αντίστοιχων δομικών «φραγμών». Η CbpA δεσμεύει επίσης το C3 στοιχείο του συμπληρώματος καθώς και τον παράγοντα H. Και οι άλλες προσκολλητίνες της ίδιας οικογενείας CbpD, CbpE, CbpG έχουν παρόμοια δράση όσον αφορά την ικανότητα προσκόλλησης των βακτηρίων [46, 50].

Διάφορες **αυτολυσίνες** (Lyt A, Lyt B και Lyt C ή λυσοζύμη), οι οποίες έχουν δράση στην υδρόλυση της πεπτιδογλυκάνης και είναι απαραίτητες στην κυτταρική διαίρεση. Υπό την επίδραση της αυτολυσίνης και μετά τη λύση του βακτηριακού κυττάρου παράγεται μία κυτταροτοξική πρωτεΐνη, η **πνευμονολυσίνη**, η οποία προκαλεί καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης του ευκαρυωτικού κυττάρου και ενεργοποίηση του συμπληρώματος.

III. Οι πρωτεΐνες λιποπρωτεϊνικής δομής

Πρόκειται για πρωτεΐνες απαραίτητες για τη μεταφορά ουσιών διαμέσου του υποστρώματος και τη δράση του βακτηρίου.

Η πρωτεΐνη **PsaA** είναι το υπόστρωμα πρόσδεσης ενός ABC τύπου συστήματος μεταφοράς μαγγανίου [51].

Ενώ οι πρωτεΐνες **PiaA** και **PiuA** είναι λιποπρωτεΐνες, όπου συνδέονται δύο διαφορετικοί ABC τύπου μεταφορείς σιδήρου [52].

Δύο λιποπρωτεΐνες επιφανείας, οι **PpmA** και **SlrA** συμμετέχουν στην έκκριση και δράση μορίων της κυτταρικής επιφανείας.

Στις πρωτεΐνες επιφανείας περιλαμβάνονται επιπλέον πέντε **πρωτεΐνες δεσμευτικές της πενικιλίνης (PBPs)**, ο ρόλος των οποίων είναι σημαντικός στη δράση των αντιβιοτικών και θα αναφερθεί στην πορεία.

Γ. Η κάψα (έλυτρο) του πνευμονιοκόκκου περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα και αποτελείται από πολυσακχαρίτες, που ποικίλουν ως προς την αλληλουχία των ολιγοσακχαριτών / μονοσακχαριτών μεταξύ τους και ως προς την παρουσία μη σακχαριδικών συστατικών. Οι σακχαρίτες είναι συνδεδεμένοι στην πεπτιδογλυκάνη και την πολυσακχαρίδη του κυτταρικού τοιχώματος, γεγονός που εξηγεί το δύσκολο διαχωρισμό της κάψας από το κυτταρικό τοίχωμα.

Η πνευμονιοκοκκική κάψα έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ιστορία πολλών ιατρικών ανακαλύψεων, όπως έχει αναφερθεί, καθώς βοήθησε στην

ανακάλυψη του DNA με τα πειράματα του Griffith και των Avery, MacLeod και McCarty στη συνέχεια (20).

Παρεμποδίζει στερεοχημικά τη φαγοκυττάρωση του βακτηρίου, εμποδίζοντας την πρόσβαση των λευκοκυττάρων στο κυτταρικό τοίχωμα.

Ο πολυσακχαρίτης της κάψας καθορίζει και τον ορότυπο του στελέχους που απομονώνεται.

Η περιοχή του DNA του πνευμονιοκόκκου που κωδικοποιεί την κάψα μεταγράφεται ως ενιαίο οπερόνιο και αποτελείται από ομάδα γονιδίων που ένα συγκεκριμένο τύπο κάψας. Ο πνευμονιόκοκκος έχει τη σημαντική ικανότητα (λέγεται *competence*) να προσλαμβάνει και να μετασχηματίζει εξωγενές DNA από άλλους πνευμονιοκόκκους ή από άλλα βακτήρια και να το ενσωματώνει στο γονιδίωμά του. Λόγω της ιδιότητάς του αυτής μπορεί να αποκτά νέες φαινοτυπικές μορφές (*transformation*), παράγοντας έτσι οροτυπικά διάφορες κάψες. Ουσιαστικά, ο πνευμονιόκοκκος έχει την ιδιότητα μεταβολής της κάψας και άρα του οροτύπου του.

Ορότυποι του πνευμονιοκόκκου με βάση το καψιδικό αντιγόνο.

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 93 ορότυποι του *Streptococcus pneumoniae*, που ανήκουν σε 46 οροομάδες. Η ευρέως χρησιμοποιούμενη ταξινόμηση είναι η δανέζικη (Πιν.2). Οι 46 οροομάδες αριθμούνται από 1 έως 48 (δε χρησιμοποιούνται οι αριθμοί 26,30). Μία οροομάδα μπορεί να έχει διαφορετικούς οροτύπους, οι οποίοι διαχωρίζονται με ένα γράμμα. Για παράδειγμα, στην οροομάδα 10 περιέχονται οι ορότυποι 10A, 10B, 10C, 10F. Σημειώνεται πως τα στελέχη του μικροβίου που προκαλούν συχνότερα λοίμωξη στον άνθρωπο είναι εκείνα που ταυτοποιήθηκαν πιο νωρίς και έλαβαν πρώτα αύξονα αριθμό οροομάδας/οροτύπου. Έτσι εξηγείται το ότι οι ορότυποι με μικρότερο αύξονα αριθμό προκαλούν συχνότερα λοίμωξη.

| ΟΡΟΜΑΔΑ | ΟΡΟΤΥΠΟΙ |
|---------|-------------------------|
| | 1 |
| | 2 |
| | 3 |
| | 4 |
| | 5 |
| 6 | 6A, 6B |
| 7 | 6A, 6B, 6C,6D, 6F |
| | 8 |
| 9 | 9A,9L, 9N, 9V |
| 10 | 10A,10B,10C,10F |
| 11 | 11A,11B,11C,11D,11E,11F |
| 12 | 12A,12B,12F |
| | 13 |
| | 14 |
| 15 | 15A,15B,15C,15F |
| 16 | 16A,16F |
| 17 | 17A,17F |
| 18 | 18A,18B,18C,18F |
| 19 | 19A,19B,19C,19F |
| | 20 |
| | 21 |
| 22 | 22A,22F |
| 23 | 23A,23B,23F |
| 24 | 24A,24B,24F |
| 25 | 25A,25F |
| | 27 |
| 28 | 28A,28F |
| | 29 |
| | 31 |
| 32 | 32A,32F |
| 33 | 33A,33B,33C,33D,33F |
| | 34 |
| 35 | 35A,35B,35C,35F |
| | 36 |
| | 37 |
| | 38 |
| | 39 |
| | 40 |
| 41 | 41A,41F |
| | 42 |
| | 43 |
| | 44 |
| | 45 |
| | 46 |
| 47 | 47A,47F |
| | 48 |

Πιν.2 Ορότυποι-Ορομάδες
Streptococcus pneumoniae (Δανέζικη κατάταξη)

3.6 Γονιδίωμα

➤ Χαρτογράφηση του γονιδιώματος

Η πρώτη πλήρης δημοσίευση του μεγέθους 2,16 Mbps γονιδιώματος του στρεπτοκόκκου της πνευμονίας, με κωδικοποίηση 2236 πρωτεϊνών παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 2001, όπως φαίνεται ακολούθως (Εικ.6) [53]. Η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων του γονιδιώματος (www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/streptococcus-pneumoniae.html και www.biomedcentral.com/1471-2180/11/25) δείχνει ένα διατροφικά απαιτητικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο με περιεκτικότητα σε G και C 40 %.

Επειδή ο πνευμονιόκοκκος στερείται τον κύκλο TCA, εξαρτάται ενεργειακά από το μεταβολισμό των υδατανθράκων και μπορεί να καταβολίζει 14 διαφορετικά σάκχαρα. Το ένα τρίτο του κωδικοποιούμενου γονιδιώματος δεν έχει καμία γνωστή λειτουργία.

Λόγω της ιδιότητας του βακτηρίου να προσλαμβάνει και να ενσωματώνει στο γονιδίωμά του ξένο DNA (μετασχηματισμός), θεωρείται ένας γονιδιακά ευμετάβλητος μικροοργανισμός. Έως 10% των γονιδίων δείχνουν αλλαγμένες αλληλουχίες μεταξύ των απομονώσεων και 3-5% του γονιδιώματος δείχνει αλληλουχίες με προσθήκη ή αφαίρεση βάσεων αμινοξέων. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA είναι χαρακτηριστικό όλων των χαρτογραφημένων γονιδιωμάτων και πιθανόν συμβάλλει στην πλαστικότητα του οργανισμού. Η σύγχρονη τεχνική της αλληλούχισης του DNA (DNA sequencing) έχει δείξει ότι τα στελέχη του πνευμονιοκόκκου που αποικίζουν πλέον το ρινοφάρυγγα του ξενιστή, φέρουν γενετικό υλικό ανασυνδυασμένο σε συνθήκες *in vivo* [54]. Αλληλούχιση του γονιδιώματος εκατοντάδων στελεχών σε παγκόσμιο επίπεδο ενός συγκεκριμένου οροτύπου πνευμονιοκόκκου, του 23F, έδειξε γεγονότα ανασυνδυασμού μεγάλης κλίμακας, που κυμαίνονται σε μέγεθος μεταξύ 3 kb και 72038 kb [55]. Σημαντικές αλλαγές στο γονιδίωμα είχαν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και μια τάση αλλαγής της κάψας του

οροτύπου 23F σε 19A, ως αποτέλεσμα της πίεσης φυσικής επιλογής μετά την εφαρμογή του αντιπνευμονιοκοκκικού εμβολιασμού.

Έχει επιχειρηθεί να χαρτογραφηθεί το γονιδίωμα των υπεύθυνων λοιμογόνων παραγόντων για τις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις. Βιβλιοθήκες/τράπεζες καταχώρησης γονιδιακών χαρτογραφήσεων έχουν τεθεί στην υπηρεσία των επιστημόνων, καταγράφοντας τις μεταλλάξεις του DNA του πνευμονιοκόκκου σε παγκόσμιο επίπεδο [56, 57, 58]. Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *in vivo* και σε διάφορους ιστούς έχει διεξαχθεί στο επίπεδο του τρανσκριπτόνιου με τη χρήση μικροσυστοιχιών, την τεχνική της αλληλούχισης του RNA (RNA sequencing), και τεχνικές υβριδισμού [59]. Η γονιδιακή μελέτη των στελεχών πνευμονιοκόκκου που προκαλούν διεισδυτικές και μη λοιμώξεις, πρότεινε πως υπεύθυνες είναι οι περιοχές γενετικής ποικιλότητας, που μεταγράφονται ως «κασσέτα» γονιδίων για ένα συγκεκριμένο κλώνο και η κάθε «κασσέτα» γονιδιακού υλικού προσδιορίζει τόσο τη δυναμική της λοίμωξης όσο και την ειδικότητα στη μολυσματικότητα συγκεκριμένου οργάνου [60]. Οι ίδιες σύγχρονες μέθοδοι έχουν επίσης αποκαλύψει και τις πιθανές πολύπλοκες ρυθμιστικές οδούς αυτών των διεργασιών αλλαγής της γενετικής πληροφορίας [61].



Εικ.6 Κυκλική απεικόνιση του γονιδιώματος του *S. pneumoniae* TIGR4 και συγκριτικοί γενετικοί υβριδισμοί χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες. Περιλαμβάνονται: 2-2.110 ζεύγη βάσεων, 1.553 γονίδια απαραίτητα για την επιβίωση, 154 γονίδια για τη λοιμογόνο δύναμη και 176 γονίδια για τον μη διεισδυτικό φαινότυπο

➤ Μελέτη των κλώνων

Δεδομένης της ικανότητας του πνευμονιοκόκκου να προσλαμβάνει ξένο γενετικό υλικό και να τροποποιεί τον πολυσακχαρίτη του ελύτρου αλλάζοντας ορότυπο, απαιτούνται άλλες μέθοδοι εκτός της οροτυπίας για τη μελέτη της γενετικής συσχέτισης μεταξύ των κλινικών στελεχών του πνευμονιοκόκκου, όπως η μελέτη των κλώνων. Τέτοιες μοριακές τεχνικές είναι οι εξής:

α. Η **PFGE**, Pulsed Field Gel Electrophoresis (Ηλεκτροφόρηση Εναλλασσόμενου Ηλεκτρικού Πεδίου), με την οποία βακτηριακό χρωμοσωμικό DNA διασπάται με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων και στη συνέχεια χρησιμοποιείται γέλη και εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο, που διαχωρίζει τις ζώνες ανάλογα με το φορτίο και το μέγεθος τους.

β. Η **MLST**, Multilocus sequence typing (τυποποίηση μετά αλληλούχιση πολλαπλών γενετικών τόπων), μέθοδος που βασίζεται στην αλληλούχιση και στην οποία χρησιμοποιούνται επτά γονίδια (housekeeping, διατήρησης γενετικής πληροφορίας) στα οποία γίνεται αλληλούχιση και καταγραφή και έτσι προκύπτει συγκεκριμένος τύπος αλληλουχίας (ST), ανάλογα με αλληλικές παραλλαγές.

Η PFGE έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από ό,τι η MLST και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη επιδημιών. Επιπλέον, μελέτες σύγκρισης γονιδιώματος, που χρησιμοποιούν ολόκληρες μικροσυστοιχίες και βασίζονται στο γονιδίωμα έχουν δείξει ότι η τεχνική της MLST μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μία καλή μέθοδος για την εκτίμηση του περιεχομένου του γονιδιώματος του πνευμονιοκόκκου [62].

3.7 Βιολογία των αποικιών

➤ Η σημασία τους στον αποικισμό του ρινοφάρυγγα.

Ως φυσική «δεξαμενή» του πνευμονιοκόκκου θεωρείται ο ρινοφάρυγγας των μικρών παιδιών. Η συχνότητα φορείας μειώνεται όσο μεγαλύτερη η ηλικία ενώ

η διάρκεια φορέας είναι μεγαλύτερη σε μικρότερα (~43 ημέρες) παρά σε μεγαλύτερα (~25 ημέρες) παιδιά [63].

Όταν τα βακτήρια εισέλθουν στην ρινική κοιλότητα, η αρνητικά φορτισμένη κάψα τους τα προστατεύει από το να παγιδούνται στους βλεννογόνους και έτσι μπορούν να φθάσουν στην επιφάνεια του επιθηλίου. Η σύνθεση της επιφάνειας του πνευμονιοκόκκου διαφέρει στις λείες και αδιαφανείς αποικίες χαρακτηριστικά [64]. Οι διαφανείς αποικίες εκφράζουν μια λεπτότερη κάψα, που έχει την ικανότητα καλύτερης προσκόλλησης στο αναπνευστικό επιθήλιο στα πρώτα στάδια αποικισμού [64]. Ο ακριβής μηχανισμός αυτής της μεταβολής φάσης είναι ασαφής, αλλά ο ρόλος της είναι να βοηθήσει στην αποφυγή της άμυνας του ξενιστή, όπως είναι η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), η οποία έχει στόχο τη φωσφορυλοχολίνη (PCho) και τα λευκοκύτταρα της κυκλοφορίας, καθώς το βακτήριο του πνευμονιοκόκκου προσπαθεί να αποικίσει το ρινοφάρυγγα. Ο διαφανής φαινότυπος κυριαρχεί στον ρινοφάρυγγα και εκφράζει λιγότερη κάψα και λιγότερο την πρωτεΐνη δέσμευσης της χολίνης (PsrA), αλλά περισσότερο αυτή της σύνδεσης των πρωτεϊνών CbpA και LytA αυτολυσίνη χολίνης. Αντιθέτως, ο αδιαφανής φαινότυπος κυριαρχεί στο αίμα και χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση καψικού πολυσακχαρίτη και PsrA και λιγότερο CbpA. Αδιαφανή βακτήρια παράγουν επίσης ένα μεγαλύτερο βιοφίλμ και για το λόγο αυτό είναι περισσότερο διεισδυτικά στους πνεύμονες και τον εγκέφαλο [65].

Πολλές πρωτεΐνες της επιφάνειας παίζουν ρόλο στο ρινοφαρυγγικό αποικισμό, όπως αναφέρεται προηγουμένως στην δομική περιγραφή των συστατικών επιφανείας του πνευμονιοκόκκου. Ένα σημαντικό παράδειγμα είναι η CbpA, που συνδέεται με τον υποδοχέα της ανοσοσφαιρίνης (pIgR) και προωθεί την προσκόλληση και είσοδο των βακτηρίων σε ρινοφαρυγγικά κύτταρα [46, 66, 67]. Άλλες συγκολλητίνες με παρόμοιο ρόλο είναι οι CbpG [68], CbpD [69], και LPXTG πρωτεΐνες όπως οι πρωτεΐνες των ινιδίων και η IgA πρωτεάση [70]. Ο σχηματισμός βιοφίλμ προωθείται από την πρωτεΐνη PSRP που διευκολύνει τη βακτηριακή συσσώρευση και προσκόλληση [71].

Ένζυμα, όπως η νευραμινιδάση, η β-γλυκοσιδάση και η β-N-γλυκοζαμινιδάση, επηρεάζουν τον αποικισμό με διάσπαση ακραίων

σακχάρων σε γλυκοσυζεύγματα κυττάρων του ξενιστή, εκθέτοντας έτσι υποδοχείς για πιθανή προσκόλληση. Η νευραμινιδάση επιπλέον προωθεί επίσης το σχηματισμό βιοφίλμ και συμβάλλει στην ανάπτυξη της μέσης ωτίτιδας [72, 73]. Η υαλουρονιδάση βοηθά στον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων στον ιστό και συστατικά στοιχεία όπως το PAVA και η ενολάση αλληλεπιδρούν με εξωκυττάρια πρωτεΐνες, όπως την ινονεκτίνη και το πλασμινογόνο [74, 75]. Η HtrA πρωτεάση της σερίνης επηρεάζει επίσης έντονα τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα [76].

Μελέτες αποικισμού στελεχών πνευμονιοκόκκου σε ανθρώπους έδειξαν ότι η φορεία προκαλεί τόσο τοπικά στο βλεννογόνο όσο και συστηματικά παραγωγή ανοσοσφαιρίνης ειδικής για το συγκεκριμένο στέλεχος και ορότυπο [77]. Στην πρόληψη του αποικισμού συμμετέχει η απάντηση των Th17 κυττάρων [78], ενώ στην μετέπειτα άμυνα έναντι της διεισδυτικής νόσου συμμετέχουν τα παραγόμενα αντισώματα [79]. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι η κάθαρση χρειάζεται βακτηριακή φαγοκυττάρωση από CCR2-φέροντα μονοκύτταρα-μακροφάγα. Η στρατολόγηση αυτών των κυττάρων και η παραγωγή αντισωμάτων έναντι του πολυσακχαριδικού ελύτρου εξαρτώνται από την επαγωγή της CCL2 από τα μακροφάγα, που προϋποθέτει τον μεσολαβούμενο από το ένζυμο LysM κατακερματισμό της πεπτιδογλυκάνης, την πρόσληψη των θραυσμάτων, και την ανίχνευση αυτών από τα NOD2 [80]. Έτσι, υδρολάσες της πεπτιδογλυκάνης, όπως οι LysM, LytB (γλυκοζαμινιδάσης), LytC (λυσοζύμης), και Pce ή CbpE (εστεράσης) μπορούν να επηρεάσουν τον αποικισμό προκαλώντας ανοσιακή απάντηση [81].

Μια σημαντική πτυχή της επιδημιολογίας του πνευμονιοκοκκικού αποικισμού είναι η κοινή εμφάνιση συν- μολύνσεων. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η θνησιμότητα κατά τη διάρκεια κρουσμάτων γρίπης οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη δευτεροπαθή πνευμονιοκοκκική πνευμονία. Αποικισμός με πνευμονιόκοκκο ταυτόχρονα με γρίπη οδηγεί σε μια συνεργική τύπου 1 απόκριση ιντερφερόνης με μειωμένη κάθαρση των βακτηρίων από τον ρινοφάρυγγα και πρόκληση πνευμονίας [82].

4. Επιδημιολογία

4.1 Φορεία

Ο *Streptococcus pneumoniae* είναι ένα παθογόνο μικρόβιο αποκλειστικό για τον άνθρωπο. Δεν επιβιώνει στο περιβάλλον. Αποικίζει το ρινοφάρυγγα, που αποτελεί και τη δεξαμενή του μικροβίου. Ο τρόπος μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο είναι μέσω σταγονιδίων. Σύμφωνα με τα στοιχεία του CDC, Centers for Disease Control and Prevention [83], εκτιμάται πως οι 10 πιο κοινοί ορότυποι του μικροβίου αντιπροσωπεύουν περίπου το 62% της διεισδυτικής νόσου σε παγκόσμιο επίπεδο. Η κατάταξη και η επικράτηση των οροτύπων διαφέρει ανά ηλικιακή ομάδα των ασθενών και γεωγραφική περιοχή. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι επτά πιο κοινοί ορότυποι που απομονώθηκαν από το αίμα ή το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) σε παιδιά μικρότερα των 6 ετών αντιπροσωπεύουν το 80% των λοιμώξεων. Αυτοί οι επτά ορότυποι αντιπροσωπεύουν μόνο το 50% των στελεχών σε μεγαλύτερα παιδιά και ενήλικες .

Ο πνευμονιόκοκκος μπορεί να απομονωθεί στο ρινοφάρυγγα των υγιών ενηλίκων σε ποσοστό 5% έως 70%. Τα ποσοστά ασυμπτωματικής φορείας ποικίλουν ανάλογα με την ηλικία, το περιβάλλον, και η παρουσία λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού. Μόνο το 5-10% των ενηλίκων χωρίς παιδιά είναι φορείς. Οι ενήλικες με μικρά παιδιά στο σπίτι μπορεί να έχουν υψηλότερο ποσοστό φορείας. Τα ποσοστά φορείας είναι αυξημένα κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Συνθήκες συνωστισμού αυξάνουν την πιθανότητα και συχνότητα αποικισμού. Σε σχολεία, βρεφονηπιακούς σταθμούς και ιδρύματα για παιδιά, 27-58% των μαθητών και των ενοίκων ενδέχεται να είναι φορείς. Στις στρατιωτικές εγκαταστάσεις, το 50-60% του προσωπικού των υπηρεσιών μπορεί να είναι φορείς. Η διάρκεια της φορείας ποικίλλει και είναι κατά κανόνα μεγαλύτερη σε παιδιά από τους ενήλικες. Σε μελέτες που έγιναν σε παιδιά, βρέθηκαν αποικισμένα από τον 6^ο μήνα και η διάρκεια φορείας ήταν 4 μήνες. Αντίθετα, σε ενήλικες ο αποικισμός διαρκεί λιγότερο (2-4 εβδομάδες). Η

διάρκεια της φορέας εξαρτάται από την ηλικία και τον ορότυπο. Τα ποσοστά διαφέρουν μεταξύ των χωρών.

Η παρακολούθηση της φορέας του πνευμονιοκόκκου τόσο σε τοπικό όσο και παγκόσμιο επίπεδο γίνεται συνήθως με τον προσδιορισμό του οροτύπου, με βάση τον πολυσακχαρίτη της κάψας/ελύτρου. Από του 93 ορότυπους που έχουν περιγραφεί, ορισμένοι εντοπίζονται συχνότερα σε μικρά παιδιά, όπως οι ορότυποι 6B , 9V , 14 , 19F, και 23F.

4.2 Πνευμονιοκοκκική λοίμωξη

Πριν από κάθε λοίμωξη προηγείται αποικισμός του ρινοφάρυγγα από συγκεκριμένο στέλεχος πνευμονιοκόκκου. Η βακτηριαιμία και η μηνιγγίτιδα αποτελούν τις διεισδυτικές μορφές της νόσου. Η συχνότητα της διεισδυτικής πνευμονικής νόσου διαφέρει σε διάφορες χώρες και σε ορισμένες περιοχές μπορεί να είναι 10πλάσια. Εξαρτάται από την ηλικία, γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η επιδημιολογία της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης επηρεάστηκε σαφώς τις τελευταίες δεκαετίες και από την πίεση της φυσικής επιλογής από τη χρήση αντιβιοτικών και την εφαρμογή του εμβολιασμού.

➤ **Ηλικία**

Ενήλικος πληθυσμός

Κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες καταγράφονται 175.000 νοσηλείες λόγω πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας στο σύνολο του πληθυσμού. Υπολογίζεται πως το 36% πρόκειται για πνευμονία της κοινότητας και το 50% για νοσοκομειακή πνευμονία. Η πνευμονία είναι μια κοινή βακτηριακή επιπλοκή της γρίπης. Η θνητότητα είναι 5-7% και μπορεί να είναι πολύ υψηλότερη μεταξύ των ηλικιωμένων ατόμων. Επιπλοκές της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας περιλαμβάνουν το εμπύημα, την περικαρδίτιδα και τη βρογχική απόφραξη, με ατελεκτασία και σχηματισμό αποστήματος στον πνεύμονα .

Περισσότερες από 50.000 περιπτώσεις πνευμονοκοκκικής βακτηριαιμίας συμβαίνουν κάθε χρόνο. Βακτηριαιμία εμφανίζεται σε περίπου 25-30% των ασθενών με πνευμονοκοκκική πνευμονία. Η συνολική θνητότητα για βακτηριαιμία είναι περίπου 20%, αλλά μπορεί φτάσει στο 60% στους ηλικιωμένους ασθενείς. Ασθενείς με ασπληνία, που αναπτύσσουν βακτηριαιμία μπορεί να έχουν ραγδαία εξέλιξη της νόσου

Ο πνευμονιόκοκκος είναι το αίτιο βακτηριακής μηνιγγίτιδας σε ποσοστό 13-19% στις Ηνωμένες Πολιτείες. Υπολογίζεται ότι 3.000 έως 6.000 περιπτώσεις πνευμονοκοκκικής μηνιγγίτιδας συμβαίνουν κάθε χρόνο. Το ένα τέταρτο των ασθενών με πνευμονοκοκκική μηνιγγίτιδα έχουν επίσης πνευμονία. Η θνητότητα της πνευμονοκοκκικής μηνιγγίτιδας είναι περίπου 30%, αλλά μπορεί φτάσει στο 80% στους ηλικιωμένους. Τα νευρολογικά υπολείμματα είναι συχνά.

Καταστάσεις που αυξάνουν τον κίνδυνο της διεισδυτικής πνευμονοκοκκικής νόσου περιλαμβάνουν μειωμένη λειτουργία του ανοσοποιητικού από τη νόσο ή φάρμακα, λειτουργική ή ανατομική ασπληνία, χρόνια καρδιακή νόσο, πνευμονική νόσο (συμπεριλαμβανομένου του βρογχικού άσθματος), ηπατική ή νεφρική νόσο και κάπνισμα τσιγάρων.

Παιδιά

Βακτηριαιμία χωρίς εντοπισμένη λοίμωξη είναι η πιο κοινή κλινική παρουσίαση της πνευμονοκοκκικής λοίμωξης μεταξύ των παιδιών ηλικίας 2 ετών και μικρότερα, που αντιπροσωπεύουν περίπου το 70% της διεισδυτικής νόσου σε αυτή την ηλικιακή ομάδα. Βακτηριακή πνευμονία ευθύνεται για το 12-16% της διεισδυτικής πνευμονοκοκκικής νόσου σε παιδιά της ίδιας ηλικιακής ομάδας. Με τη σταδιακή μείωση της επίπτωσης της νόσου από τον αιμόφιλο της ινφλουέντζας, ο *S. pneumoniae* έχει γίνει η κύρια αιτία της βακτηριακής μηνιγγίτιδας σε παιδιά μικρότερα των 5 ετών στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Πριν από την ευρεία εφαρμογή του συζευγμένου επταδύναμου εμβολίου έναντι του πνευμονιόκοκκου, παιδιά μικρότερα του 1

έτους είχαν τα υψηλότερα ποσοστά μηνιγγίτιδας από πνευμονιόκοκκο, περίπου 10 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού .

Ο πνευμονιόκοκκος είναι συχνό αίτιο της οξείας μέσης ωτίτιδας και απομονώνεται σε ποσοστό 28-55% από καλλιέργειες μικροαναροφήσεων του μέσου ωτός. Μέχρι την ηλικία των 12 μηνών, πάνω από το 60% των παιδιών έχουν τουλάχιστον ένα επεισόδιο οξείας μέσης ωτίτιδα. Οι λοιμώξεις του μέσου ωτός είναι ο συχνότερος λόγος αναζήτησης ιατρικής βοήθειας στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, με αποτέλεσμα πάνω από 20 εκατομμύρια επισκέψεις ετησίως. Επιπλοκές της πνευμονιοκοκκικής μέσης ωτίτιδας είναι η μηνιγγίτιδα και η μαστοειδίτιδα.

Πριν από τη συνήθη χρήση του συζευγμένου εμβολίου, η βαρύτητα της πνευμονιοκοκκικής νόσου σε παιδιά μικρότερα των 5 ετών ήταν σημαντική: περίπου 17.000 περιπτώσεις διεισδυτικής νόσου κάθε χρόνο, εκ των οποίων 13.000 ήταν βακτηριαιμία χωρίς εντοπισμένη λοίμωξη και περίπου 700 ήταν μηνιγγίτιδα. Εκτιμάται ότι 200 παιδιά έχασαν τη ζωή τους κάθε χρόνο, ως αποτέλεσμα της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου. Αν και δεν θεωρείται διεισδυτική νόσος, εκτιμάται ότι περίπου 5 εκατομμύρια περιπτώσεων οξείας μέσης ωτίτιδας έλαβαν χώρα κάθε χρόνο μεταξύ των παιδιών ηλικίας κάτω των 5 ετών .

Τα παιδιά με λειτουργική ή ανατομική ασπληνία, ιδίως εκείνα με δρεπανοκυτταρική νόσο και τα παιδιά με τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) βρίσκονται σε πολύ υψηλό κίνδυνο διεισδυτικής νόσου, με τα ποσοστά σε ορισμένες μελέτες πάνω από 50 φορές υψηλότερα από εκείνα μεταξύ των παιδιών της ίδιας ηλικίας χωρίς αυτές τις συνθήκες (δηλαδή με συχνότητες εμφάνισης των 5.000-9.000 ανά 100.000 πληθυσμού). Τα παιδιά με κοχλιακό εμφύτευμα είναι σε αυξημένο κίνδυνο για πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα .

➤ Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Η εποχή παίζει ρόλο στην εμφάνιση των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων. Υπάρχει αυξημένη επίπτωση το χρονικό διάστημα Νοέμβριο με Απρίλιο με μέγιστη επίπτωση το Φεβρουάριο. Η σχολική περίοδος συνδυάζεται σαφώς με αυξημένη επίπτωση πνευμονιοκοκκικής νόσου στον παιδιατρικό πληθυσμό. Είναι επιπλέον γνωστό πως οι ιογενείς λοιμώξεις, που ευδοκιμούν το αντίστοιχο χρονικό διάστημα ευνοούν τις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις.

Η φοίτηση σε κέντρο παιδικής μέριμνας έχει επίσης αποδειχθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου και της οξείας μέσης ωτίτιδας επί 2-3 φορές μεταξύ των παιδιών ηλικίας μικρότερης των 59 μηνών.

➤ Γενετικοί παράγοντες

Φυλετική γενετική συσχέτιση

Η επίπτωση της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης διαφέρει από χώρα σε χώρα και έχει βρεθεί πως είναι μεγαλύτερη μεταξύ των παιδιών ορισμένων φυλετικών και εθνικών ομάδων, ιδίως εκείνων της ιθαγενών της Αλάσκα, Αφροαμερικάνων και ορισμένων φυλών Ινδιάνων (Αριζόνα, Νέο Μεξικό, και Navajo πληθυσμούς στο Κολοράντο και τη Γιούτα). Ο λόγος για αυτό τον αυξημένο κίνδυνο από τη φυλή και την εθνικότητα δεν είναι γνωστός με βεβαιότητα, αλλά ήταν ήδη γνωστή η ευαισθησία αυτών των φυλετικών ομάδων για την διεισδυτική λοίμωξη και από *Haemophilus influenzae*.

Συσχέτιση με το γονιδίωμα του μικροβίου. Η σημασία του οροτύπου

Οι περισσότεροι ορότυποι του πνευμονιοκόκκου δύνανται να προκαλέσουν νόσο. Οι «νοσογόνοι» ορότυποι διαφέρουν μεταξύ γεωγραφικών περιοχών και η κατανομή τους εξαρτάται και από το χρονικό διάστημα που μελετήθηκαν. Επίσης, διαφέρουν ανάλογα με την ηλικία του ξενιστή. Με βάση δεδομένα των ΗΠΑ, το 80% των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων σε παιδιά μικρότερα των 6 ετών και το 50% των λοιμώξεων σε ηλικίες >6 ετών οφείλονται στους ορότυπους 14, 6B, 19F, 18C, 23F, 4, 9V, οι οποίοι περιέχονται στο

συζευγμένο επταδύναμο εμβόλιο. Αντίθετα στους ενήλικες στις ΗΠΑ διεισδυτικές λοιμώξεις προκαλούν οι ορότυποι 1, 3, 4, 7, 8, 9, 12, 14 του πνευμονιοκόκκου

Μελέτες διεισδυτικών λοιμώξεων από πνευμονιόκοκκο και φορέας από την ίδια περιοχή κατά την ίδια χρονική περίοδο, δείχνουν ότι η λοιμογόνος δύναμη διαφέρει ανάλογα με τον ορότυπο της κάψας [84, 85, 86]. Μερικοί ορότυποι, όπως οι 1 και 7F, προκαλούν συχνότερα διεισδυτική νόσο, ενώ οι άλλοι τύποι αφορούν κυρίως τη φορεία. Σπάνια ορότυποι προκαλούν μόνο φορεία. Οι ασθενείς που έχουν μολυνθεί με ορότυπους με μικρή ικανότητα πρόκλησης διεισδυτικής νόσου, έχουν πιο συχνά μια υποκείμενη νόσο πριν από την πνευμονιοκοκκική λοίμωξη, σε σύγκριση με ασθενείς που έχουν προσβληθεί από τους ορότυπους με υψηλό δυναμικό της διεισδυτικής νόσου [87]. Ωστόσο, τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας βρέθηκαν σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί με ορότυπους μικρότερης δυναμικής για διεισδυτική νόσο, όπως οι τύποι 3, 6B και 19F [85].

➤ Εμβολιασμός

Οι «νοσογόνοι» ορότυποι, όπως ήδη αναφέρθηκε, διαφέρουν μεταξύ γεωγραφικών περιοχών και η κατανομή τους εξαρτάται και από το χρονικό διάστημα που μελετήθηκαν. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, επειδή τα υπάρχοντα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια βασίζονται σε έναν περιορισμένο αριθμό των καψικών πολυσακχαριτών για την παραγωγή τους.

Για δεκαετίες, ένα 23-δύναμο εμβόλιο, που αποτελείται από μόνο πολυσακχαρίτες, χρησιμοποιούνταν στους ηλικιωμένους και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Καθώς αυτό το εμβόλιο δεν είναι ανοσογόνο στα μικρότερα παιδιά, χρησιμοποιούνται σήμερα νεότερα εμβόλια, στα οποία πρωτεΐνες συνδέονται με τους πολυσακχαρίτες για να προκαλέσουν μια ισχυρή ανοσιακή απάντηση καθοδηγούμενη από τα Τ-κύτταρα. Για τεχνικούς λόγους και λόγω του υψηλού κόστους, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός των πολυσακχαριτών έχουν συμπεριληφθεί ως τώρα στα συζευγμένα εμβόλια (7, 10, και πρόσφατα 13). Οι ορότυποι έχουν επιλεγεί επειδή είναι οι κύριοι

ορότυποι, που προκαλούν διεισδυτική νόσο στις Ηνωμένες Πολιτείες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, γεγονός που σημαίνει ότι η επιλογή αυτών δεν είναι απόλυτα αντίστοιχη με την κατανομή των οροτύπων σε άλλες γεωγραφικές περιοχές άνα τον κόσμο, όπου εφαρμόζεται ο εμβολιασμός έναντι του πνευμονιοκόκκου. Μια ανασκόπηση από τον Lin με συγκέντρωση δεδομένων από μελέτες που διεξήχθησαν στην περιοχή της Ασίας-Ειρηνικού δείχνει ότι ο δυνητικός βαθμός κάλυψης για το συζευγμένο επταδύναμο εμβόλιο κυμαίνεται από 50-70% [88]. Το επταδύναμο εμβόλιο εισήχθη στο πρόγραμμα παιδικού εμβολιασμού στις Ηνωμένες Πολιτείες κατά το έτος 2000. Από τότε μια τεράστια μείωση έχει παρατηρηθεί σε σχετιζόμενες με το εμβόλιο διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές νόσους σε παιδιά [89]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί μείωση της φορέας των οροτύπων του εμβολίου καθώς και η μεταφερόμενη ανοσία και στον ενήλικο πληθυσμό, που δεν είναι εμβολιασμένος για τον πνευμονιόκοκκο.

Το όφελος του συστηματικού εμβολιασμού κυρίως στα παιδιά μικρότερα των 5 ετών, αλλά και γενικότερα στο κοινωνικό σύνολο μέσω του φαινομένου της συλλογικής ανοσίας έχει καταδειχθεί σε πολυάριθμες διεθνείς μελέτες. Αξίζει κανείς να αναφέρει τη σημαντική μείωση των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών νοσημάτων (ΔΠΝ) από τους ορότυπους του εμβολίου που διαπιστώθηκε σε πολλά ευρωπαϊκά κράτη, όπως μείωση κατά 39% στις πνευμονιοκοκκικές μηνιγγίτιδες και 29% στις βακτηριαιμίες σε παιδιά < 2 ετών στη Γαλλία [90], μείωση κατά 50% των ΔΠΝ σε παιδιά < 2 ετών στη Γερμανία [91], και κατά 40% στην Ισπανία [92] κατά 95% των ΔΠΝ από ορότυπους του PCV-7 σε παιδιά <5 ετών στην Νορβηγία [93], κατά 89% σε παιδιά <2 ετών στη Δανία [94], και κατά 98% στην ίδια ηλικιακή ομάδα στην Αγγλία και Ουαλία [95]. Στις ΗΠΑ η μείωση των ΔΠΝ από τους 7 ορότυπους του εμβολίου σε παιδιά > 5 ετών έφθασε το 100% το 2007, που αντιπροσώπευε μια συνολική μείωση κατά 76% των συνολικών περιστατικών ΔΠΝ [96]. Αντίστοιχα για τους ενήλικες >65 ετών, στα πλαίσια της συλλογικής ανοσίας, η μείωση των ΔΠΝ από τους ορότυπους του PCV-7 έφθασε το 92% και το 37% συνολικά για όλα τα περιστατικά ΔΠΝ [96]. Σημαντικά ήταν τα οφέλη και στις μη διεισδυτικές λοιμώξεις, αφού για παράδειγμα καταγράφηκε μείωση 22% στο συνολικό αριθμό νοσηλειών παιδιών <1 έτους με πνευμονιοκοκκική πνευμονία της

κοινότητας στις ΗΠΑ [97], μείωση κατά 70,5% των νοσηλειών πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας στην Ιταλία [98] και κατά 48% των περιστατικών ΟΜΩ με ωτόρροια στη χώρα μας [99]. Ας υπογραμμιστεί επιπλέον, η σημαντική μείωση που επέφερε η χρήση του εμβολίου στη ρινοφαρυγγική φορεία των ορότυπων του εμβολίου, που σε πρόσφατη μελέτη από την Ολλανδία ανέρχεται σε 92% σε παιδιά 24 μηνών και 94% στους γονείς τους [100].

Η ευρεία χρήση του PCV-7 οδήγησε σε σημαντική μείωση των περιπτώσεων ΔΠΝ από τους επτά ορότυπους, αλλά έφερε στο προσκήνιο κάποιους άλλους ορότυπους που δεν περιλαμβάνονται στο εμβόλιο και χαρακτηρίζονται από σημαντική διεισδυτική ικανότητα, όπως οι 1, 5, 6A και κυρίως ο 19A [101]. Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν συζευγμένα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια δεύτερης γενιάς με σκοπό την αντιμετώπιση των αναδυόμενων αυτών οροτύπων. Το 2009 εντάχθηκε στο Εθνικό Πρόγραμμα εμβολιασμού της χώρας μας το 10δύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (PCV-10), που περιελάμβανε επιπλέον του 7δύναμου τους ορότυπους 1, 5 και 7F, ενώ τον Ιούνιο του 2010 εντάχθηκε και το 13δύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο [102] (PCV-13), στο οποίο περιλαμβάνονται οι ορότυποι του 10δύναμου και επιπλέον οι ορότυποι 3, 6A και 19A, που έχουν αυξημένη παρουσία και στη χώρα μας τα τελευταία χρόνια [103]. Πολυκεντρική μελέτη που διεξήχθη στη χώρα μας, έδειξε ότι ο ορότυπος 19A είναι το συχνότερο αίτιο διεισδυτική πνευμονιοκοκκικής νόσου και οξείας μέσης ωτίτιδας σε παιδιά <5 ετών, ενώ είναι συχνά πολυανθεκτικός σε θεραπείες πρώτης γραμμής [104]. Μέσα σε λίγα χρόνια από τη χρήση του PCV-13 τα στοιχεία για την αποτελεσματικότητά του είναι ιδιαίτερα θετικά. Στις ΗΠΑ αρχικά στοιχεία από 8 μεγάλα νοσοκομεία υποδεικνύουν μια μείωση κατά 36% των περιστατικών ΔΠΝ σε παιδιά ένα χρόνο μετά την εισαγωγή του εμβολίου με αντίστοιχη μείωση κατά 45% των περιπτώσεων από τον ορότυπο 19A [105]. Σημαντική μείωση των δηλούμενων περιπτώσεων ΔΠΝ από τους 6 επιπρόσθετους ορότυπους του εμβολίου καταγράφηκε επίσης από το ΗΡΑ (Health Protection Agency) στα παιδιά <2 ετών και ιδίως από τους ορότυπους 19A και 7F [106, 107]. Στη Γερμανία, 3 χρόνια μετά την χρησιμοποίηση των συζευγμένων εμβολίων δεύτερης γενιάς καταγράφονται λιγότερα περιστατικά

ΔΠΝ από τους ορότυπους 1, 3, 7F και 19A σε παιδιά <2 ετών [108]. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη χώρα μας, σύμφωνα με στοιχεία του ΚΕΕΛΠΝΟ, μέσα στο πρώτο χρόνο κυκλοφορίας του PCV-13 καταγράφηκε μείωση 23,3% των περιστατικών πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας σε παιδιά <5 ετών [109].

Η αύξηση της διεισδυτικής νόσου, που προκαλείται από τους ορότυπους, που δεν ανήκουν στα χρησιμοποιούμενα εμβόλια και η κλωνική επέκταση των κλώνων ορισμένων από αυτούς τους οροτύπους έχει ήδη παρατηρηθεί. Είναι ανησυχητικό το γεγονός ότι οι πνευμονιόκοκκοι μπορούν να υπερκεράσουν την προστασία του εμβολίου με τη δυνατότητά τους να τροποποιούν το καψιδικό αντιγόνο προσλαμβάνοντας ξένο γενετικό υλικό (transformation). Επίσης, με την πίεση της φυσικής επιλογής από τη χρήση του εμβολίου, ο πνευμονιόκοκκος μπορεί να επιλέξει για φορεία και πρόκληση λοιμώξεων οροτύπους ήσσονος έως τώρα κλινικής σημασίας. Ως εκ τούτου, η επιδημιολογική παρατήρηση της φορείας του πνευμονιόκοκκου με σύγχρονες μοριακές τεχνικές, πρέπει να είναι σταθερή και συνεχής στην εποχή μετά την εφαρμογή του αντιπνευμονιοκοκκικού εμβολιασμού.

➤ Χρήση αντιβιοτικών

Για δεκαετίες, η συνήθης θεραπεία για λοιμώξεις από πνευμονιόκοκκο παρέμενε η πενικιλίνη. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί μια ευρεία αύξηση των ανθεκτικών πνευμονιόκοκκων στα περισσότερα αντιβιοτικά (εκτός από τη βανκομυκίνη). Στοιχεία από το ευρωπαϊκό δίκτυο EARSS (www.rivm.nl / EARSS, European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) σχετικά με τα ποσοστά ανθεκτικότητας σε ορισμένα αντιβιοτικά, μεταξύ των στελεχών που απομονώνονται σε διεισδυτικές λοιμώξεις στην Ευρώπη, δείχνουν μια αυξανόμενη τάση αντοχής στην πενικιλίνη και την ερυθρομυκίνη. Πολυανθεκτικοί κλώνοι πνευμονιόκοκκου έχουν προκύψει ακόμη και σε χώρες με χαμηλή συχνότητα αντοχής, όπως στη Σουηδία. Η μοριακή τυποποίηση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών, δείχνει ότι μερικοί τύποι κλώνων πνευμονιόκοκκου είναι πιο επιρρεπείς να εξαπλωθούν σε παγκόσμιο επίπεδο. Παράδειγμα τέτοιου κλώνου είναι ο ST156, ο οποίος φέρει αντοχή

στην πενικιλίνη και τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη και οποίος προέρχεται από την Ισπανία και έχει εξαπλωθεί και σε άλλες χώρες. Η διασπορά του κλώνου διευκολύνεται από ένα οπερόνιο που κωδικοποιεί μία νηματοειδή δομή στην επιφάνεια του βακτηρίου και η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στον αποικισμό ενός είδους επίμυων που χρησιμοποιήθηκε ως πειραματόζωο [42,110]. Η εισαγωγή του αντιπνευμονιοκοκκικού εμβολίου στα προγράμματα παιδικού εμβολιασμού σε πολλές χώρες αναμένεται επίσης να επηρεάσει την αντοχή στα αντιβιοτικά. Ωστόσο, οι μελέτες διαφέρουν, διότι σε ορισμένες περιοχές παρατηρούμε μια μείωση του ποσοστού της αντοχής μετά την εφαρμογή του εμβολιασμού, ενώ σε άλλες δεν διαπιστώνεται το ίδιο αποτέλεσμα, επειδή έχουν ταυτόχρονη αύξηση των οροτύπων που δεν περιλαμβάνονται στο εμβόλιο. Στις Ηνωμένες Πολιτείες μια επέκταση του ορότυπου 19A παρατηρήθηκε με αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά φάρμακα, δημιουργώντας προβλήματα για τη θεραπεία κοινών λοιμώξεων, που μέχρι τότε ήταν εύκολα θεραπεύσιμες.

5. Πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις

5.1 Λοιμογόνοι παράγοντες του πνευμονιοκόκκου

Η παθογόνος δράση του πνευμονιοκόκκου σχετίζεται με τα δομικά του συστατικά και κυρίως με το έλυτρο (που αποτελεί τον ισχυρότερο λοιμογόνο παράγοντα), αλλά και στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος, καθώς και ένζυμα και τοξίνες που παράγει.

Συνοπτικά ακολούθως, αναφέρονται οι κύριοι λοιμογόνοι παράγοντες του μικροβίου και ο μηχανισμός δράσης τους:

| Λοιμογόνος παράγοντας | Μηχανισμός δράσης |
|--|--|
| Πολυσακχαρίτης ελύτρου: | Εμποδίζει τη φαγοκυττάρωση, Ενεργοποιεί το συμπλήρωμα |
| Πολυσακχαρίτης κυτταρικού τοιχώματος: | Ενεργοποιεί το συμπλήρωμα |
| Πρωτεΐνη επιφανείας PspA: | Αναστέλλει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος |
| IgA1-πρωτεάση: | Αναστέλλει τη δράση της εκκριτικής IgA της βλέννης, διευκολύνοντας τον αποικισμό |
| Νευραμινιδάση: | Προάγει τη διείσδυση στους ιστούς |
| Αυτολυσίνη: | Απελευθερώνει την πνευμονολυσίνη και στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος |
| Πνευμολυσίνη: | Κυτταροτοξική δράση Ενεργοποιεί το συμπλήρωμα |

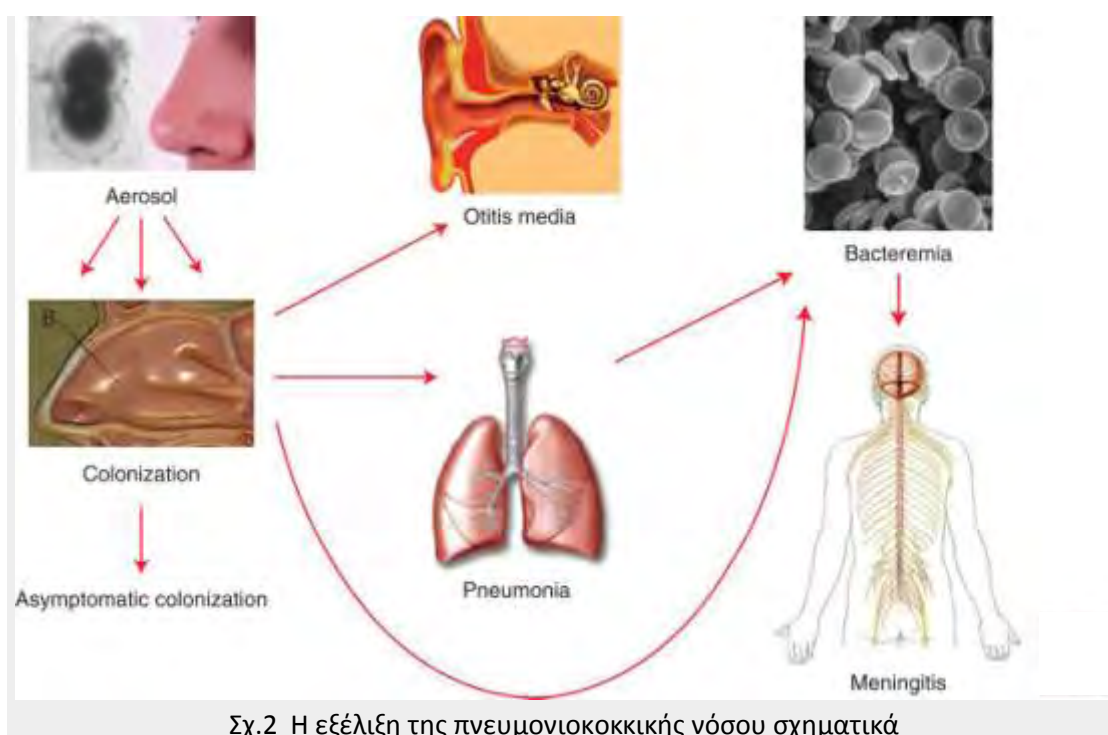
5.2 Προδιαθεσικοί παράγοντες του ξενιστή στην πρόκληση πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης

Παράγοντες του ξενιστή (ανθρώπου) προδιαθέτουν σε λοιμώξεις και καθορίζουν τη βαρύτητα και την πορεία της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης. Συνοπτικά αναφέρονται ακολούθως:

| | |
|--|---|
| A. Ανεπαρκής παραγωγή αντισωμάτων | |
| <u>Πρωτοπαθής</u> | <u>Δευτεροπαθής</u> |
| Συγγενής αγαμμασφαιριναιμία | Πολλαπλούν μυέλωμα |
| Επίκτητη αγαμμασφαιριναιμία | Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία |
| Επιλεκτική ανεπάρκεια υποτάξεων IgG | Λέμφωμα |
| | HIV λοίμωξη |
| B. Ανεπαρκής παραγωγή συμπληρώματος | |
| Μειωμένη παραγωγή ή απουσία των παραγόντων C1, C2, C4 | |
| Γ. Ποσοτική διαταραχή των πολυμορφοκυττάρων | |
| <u>Πρωτοπαθής</u> | <u>Δευτεροπαθής</u> |
| Κυκλική ουδετεροπενία | Φαρμακευτικής αιτιολογίας ουδετεροπενία |
| | Απλαστική αναιμία |
| Δ. Μειωμένη λειτουργικότητα πολυμορφοκυττάρων | |
| Αλκοολισμός | |
| Χρήση κορτικοστεροειδών | |
| Νεφρική ανεπάρκεια | |
| Ε. Ανεπαρκής απομάκρυνση του μικροβίου από την κυκλοφορία | |
| <u>Πρωτοπαθής</u> | <u>Δευτεροπαθής</u> |
| Συγγενής ασπληνία / υποσπληνία | Σπληνεκτομή |
| | Δρεπανοκυτταρική αναιμία |
| ΣΤ. Πολυπαραγοντικοί | |
| Βρέφη και Τρίτη ηλικία | Σακχαρώδης διαβήτης |
| Χρήση κορτικοστεροειδών | Αλκοολισμός |
| Υποθρεψία | Παρατεταμένη νοσηλεία |
| Κίρρωση ήπατος | Άγχος |
| Νεφρική ανεπάρκεια | Έκθεση στο ψύχος |
| Ζ. Συνθήκες υψηλής έκθεσης στο μικρόβιο | |
| Βρεφονηπιακοί σταθμοί | |
| Ιδρύματα | |
| Η. Προηγούμενες λοιμώξεις του αναπνευστικού | |
| Γρίπη | |
| Θ. Χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις του αναπνευστικού | |
| Κάπνισμα | |
| Άσθμα | |
| Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια | |

5.3 Από τον αποικισμό στην λοίμωξη

Τα κύτταρα του πνευμονιοκόκκου εισέρχονται στη ρινική κοιλότητα και προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα και μπορεί στη συνέχεια είτε να παραμείνουν εκεί ως ξενιστές ή να μεταφερθούν κατά συνέχεια ιστού σε άλλα όργανα, όπως τα ώτα, τις παραρρίνιες κοιλότητες, ή μέσω των βρόγχων στους πνεύμονες και στη συνέχεια ενδεχομένως να διαπεράσουν το φράγμα του βλεννογόνου και να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος ή / και να διαρρήξουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να προκαλέσουν μηνιγγίτιδα (Σχήμα 2)



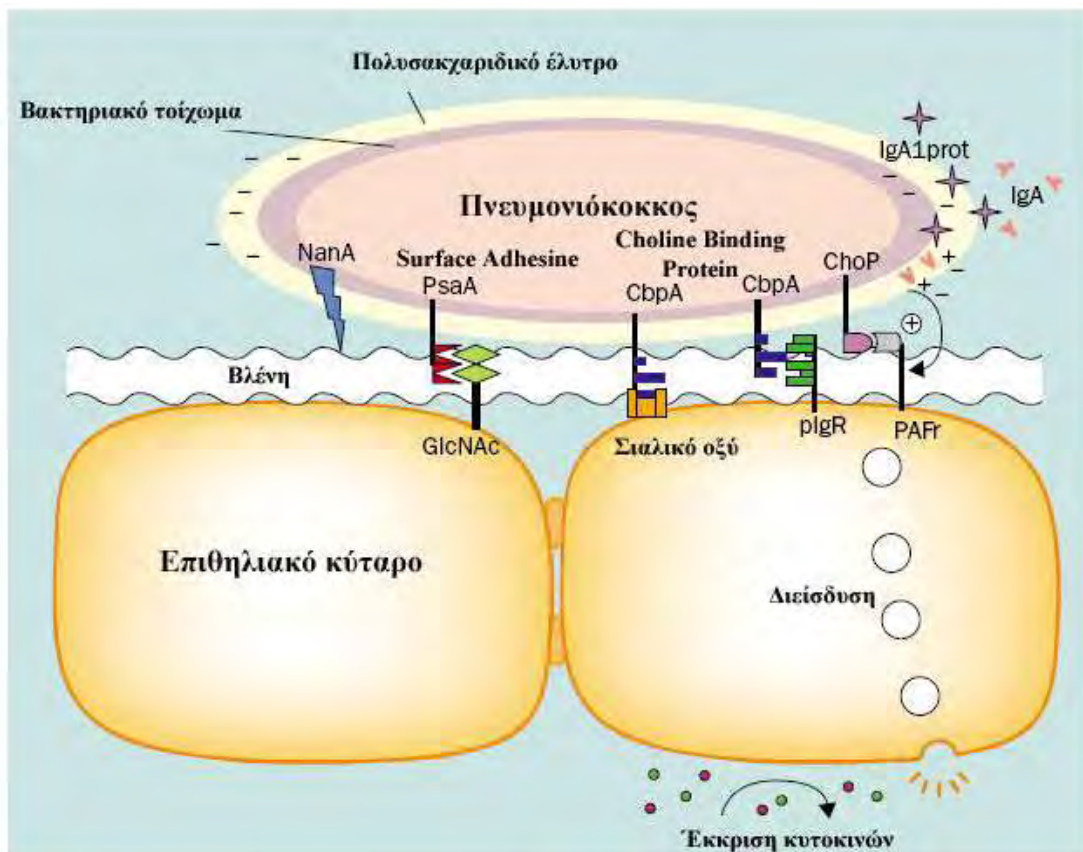
Σχ.2 Η εξέλιξη της πνευμονιοκοκκικής νόσου σχηματικά

Ο αποικισμός του αναπνευστικού επιθηλίου είναι το πρώτο βήμα για την πρόκληση νόσου. Ο πνευμονιόκοκκος προσκολλάται στους δισακχαριδικούς υποδοχείς (GlcNAcβ1-4Gal) των επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή. Η παρουσία της IgA1 πρωτεΐνης και της νευραμινιδάσης διευκολύνουν τον αποικισμό (Σχήμα 3).

Μετά τον αποικισμό, τα βακτήρια πρέπει να υπερκεράσουν τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή και να εισέλθουν στους ιστούς. Αυτό συμβαίνει ευκολότερα όταν το μικρόβιο αποικίσει τα παραρρίνια, την ευσταχιακή

σάλπιγγα ή τους βρόγχους. Η δράση των κροσσών του αναπνευστικού επιθηλίου και οι τοπικοί μηχανισμοί άμυνας του οργανισμού, απομακρύνουν τους πνευμονιοκόκκους. Όταν όμως συνυπάρχει ιογενής λοίμωξη, αλλεργία ή άλλο έλλειμμα επαρκούς ανοσιακής απάντησης, οι μηχανισμοί αυτοί δεν επαρκούν και το μικρόβιο διεισδύει στον οργανισμό του ξενιστή.

Ο πνευμονιοκόκκος λόγω του ελύτρου του και ηλεκτροχημικών δυνάμεων, διαφεύγει της φαγοκυττάρωσης και της ενδοκυττάριας πέψης, απουσία ειδικών αντισωμάτων έναντι του πολυσακχαρίτη του ελύτρου (διαδικασία οψωνινοποίησης). Το μικρόβιο μπορεί να πολλαπλασιαστεί στους ιστούς διεγείροντας ισχυρή φλεγμονώση αντίδραση. Τα συστατικά του ελύτρου και του κυτταρικού τοιχώματος ενεργοποιούν την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος, ενώ τα αντισώματα έναντι πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος, ενεργοποιούν την κλασσική οδό του συμπληρώματος.



Σχήμα 3. Η προσκόλληση του πνευμονιοκόκκου στο επιθηλιακό κύτταρο

5.4.Κλινικά σύνδρομα

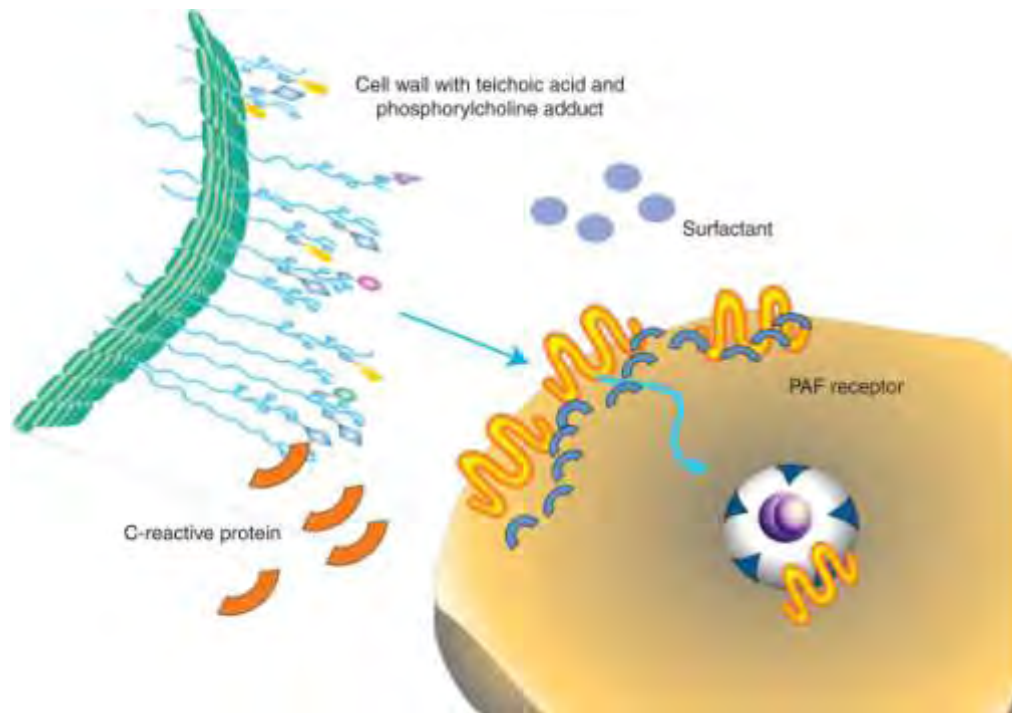
➤ ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ

Καθώς τα βακτήρια εισέρχονται στην κατώτερη αναπνευστική οδό, η παθογένεση της πνευμονίας προϋποθέτει να υπερκεράσουν τον φραγμό του βλεννογόνου και να μεταναστεύσουν στις κυψελίδες. Η νευραμινιδάση διασπά τη βλέννη ενώ η απουσία της NanA μειώνει την λοιμογόνο ικανότητα του πνευμονιοκόκκου [111]. Η NanA αποκαλύπτει επίσης γλυκοσυζεύγματα, όπως η N-ακετυλογαλακτοζαμίνη, β1-3 γαλακτόζη, σε κύτταρα ξενιστές, τα οποία παρέχουν θέσεις χαλαρής βακτηριακής προσκόλλησης. Παρεμβολή σε αυτό το βήμα με χορήγηση αναστολέων της νευραμινιδάσης (όπως oseltamivir), αναστέλλει τη συνέργεια σε πνευμονία μεταξύ της γρίπης και του πνευμονιόκοκκου.

Η σταθερή προσκόλληση των βακτηρίων στο κυψελιδικό επιθήλιο, ο πολλαπλασιασμός τους και η επακόλουθη έναρξη ιστικής βλάβης με κινητοποίηση μηχανισμών φλεγμονής οδηγεί στην κλασική εξέλιξη της λοβώδους πνευμονίας. Η αλληλεπίδραση των εκκρινόμενων προϊόντων και των βακτηριακών συστατικών που είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια του κυττάρου με το κυψελιδικό επιθήλιο και το ανοσιακό σύστημα του οργανισμού συντηρεί και οργανώνει τη φλεγμονώδη αντίδραση. Η δράση της πνευμολυσίνης με το σχηματισμό πόρων και το υπεροξειδίο του υδρογόνου που απελευθερώνεται σε άφθονες ποσότητες από τα βακτήρια διαρρηγνύει το κυψελιδικό επιθήλιο και συσσωρεύεται οίδημα στο κυψελιδικό χώρο [112]. Λιποτειχοϊκό οξύ, λιποπρωτεΐνες και μια σειρά πρωτεϊνών που συνδέονται με τη βακτηριακή επιφάνεια ενισχύουν τη φλεγμονώδη διαδικασία. Κατά τη διάρκεια αυτής της πρώιμης ανοσιακής απάντησης, τα βακτήρια αποκτούν σταθερή προσκόλληση στο κυψελιδικό επιθήλιο, χρησιμοποιώντας διάφορες συγκολλητίνες, συμπεριλαμβανομένης την οικογένεια των λιποπρωτεϊνών, τις LPxTG πρωτεΐνες, τις πρωτεΐνες δεσμευτικές της χολίνης και τις φίμπριες (ινίδια) [113]. Στις πρωτεΐνες που ακολουθούν το μοτίβο LPxTG και που δεσμεύουν την εξωκυττάρια ουσίες, περιλαμβάνονται οι PανB, PfbA, PclA, και PsrP [114]. Οι φίμπριες, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια PI - 1 και PI-

2, βοηθούν στη δέσμευση των βακτηρίων στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος [42,115]. Η οικογένεια των πρωτεϊνών Cbr που συνδέονται μη ομοιοπολικά στο τειχοϊκό οξύ της επιφανείας του πνευμονιοκόκκου, έχουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών ως πρωτεάσες, τροποποιητικά ένζυμα του κυτταρικού τοιχώματος και ως αλληλεπιδρώντα στοιχεία με συγκολλητικές [28]. Η CbrA ειδικότερα είναι σημαντική στην δέσμευση πνευμονιοκόκκων σε κύτταρα ξενιστές και η PspA αλληλεπιδρά με πολλά συστατικά της ανοσιακής απάντησης του ξενιστή.

Τα περισσότερα αναπνευστικά παθογόνα έχουν κοινή στρατηγική όσον αφορά την πρόκληση βακτηραιμίας μετά τον αποικισμό του αναπνευστικού βλενογόνου. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται «έμφυτη εισβολή» και αντισταθμίζεται από τα πρώιμα στοιχεία ανοσιακής απάντησης του ξενιστή [116,117]. Ο βασικός υποδοχέας που προκαλεί με την ενεργοποίησή του τον παραπάνω μηχανισμό είναι ο υποδοχέας του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAFr) [47]. Πολλά αναπνευστικά παθογόνα φέρουν στην επιφάνειά τους φωσφορυλοχολίνη (PCho), η οποία με το μηχανισμό της μοριακής μίμησης όταν συνδεθεί στον υποδοχέα PAFr προκαλεί την είσοδο των βακτηρίων σε ένα κενοτόπιο του κυττάρου του ξενιστή και στη συνέχεια πολλαπλασιασμό αυτών και διασπορά με τη λύση του κυττάρου στην κυκλοφορία του αίματος [48]. Επίμυες, που στερούνται τον υποδοχέα PAFr και αυτοί που έλαβαν θεραπεία με ανταγωνιστές PAFr αδυνατούν να προχωρήσουν από πνευμονία σε σήψη. Το θεμελιώδες βήμα PCho - PAFr στην παθογένεση αντιμετωπίζεται από την έμφυτη , παραγωγή μίας πρωτεΐνης οξειάς φάσης, της C- αντιδρώσα πρωτεΐνης (CRP), η οποία δεσμεύει την PCho και ανταγωνιστικά αναστέλλει την ενεργοποίηση του PAFr και την PAFr/PCho μεσολαβούμενη βακτηριακή εισβολή [116]. Ομοίως, ο επιφανειοδραστικός παράγοντας, ο οποίος είναι πλούσιος σε PCho , και ένα αντίσωμα έναντι της φωσφορυλοχολίνης είναι ανταγωνιστικοί αναστολείς της βακτηριακής σύνδεσης στον PAFr και της CRP στους πνεύμονες [49] . Με αυτό το μηχανισμό, η «έμφυτη εισβολή» εξουδετερώνεται από τις αρχές της φυσικής ανοσίας (Εικ.7) .



Εικ. 7 Η PAFr/PCho μεσολαβούμενη βακτηριακή εισβολή

Ο έλεγχος του βακτηριακού πολλαπλασιασμού στον πνεύμονα απαιτεί ανοσιακή αναγνώριση των μοριακών προτύπων πνευμονιοκοκκικών παθογόνων (PAMPs), που προκαλεί την κινητοποίηση των ουδετερόφιλων και τη συσσώρευση αιμορραγικών θραυσμάτων ως αποτέλεσμα της προκαλούμενης φλεγμονώδους αντίδρασης. Συστατικά της πεπτιδογλυκάνης επιφανείας του βακτηρίου, προάγουν τη σηματοδότηση διαμεσολαβούμενη από υποδοχείς TLR2 και LPS πρωτεΐνες [118, 119]. Το τειχοϊκό οξύ που φέρει τη φωσφορυλοχολίνη δεσμεύεται σε υποδοχείς PAFr [49]. Τα δε μικρά θραύσματα πεπτιδογλυκάνης αναγνωρίζονται ενδοκυττάρια από Nod2 [120,121]. Η πνευμονολυσίνη ανιχνεύεται από TLR4 [122] και το DNA ανιχνεύεται από TLR9 [123]. Η σημασία της φλεγμονώδους αντίδρασης μέσω των TLR οδών προς ενεργοποίηση του παράγοντα νέκρωσης NF-κΒ αποδείχθηκε από τη διαφορετική ευαισθησία στη νόσο σε άτομα με πολυμορφισμούς σε αυτό το μονοπάτι [124]. Οι SNPs σε NF-κΒΙΑ, NF-κΒΙΕ, και TIRAP, που οδηγούν σε μειωμένη φλεγμονώδη απάντηση, δείχνουν μια προστατευτική επίδραση, ενώ μειωμένη λειτουργία του IRAK4 ή NEMO αυξάνει την ευαισθησία στην πνευμονιοκοκκική λοίμωξη. Η NF-κΒ σηματοδότηση οδηγεί στην απελευθέρωση των κυτοκινών, ιδιαίτερα της IL - 6 και IL-1SS , η οποία στη συνέχεια επάγει στρατολόγηση των ουδετερόφιλων

και ενεργοποίηση των μακροφάγων. Ο πνεύμονας έχει μοναδική ικανότητα στο να διευκολύνει την πρόσληψη ουδετερόφιλων ως απάντηση στην πνευμονιοκοκκική εισβολή τόσο με CD-11/CD-18 εξαρτώμενη και ανεξάρτητη φλεγμονώδη αντίδραση [125]. Μολονότι τα ουδετερόφιλα απαιτούνται για την εκκαθάριση των βακτηρίων, η έντονη φλεγμονή που προκαλείται από αυτά συμβάλει στην πρόκληση πνευμονικής ιστικής βλάβης. Η ουδετεροπενία (όχι πλήρης απουσία ουδετερόφιλων) έχει δειχθεί πως μπορεί να μετριάσει τη βλάβη και τη βελτίωση της έκβασης της πνευμονίας από πνευμονιόκοκκο [126].

Ο πνευμονιόκοκκος εκκρίνει μία ισχυρή τοξίνη, την πνευμολυσίνη, η οποία ανήκει στην οικογένεια κυτταροτοξινών εξαρτώμενων από τη χολίνη, που προκαλούν δημιουργία πόρων [127, 128]. Παίζει σημαντικό ρόλο στην αναπνευστική οδό, όχι μόνο στη λύση κυττάρων-ξενιστών, αλλά και προκαλώντας την καταστροφή του βλεννοκροσσώτου αναπνευστικού επιθηλίου διαχωρίζοντας τις στενές συνδέσεις μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων [129, 130]. Συμβάλλει ομοίως στην παθογένεση της μέσης ωτίτιδας με κυτταροτοξικές επιδράσεις στα τριχωτά κύτταρα του κοχλίου στο μέσο ούς [131]. Η πνευμολυσίνη ενεργοποιεί την κλασική οδό του συμπληρώματος [132] και μπορεί να αναγνωριστεί από τον υποδοχέα TLR4, προκαλώντας με τον τρόπο αυτό φλεγμονώδη απάντηση [122]. Η πνευμολυσίνη έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη βακτηριακή πρόσληψη σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα, προκαλώντας αναστολή της κυτταρικής ενεργοποίησης και της έκκρισης κυτοκινών, και επάγοντας απόπτωση εξαρτώμενη από κασπάσες [133]. Μία μη λειτουργική πνευμολυσίνη, όπως σε ορισμένες απομονώσεις ορότυπου 1, επηρεάζει επίσης τη φλεγμονή που προκαλείται από την αλληλεπίδραση των βακτηρίων στα δενδριτικά κύτταρα και δύναται να προκαλέσει την ανάπτυξη λοιμώξεων, όπως το εμπύημα [134].

➤ ΒΑΚΤΗΡΙΑΙΜΙΑ

Το πιο σημαντικό στοιχείο για την ανάπτυξη υψηλού τίτλου βακτηριαιμίας είναι το πολυσακχαριδικό έλυτρο του πνευμονιόκοκκου [2,135]. ο πολυσακχαρίτης της κάψας προστατεύει το βακτήριο από τη φαγοκυττάρωση και η παραγωγή ειδικού αντισώματος έναντι του συγκεκριμένου πολυσακχαρίτη του οροτύπου προκαλεί «οψωνινοποίηση» του βακτηρίου και φαγοκυττάρωση από τα ουδετερόφιλα μακροφάγα. Κάθε ένας από τους πάνω από 90 ορότυπους πνευμονιοκόκκου έχει ένα μοναδικό δομικά πολυσακχαρίτη και αυτός διαφέρει σε αντιφαγοκυτταρική αποτελεσματικότητα. Παράγοντες όπως η στερεοχημική παρεμπόδιση και το αρνητικό φορτίο προσδιορίζουν την ικανότητα ενός τύπου ελύτρου να αναστέλει την εναπόθεση στην επιφάνεια του βακτηρίου στοιχείων του συμπληρώματος, της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, δεσμευτικών της μαννόζης πρωτεϊνών, και αντισωμάτων, τα οποία μπορούν να συνδεθούν σε υποδοχείς των φαγοκυττάρων [135]. Η ποσότητα της κάψας είναι επίσης σημαντικό στοιχείο, καθώς πρόκειται για μία μεταβλητή ιδιότητα φάσης και ουσιαστικά στελέχη μη επικαλυπτόμενα από έλυτρο είναι ουσιαστικά και μη λοιμογόνα.

Εκτός από το έλυτρο, βακτηριακά συστατικά επιφάνειας αλληλεπιδρούν με τον καταρράκτη του συμπληρώματος εμποδίζοντας την εναπόθεση στοιχείων αυτού [132]. Η PspA αναστέλλει την εναπόθεση στοιχείων της κλασσικής οδού του συμπληρώματος και η CbrA δεσμεύει το C3 και τον παράγοντα H. Υποδοχείς, όπως οι SR- A, υποδοχείς μακροφάγων με δομή κολλαγόνου (Marco) και LOX- 1, στοχεύουν το πολυανιονικό τειχοϊκό οξύ και παίζουν ρόλο στην κάθαρση των βακτηρίων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις ουσιαστικά φέρνουν σε επαφή το βακτήριο-εισβολέα με τα φαγοκύτταρα/μακροφάγα καθώς και τα στοιχεία του συμπληρώματος.

➤ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

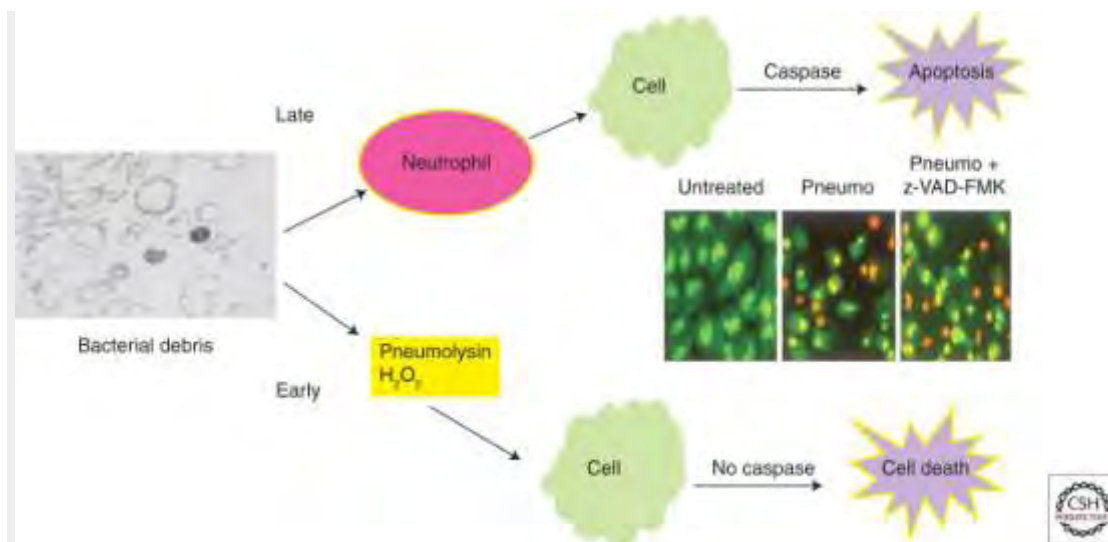
Η υψηλού τίτλου βακτηριαιμία, έχει ως αποτέλεσμα κύτταρα πνευμονιοκόκκου να έρθουν σε άμεση επαφή με τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα στο επίπεδο του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η διέλευση μέσω των ειδικών στενών διακυτταρικών συνδέσεων αυτού του εξειδικευμένου ενδοθηλίου, επιτρέπει την είσοδο του βακτηρίου εντός του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Χρησιμοποιώντας κύτταρα πνευμονιοκόκκου ως ανιχνευτή (probe), βρέθηκε μια κοινή πύλη εισόδου για παθογόνα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Οι βακτηριακές συγκολλητίνες των *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* και *Neisseria meningitidis* μοιράζονται ένα κοινό επίτοπο που επιτρέπει την σύνδεση με τον 37/67-kDa υποδοχέα λαμίνης (LR) των ενδοθηλιακών κυττάρων [50]. Αυτός ο υποδοχέας είναι επίσης στόχος για πολλούς νευροτρόπους ιούς, εξηγώντας έναν κοινό μηχανισμό στην ανάπτυξη της μηνιγγίτιδας γενικά. Στην περίπτωση των πνευμονιοκόκκων, η προσκολλητίνη CbpA του βακτηρίου δεσμεύει τον υποδοχέα λαμίνης, που βρίσκεται σε μια επιφάνεια του ενδοθηλιακού κυττάρου εκτεθειμένη σαν θηλειά, διαφορετική από εκείνη όπου προσδέεται ο πολυμερικός υποδοχέας της ανοσοσφαιρίνης στο ρινοφάρυγγα. Πρόσφατα προτάθηκε πως η νευραμινιδάση (NanA) προωθεί κι αυτή την προσκόλληση των κυττάρων του πνευμονιοκόκκου στα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου μέσω ενός λαμίνης G-ομοιάζοντος τμήματος της λεκτίνης [136]. Μόλις τα βακτήρια προσδεθούν στο ενδοθήλιο του αγγειακού τοιχώματος, αντιστέκονται στη ροή του αίματος και ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα προκειμένου να αυξηθεί ο αριθμός των υποδοχέων PAFr στην ενδοθηλιακή επιφάνεια [137]. Ο PAFr υποδοχέας συνδέεται με τη φωσφορυλοχολίνη επί του κυτταρικού τοιχώματος και έτσι μεταφέρονται τα βακτήρια κατά μήκος του ενδοθηλίου ενδοκυτταρικά επιτρέποντας τη διέλευση από το αίμα στον εγκέφαλο. Επίμυες που στερούνται PAFr υποδοχέων ή βακτήρια ανεπαρκή σε CbpA δεν αναπτύσσουν μηνιγγίτιδα ακόμη και σε πολύ υψηλό τίτλο βακτηριαιμίας. Αντισώματα έναντι CbpA είναι προστατευτικά κατά της μηνιγγίτιδας σε διάφορα είδη βακτηρίων.

Η μηνιγγίτιδα ως μοντέλο της φλεγμονώδους βλάβης

Ο πολλαπλασιασμός των βακτηριδίων στο χώρο του ΚΝΣ είναι κεραυνοβόλος καθώς δεν υπάρχουν μηχανισμοί άμυνας σε αυτό το διαμέρισμα. Έτσι, η εγκεφαλική βλάβη ακολουθεί παράλληλα χρονικά την αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηριακών συστατικών και την απάντηση του ξενιστή. Τα βακτηριακά συστατικά που είναι υπεύθυνα για τα σημεία και τα συμπτώματα της νόσου έχουν χαρτογραφηθεί από την κλασματοποίηση του πνευμονιόκοκκου, ειδικότερα ενιόντας τμήματα αυτών στο ΚΝΣ αλλά και μετά από φλεγμονή και τραυματισμό [138]. Η μηνιγγίτιδα προκαλεί στρατολόγηση των λευκοκυττάρων, αυξημένη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, όπως μετράται από την αύξηση της πρωτεΐνης CSF και αγγειακή διαταραχή, οδηγώντας σε αυξημένη ενδοκράνια πίεση. Αυτοί οι μηχανισμοί μπορεί να αναπαραχθούν και απουσία ζωντανών βακτηρίων, μόνο με ενστάλαξη συστατικών του πνευμονιοκοκκικού κυτταρικού τοιχώματος ή τοξινών. Η σημασία αυτού του ευρήματος είναι διττή: Καταρχήν, το κυτταρικό τοίχωμα και η αλληλεπιδράσεις της τοξίνης, που οδηγούν σε φλεγμονή είναι οι κύριοι παράγοντες για τη πρόκληση βλάβης και επιπλέον, τα αντιβιοτικά προκαλούν λύση και απελευθέρωση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, τα οποία, κατά τις πρώτες δόσεις αντιβιοτικού, αυξάνουν τη φλεγμονή στο ΚΝΣ. Αυτό εξυπηρετεί η προσπάθεια μετριασμού της πρόκλησης βλάβης στο ΚΝΣ του ξενιστή, μειώνοντας την φλεγμονώδη απόκριση κατά τη διάρκεια της θεραπείας με αντιβιοτικά [139]. Ο περιορισμός της εισόδου των λευκοκυττάρων στο ΚΝΣ μειώνει την επακόλουθη φλεγμονή και επομένως μειώνει το εγκεφαλικό οίδημα, την ενδοκρανιακή πίεση και τη βλάβη του ΚΝΣ [140, 141]. Αν και η πλήρης απουσία TLR2 ή MyD88 σε επίμυες οδηγεί σε υψηλότερη θνησιμότητα με βακτηριακή υπερανάπτυξη [142], η καταστολή των σημάτων ενεργοποίησης της ανοσιακής απάντησης φαίνεται πως είναι ευεργετική, συμπεριλαμβανομένης της στόχευσης των MAP κινασών, της NP-κΒ [143], προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών [144], καθώς και χημειοκινών. Σε ζωικά μοντέλα, η επιβίωση και η βαρύτητα των επιπλοκών της πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας βελτιώνεται με τη χρήση αντιφλεγμονωδών παραγόντων, παράλληλα με τη χρήση αντιβιοτικών [145], συμπεριλαμβανομένης της δεξαμεθαζόνης [146], παραγόντων έναντι

λευκοκυττάρων (αντισελεκτίνες ή αντι-CD18 ιντεγκρίνες) [140], μεταλλοπρωτεασών (antimatrix) , ή αναστολέων του νιτρικού οξειδίου .

Οι λεπτομέρειες της αλληλεπίδρασης ξενιστή-παθογόνου στο ΚΝΣ απέδωσαν ένα εξαιρετικό παράδειγμα της συνολικής εικόνας της απάντησης του ξενιστή σε Gram θετική νόσο. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους διαδικασίας, νευρωνική τοξικότητα παρατηρείται σε δύο κύματα (Εικ. 8). Άμεσα χρονικά, με τη μεσολάβηση τοξινών, επέρχεται θάνατος νευρικών κυττάρων, ο οποίος εμφανίζεται νωρίς στη σήψη, που προκαλείται από την απελευθέρωση και τη διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού από πνευμονολυσίνη και υπεροξειδίου του υδρογόνου [133,147]. Για το θάνατο των νευρικών κυττάρων ενοχοποιούνται τοξίνες και είναι ανεξάρτητος της παρουσίας κασπασών. Αργότερα κατά τη διάρκεια της απάντησης του ξενιστή σε θραύσματα κυτταρικού τοιχώματος στα πλαίσια καταστροφής των βακτηριακών κυττάρων, προκαλείται απόπτωση των νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων ως «φαινόμενο γεινιάσεως» [148]. Καθώς τα λευκοκύτταρα και τα συστατικά ορού εμφανίζονται στο ΕΝΥ επί ώρες, η βακτηριακή πεπτιδογλυκάνη και τείχοϊκό οξύ δεσμεύονται στους υποδοχείς TLR2 και αυτό οδηγεί στη συνέχεια σε ενεργοποίηση του NP-κΒ [118, 149]. Μικρότερα θραύσματα πεπτιδίων προερχόμενα από το κυτταρικό τοίχωμα δεσμεύονται σε κυτταρικές πρωτεΐνες NOD. Η συσσώρευση των λευκοκυττάρων επιταχύνεται από ενεργοποίηση του καταρράκτη χημειοκίνης/κυτοκίνης, του συμπληρώματος και του μηχανισμού της πήξης. Η ζημία που προκαλείται από τη φλεγμονώδη απάντηση του ξενιστή είναι μεγαλύτερη στον ιππόκαμπο, όπου απόπτωση των νευρικών κυττάρων καθοδηγείται από την παρουσία κασπασών [150]. Οξειδωτική βλάβη από ξενιστή από απελευθερούμενες ελεύθερες ρίζες επιβαρύνει επιπρόσθετα τη βλάβη του ιστού [133,151] .



Εικ. 8 Μηχανισμοί τοξικότητας στους νευρώνες του ΚΝΣ σε πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα

➤ ΟΞΕΙΑ ΜΕΣΗ ΩΤΙΤΙΔΑ

Η επικρατούσα άποψη στην παθογένεια της ΟΜΩ είναι ότι αποτελεί επιπλοκή προηγηθείσας λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού. Η ίωση προκαλεί αλλοίωση του αναπνευστικού επιθηλίου, οίδημα και απόφραξη της ευσταχιανής σάλπιγγας. Ο πολλαπλασιασμός των μικροβίων προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση και παραγωγή οιδήματος (υγρού) στο μέσο ους. Στις επιπλοκές της ωτίτιδας λόγω μετάδοσης κατά συνέχεια ιστού, περιλαμβάνεται η μαστοειδίτιδα. Επιπλέον, η παραγωγή υγρού που παραμένει επί μακρόν στο μέσο ους είναι υπεύθυνη για τις υποτροπές της νόσου και διαταραχές της ακοής. Άλλες σπανιότερες επιπλοκές είναι η πρόκληση μηνιγγίτιδας, το υποσκληρίδιο εμπύημα και το εγκεφαλικό απόστημα.

➤ ΡΙΝΟΚΟΛΠΙΤΙΔΑ

Η παθογένεσή της είναι παρόμοια με αυτή της οξείας μέσης ωτίτιδας. Συχνοί προδιαθεσικοί παράγοντες είναι συνυπάρχουσες λοιμώξεις, αλλεργική ρινίτιδα, ρινικοί πολύποδες, οδοντικές λοιμώξεις και κυστική ίνωση. Σπάνιες επιπλοκές της νόσου είναι η μηνιγγίτιδα, το εγκεφαλικό απόστημα, υποσκληρίδιο εμπύημα και θρόμβωση των φλεβωδών κόλπων.

➤ **ΕΞΑΡΣΗ ΧΡΟΝΙΑΣ ΒΡΟΓΧΙΤΙΔΑΣ**

Η παθογένεσή της δε διαφέρει από τις προηγούμενες περιγραφές. Η ιδιαιτερότητα όμως αυτής σχετίζεται με τη διαπίστωση πως, όταν αναγνωρίζεται κλινικά η οντότητα, συνήθως συσχετίζεται με την παρουσία νέου πνευμονιοκοκκικού στελέχους [152].

➤ **ΑΛΛΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ**

Ο πνευμονιόκοκκος είναι το κύριο αίτιο της σπάνιας σε συχνότητα **αυτόματης βακτηριακής περιτονίτιδας** στα παιδιά [153]. Σπάνιες επίσης λοιμώξεις είναι η **ενδοκαρδίτιδα** [154], το **επισκληρίδιο** και **εγκεφαλικό απόστημα**, η **σηπτική αρθρίτιδα** (σε παιδιά με ρευματοειδή αρθρίτιδα ή σε παρουσία προσθετικής άρθρωσης) [155], η **οστεομυελίτιδα** [156], η **επιπεφυκίτιδα** [157] και οι σπανιότατες **λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων** (σε παιδιά με νοσήματα του συνδετικού ιστού) [158]. Ο μηχανισμός της παθογένεσης ομοιάζει με τους προαναφερθέντες και σε αυτόν περιέχονται και τα ιδιαίτερα στοιχεία της συνήθως συνυπάρχουσας αντίστοιχης νοσολογικής οντότητας.

6. Ενεργητική ανοσοποίηση

6.1 Κυκλοφορούντα εμβόλια έναντι πνευμονιοκόκκου

➤ Πολυσακχαριδικό πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο

Το πολυσακχαριδικό πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο αποτελείται από κεκαθαρμένα παρασκευάσματα του πολυσακχαρίτη της κάψας του πνευμονιόκοκκου. Το πρώτο πολυσακχαριδικό εμβόλιο κατά του πνευμονιόκοκκου έλαβε άδεια στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής το 1977. Περιείχε κεκαθαρμένο αντιγόνο καψικού πολυσακχαρίτη από 14 διαφορετικούς οροτύπους πνευμονιοκόκκου. Το 1983, ένα 23-δύναμο εμβόλιο πολυσακχαρίτη (PPSV23) πήρε άδεια και αντικατέστησε το 14-δύναμο εμβόλιο, το οποίο δεν παράγεται πλέον. Το PPSV23 περιέχει το αντιγόνο του πολυσακχαρίτη από 23 οροτύπους πνευμονιοκόκκου, που προκαλούν το 88% των βακτηριαμιών πνευμονιοκοκκικής αιτιολογίας. Επιπλέον, διασταυρούμενη ανοσογονικότητα υπάρχει για αρκετούς οροτύπους που δεν περιλαμβάνονται στο εμβόλιο αυτό, σε ποσοστό που αντιπροσωπεύει ένα επιπλέον 8% της βακτηριαμίας.

Το εμβόλιο πολυσακχαρίτη που διατίθενται σήμερα στις Ηνωμένες περιέχει 25 mcg του κάθε αντιγόνου ανά δόση και περιέχει 0,25% φαινόλη ως συντηρητικό. Η οδός χορήγησης του εμβολίου είναι ενδομυϊκή ή υποδόρια.

➤ Συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο

Το πρώτο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (PCV7) έλαβε άδεια κυκλοφορίας στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής το 2000. Στη Ελλάδα κυκλοφόρησε τον Οκτώβριο του 2004 και εντάχθηκε στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμού το 2006. Περιλαμβάνει κεκαθαρμένο καψικό πολυσακχαρίτη από επτά ορότυπους του *S. pneumoniae* (4 , 9V, 14 , 19F, 23F , 18C, και 6B)

συζευγμένο με μία ισχυρή ανοσογόνο πρωτεΐνη, μη τοξική παραλλαγή της τοξίνης της διφθερίτιδας, γνωστή ως CRM197. Το 2010 ένα 13-δύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (PCV13) έλαβε άδεια στις ΗΠΑ. Περιέχει τα αντιγόνα από τους 7 ορότυπους του επταδύναμου εμβολίου και επιπλέον τους ορότυπους 1, 3, 5, 6A, 7F και 19A τα οποία είναι επίσης συζευγμένα με την τοξίνη CRM197. Μια δόση PCV13 0,5ml περιέχει περίπου 2,2μg πολυσακχαρίτη από καθένα από τους 12 ορότυπους και περίπου 4,4μg πολυσακχαρίτη από οροτύπου 6B. Η συνολική συγκέντρωση του CRM197 είναι περίπου 34 μg. Το εμβόλιο περιέχει 0,02% πολυσορβικό 80 (P80), 0,125mg φωσφορικού αργιλίου (AlPO₄) ως ανοσοενισχυτικό, 5ml ρυθμιστικού διαλύματος. Δεν περιέχεται στη σύνθεσή του το συντηρητικό θιμεροσάλη. Εκτός από την προσθήκη των αντιγόνων των έξι οροτύπων, το πολυσορβικό 80 και το ρυθμιστικό διάλυμα, η σύνθεση του PCV13 είναι η ίδια όπως εκείνη του PCV7.

Δεδομένα του ABCs (Active Bacterial Core surveillance) φαίνεται ότι το 2008, συνολικά 61% των περιπτώσεων διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου σε παιδιά μικρότερα των 5 ετών οφείλονταν σε ορότυπους που περιλαμβάνονται στο PCV13, με 43% αναλογία για τον 19A ορότυπο. Οι ορότυποι του PCV7 ευθύνονταν για λιγότερο από 2 % για πνευμονιοκοκκική λοίμωξη.

6.2 Η ανοσογονικότητα και αποτελεσματικότητα του εμβολίου

➤ Πολυσακχαριδικό πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο

Περισσότερο από το 80% των υγιών ενηλίκων, που εμβολιάζονται με το PPSV23, αναπτύσσουν αντισώματα έναντι των οροτύπων που περιέχονται στο εμβόλιο, συνήθως εντός 2 έως 3 εβδομάδων μετά τον εμβολιασμό. Οι ενήλικες μεγαλύτερης ηλικίας και άτομα με ορισμένες χρόνιες ασθένειες ή ανοσοανεπάρκεια, δεν έχουν φτωχή ανοσιακή ανταπόκριση στο εμβόλιο. Αντίστοιχα, σε παιδιά μικρότερα των 2 ετών, το 23δύναμο πολυσακχαριδικό

εμβόλιο δεν προκαλεί σημαντική παραγωγή αντισωμάτων. Αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων επιμένουν για τουλάχιστον 5 έτη σε υγιείς ενήλικες, αλλά μειώνονται πιο γρήγορα σε άτομα με ορισμένες υποκείμενες νόσους.

Πολλές μελέτες έχουν οδηγήσει σε διάφορες εκτιμήσεις της κλινικής αποτελεσματικότητας του εμβολίου PPSV23. Συνολικά, το εμβόλιο είναι αποτελεσματικό στην πρόληψη διεισδυτικής νόσου σε ποσοστό 60-70% στο σύνολο του πληθυσμού. Το εμβόλιο μπορεί να είναι λιγότερο αποτελεσματικό στην πρόληψη της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης σε ορισμένες ομάδες, ιδίως εκείνων που διαθέτουν σημαντική υποκείμενη νόσο. Παρά το γεγονός ότι το εμβόλιο μπορεί να μην είναι τόσο αποτελεσματικό σε ορισμένα άτομα, ειδικά σε αυτά που είναι μειωμένης ανοσιακής αντίστασης, συνιστάται ο εμβολιασμός και για τα άτομα αυτά, επειδή βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο να αναπτύξουν σοβαρή πνευμονιοκοκκική νόσο. Το PPSV23 δεν έχει αποδειχθεί ότι παρέχει προστασία κατά της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας.

Μελέτες που συγκρίνουν τα πρότυπα φορέας του μικροβίου πριν και μετά τον εμβολιασμό με το PPSV23, δεν έχουν δείξει στατιστικά σημαντική μείωση στα ποσοστά νόσησης μεταξύ των εμβολιασθέντων και των φορέων πνευμονιοκόκκου. Επιπλέον, καμία αλλαγή στην κατανομή της φορέας δεν σχετίζεται με την εφαρμογή του εμβολιασμού με το 23δύναμο πολυσακχαριδικό εμβόλιο στον πληθυσμό

➤ Συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο

Σε μια μεγάλη κλινική μελέτη, το PCV7 φαίνεται να μείωσε κατά 97% τα ποσοστά της διεισδυτικής νόσου που προκαλείται από τους ορότυπους του εμβολίου, και να ευθύνεται και για τη μείωση της διεισδυτικής νόσου που προκαλείται από όλους τους ορότυπους του πνευμονιοκόκκου, συμπεριλαμβανομένων και αυτών, που δεν περιέχονται στο εμβόλιο κατά 89%. Τα παιδιά που έλαβαν PCV7 είχε 7% λιγότερα επεισόδια οξείας μέσης ωτίτιδας και υποβλήθηκαν σε κατά 20% λιγότερες τοποθετήσεις σωληνίσκων τυμπανοστομίας από ό,τι τα μη εμβολιασμένα παιδιά. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το PCV7 μειώνει τη ρινοφαρυγγική φορέα των οροτύπων, που περιλαμβάνονται στο εμβόλιο .

Το 13δύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (PCV13) έλαβε άδεια το 2010 στις Ηνωμένες Πολιτείες, βασιζόμενο σε μελέτες που συνέκριναν την ορολογική απόκριση των παιδιών που εμβολιάστηκαν με το PCV13 με όσα εμβολιάστηκαν με το PCV7. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι η επαγόμενη από το PCV13 παραγωγή αντισωμάτων, ήταν συγκρίσιμη με την αντίστοιχη, που επάγει το PCV7 και η οποία έχει ήδη φανεί πως προστατεύει αποτελεσματικά έναντι της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου.

Σε μια άλλη μελέτη του PCV13, σε παιδιά ηλικίας 7-11 μηνών, 12-23 μηνών και 24-71 μηνών που δεν είχαν λάβει πνευμονιοκοκκικό συζευγμένο εμβόλιο στο παρελθόν, χορηγήθηκαν 1, 2, ή 3 δόσεις του PCV13 με βάση συγκεκριμένα χρονοδιαγράμματα αναλόγως της ηλικιακής ομάδας. Αυτά τα σχήματα εμβολιασμού οδήγησαν σε παραγωγή αντισωμάτων για καθέναν από τις 13 ορότυπους, που ήταν συγκρίσιμα ποσοτικά με εκείνα που επιτυγχάνονται μετά από τις 3 δόσεις PCV13 σε βρέφη (βάσει του εθνικού προγράμματος εμβολιασμού στις ΗΠΑ). Εξαίρεση υπάρχει για τον ορότυπο 1, για τον οποίο η παραγωγή η IgG GMC (geometric mean concentrations), ήταν χαμηλότερη σε παιδιά ηλικίας 24-71 μηνών.

6.3 Χρονοδιάγραμμα βασικού εμβολιασμού

➤ Πολυσακχαριδικό πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο

Πολυσακχαριδικό πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο πρέπει να χορηγείται συστηματικά σε όλους τους ενήλικες ηλικίας 65 ετών και άνω. Το εμβόλιο ενδείκνυται επίσης για παιδιά ηλικίας 2 ετών και άνω, με ένα ανοσοικανό ανοσοποιητικό σύστημα που έχουν μια χρόνια ασθένεια, όπως καρδιαγγειακή νόσο, πνευμονική νόσο, σακχαρώδη διαβήτη, αλκοολισμό, κίρρωση ήπατος ή παιδιά που φέρουν κοχλιακό εμφύτευμα ή βαλβίδα κοιλιοπεριτοναϊκής παροχέτευσης.

Παιδιά σε ανοσοκαταστολή ηλικίας 2 ετών και άνω, τα οποία διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο πνευμονιοκοκκικής νόσου ή επιπλοκές της θα πρέπει

επίσης να εμβολιάζονται. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει άτομα με δυσλειτουργία του σπλήνα ή απουσία αυτού (είτε από ασθένεια ή χειρουργική αφαίρεση), νόσο του Hodgkin, λέμφωμα, πολλαπλούν μυέλωμα, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, νεφρωσικό σύνδρομο ή έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση οργάνων λόγω υποβολής αυτών σε ανοσοκαταστολή. Άτομα σε ανοσοκαταστολή από χημειοθεραπεία ή που λαμβάνουν θεραπεία με κορτικοστεροειδή υψηλής δόσης (για ≥ 14 ημέρες) θα πρέπει επίσης να εμβολιάζονται. Άτομα ηλικίας 2 ετών και άνω με ασυμπτωματική ή συμπτωματική HIV λοίμωξη θα πρέπει να εμβολιάζονται. Πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο θα πρέπει να χορηγείται και για τα άτομα που ζουν σε ειδικό περιβάλλον ή κοινωνικές συνθήκες αυξημένου κινδύνου για πνευμονιοκοκκική νόσο, όπως και άτομα συγκεκριμένης φυλετικής καταγωγής όπως είναι οι Ιθαγενείς της Αμερικής (πληθυσμοί Αλάσκα, Native, Navajo, και Apache).

Το 2008 η Συμβουλευτική Επιτροπή Εφαρμογής Εμβολιασμού, ACIP (Advisory Committee on Immunization Practices) προσέθεσε δύο νέες ενδείξεις για το πνευμονιοκοκκικό πολυσακχαριδικό εμβόλιο για τους ενήλικες 19 ετών και άνω. Αυτές οι νέες ενδείξεις είναι το βρογχικό άσθμα και το κάπνισμα. Αυτές οι ομάδες προστέθηκαν, λόγω στοιχείων που έδειξαν πως βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο να προσβληθούν από διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσο. Τα διαθέσιμα δεδομένα δεν υποστηρίζουν το άσθμα ή το κάπνισμα τσιγάρων ως ενδείξεις για PPSV23 μεταξύ ατόμων ηλικίας μικρότερης των 19 ετών.

Αν επίκειται το ενδεχόμενο σπληνεκτομής ή τοποθέτησης κοχλιακού εμφυτεύματος, το εμβόλιο θα πρέπει να χορηγείται τουλάχιστον 2 εβδομάδες πριν από το χειρουργείο. Εάν ο εμβολιασμός πριν από τη διαδικασία δεν είναι εφικτός, το εμβόλιο θα πρέπει να χορηγείται το συντομότερο δυνατόν μετά την επέμβαση. Ομοίως, θα πρέπει επίσης να υπάρχει ένα διάστημα 2 εβδομάδων μεταξύ εμβολιασμού και την έναρξη της χημειοθεραπείας ή άλλης ανοσοκατασταλτικής θεραπείας, αν αυτό είναι δυνατό.

Άτομα με αβέβαιη ή άγνωστη κατάσταση εμβολιασμού ή πλημμελή εμβολιασμό για άλλα παθογόνα, θα πρέπει επίσης να εμβολιαστούν.

Η ομάδα «στόχος» του πληθυσμού τόσο για πνευμονιοκοκκικό πολυσακχαριδικό εμβόλιο όσο και για το εμβόλιο κατά της γρίπης έχουν κοινά χαρακτηριστικά. Αυτά τα εμβόλια συνίσταται να χορηγούνται ταυτόχρονα σε διαφορετικές θέσεις, εφόσον υπάρχει ένδειξη. Ωστόσο, οι περισσότεροι άνθρωποι χρειάζονται μόνο μία δόση του εμβολίου PPSV23 κατά τη διάρκεια της ζωής τους.

➤ **Συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο**

Όλα τα παιδιά 2 έως 59 μηνών πρέπει να εμβολιάζονται σε τακτική βάση με το PCV13. Το βασικό σχήμα εμβολιασμού αφορά στην παιδική ηλικία και αποτελείται από τρεις δόσεις, που χορηγούνται συνήθως σε ηλικία 2, 4, και 6 μηνών. Η πρώτη δόση μπορεί να χορηγηθεί από την ηλικία των 6 εβδομάδων το νωρίτερο. Μία τέταρτη (αναμνηστική) δόση συνιστάται στη ηλικία των 12-15 μηνών. Το PCV13 πρέπει να χορηγείται ταυτόχρονα με άλλα εμβόλια ρουτίνας παιδική ηλικία, χρησιμοποιώντας μία ξεχωριστή σύριγγα και θέση ένεσης. Για τα παιδιά που εμβολιάστηκαν πριν από την ηλικία των 12 μηνών, το ελάχιστο χρονικό διάστημα μεταξύ των δόσεων είναι 4 εβδομάδες. Δόσεις που δίνονται σε ηλικία 12 μηνών και άνω θα πρέπει να έχουν μεσοδιάστημα τουλάχιστον 8 εβδομάδων. Ένα παιδί που έχει ξεκινήσει να εμβολιάζεται με το PCV7, συστήνεται να συνεχίσει τον εμβολιασμό του με το PCV13.

Η Επιτροπή ACIP το 2010 κατέγραψε ένα πλήρες χρονοδιάγραμμα εμβολιασμού ανάλογα με βάση την ηλικία και το υπάρχον status εμβολιασμού για τον πνευμονιόκοκκο.

Τα μη εμβολιασμένα παιδιά ηλικίας 7 μηνών και άνω δεν απαιτούν μια πλήρη σειρά των τεσσάρων δόσεων του εμβολίου. Ο αριθμός των δόσεων που χρειάζεται ένα παιδί για να ολοκληρωθεί η σειρά εξαρτάται από την τρέχουσα ηλικία του παιδιού. Ανεμβολίαστα παιδιά ηλικίας 7 έως 11 μηνών θα πρέπει να λάβουν δύο δόσεις του εμβολίου με μεσοδιάστημα δόσεων τουλάχιστον 4 εβδομάδων, ακολουθούμενη από μία αναμνηστική δόση στην ηλικία των 12 έως 15 μηνών. Ανεμβολίαστα παιδιά ηλικίας 12 έως 23 μηνών πρέπει να λάβουν δύο δόσεις του εμβολίου, με μεσοδιάστημα δόσεων τουλάχιστον 8 εβδομάδων. Ανεμβολίαστα για πνευμονιόκοκκο, υγιή παιδιά ηλικίας 24 έως 59 μηνών πρέπει να λαμβάνουν μία εφάπαξ δόση του PCV13. Ανεμβολίαστα

παιδιά 24 έως 71 μηνών, με ορισμένες χρόνιες παθήσεις, θα πρέπει να λαμβάνουν 2 δόσεις PCV13 με μεσοδιάστημα δόσεων τουλάχιστον 8 εβδομάδων.

Μια συμπληρωματική δόση PCV13 συνιστάται για όλα τα παιδιά 14 έως 59 μηνών που έλαβαν 4 δόσεις του PCV7 ή κάποιο άλλο κατάλληλο για την ηλικία, πλήρες σχήμα εμβολιασμού με PCV7. Για τα παιδιά που έχουν μια υποκείμενη παθολογική νόσο, μία συμπληρωματική δόση PCV13 συνιστάται έως την ηλικία των 71 μηνών. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει και τα παιδιά που ήδη έχουν εμβολιαστεί με το PPSV23. Το PCV13 πρέπει να χορηγείται τουλάχιστον 8 εβδομάδες μετά την τελευταία δόση PCV7 ή PPSV23 .

Μία εφάπαξ δόση PCV13 μπορεί να χορηγηθεί για παιδιά από 6 έως 18 ετών που δεν έχουν λάβει προηγουμένως PCV13 και βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου, ανεξάρτητα από το αν έχουν λάβει προηγουμένως PCV7 ή PPSV23.

Η τακτική χρήση της PCV13 δεν συνιστάται για υγιή παιδιά ηλικίας 5 ετών και άνω .

Τα παιδιά που έχουν λάβει PPSV23 προηγουμένως, θα πρέπει επίσης να εμβολιάζονται με το PCV13. Παιδιά 24 έως 71 μηνών, με μια υποκείμενη παθολογική νόσο, που έλαβαν λιγότερες από 3 δόσεις PCV7 πριν την ηλικία των 24 μηνών θα πρέπει να λάβουν μια σειρά από 2 δόσεις PCV13 ακολουθούμενη από 1 δόση PPSV23 με μεσοδιάστημα δόσεων τουλάχιστον 8 εβδομάδες. Παιδιά 24 έως 71 μηνών με μια υποκείμενη νόσο, που έλαβαν οποιαδήποτε ελλιπές σχήμα των 3 δόσεων PCV7 πριν την ηλικία των 24 μηνών, πρέπει να λαμβάνουν 1 δόση PCV13 ακολουθούμενη από 1 δόση PPSV23 με μεσοδιάστημα δόσεων τουλάχιστον 8 εβδομάδες. Όταν επίκειται σπληνεκτομή, ανοσοκατασταλτική θεραπεία, ή τοποθέτηση κοχλιακού εμφυτεύματος, ο εμβολιασμός με το PCV13 ή / και το PPSV23 θα πρέπει να ολοκληρώνεται, εφόσον αυτό είναι εφικτό, τουλάχιστον 2 εβδομάδες πριν από τη χειρουργική επέμβαση ή την έναρξη της θεραπείας .

Τον Δεκέμβριο του 2011, η FDA των ΗΠΑ ενέκρινε τη χρήση του PCV13 ως εφάπαξ δόση για την πρόληψη της πνευμονίας και της διεισδυτικής νόσου,

που προκαλείται από τους ορότυπους του εμβολίου του *S. pneumoniae* σε άτομα ηλικίας 50 ετών και άνω. Η αποτελεσματικότητα του PCV13 στην πρόληψη της πνευμονίας και της διεισδυτικής νόσου σε αυτή την ηλικιακή ομάδα δεν έχει ακόμη αποδειχθεί σε τρέχουσες κλινικές μελέτες. Η ACIP έχει συζητήσει αυτό το θέμα, αλλά στις οδηγίες της το Φεβρουάριο του 2012, δεν έχει γίνει σύσταση για τη χρήση του PCV13 σε άτομα 50 ετών και άνω .

6.4 Επανεμβολιασμός

➤ Πολυσακχαριδικό πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο

Λόγω της έλλειψης αποδεικτικών στοιχείων όσον αφορά τη αύξηση της ανοσιακής προστασίας μετά τη χρήση πολλαπλών δόσεων του 23-δύναμου εμβολίου, δε συνιστάται επανεμβολιασμός ανοσοϊκανών ατόμων. Ωστόσο, ο επαναληπτικός εμβολιασμός συνιστάται για τα παιδιά ηλικίας 2 ετών και άνω, που βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο για σοβαρή πνευμονιοκοκκική λοίμωξη. Μόνο μία δόση PPSV23 επανεμβολιασμού συνιστάται για άτομα υψηλού κινδύνου. Η δεύτερη δόση πρέπει να χορηγείται 5 ή περισσότερα χρόνια μετά την πρώτη δόση.

Τα άτομα που διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο περιλαμβάνουν παιδιά ηλικίας 2 ετών και άνω, με λειτουργική ή ανατομική ασπληνία (π.χ. από δρεπανοκυτταρική αναιμία ή σπληνεκτομή), μόλυνση με HIV, λευχαιμία, λέμφωμα, νόσο του Hodgkin, πολλαπλούν μυέλωμα, γενικευμένη κακοήθεια, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, νεφρωσικό σύνδρομο ή άλλες παθήσεις που σχετίζονται με ανοσοκαταστολή (π.χ. μεταμόσχευση οργάνου ή μυελού των οστών) και εκείνων που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική χημειοθεραπεία, συμπεριλαμβανομένων την μακροχρόνιας χρήσης κορτικοστεροειδών. Άτομα ηλικίας 65 ετών και άνω θα πρέπει να λαμβάνουν και μια δεύτερη δόση του εμβολίου κατά του πνευμονιόκοκκου, εφόσον έλαβαν το εμβόλιο για περισσότερα από 5 χρόνια πριν, και ήταν ηλικίας μικρότερης των 65 ετών κατά τη στιγμή της πρώτης δόσης.

➤ Συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο

Επαναληπτικός εμβολιασμός μετά την ολοκλήρωση του βασικού εμβολιασμού για το PCV13 δεν συνιστάται.

6.5 Αντενδείξεις και προφυλάξεις στον εμβολιασμό

Και για τις δύο μορφές εμβολίου, μια σοβαρή αλλεργική αντίδραση (αναφυλαξία) σε ένα συστατικό του εμβολίου ή μετά από χορήγηση προηγούμενης δόση είναι αντένδειξη για περαιτέρω δόσεις του εμβολίου. Τέτοιες αλλεργικές αντιδράσεις είναι σπάνιες. Τα άτομα με μέτρια ή σοβαρή οξεία ασθένεια δεν θα πρέπει να εμβολιαστούν μέχρι να βελτιωθεί η κατάστασή τους. Ωστόσο, μικρότερης βαρύτητας ασθένειες, όπως ήπιες λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού, δεν αποτελούν αντένδειξη για εμβολιασμό .

Η ασφάλεια του εμβολίου PPSV23 για τις έγκυες γυναίκες δεν έχει μελετηθεί, αν και δεν έχουν αναφερθεί δυσμενείς επιπτώσεις στα νεογνά, των οποίων οι μητέρες είχαν εμβολιαστεί εκ παραδρομής κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Οι γυναίκες που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για πνευμονιοκοκκική νόσο και πληρούν τα κριτήρια εμβολιασμού, θα πρέπει να εμβολιάζονται πριν από την εγκυμοσύνη , εάν είναι δυνατόν.

6.6 Ανεπιθύμητες ενέργειες

Τοπικές αντιδράσεις στο σημείο του εμβολιασμού, συμβαίνουν μετά από το πολυσακχαριδικό εμβόλιο σε ποσοστό 30-50%, ενώ μετά το συζευγμένο σε ποσοστό 5-49%. Συστηματικές αντιδράσεις, όπως πυρετός και πολυμυαλγία, συμβαίνουν μετά από το πολυσακχαριδικό εμβόλιο σε ποσοστό <1%, ενώ μετά το συζευγμένο σε ποσοστό 24-35%. Σοβαρές ανεπιθύμητες αντιδράσεις στο εμβόλιο και των δύο τύπων είναι σπάνιες.

7. Αντοχή του πνευμονιοκόκκου στα αντιβιοτικά

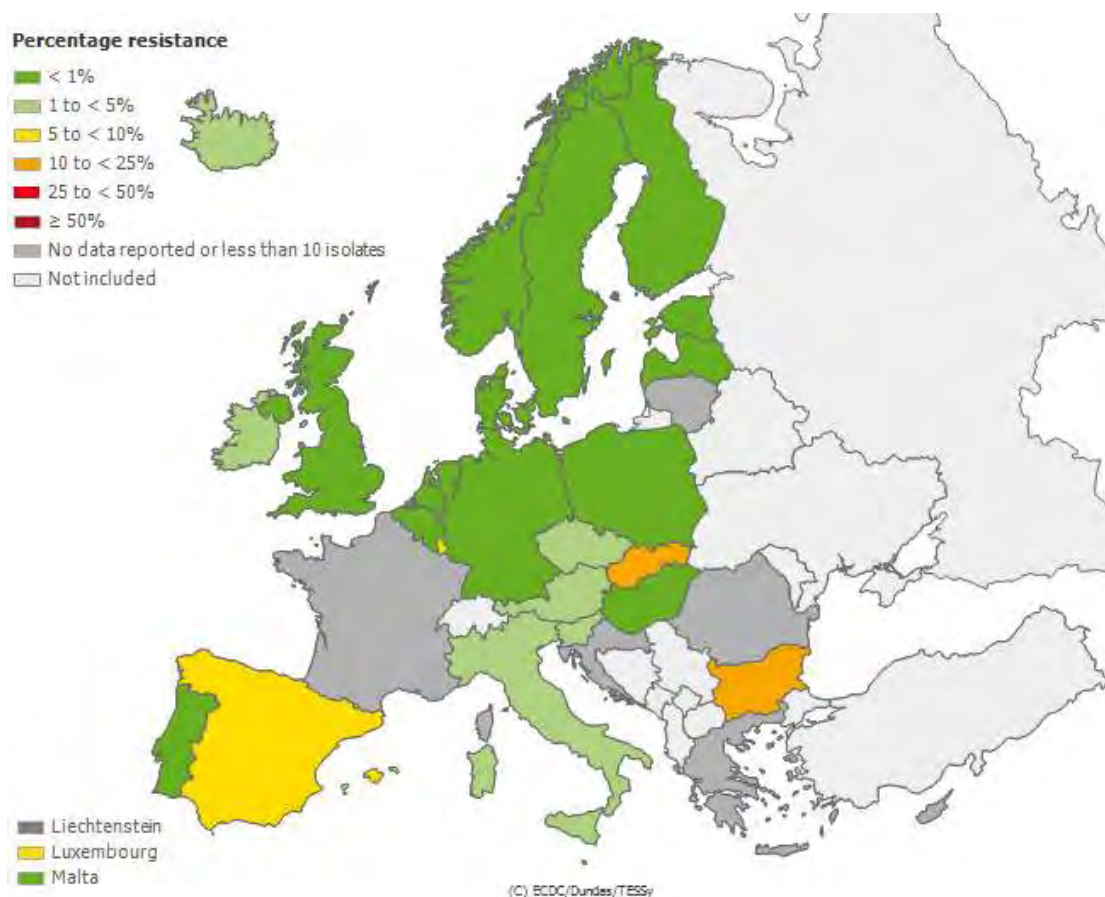
Ως φάρμακο εκλογής για τη θεραπεία των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον στο παρελθόν η πενικιλίνη. Το 1967, απομονώθηκε το πρώτο ανθεκτικό στην πενικιλίνη στελεχος σε ασθενή της φυλής Παπούα της Ν. Γουϊνέας. Τη δεκαετία που ακολούθησε, μόνο σποραδικές περιπτώσεις ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Το 1977 ο παγκόσμιος επιδημιολογικός χάρτης φάνηκε να αλλάζει, με την απομόνωση σε αρκετά νοσοκομεία της Νότιας Αφρικής, ανθεκτικών στελεχών πνευμονιοκόκκου, με σημαντικά υψηλότερες ελάχιστες ανασταλτικές πυκνότητες (MIC) στην πενικιλίνη και επιπλέον με αντοχή σε αρκετές ομάδες μη β-λακταμικών αντιβιοτικών, όπως η ερυθρομυκίνη, η τετρακυκλίνη, η χλωραμφενικόλη, η στρεπτομυκίνη, η κλινταμυκίνη, ακόμη και η ριφαμπικίνη. Αυτή η παρατήρηση, αν και ακολούθησε 40 έτη μετά τη χρήση της πενικιλίνης, σήμανε και το τέλος της εποχής που ο πνευμονιοκόκκος θεωρούνταν ένα μικρόβιο με προβλέψιμη ευαισθησία στα αντιβιοτικά. Η διεθνής επιστημονική κοινότητα άρχισε να επιτείνει την επιδημιολογική παρατήρηση για το συγκεκριμένο μικρόβιο και σήμερα η αντοχή του πνευμονιοκόκκου στα αντιβιοτικά, θεωρείται ένα από τα πιο κρίσιμα προβλήματα της επιστημονικής κοινότητας, που ασχολείται με τις λοιμώξεις. Τα μόνα αντιβιοτικά για τα οποία διεθνώς δεν καταγράφεται αντοχή του πνευμονιοκόκκου είναι καταρχήν η βανκομυκίνη και κατά δεύτερο λόγο η ιμιπενέμη [159-162].

Τα ποσοστά της αντοχής στα διάφορα αντιβιοτικά διαφέρουν από χώρα σε χώρα και υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση τόσο στο φαινότυπο όσο και στο γονότυπο των ανθεκτικών στελεχών του μικροβίου. Για το λόγο αυτό απαιτείται συνεχής έλεγχος και καταγραφή των ανθεκτικών στελεχών σε εθνικό επίπεδο καθώς και διεθνής συνεργασία της επιστημονικής κοινότητας, προκειμένου τα αντιμικροβιακά σχήματα να τροποποιούνται αναλόγως των επιδημιολογικών δεδομένων αντοχής [159-162].

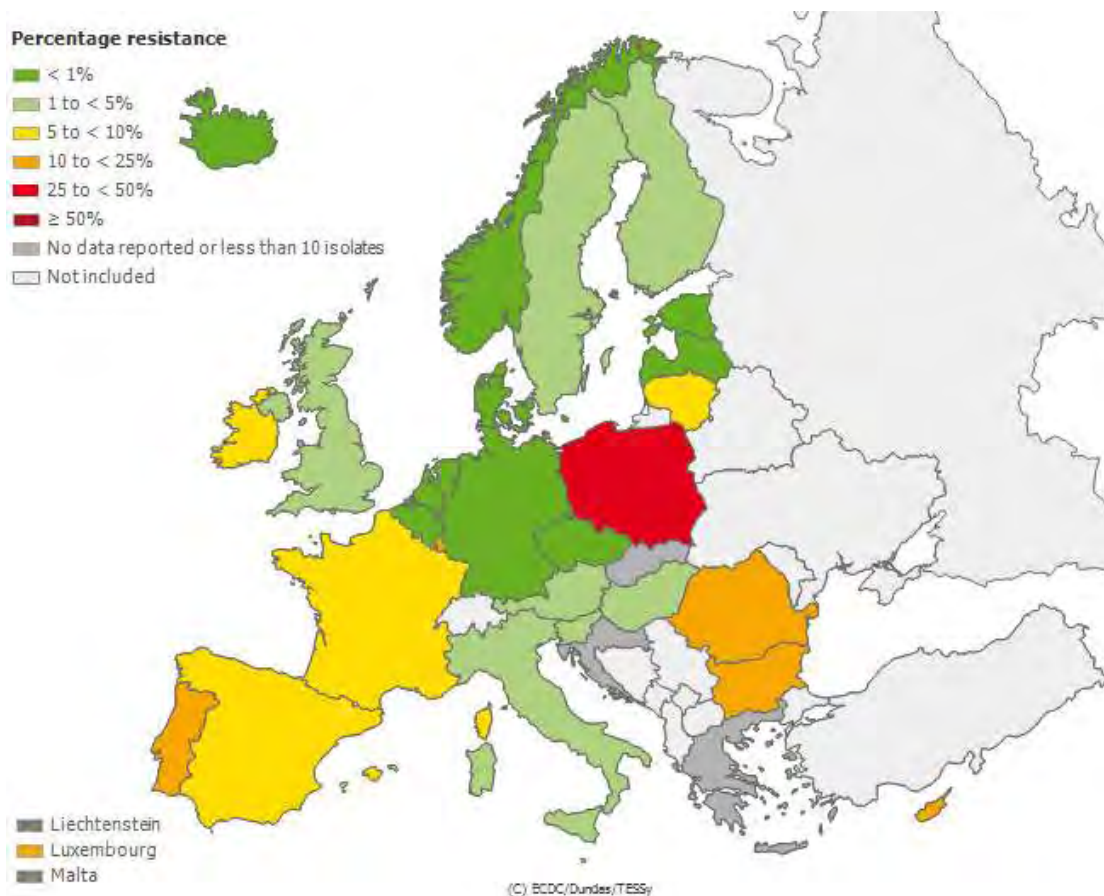
7.1 Αντοχή στην πενικιλίνη

➤ Επιδημιολογικά δεδομένα

Στην Ευρώπη, σύμφωνα με δεδομένα του 2004 του Ευρωπαϊκού Συστήματος Παρακολούθησης της Αντοχής στα Αντιβιοτικά (European Antimicrobial Resistance Surveillance System - EARSS), που αφορούν στην αντοχή στην πενικιλίνη στελεχών που απομονώθηκαν από ασθενείς με σοβαρές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις (Χάρτης 1), η αντοχή στις βόρειες Ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Νορβηγία, η Σουηδία, η Δανία αλλά και η Ολλανδία και η Γερμανία, κυμαίνεται μεταξύ 1 και 5%. Στην Αγγλία η αντοχή κυμαίνεται μεταξύ 5-10%, στην Ιρλανδία και την Ιταλία μεταξύ 10 και 25%, ενώ στη Γαλλία και την Ισπανία, αλλά και τη Ρουμανία και την Ουγγαρία, μεταξύ 25 και 50%, στο Βέλγιο και την Αυστρία 5-10%, στην Αγγλία και Γερμανία 10-25%, ενώ στη Γαλλία, Ιταλία και Ισπανία πάνω από 25% [163].



Ο αντίστοιχος χάρτης της Ευρώπης του 2009, εμφανίζει υψηλότερα ποσοστά αντοχής στην πενικιλίνη στις περισσότερες χώρες της Ευρώπης (Χάρτης 2)



Χάρτης 2

Στις ΗΠΑ η αντοχή παρουσιάζει σημαντικές διαφορές από πολιτεία σε πολιτεία, σημειώνοντας πάντως σταδιακή αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες. Έτσι, ενώ πριν το 1989 δεν ξεπερνούσε το 5%, το 2003, μετά την εφαρμογή του αντιπνευμονιοκοκκικού εμβολιασμού και την ευρεία χρήση των αντιβιοτικών, στις πολιτείες της Νέας Αγγλίας κυμαίνεται στο 11-16%, στις νοτιοατλαντικές περιοχές στο 19,5-24,8%, ενώ σε ορισμένες περιοχές ξεπερνά ακόμη και το 50% [162]. Αντίθετα, στον Καναδά, η αντοχή κυμαίνεται στο 20% [164].

Η συσχέτιση αντοχής και συνταγογράφησης της πενικιλίνης είναι σημαντική. Σύμφωνα με μελέτη στην Ισπανία [165] το 1983, χρονιά όπου αυξήθηκε σημαντικά η αντοχή του πνευμονιοκόκκου στην πενικιλίνη, η κατανάλωση αμινοπενικιλλινών σε εκατομμύρια μονάδες, ήταν στη συγκεκριμένη χώρα 27, ενώ στη Γαλλία 18, στην Ιταλία 16 και στην Αγγλία 52. Αξίζει να

αναφερθεί ότι στην Ελβετία η αντοχή παραμένει σταθερή από το 1984, ανερχόμενη στο 7%, γεγονός που αποδίδεται στην ιδιαίτερα προσεκτική συνταγογράφηση, αλλά και στη συμπεριφορά των πολιτών, οι οποίοι τηρούν με αυστηρότητα τις δόσεις και τη διάρκεια της θεραπείας [166].

➤ Μηχανισμοί αντοχής

Η αντιμικροβιακή δράση της πενικιλίνης συνίσταται στο να αναστέλλει τη δράση πολλών βακτηριδιακών ενζύμων και ιδιαίτερα τη δράση των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (Penicillin-Binding Proteins, PBPs). Οι PBPs είναι ένζυμα της κυτταροπλασματικής μεμβράνη του πνευμονιοκόκκου, που έχουν δράση στα τελικά στάδια σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, καταλύοντας την τρανσπεπτιδίωση της πεπτιδογλυκάνης [167, 168]. Ο πνευμονιόκοκκος διαθέτει έξι PBPs, τις 1α, 1β, 2α, 2χ, 2β και 3. Από αυτές μόνο οι πέντε πρώτες είναι στόχοι των β-λακταμικών αντιβιοτικών.

Μοριακές μέθοδοι έδειξαν ότι τα ανθεκτικά στελέχη πνευμονιοκόκκου συνθέτουν γενετικά διαφοροποιημένες PBPs, μειωμένης συγγένειας με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, ενώ τα ευαίσθητα διαθέτουν PBPs υψηλής συγγένειας. Η σύνθεση των PBPs κωδικοποιείται από αντίστοιχα *pbp* γονίδια. Τα χαμηλής συγγένειας PBPs κωδικοποιούνται από ανασυνδυασμένα *pbp* γονίδια, στα οποία η νουκλεοτιδική αλληλουχία είναι ετερογενής, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα γονίδια των ευαίσθητων στελεχών που παρουσιάζουν μεγάλη ομοιογένεια. Η δημιουργία νέων "μωσαϊκών" γονιδίων είναι αποτέλεσμα μεταφοράς DNA αλλά και γενετικών ανασυνδυασμών. Η ανταλλαγή γενετικού υλικού, δηλαδή τμημάτων *pbp* γονιδίων, γίνεται μεταξύ ευαίσθητων στα β-λακταμικά στελεχών πνευμονιοκόκκου με άλλα ανθεκτικά στα β-λακταμικά στελέχη πνευμονιοκόκκου ή άλλων στρεπτοκόκκων όπως είναι π.χ. ο *Streptococcus mitis*, που ήδη έχουν αποκτήσει αντοχή μέσω γενετικού ανασυνδυασμού.

Η παρουσία των ανασυνδυασμένων γονιδίων *pbp* 1α και 2χ, τα οποία κωδικοποιούν τις PBPs 1α και 2χ, προσδίδει στα στελέχη μικρού βαθμού αντοχή στην πενικιλίνη, ενώ η πρόσθετη παρουσία των ανασυνδυασμένων

γονιδίων *rbp* 2β, τα οποία κωδικοποιούν την PBP 2β, προσδίδει στα στελέχη υψηλή αντοχή στην πενικιλίνη. Η μετάδοση της αντοχής γίνεται είτε οριζόντια, με μεταφορά "μωσαϊκών" *rbp* γονιδίων από στέλεχος σε στέλεχος, είτε κλωνική, με μετάδοση ανθεκτικών στελεχών στον πληθυσμό από άνθρωπο σε άνθρωπο [167, 168, 169]. Επειδή οι τροποποιημένες PBPs έχουν μειωμένη συγγένεια με τα περισσότερα β-λακταμικά αντιβιοτικά, τα ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη παρουσιάζουν ταυτόχρονα αντοχή και στις κεφαλοσπορίνες. Στην πράξη όμως, οι κεφαλοσπορίνες είναι αποτελεσματικότερες της πενικιλίνης, επειδή επιτυγχάνουν υψηλότερες συγκεντρώσεις και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στον ορό και το ENY [169].

➤ Μικροβιολογική διάγνωση της αντοχής

Σήμερα, με την αύξηση της αντοχής του πνευμονιοκόκκου στα αντιβιοτικά, η εμπειρική αγωγή δεν είναι πάντα ασφαλής και η συνεργασία κλινικών ιατρών και μικροβιολόγων είναι επιβεβλημένη. Το NCCLS (National Center of Clinical Laboratory Standards) έχει εκδώσει κατευθυντήριες οδηγίες, για τη χρήση ειδικών μεθόδων στα αντιβιογράμματα, προκειμένου να ανιχνεύονται τα ανθεκτικά στελέχη στην πενικιλίνη. Οι οδηγίες αυτές αφορούν σε πρώτο στάδιο, την εφαρμογή της μεθόδου διάχυσης στο άγαρ κατά Kirby-Bauer χρησιμοποιώντας δίσκους οξακιλλίνης του 1μg, οι οποίοι περιλαμβάνονται στο αντιβιογράμμα. Ζώνη αναστολής στην οξακιλλίνη $\geq 20\text{mm}$ σημαίνει ευαισθησία, τόσο στην πενικιλίνη, όσο και σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, ενώ αντίθετα, ζώνη αναστολής $\leq 19\text{mm}$, σημαίνει μη ευαίσθητο στέλεχος στην πενικιλίνη. Σε περίπτωση απομόνωσης μη ευαίσθητων στην πενικιλίνη στελεχών στελεχών, συνιστάται συνέχιση ελέγχου της ευαισθησίας, προκειμένου να καθοριστεί αν τα στελέχη αυτά είναι μετρίως ή πλήρως ανθεκτικά στην πενικιλίνη, αλλά και για να καθοριστεί επίπλέον, αν αυτά τα στελέχη είναι ευαίσθητα ή ανθεκτικά στις 3ης γενεάς κεφαλοσπορίνες. Αυτό επιτυγχάνεται με προσδιορισμό των ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MIC) τόσο στην πενικιλίνη, όσο και στην κεφοταξίμη ή κεφτριαξόνη, με εφαρμογή διαφόρων μεθόδων, όπως των αραιώσεων σε άγαρ ή σε ζυμό ή και με εφαρμογή μοριακών τεχνικών. Η ευρύτερα καθιερωμένη μέθοδος, είναι αυτή με τις ταινίες E test.

Το NCCLS όρισε αρχικά τα όρια ευαισθησίας των MIC, να είναι για την πενικιλλίνη $\leq 0,06\mu\text{g/ml}$ για ευαίσθητα στελέχη, $0,12-1\mu\text{g/ml}$ για μέτριας ευαισθησίας στελέχη και $\geq 2\mu\text{g/ml}$ για πλήρως ανθεκτικά, ενώ για τις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς (κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη), η αντιστοιχία είναι $< 0,5\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$ και $> 2\mu\text{g/ml}$. Το 2008 η ευαισθησία στην πενικιλλίνη ορίστηκε διαφορετικά, καθώς έγινε κατανοητό πως τα όρια των MIC έπρεπε να τροποποιηθούν με βάση την εντόπιση της λοίμωξης και την οδό χορήγησης του αντιβιοτικού, λόγω διαφορετικής φαρμακοδυναμικής και φαρμακοκινητικής του φαρμάκου [170]. Επομένως, για στελέχη που απαιτούν παρεντερική χρήση αντιβιοτικού και δεν αφορούν λοιμώξεις του ΚΝΣ, τα νέα όρια ευαισθησίας των MIC είναι $\leq 2\mu\text{g/ml}$ για ευαίσθητα, ίση με $4\mu\text{g/ml}$ για ενδιάμεσης ευαισθησίας και $\geq 8\mu\text{g/ml}$ για πλήρως ανθεκτικά στελέχη. Για λοιμώξεις του ΚΝΣ (μηνιγγίτιδα), οι αντίστοιχες MIC είναι $\leq 0,06\mu\text{g/ml}$ για ευαίσθητα και $\geq 0,12\mu\text{g/ml}$ για πλήρως ανθεκτικά στελέχη. Για την από του στόματος χορήγηση του αντιβιοτικού, οι ευαισθησίες παρέμειναν ως είχαν.

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή καθορισμού αντιμικροβιακής ευαισθησίας EUCAST (European Committee on Antimicrobial Testing) προτείνει διαφορετικά όρια ευαισθησίας για στελέχη, που δεν προέρχονται από μηνιγγιτιδοκοκκική νόσο: MIC $\leq 0,06\mu\text{g/ml}$ για ευαίσθητα στελέχη, MIC $0,12-2\mu\text{g/ml}$ για μέτριας ευαισθησίας στελέχη και MIC = $4\mu\text{g/ml}$ για πλήρως ανθεκτικά [171].

➤ Κλινική σημασία της αντοχής στην πενικιλλίνη

Σε κάθε περίπτωση συστηματικής πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης, ο έλεγχος ευαισθησίας πρέπει να περιλαμβάνει εξ αρχής τον προσδιορισμό της MIC.

Οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν πως η πλειοψηφία ($>60\%$) των στελεχών πνευμονιοκόκκου που προέρχονται από συστηματικές λοιμώξεις είναι ευαίσθητα στην πενικιλλίνη.

Τα ενδιάμεσης αντοχής είναι αυτά που προκαλούν κυρίως πνευμονία και τα υπάρχοντα αντιμικροβιακά σχήματα δεν χρειάζονται συνήθως τροποποίηση. Στην περίπτωση όμως της μηνιγγίτιδας, η οποία οφείλεται σε μετρίως ευαίσθητα στην πενικιλίνη στελέχη, απαιτείται άμεση αντιμετώπιση με τρίτης γενεάς κεφαλοσπορίνες [172].

Τα πλήρως ανθεκτικά στελέχη, παρουσιάζουν ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον. Αυτά προέρχονται συνήθως από λοιμώξεις του κατωτέρου αναπνευστικού ή από φορεία, ιδιαίτερα από παιδιά μικρότερα των 5 ετών. Δεν έχει αποδειχθεί πως τα στελέχη αυτά σχετίζονται με μεγαλύτερα ποσοστά θανάτου ή με μεγαλύτερη βαρύτητα της νόσου. Συγκεκριμένα στην πνευμονιοκοκκική βακτηριαιμία, τα ποσοστά θνησιμότητας δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών στην πενικιλίνη και η πορεία της νόσου εξαρτάται κυρίως από άλλους παράγοντες [173]. Παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη αντοχής στην πενικιλίνη είναι μεταξύ άλλων η προηγηθείσα νοσηλεία, αντιβιοτική αγωγή τους τελευταίους 3 μήνες, πνευμονία, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, συνυπάρχουσα HIV λοίμωξη, καθώς επίσης και η μικρή ή μεγάλη ηλικία των ασθενών. Επιδημιολογικό ενδιαφέρον έχει η διαπίστωση πως η απομόνωση ανθεκτικών στελεχών δεν προέρχεται αποκλειστικά από νοσοκομειακούς ασθενείς ή ασθενείς πόλεων, αλλά αφορά ακόμη και άτομα των αγροτικών περιοχών [159-161, 174, 176].

➤ Πολυανθεκτικά στελέχη

Μεγάλος αριθμός πνευμονιοκόκκων ανθεκτικών στην πενικιλίνη, κυρίως αυτών με MIC $\geq 1\mu\text{g/ml}$, είναι ανθεκτικοί και σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών, εκτός των β-λακταμικών. Το CDC (Center of Diseases Control), το 1991, όρισε ως πολυανθεκτικά (MDR, Multi Drug Resistant), τα στελέχη με αντοχή σε τουλάχιστον τρεις διαφορετικές ομάδες αντιβιοτικών. Το 1991 το 5,5% των στελεχών ήταν πολυανθεκτικά με αντοχή, στην πενικιλίνη, την ερυθρομυκίνη και την κοτριμοξαζόλη [160]. Τα πολυανθεκτικά στελέχη πνευμονιοκόκκου απομονώνονται σε μεγάλο ποσοστό σε παιδικούς σταθμούς και γηροκομεία και από εκεί γίνεται εύκολα η διασπορά στην κοινότητα. Έχει επιβεβαιωθεί ότι ο κυριότερος προδιαθεσικός παράγοντας για το γεγονός αυτό είναι η

προηγηθείσα μεγάλη έκθεση σε αντιβιοτικά [175]. Σε πολλές χώρες του κόσμου παρατηρείται αύξηση των MDR στελεχών [159]. Παρ' όλον ότι η πολυαντοχή αποτελεί πρωτίστως ιδιότητα των ανθεκτικών στην πενικιλίνη, σήμερα, σε παγκόσμιο επίπεδο απομονώνονται και στελέχη ευαίσθητα στην πενικιλίνη μεν, αλλά πολυανθεκτικά (MDR), με αντοχή στην ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη, τετρακυκλίνη, χλωραμφαινικόλη και κοτριμοξαζόλη. Πολλά από αυτά, ανήκουν στον ορότυπο 6B, ο οποίος αποικίζει συνήθως υγιή παιδιά στην Ελλάδα, Ιταλία και Ισραήλ [177-179].

Από μοριακές μελέτες, φάνηκε πως αυτή η πολυανθεκτικότητα οφείλεται στο τρανσποζόνιο Tn 1545, το οποίο φέρει γονίδια αντοχής στην ερυθρομυκίνη (*ermB*), στην τετρακυκλίνη (*tetM*), στις αμινογλυκοσίδες (*aphA3*), αλλά και στη χλωραμφαινικόλη (*cat*) [178]. Το Tn 1545 παρουσιάζει μεγάλη ομολογία βάσεων με το Tn 916, το οποίο κωδικοποιεί αντοχή και στην τετρακυκλίνη, αλλά όχι στην καναμυκίνη και ερυθρομυκίνη [180].

Η πολυανθεκτικότητα του πνευμονιοκόκκου στα αντιβιοτικά, στην κλινική πράξη σημαίνει ευρύτερη χρήση της βανκομυκίνης, γεγονός που έχει ως συνέπεια τον κίνδυνο αύξησης της αντοχής καταρχήν του εντεροκόκκου αλλά και του σταφυλοκόκκου στη βανκομυκίνη, παρατήρηση ιδιαίτερης κλινικής σημασίας [160].

7.2 Αντοχή στις μακρολίδες

➤ Επιδημιολογικά δεδομένα

Το πρόβλημα αντοχής στην ερυθρομυκίνη και τις υπόλοιπες μακρολίδες είναι εξίσου σημαντικό με την αντοχή στην πενικιλίνη, καθώς πρόκειται για ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία αντιβιοτικού. Τα ποσοστά αντοχής μάλιστα σε πολλές χώρες, ξεπερνούν αυτά της πενικιλίνης. Σύμφωνα με δεδομένα του Alexander project της περιόδου 1992-1995 (διεθνές σύστημα παρακολούθησης της αντοχής), 12 από τα 19 (63,2%) κέντρα, που συγκέντρωναν στοιχεία, δήλωσαν σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής στην ερυθρομυκίνη σε σύγκριση με την πενικιλίνη [163, 181].

Η αύξηση της αντοχής στις μακρολίδες αποδίδεται στην υπερσυνταγογράφηση των συγκεκριμένων φαρμάκων. Υπάρχουν διαφορές αντοχής μεταξύ των χωρών, όμως όλες οι μελέτες συγκλίνουν στη διαπίστωση πως οι τάσεις είναι αυξητικές [182]. Στις ΗΠΑ, κατά την περίοδο 1979-87 τα ποσοστά αντοχής στις μακρολίδες σε 25 χρόνια παρουσίασαν μια σημαντική αύξηση από 0,3% σε 20. Σύμφωνα με δεδομένα του EARSS, στις βόρειες Ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Σουηδία, η Νορβηγία, η Δανία, αλλά και η Ολλανδία, Γερμανία και Ελβετία, η αντοχή στην ερυθρομυκίνη κυμαίνεται μεταξύ 1 και 5%. Στην Αγγλία η αντοχή κυμαίνεται μεταξύ 10 και 25%, ενώ στην Ισπανία, Γαλλία, Ρουμανία, μεταξύ 25 και 50% [181, 182].

Η αντοχή στις μακρολίδες ανιχνεύεται κυρίως σε στελέχη προερχόμενα από παιδιά ηλικίας <5 ετών, όπως επίσης σε στελέχη προερχόμενα από περιπτώσεις μέσης πυώδους ωτίτιδας, από το ρινοφάρυγγα, από το κατώτερο αναπνευστικό και γενικά από κλινικά δείγματα άλλα, εκτός του αίματος. Γενικά, η ένταξη σε παιδικούς σταθμούς, η παραμονή στα νοσοκομεία, οι υποτροπές χρόνιας βρογχίτιδας και μέσης πυώδους ωτίτιδας, η κατάχρηση μακρολιδών, αλλά και β-λακταμικών αντιβιοτικών αποτελούν τους σημαντικότερους προδιαθεσικούς παράγοντες αντοχής στις μακρολίδες. Τη σημαντικότερη πάντως δεξαμενή αντοχής εξ όλων, αποτελούν τα μικρά παιδιά [182].

➤ Μηχανισμοί αντοχής

Η αντοχή του πνευμονιοκόκκου στις μακρολίδες οφείλεται σε δύο κύριους μηχανισμούς δράσης, που είναι κοινοί για όλους τους στρεπτοκόκκους: την ενεργητική έξοδο του αντιμικροβιακού από το κύτταρο του βακτηρίου και την τροποποίηση του στόχου δράσης [183].

α) Η ενεργητική αποβολή του αντιβιοτικού από το μικροβιακό κύτταρο επιτελείται με τη δράση μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης με ιδιότητες αντλίας εξώθησης (efflux) του αντιβιοτικού έξω από το βακτηριακό κύτταρο, που έχει ως αποτέλεσμα το μικρόβιο να αποβάλλει σημαντική ποσότητα του αντιβιοτικού προς το περιβάλλον, περιορίζοντας τη στάθμη του φαρμάκου στο εσωτερικό του κυττάρου σε υποτοξικά επίπεδα. Η αντλία εξώθησης *mef* (macrolide efflux pump) κωδικοποιείται από τα γονίδια *mefA* και *mefE*. Επειδή μεταξύ των δύο γονιδίων η ομολογία είναι >80%, τα γονίδια αυτά εκλαμβάνονται ως ένα, υπό την ονομασία *mefA*. Ο μηχανισμός αντλίας εκφράζει τον φαινότυπο αντοχής M, ο οποίος χαρακτηρίζεται από μικρή αντοχή στις μακρολίδες με 14μελή και 15μελή λακτονικό δακτύλιο, όπως είναι η ερυθρομυκίνη, η κλαριθρομυκίνη και η αζιθρομυκίνη, ενώ δεν επηρεάζει τις μακρολίδες με 16μελή δακτύλιο (μιντεκαμυκίνη), ούτε και τις λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνες. Η αντοχή στις μακρολίδες των *mefA* (+) στελεχών είναι μικρού βαθμού (MIC ≤ 16 μg/ml). Αυτό σημαίνει πως σε υψηλότερες δόσεις οι μακρολίδες υπερνικούν το μηχανισμό αντλίας και έχουν κυτταροτοξική δράση. Ο φαινότυπος M επικρατεί στη Β. Αμερική και στην Ιαπωνία, ενώ στην Ευρώπη και στη Ν. Αφρική η συχνότητα του δεν ξεπερνά το 20% [177, 178, 182, 183, 185].

β) Η τροποποίηση του στόχου δράσης αφορά στη διμεθυλίωση μέσω ενός ενζύμου (μεθυλάσης), μιας αδενίνης στην περιοχή V, του ριβοσωμιακού 23S rRNA της 50S υπομονάδας του ριβοσωμικού RNA του βακτηριακού κυττάρου. Η μεθυλάση αυτή κωδικοποιείται από *erm* γονίδια (erythromycin ribosomal methylase). Η τροποποίηση του «στόχου» μειώνει τη συγγένεια των μακρολιδών με τη θέση σύνδεσης στο ριβόσωμα. Το αποτέλεσμα είναι η διασταυρούμενη αντοχή στις μακρολίδες (M), στις λινκοσαμίδες (L) και στη

στρεπτογραμίνη Β (S_B). Έτσι προκύπτει ο φαινότυπος αντοχής MLS_B . Το γονίδιο *ermB*, μεταφέρεται από τα μεταθετά στοιχεία (τρανσποζόνια) Tn 1545 και Tn 917, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ταχεία εξάπλωση της αντοχής μεταξύ των βακτηρίων. Η αντοχή στις μακρολίδες των *ermB* (+) στελεχών είναι υψηλού βαθμού ($MIC \geq 64$ $\mu\text{g/ml}$). Αυτό σημαίνει πως ακόμη και σε υψηλότερες δόσεις χορήγησης, οι μακρολίδες δεν έχουν δράση. Ο φαινότυπος MLS_B χαρακτηρίζεται από τις μακρολίδες, δεν επηρεάζει τις κετολίδες. Το πρότυπο αυτό αντοχής επικρατεί στην Ευρώπη και τη Νότια Αφρική [177, 178, 182, 183, 185].

Αυτοί οι δύο μηχανισμοί αντοχής αντλίας και τροποποίησης στόχου δράσης, μπορεί να συνυπάρχουν στο ίδιο στέλεχος [186].

Η αντοχή MLS_B έχει δύο φαινότυπους έκφρασης, τον ιδιοσυστασιακό και τον επαγώγιμο:

Ο $cMLS_B$ ιδιοσυστασιακός (ή σταθερός), σημαίνει πως η παραγωγή της μεθυλάσης της ριβοσωμικής υπομονάδας είναι σταθερή. Χαρακτηρίζεται από υψηλή αντοχή στις μακρολίδες με 14-, 15- και 16-μελείς λακτονικούς δακτυλίους με $MIC \geq 64$ $\mu\text{g/ml}$, ενώ συνυπάρχει και υψηλού βαθμού αντοχή στις λινκοσαμίδες ($MIC \geq 64$ $\mu\text{g/ml}$) και τη στρεπτογραμίνη Β ($MIC \geq 25$ $\mu\text{g/ml}$). Ο $iMLS_B$ επαγώγιμος φαινότυπος αντοχής, σημαίνει πως η παραγωγή της μεθυλάσης της ριβοσωμικής υπομονάδας δεν είναι σταθερή, αλλά επάγεται από ουσίες που περιέχουν οι 14-μελείς και 15-μελείς μακρολίδες. Χαρακτηρίζεται από διασταυρούμενη αντοχή και στις τρεις αυτές κατηγορίες αντιβιοτικών, ενώ η αντοχή στις λινκοσαμίδες ($MIC \geq 64$ $\mu\text{g/ml}$), εκφράζεται μόνο παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων ερυθρομικίνης.

Τελευταία προσδιορίστηκε και τρίτος μηχανισμός αντοχής, ο οποίος μάλιστα ανιχνεύθηκε στην Ελλάδα και ο οποίος χαρακτηρίζεται από υψηλού βαθμού αντοχή στην ερυθρομικίνη 27. Ο μηχανισμός αυτός κωδικοποιείται από το γονίδιο *ermA*.

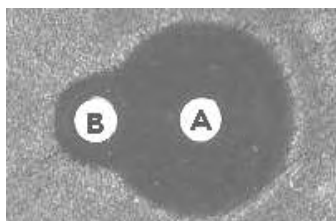
Υπάρχουν και δύο άλλοι φαινότυποι: ο MS_B , ο οποίος χαρακτηρίζεται από αντοχή στις μακρολίδες και τη στρεπτογραμίνη Β και ευαισθησία στις λινκοσαμίδες και ο ML , ο οποίος χαρακτηρίζεται από αντοχή στις μακρολίδες

και τις λινκωσαμίδες και ευαισθησία στη στρεπτογραμίνη Β. Οι φαινότυποι αυτοί δε σχετίζονται με έκφραση των *mefA* ή *erm* γονιδίων αλλά με μεταλλάξεις στην 23S περιοχή του rRNA(θέση 2059) ή στις πρωτεΐνες του ριβοσώματος, κυρίως τις L4 και L22 [187, 188].

➤ Μικροβιολογική διάγνωση της αντοχής

Ο φαινότυπος ανθεκτικών στελεχών στις μακρολίδες καθορίζεται με το D-test, τη δοκιμασία επαγωγής με τους διπλούς δίσκους ερυθρομυκίνης και κλινδαμυκίνης [189]. Συγκεκριμένα, δίσκοι ερυθρομυκίνης (των 15μg) και κλινδαμυκίνης (των 2 μg) τοποθετούνται σε απόσταση 15-20mm, σε τρυβλίο με αιματούχο άγαρ Mueller-Hinton, στο οποίο έχει επιστρωθεί εναιώρημα βακτηριακής καλλιέργειας του στελέχους θολερότητας 0,5 της κλίμακας McFarland. Τα τρυβλία επωάζονται για 20-24 ώρες στους 35°C σε συνθήκες 3-5% CO₂. Ακολουθεί η ανάγνωση του φαινοτύπου ως εξής:

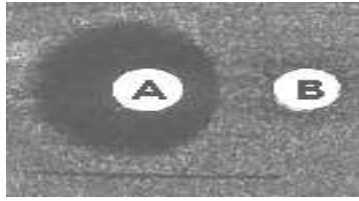
-Φαινότυπος M αντιστοιχεί σε στέλεχος ανθεκτικό στην ερυθρομυκίνη και η άλως αναστολής γύρω από την κλινδαμυκίνη είναι κανονική.



-Φαινότυπος cMLS_B, ιδιοστασιακής αντοχής αντιστοιχεί σε στέλεχος χωρίς άλως αναστολής και άρα ανθεκτικό και σε κλινδαμυκίνη και στην ερυθρομυκίνη.



-Φαινότυπος iMLS_B, επαγωγίμης αντοχής αντιστοιχεί σε στέλεχος ανθεκτικό στην ερυθρομυκίνη και απάλειψη της ζώνης αναστολής της κλινδαμυκίνης στην πλευρά που γειτνιάζει με το δίσκο της ερυθρομυκίνης.



➤ Πολυανθεκτικά στελέχη

Το 48-70% των ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών είναι ανθεκτικά στις μακρολίδες. Η διαπίστωση αυτή έχει μεγάλη πρακτική αξία, διότι τυπικά οι μακρολίδες πρέπει να αποφεύγονται στη θεραπευτική αντιμετώπιση ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών, εκτός αν το αντιβιογράμμα συνηγορεί για το αντίθετο [182].

Αντοχή στις μακρολίδες εμφανίζεται με σταδιακά αυξανόμενη συχνότητα και σε ευαίσθητα στελέχη στην πενικιλίνη, πολλά εκ των οποίων μάλιστα είναι ανθεκτικά σε πολλές διαφορετικές επιπλέον ομάδες αντιβιοτικών. Πρόκειται δηλαδή για MDR στελέχη, ευαίσθητα στην πενικιλίνη και στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Σε πολλές χώρες, τα ποσοστά πολυανθεκτικότητας μεταξύ των ευαίσθητων στελεχών στην πενικιλίνη είναι πολύ μεγάλα, φθάνοντας στην Ιαπωνία το 48% και στην Κίνα το 72%, σύμφωνα με στοιχεία του συστήματος Alexander project [181]. Αυτό το γεγονός είναι αποτέλεσμα της υπερκατανάλωσης μακρολιδών.

Μεταξύ των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη στελεχών πνευμονιοκόκκου, υψηλά ποσοστά είναι ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη. Ο συσχετισμός αντοχής μεταξύ ερυθρομυκίνης και τετρακυκλίνης οφείλεται στο τρανσποζόνιο Tn 1545, το οποίο μεταφέρει συγχρόνως τα γονίδια αντοχής *ermB*, που κωδικοποιούν αντοχή στην ερυθρομυκίνη, τα γονίδια αντοχής *tetM* για αντοχή στην τετρακυκλίνη, καθώς και τα γονίδια *aphA3* για αντοχή στην καναμυκίνη [180, 184, 190].

➤ Κλινική σημασία αντοχής στις μακρολίδες

Η αντοχή στις μακρολίδες φαίνεται ότι σχετίζεται με κλινική αποτυχία, κάτι που δε συμβαίνει με στελέχη ανθεκτικά στην πενικιλίνη. Σε μελέτη [191]

θεραπείας πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων με μακρολίδες, σε 76 ασθενείς απομονώθηκε πνευμονιόκοκκος ανθεκτικός στην ερυθρομυκίνη και 18 από αυτούς (24%) παρουσίασαν βακτηριαιμία ενώ ήταν υπό αγωγή με μακρολίδη. Αντιθέτως, σε 136 ασθενείς (ομάδα ελέγχου) που απομονώθηκε ευαίσθητος πνευμονιόκοκκος στις μακρολίδες, δεν παρατηρήθηκε κανένα επεισόδιο βακτηριαιμίας. Δεδομένα και από άλλες μελέτες, επιβεβαιώνουν τον αρχικό ισχυρισμό.

Μια νέα κατηγορία φαρμάκων όμως, οι κετολίδες, με ευρύτερα γνωστή εκπρόσωπο την τελιθρομυκίνη, που είναι ημισυνθετικά παράγωγα της ερυθρομυκίνης A, σχεδιάστηκαν για να υπερκεραστούν οι μηχανισμοί αντοχής στις μακρολίδες. Με την προσθήκη μιας κετομάδας στη θέση 3 του λακτονικού δακτυλίου για παρεμπόδιση της επαγωγής MLS_B αντοχής, καθώς και προσθήκη μιας πλευρικής αλύσου στις θέσεις 11 και 12 του λακτονικού δακτυλίου για βελτίωση της σύνδεσης του αντιβιοτικού στο ριβόσωμα, οι κετολίδες δεν επάγουν αντοχή στις μακρολίδες, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνες και είναι ενεργείς έναντι των Gram-θετικών κόκκων που φέρουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τη μεθυλάση [192, 193].

7.3 Αντοχή σε άλλα αντιβιοτικά

Τετρακυκλίνες: Δρουν βακτηριοστατικά όταν συνδεθούν με την 30S ριβοσωμική υπομονάδα του μικροβίου. Ο μηχανισμός αντοχής στις τετρακυκλίνες στοχεύει στη μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φαρμάκου, είτε με ελάττωση της εισόδου του αντιμικροβιακού στο κύτταρο είτε με ενεργητική απέκκριση του φαρμάκου εκτός του κυττάρου [194].

Κινολόνες: Δρουν εμποδίζοντας την αντιγραφή του βακτηριακού DNA, εμποδίζοντας τη δράση της DNA γυράσης και της τοποϊσομεράσης IV. Η ανάπτυξη αντοχής οφείλεται σε μεταλλάξεις των γονιδίων (*parC*, *parE*, *parA*, *gyrB*), που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα [195].

Τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη: Δρα εμποδίζοντας το μεταβολισμό του φυλλικού οξέος του βακτηριακού κυττάρου, αναστέλλοντας τη δράση των

ενζύμων διϋδροπτεροϊκής συνθετάσης και διϋδροφυλλικής ρεδοκτάσης. Η ανάπτυξη αντοχής σχετίζεται με τροποποίηση των ενζύμων αυτών με αποτέλεσμα μειωμένη χυμική συνάφεια με το αντιβιοτικό [196, 197].

Χλωραμφενικόλη: Η αντοχή αφορά στελέχη που παράγουν το ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση, το οποίο με τη σειρά του ακετυλιώνει τη χλωραμφενικόλη με αποτέλεσμα αδρανές ακετυλιωμένο παράγωγο του αντιβιοτικού [194].

Ριφαμπικίνη: Η ανάπτυξη αντοχής είναι πολύ σπάνια και αφορά βακτηριακά κύτταρα που φέρουν τροποποιημένη τη β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης, με αποτέλεσμα να μην δρά το αντιβιοτικό στο σημείο στόχου.

7.4 Ορότυποι με αντοχή στα αντιβιοτικά

Τα στελέχη πνευμονιοκόκκου με υψηλή αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά ανήκουν στους οροτύπους 6B, 9V, 14, 19A, 19F και 23F. Μία εξήγηση είναι πως αυτοί οι ορότυποι αποικίζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό το ρινοφάρυγγα των παιδιών και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, οπότε η πίεση της φυσικής επιλογής των αντιβιοτικών ευνοεί την ανάπτυξη αντοχής [198].

Ως προς την αντοχή στις μακρολίδες, οι ορότυποι 6 και 19 συνδέονται κατά κύριο λόγο με αντοχή στην ερυθρομυκίνη και συγκεκριμένα με αντοχή τύπου MLS_B, συνδέονται οι οροτύποι 6B, 23F, 14 και 19F, ενώ με αντοχή τύπου M οι οροτύποι 14, 6A και 19F. Ο ορότυπος 14 εξ άλλου, σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με συστηματικές λοιμώξεις. Οι ορότυποι που προαναφέρθηκαν περιλαμβάνονται στο πολυδύναμο εμβόλιο κατά του πνευμονιοκόκκου [199].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Ο στρεπτόκοκκος της πνευμονίας είναι ένα Gram θετικό βακτήριο που αποικίζει συνήθως τον ανθρώπινο ρινοφάρυγγα, ιδίως κατά την πρώιμη παιδική ηλικία [200, 201]. Στα περισσότερα άτομα ο αποικισμός είναι ασυμπτωματικός και δεν εξελίσσεται σε νόσο [202, 203]. Εκτός από το ρόλο του στη φορεία, ο *S. pneumoniae* είναι επίσης ένα κοινό ανθρώπινο παθογόνο βακτήριο, που ευθύνεται για βακτηριαμία, σήψη, μηνιγγίτιδα καθώς και μη διεισδυτικές νόσους, όπως μη βακτηριαμική πνευμονία, μέση ωτίτιδα, και ιγμορίτιδα [203, 88].

Για πολλά χρόνια η πενικιλίνη ήταν το φάρμακο εκλογής για την επιτυχή αντιμετώπιση των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων. Τα δεδομένα όμως άρχισαν να αλλάζουν με την ευρεία χρήση των αντιβιοτικών, καθώς η πίεση της φυσικής επιλογής άλλαξε, όπως αναμενόταν, τα επιδημιολογικά δεδομένα. Σήμερα, η θεραπεία των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων αντιμετωπίζει σημαντικές δυσκολίες, δεδομένης της σταδιακά αυξανόμενης αντοχής του μικροβίου στα αντιβιοτικά, κυρίως στα β-λακταμικά και στις μακρολίδες, αλλά και της πολυαντοχής του, δηλαδή της αντοχής σε αρκετές άλλες επιπλέον ομάδες αντιβιοτικών. Το Μικροβιολογικό Εργαστήριο οφείλει να διαπιστώνει την αντοχή του πνευμονιοκόκκου, εφαρμόζοντας τις σύγχρονες κατευθυντήριες οδηγίες, βοηθώντας ουσιαστικά τους κλινικούς ιατρούς. Οι δε κλινικοί ιατροί, οφείλουν από την πλευρά τους να αναφέρονται στο εργαστήριο, ώστε να εξασφαλίζεται η επιτυχία του θεραπευτικού σχήματος. Επιπλέον, εργαστηριακοί και κλινικοί ιατροί οφείλουν να ενημερώνονται για τα επιδημιολογικά δεδομένα της περιοχής τους, καθώς η σημαντική αυτή γνώση καθορίζει την πορεία τόσο της κλινικής επιτυχίας όσο και την εξέλιξη της δυναμικής «αντιπαράθεσης» μεταξύ του πνευμονιοκόκκου και των αντιμικροβιακών παραγόντων.

Η αντοχή στην ερυθρομυκίνη και τις άλλες μακρολίδες είναι κοινό χαρακτηριστικό σε απομονωθέντα στελέχη *S. pneumoniae* τόσο από φορείς όσο και από ασθενείς [204-212]. Οι κύριοι μηχανισμοί μικροβιακής αντοχής

του *S. pneumoniae* στις μακρολίδες είναι η τροποποίηση του κυτταρικού στόχου και ο μηχανισμός αντλίας εξώθησης του φαρμάκου από το κύτταρο [213].

Το γονίδιο που κωδικοποιεί ο πνευμονιόκοκκος και συνδυάζεται με αντοχή στις μακρολίδες, μέσω τροποποίησης του κυτταρικού στόχου, είναι κυρίως το *erm(B)* [214]. Το γονίδιο *erm(B)* κωδικοποιεί μεθυλίωση στο κέντρο πεπτιδυλτρανσφεράσης της 23S υπομονάδας του rRNA, παρέχοντας έτσι υψηλού επιπέδου αντοχή σε 14-, 15- και 16-μελούς δακτυλίου μακρολίδες, λινκοζαμίδες και στρεπτογραμίνη B (φαινότυπος MLS_B) [213].

Ο δεύτερος μηχανισμός ανθεκτικότητας στις μακρολίδες, είναι ένα σύστημα αντλίας εκροής του φαρμάκου από το βακτηριακό κύτταρο, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mef* και μιας ATP-δεσμευτικής πρωτεΐνης κασέτας, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mel* [215]. Ο μηχανισμός εκροής προσδίδει αντοχή μόνο σε σε 14- και 15- μελείς μακρολίδες (M φαινότυπος) [216, 217].

Δύο κύριες παραλλαγές του γονιδίου *mef*, κωδικοποιούνται από το *S. pneumoniae*, τα γονίδια *mef(E)* και *mef(A)*, τα οποία είναι περίπου 90% ομόλογα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και θεωρούνται πως ανήκουν ουσιαστικά στην ίδια κατηγορία των καθοριστικών παραγόντων της αντοχής στις μακρολίδες, αποκαλούμενα συχνά για το λόγο αυτό αμφότερα ως *mef(A)* [218][219,220]. Αυτά τα δύο γονίδια μεταφέρονται με διαφορετικά γενετικά στοιχεία μεταξύ στελεχών πνευμονιοκόκκου αλλά και μεταξύ στελεχών πνευμονιοκόκκου και άλλων μικροοργανισμών [220,221]. Το *mef(A)* βρίσκεται στο τρανσποζόνιο *Tn1207.1* [222], ή το στενά συνδεδεμένο τρανσποζόνιο *Tn1207.3* [223], ενώ το *mef(E)* βρίσκεται και μεταφέρεται με το αποκαλούμενο "μέγα" στοιχείο [215,224,225].

Η Ελλάδα έχει υψηλό επιπολασμό των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών *S. pneumoniae* [226-228]. Η παρατήρηση αυτή είναι κοινή σε πολλές χώρες ανά τον κόσμο, όπου η ευρεία και πιθανόν άκριτη χρήση των αντιβιοτικών ήταν για χρόνια κοινή ιατρική πρακτική.

Η πρόληψη των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων γίνεται με την εφαρμογή του αντιπνευμονιοκοκκικού εμβολιασμού στις ηλικιακές ομάδες υψηλής επίπτωσης της πνευμονιοκοκκικής νόσου. Στη χώρα μας, το πρώτο επταδύναμο εμβόλιο για τον πνευμονιόκοκκο (PCV7) έγινε εμπορικά διαθέσιμο τον Οκτώβριο του 2004. Επίσημα εισήχθη στο Πρόγραμμα εμβολιασμού της χώρας, σε παιδιά μικρότερα των 5 ετών, τον Ιανουάριο του 2006 και καλύφθηκε κατά 80% από το εθνικό ασφαλιστικό σύστημα υγείας, τον Ιούνιο του 2006.

Η εφαρμογή του εμβολίου άλλαξε τα επιδημιολογικά δεδομένα παγκοσμίως, μειώνοντας την επίπτωση της πνευμονιοκοκκικής νόσου τόσο στον παιδιατρικό πληθυσμό όσο και στο σύνολο του πληθυσμού, αποτελώντας μια ακόμη σημαντική ασπίδα προστασίας της κοινότητας. Ωστόσο, η αλλαγή των επιδημιολογικών δεδομένων, με την ευρεία εφαρμογή της ενεργητικής ανοσοποίησης, ήταν ένας ακόμη μηχανισμός πίεσης της φυσικής επιλογής του σημαντικού αυτού παθογόνου μικροβίου.

Η συνεχής, οργανωμένη και διεξαγόμενη σε διαφορετικές γεωγραφικές χώρες ανά τον κόσμο επιτήρηση της φορέας των στελεχών πνευμονιοκόκκου, είναι εξίσου αναγκαία με τη μελέτη των κλινικών στελεχών, δίνοντας σημαντικά στοιχεία στην ιατρική έρευνα και έχοντας επακόλουθη εφαρμογή στην κλινική πρακτική.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης, είναι να μελετήσει τις εξής παραμέτρους:

- τις τάσεις στη φορεία των ανθεκτικών στις μακρολίδες πνευμονιοκόκκων
- την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά στην πορεία των ετών
- τους αντίστοιχους οροτύπους, που εμφανίζουν συχνότερα αντοχή στα αντιβιοτικά και την αλλαγή των επιδημιολογικών δεδομένων μετά την εφαρμογή του εμβολιασμού με το επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο

- τους καθοριστικούς παράγοντες αντοχής στις μακρολίδες, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στη γονιδιακή συμμετοχή με τη βοήθεια των σύγχρονων μοριακών τεχνικών

Πρόκειται για μία προοπτική μελέτη που διεξήχθη σε παιδικούς σταθμούς της Κεντρικής Ελλάδας μεταξύ των ετών 2005 και 2009, κατά την οποία συλλέχθηκαν και μελετήθηκαν στελέχη πνευμονιοκόκκου φορέας υγιών νηπίων, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πρωτόκολλο μελέτης

Το πρωτόκολλο της μελέτης σχεδιάστηκε με βάση τους κανόνες της Στατιστικής Επιστήμης και τις ανάγκες της Επιδημιολογικής Έρευνας. Εν συνεχεία κατατέθηκε γραπτά και εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Συμπεριλάμβανε τη γραπτή συγκατάθεση ενός εκ των γονέων του κάθε συμμετέχοντα.

2.2 Πληθυσμός της μελέτης

Πρόκειται για παιδιά που παρακολουθούσαν δημόσιο παιδικό σταθμό σε Λάρισα, Βόλο, Τρίκαλα, και Καρδίτσα, στις 4 μεγαλύτερες πόλεις της Κεντρικής Ελλάδας, το αντίστοιχο χρονικό διάστημα της δειγματοληψίας. Οι ηλικίες του κυμαίνονταν μεταξύ 13-76 μηνών (διάμεση ηλικία οι 47 μήνες).

2.3 Δειγματοληψία

➤ Χρόνος

Ως χρόνος δειγματοληψία ορίστηκε μια περίοδος περίπου τριών μηνών κατά τα έτη 2005, 2006, 2007 και 2009. Η τρίμηνη περίοδος αφορούσε από το τέλος του χειμώνα μέχρι την άνοιξη, περίοδο αυξημένης πνευμονιοκοκκικής φορέας με βάση επιδημιολογικά δεδομένα.

➤ Δείγμα

Στην κάθε ετήσια επιτήρηση, ένα ρινοφαρυγγικό δείγμα ελήφθη από το κάθε παιδί. Τα δείγματα ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος ελήφθησαν μέσω της ρινικής οδού χρησιμοποιώντας αποστειρωμένους βαμβακοφόρους στυλεούς, με

εύκαμπτα ειδικά άκρα από ίνες αλγινικού ασβεστίου (Fisher Scientific, Pittsburgh, Philadelphia, USA).

➤ Έντυπο υλικό

Οι γονείς των παιδιών που συμμετείχαν στη μελέτη αφού έδιναν γραπτή συγκατάθεση, απαντούσαν σε ειδικό ερωτηματολόγιο. Με τον τρόπο αυτό, καταγράφηκαν τα δημογραφικά στοιχεία των παιδιών που συμμετείχαν στη μελέτη και από τα οποία ελήφθη το δείγμα, όπως και επιδημιολογικά στοιχεία σχετικά με το επίπεδο κάλυψης με το εμβόλιο PCV7 (δόσεις εμβολίου, ημερομηνίες εμβολιασμού), καθώς και η πρόσφατη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων κατά τη διάρκεια των προηγούμενων τριών μηνών (είδος αντιβιοτικού, δοσολογικό σχήμα και διάρκεια αγωγής). Επιπλέον ελήφθησαν πληροφορίες από το ατομικό ιατρικό ιστορικό του κάθε παιδιού.

2.4 Καθεστώς εμβολιασμού συμμετεχόντων

Η Ελληνική Εθνική Επιτροπή Εμβολιασμών το χρονικό διάστημα διεξαγωγής της δειγματοληψίας, συνιστούσε το επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (PCV7), καθώς ήταν το μόνο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο που κυκλοφορούσε εμπορικά. Το βασικό δοσολογικό σχήμα είναι μια σειρά 4 δόσεων για βρέφη ηλικίας 2, 4, 6, και 12 έως 23 μηνών. Πρόγραμμα αναπλήρωσης δόσης (Catch-up ανοσοποίηση) συνιστάται για όλα τα παιδιά ηλικίας έως 59 μηνών [229]. Η Catch-up ανοσοποίηση σε βρέφη περιλαμβάνει 2 δόσεις σε ηλικία 7-11 μηνών και μία τρίτη δόση σε ηλικία 12-23 μηνών, ενώ για νήπια ηλικίας 12-23 μηνών συνιστανται 2 δόσεις. Εάν ο εμβολιασμός ξεκινήσει μετά τα 2 έτη ζωής, συνιστάται μόνο μία δόση του εμβολίου. Το συνιστώμενο μεσοδιάστημα μεταξύ των δόσεων είναι τουλάχιστον 4 εβδομάδες.

Όσον αφορά την παρούσα μελέτη:

- Μία δόση του εμβολίου προσμετρούνταν αν είχε γίνει τουλάχιστον 30 ημέρες πριν από την ημερομηνία της δειγματοληψίας.

- Επαρκώς εμβολιασμένο κατά τη δειγματοληψία θεωρούνταν ένα παιδί εάν είχε λάβει όλες τις συνιστώμενες δόσεις του PCV7 για την ηλικία έναρξης του εμβολιασμού του.
- Μερικώς εμβολιασμένο κατά τη δειγματοληψία θεωρούνταν ένα παιδί εάν είχε λάβει λιγότερες από τις συνιστώμενες δόσεις του PCV7 για την ηλικία έναρξης του εμβολιασμού του.

2.5 Εργαστηριακός έλεγχος

Τα ληφθέντα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα, που ελήφθησαν με το βαμβακοφόρο στυλέο, τοποθετήθηκαν εν συνεχεία σε ειδικό υλικό μεταφοράς Amies (TGV, Sanofi Diagnostic Pasteur, Marne la Coquette, France) και μεταφέρθηκαν στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παιδιατρικών Λοιμώξεων του τμήματος Παιδιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Εκεί, ακολούθησε απομόνωση, ταυτοποίηση και έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των απομονωθέντων στελεχών *S. pneumoniae* [230]. Το χρονικό διάστημα μεταξύ της δειγματοληψίας και της καλλιέργειας είχε μέγιστο τις 7 ώρες.

➤ Καλλιέργεια και απομόνωση

Τα δείγματα επιστρώθηκαν σε τρυβλία με άγαρ Columbia, εμπλουτισμένο με 5% αίμα αλόγου (από το οποίο είχε αφαιρεθεί το ινωδογόνο), 10 μg θειϊκή κολιστίνη και 15 μg ναλιδιξικού οξέος ανά χιλιοστόλιτρο. Τα τρυβλία επωάστηκαν εν συνεχεία σε κλίβανο και στους 35°C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ για 24-72 ώρες.

➤ Ταυτοποίηση

Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (μορφολογία και ζώνη α-αιμόλυσης) χρησιμοποιήθηκαν για την αρχική ταυτοποίηση των στελεχών πνευμονοκόκκου. Στη συνέχεια, έγινε επιβεβαίωση με τις δοκιμασίες ευαισθησίας στην οπτοχίνη και διαλυτότητας στα χολικά άλατα. Όταν παρατηρήθηκαν αποικίες με περισσότερες από μία μορφολογίες, κάθε τύπος

αποικίας επανακαλλιεργήθηκε για καθαρισμό και για περαιτέρω εργαστηριακές δοκιμασίες.

➤ Προσδιορισμός του οροτύπου από τον πολυσακχαρίτη του ελύτρου

Ο προσδιορισμός των οροτύπων των στελεχών πνευμονιοκόκκου που απομονώθηκαν, συμπεριλαμβανομένων και αυτών του ορότυπου 6C, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο με τη χρήση Pneumotest-Latex και με τη δοκιμασία εξοίδησης του ελύτρου, μέθοδο που χρησιμοποιεί ειδικούς αντιορούς οροτύπου/οροομάδας ή/και παράγοντα από το Statens Serum Institut (SSI, Κοπεγχάγη, Δανία). Ακολουθήσαμε τις κατευθυντήριες οδηγίες του SSI για τον προσδιορισμό του οροτύπου .

Τα στελέχη πνευμονιοκόκκου που απομονώθηκαν με βάση τον ορότυπο χαρακτηρίστηκαν ως PCV7-ορότυποι, μη-PCV7-ορότυποι και μη τυποποιήσιμοι.

➤ Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

Οι δοκιμασίες ευαισθησίας στους διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες, που αντιπροσωπεύουν διαφορετικές κατηγορίες αντιβιοτικών, διεξήχθη σε τρυβλία, που περιείχαν ως θρεπτικό υλικό άγαρ Mueller-Hinton, εμπλουτισμένο με 5% αίμα αλόγου (από το οποίο ομοίως είχε αφαιρεθεί το ινωδογόνο). Οι διαδικασίες περιγράφονται ακολούθως:

Τα στελέχη *S. pneumoniae* που απομονώθηκαν, ελέγχθηκαν για ευαισθησία σε ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη τόσο με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου όσο και με τη μέθοδο του E-test (AB Biodisk, Στοκχόλμη, Σουηδία).

Ακολούθησε διαλογή ως προς την αντοχή στην πενικιλίνη, χρησιμοποιώντας δίσκους οξακιλλίνης του 1 μg. Εάν η ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο οξακιλλίνης ήταν <20 mm, ακολουθούσε προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) στην πενικιλίνη με τη μέθοδο του E-test.

Η ευαισθησία στις κινολόνες προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του E-test. Τα στελέχη που απομονώθηκαν ελέγχθηκαν με λεβοφλοξασίνη, εκτός από στελέχη που απομονώθηκαν το 2005 και τα οποία ελέγχθηκαν με σιπροφλοξασίνη.

Τέλος, η ευαισθησία στη χλωραμφενικόλη, τετρακυκλίνη, και τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (TMP-SMZ), ελέγχθηκε με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων.

Για τις δοκιμασίες ευαισθησίας, τρυβλία με τους δίσκους αντιβιοτικών και τις ταινίες E-test επωάστηκαν σε συνθήκες 5% CO₂.

➤ Ταξινόμηση στελεχών ως ευαίσθητα, ανθεκτικά και ενδιάμεσης αντοχής

Για την ταξινόμηση των οργανισμών ως ευαίσθητα, ενδιάμεσης αντοχής ή ανθεκτικά στα αντιβιοτικά που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν τα όρια ευαισθησίας της Clinical and Laboratory Standards (CLSI) [231] και της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τον Αντιμικροβιακό Έλεγχο Ευαισθησίας (EUCAST) [171].

Όσον αφορά την από του στόματος πενικιλίνη V, δεδομένου ότι σε παιδιατρικές λοιμώξεις η θεραπεία είναι κυρίως από το στόμα, χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς στην παρούσα μελέτη, τα παρακάτω όρια ευαισθησίας της CLSI:

- ≤ 0.06 $\mu\text{g} / \text{ml}$, ευαίσθητα
- **0.12 - 1** $\mu\text{g} / \text{ml}$, ενδιάμεσα και
- ≥ 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$, ανθεκτικά.

Όσον αφορά τη βενζυλοπενικιλίνη, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όρια ευαισθησίας της EUCAST για λοιμώξεις εκτός από μηνιγγίτιδα:

- ≤ 0.06 $\mu\text{g} / \text{ml}$, ευαίσθητα
- **0,12 - 2** $\mu\text{g} / \text{ml}$, ενδιάμεσα Και
- **2** $\mu\text{g} / \text{ml}$, ανθεκτικά.

Στελέχη πνευμονιοκόκκου ορίστηκαν ως ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη, εάν οι MICs στην ciprofloxacin ήταν ≥ 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

➤ Πολυανθεκτικά στελέχη

Στελέχη πνευμονιοκόκκου ορίστηκαν ως ανθεκτικά σε πολλαπλά αντιμικροβιακά φάρμακα (πολυανθεκτικά στελέχη, MDR), όταν ήταν ανθεκτικά σε τουλάχιστον 3 κατηγορίες αντιβιοτικών.

Οι πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και καρβαπενέμες θεωρούνται μια ενιαία κατηγορία.

➤ Δοκιμασία επαγωγίμης αντοχής (D-test).

Οι φαινότυποι αντοχής στις μακρολίδες προσδιορίστηκαν βάσει του προτύπου της ευαισθησίας στην ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη και επιβεβαιώθηκαν με τη δοκιμή διάχυσης διπλού δίσκου χρησιμοποιώντας δίσκους ερυθρομυκίνης και κλινδαμυκίνης (BBL, Cockeysville, MD).

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι των 15 μg ερυθρομυκίνης και 2 μg κλινδαμυκίνης έκαστος. Οι δίσκοι ερυθρομυκίνης-κλινδαμυκίνης τοποθετήθηκαν σε απόσταση 16 mm μεταξύ τους. Η δοκιμασία της επαγωγίμης αντοχής ήταν θετική όταν η ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο κλινδαμυκίνης ήταν αμβλεία στην πλευρά που γειτνιάζε με το δίσκο της ερυθρομυκίνης.

➤ Μοριακές μέθοδοι ανάλυσης των στελεχών

i. Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA extraction) Για την απομόνωση του γενετικού υλικού από στερεές καλλιέργειες στελεχών πνευμονιοκόκκου, χρησιμοποιήθηκε το DNA tissue easy kit της Qiagen με βάση πρωτόκολλο, ειδικά τροποποιημένο για πνευμονιόκοκκο.

ii. Τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR)

Με τη συμβατική μέθοδο PCR έγινε προσπάθεια ανίχνευσης των γονιδίων ανθεκτικότητας στις μακρολίδες, *erm(B)* και *mef* [232].

Τα κατάλληλα ζεύγη εκκινητών (primers) επιλέχθηκαν με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία. Το DNA από τα δείγματα πνευμονιοκόκκου πολλαπλασιάστηκε με τα αντίστοιχα ζεύγη εκκινητών, μετά από βελτιστοποίηση και τυποποίηση της μεθόδου.

Για το *erm(B)* γονίδιο, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών:

5'-CGA GTG AAA AAO TAC TCA ACC-3 ' και 5'-GGC TTT GTG TGC TTG CAT ATG-3'
[233]

και για το *mef* γονίδιο το ζεύγος εκκινητών:

5'- GCG TTT AAG ATA AGC TGG CA-3 'και 5'-CCT GCA CCA TTT GCT CCT AC-3'
[220].

Τα ενισχυμένα με την PCR προϊόντα DNA αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η φωτογράφιση του προϊόντος της ηλεκτροφόρησης έγινε με τη βοήθεια συσκευής υπεριώδους ακτινοβολίας και φωτογραφικής μηχανής υψηλής ανάλυσης.

iii. Ανάλυση Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Για να γίνει διάκριση μεταξύ *mef(A)* στελεχών ,δηλαδή των υποκατηγοριών *mef(A)* και *mef(E)*, διενεργήθηκε PCR restriction fragment length polymorphism analysis, όπως προτείνεται από Oster et al. [219]. Το προϊόν PCR μήκους 1743-bp για το γονίδιο *mef*, επωάστηκε και υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI* ή *DraI*. Το προϊόν της πέψης διαχωρίστηκε ηλεκτροφορητικά σε γέλη αγαρόζης.

Στην αλληλουχία των βάσεων του γονιδίου *mef(A)* υπάρχει μία θέση για δράση του περιοριστικού ενζύμου *BamHI* , οπότε και παράγονται δύο θραύσματα από μήκους βάσεων 1.340 και 403 bp, ενώ στην αλληλουχία των

βάσεων του γονιδίου *mef(E)* δεν υπάρχουν θέσεις δράσης του ενζύμου *BamHI*.

Περιορισμός του *mef(A)* με το περιοριστικό ένζυμο *DraI* αποδίδει δύο θραύσματα μήκους 1493 και 250 bp, αντίστοιχα, ενώ περιορισμός του *mef(E)* αποδίδει τρία θραύσματα των 782, 711, και 250 bp.

2.6 Στατιστική ανάλυση

Για την συγκριτική στατιστική ανάλυση των 4 ομάδων δειγμάτων και των λοιπών επιδημιολογικών χαρακτηριστικών, που συγκεντρώθηκαν κατά τη διάρκεια των τεσσάρων χρονικών περιόδων επιτήρησης της φορέας 2005, 2006, 2007, 2009, ως παράμετρος χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο χ^2 για την τάση.

Για την συγκριτική εκτίμηση 2 ομάδων (ανά ζεύγη), οι παράμετροι που συγκεντρώθηκαν συγκρίθηκαν με τη χρήση της ακριβής δοκιμασίας του Fisher.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SPSS, έκδοση 13.0.

Ένα αποτέλεσμα θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντικό όταν η στατιστική σημαντικότητα *P*-value ήταν <0.05 .

3. Αποτελέσματα

Πληθυσμός και δείγματα

Η δειγματοληψία διενεργήθηκε σε τέσσερα έτη, μεταξύ του τέλους χειμώνα και της αρχής της άνοιξης. Συγκεκριμένα μεταξύ 28^{ης} Φεβρουαρίου του 2005 και 19^{ης} Μαΐου του 2009.

Ο συνολικός αριθμός ρινοφαρυγγικών δειγμάτων που ελήφθη ήταν από 2649 παιδιά. Οι ηλικίες κυμαινόταν από 13 έως και 76 μηνών (μέση ηλικία: 48 μήνες). Δεν υπήρχαν παιδιά ηλικίας κάτω των 13 μηνών που παρακολουθούσαν παιδικό σταθμό. Τα χαρακτηριστικά των παιδιών κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Από τα 2649 παιδιά που συμμετείχαν στη μελέτη ελήφθησαν ισάριθμα δείγματα και 1196 (ποσοστό 45,1%) ταυτοποιήθηκαν ως φορείς του *Streptococcus pneumoniae*. Σε 46 δείγματα απομονώθηκαν δύο διαφορετικά στελέχη πνευμονιοκόκκου. Από το σύνολο των 1242 απομονωθέντων στελεχών πνευμονιοκόκκου, 1105 (ποσοστό 89%) ήταν τυποποιήσιμα. Η παρούσα ανάλυση βασίστηκε στο σύνολο των τυποποιήσιμων στελεχών πνευμονιοκόκκου.

Πίνακας 1 Χαρακτηριστικά των παιδιών κατά τη δειγματοληψία (N=2.649)

| Χαρακτηριστικό | Έτος επιτήρησης | | | | P |
|---|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------|
| | 2005 | 2006 | 2007 | 2009 | |
| Περίοδος δειγματοληψίας | 28 Φεβρουαρίου έως 7 Ιουνίου | 2 Φεβρουαρίου έως 13 Απριλίου | 26 Φεβρουαρίου έως 17 Μαΐου | 24 Φεβρουαρίου έως 19 Μαΐου | |
| PCV7 στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμού | - | + | + | + | |
| PCV7 επανεμβολιασμός | - | - | + | + | |
| Αριθμός παιδιών | 769 | 494 | 566 | 820 | |
| Ηλικία, Διάμεση(εύρος), μήνες | 49 (15-76) | 46,5 (13-70) | 46 (13-73) | 48 (14-72) | - |
| Άρρεν φύλο | 417 (54,2) ^a | 248 (50,2) | 297 (52,5) | 427 (52,1) | 0,529 |
| Χρήση αντιβιοτικού τους προηγούμενους 3 μήνες | 433/764 ^b (56,7) | 260/489 (53,2) | 284/566 (50,2) | 459/818 (56,1) | 0,647 |
| Εμβολιασμός με ≥1 δόση PCV7 | 99 (12,9) | 161 (32,6) | 397 (70,1) | 783 (95,5) | <0,001 |
| Επαρκώς εμβολιασμένα για την ηλικία παιδιά | 92 (12) | 150 (30,4) | 351 (62) | 668 (81,5) | <0,001 |
| Φορείς <i>Streptococcus pneumoniae</i> ανά ηλικιακή ομάδα, μήνες | | | | | |
| 13-23 | 12/21 (57,1) | 11/22 (50) | 18/26 (69,2) | 13/18 (72,2) | 0,176 |
| 24-35 | 74/121 (61,2) | 34/69 (49,3) | 50/99 (50,5) | 43/100 (43) | 0,01 |
| 36-47 | 130/231 (56,3) | 78/185 (42,2) | 84/183 (45,9) | 118/279 (42,3) | 0,006 |
| 48-59 | 101/240 (42,1) | 70/188 (37,2) | 109/208 (52,4) | 132/349 (37,8) | 0,721 |
| ≥60 | 53/156 (34) | 13/30 (43,3) | 25/50 (50) | 28/74 (37,8) | 0,273 |
| Σύνολο | 370 (48,1) | 206 (41,7) | 286 (50,5) | 334 (40,7) | 0,036 |
| ^a Ο αριθμός εντός παρενθέσεως είναι επί τοις εκατό, εκτός αν επισημαίνεται διαφορετικά ^b Ο παρονομαστής δείχνει τον αριθμό των παιδιών με διαθέσιμες πληροφορίες πρόσφατης χρήσης αντιβιοτικών | | | | | |

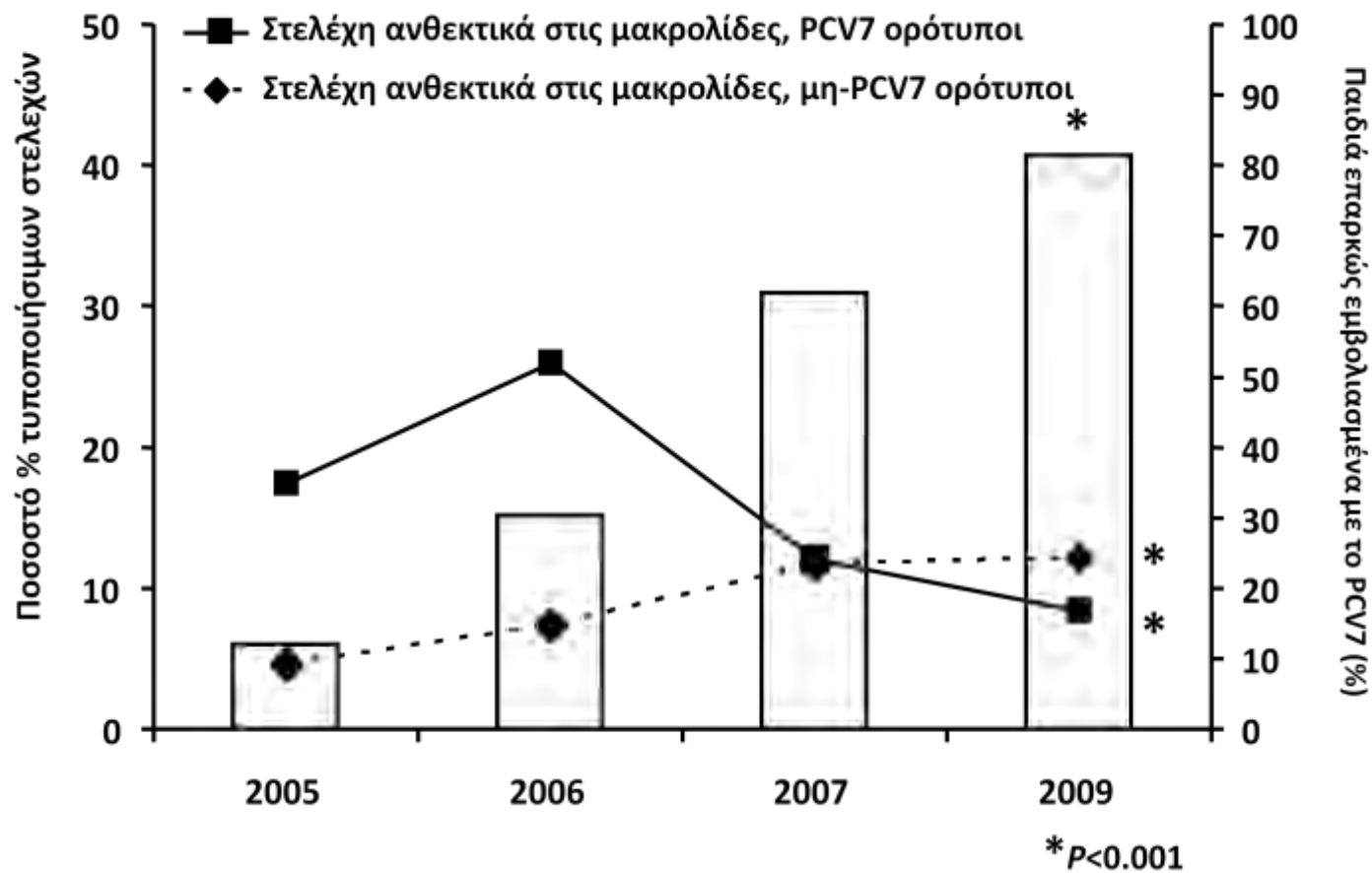
Φορεία ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών

Από το 2005 έως το 2009, 265 (ποσοστό 24%) από τα 1105 τυποποιήσιμα στελέχη *Streptococcus pneumoniae* παρουσίαζαν αντοχή στις μακρολίδες. Συγκρίνοντας τις 4 περιόδους παρακολούθησης, το ποσοστό των στελεχών με ανθεκτικότητα στις μακρολίδες δε μεταβλήθηκε σημαντικά. Συγκεκριμένα, οι συχνότητές τους ήταν 22% (77 από 350) το 2005, 33,3% (64 από 192) το 2006, 23,7% (63 από 266) το 2007, και 20,5% (61 από 297) το 2009 ($P = 0,398$).

Στην πορεία των 4 χρονικών περιόδων δειγματοληψίας, παρατηρήθηκε :

- Σημαντική μείωση σε ανθεκτικά στελέχη στις μακρολίδες, στα στελέχη που ανήκαν σε PCV7-οροτύπους (από 17,4% σε 26%, 12% και 8,4%, $P < 0.001$)
- Σημαντική αύξηση του ποσοστού των ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών, που ανήκαν σε μη PCV7 οροτύπους (από 4.6% σε 7.3%, 11.7% και 12.1%, $P < 0.001$)
- Μεταξύ των ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών πνευμονιοκόκκου, το ποσοστό αυτών που ανήκαν σε μη PCV7 οροτύπους ήταν 20,8% (16 από 77) το 2005, το 21,9% (14 από 64) το 2006, 49,2% (31 από 63) το 2007, και 59% (36 από 61) το 2009 ($P < 0,001$) [Σχήμα 1].

Κατά τη διάρκεια των πρώτων 2 ετήσιων επιτηρήσεων, οι PCV7 ορότυποι 19F, 23F, 14, και 6B αντιπροσώπευαν 60 (77,9%) από τα 77 ανθεκτικά στις μακρολίδες στελέχη το 2005 και 50 (78,1%) από τα 64 το 2006. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια της επιτήρησης το 2009, οι μη-PCV7-ορότυποι 6A, 19A, 15A, 15B και / C που αντιπροσώπευαν 33 (54,1%) από τα 61 ανθεκτικά στις μακρολίδες στελέχη πνευμονιοκόκκου.



Σχήμα 1. Ποσοστά των PCV7 και μη PCV7 οροτύπων με ανθεκτικότητα στις μακρολίδες τυποποιησιμων στελεχών πνευμονιοκόκκου και ποσοστά νηπίων επαρκώς εμβολιασμένων με το επταδύναμο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο κατά τις 4 χρονικές περιόδους μελέτης της φορέας

Καθοριστικοί παράγοντες αντίστασης στις μακρολίδες.

Φαινότυποι και πολυανθεκτικότητα.

Από τα 265 ανθεκτικά στις μακρολίδες στελέχη πνευμονιοκόκκου, 263 μελετήθηκαν για την παρουσία των καθοριστικών παραγόντων αντοχής στις μακρολίδες [Πίνακας 2].

Εβδομήντα πέντε (28,5%) φέραν το γονίδιο *erm*(B), 64 (24,3%), φέραν ταυτόχρονα τα *erm*(B) + *mef*(E) γονίδια, 110 (41,8%) μόνο το γονίδιο *mef*(E), και 14 (5,3%) μόνο το γονίδιο *mef*(A) [Πίνακας 2].

Όλα τα στελέχη πνευμονιοκόκκου, που ήταν *mef*(A) ή *mef*(E) θετικά, εμφάνιζαν τον ονομαζόμενο M-φαινότυπο αντοχής στις μακρολίδες.

Όλα τα *erm*(B) θετικά και τα *erm*(B) + *mef*(E) θετικά στελέχη εμφάνιζαν τον cMLS_B φαινότυπο αντοχής.

Οι MICs στην ερυθρομυκίνη:

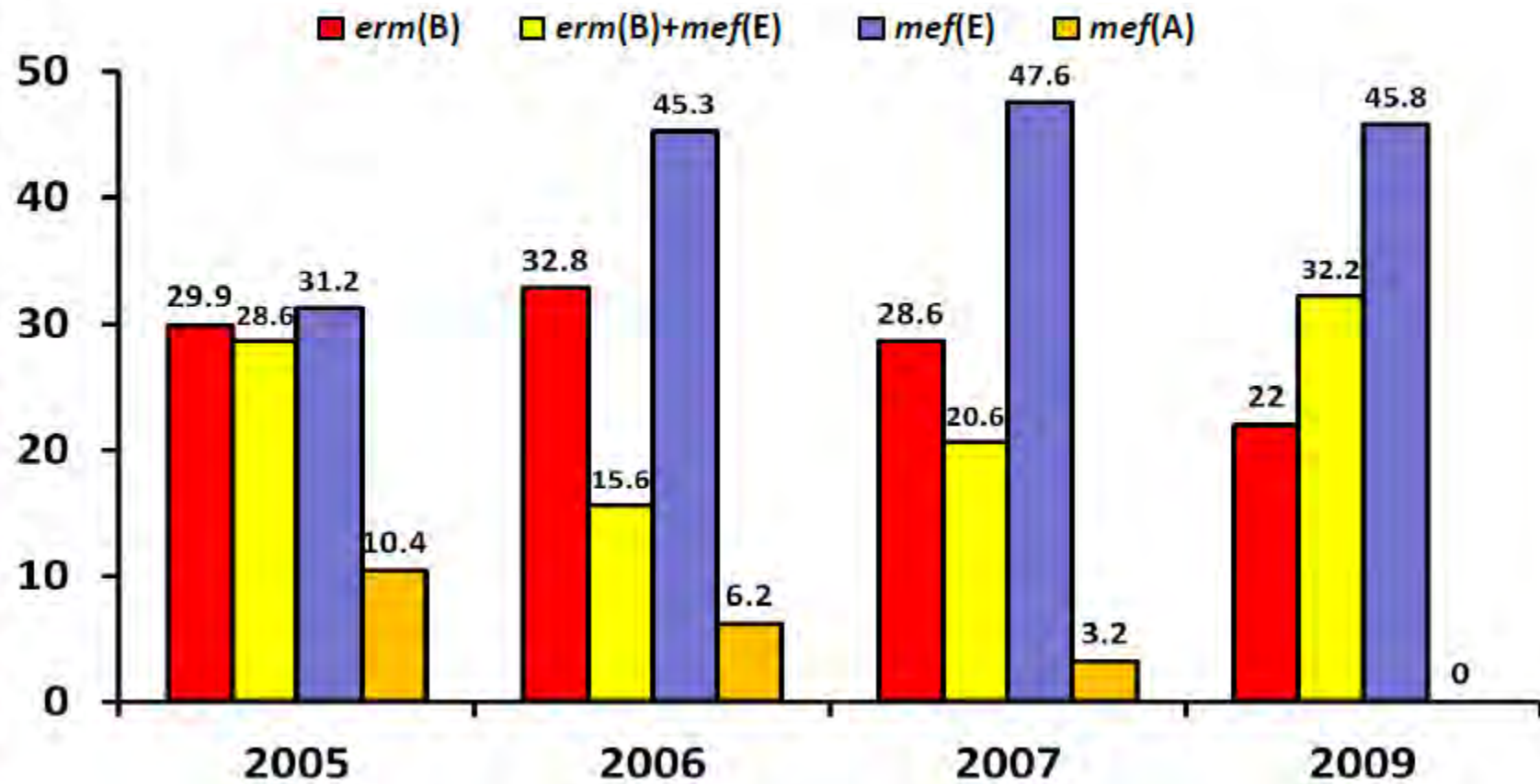
- των *mef*(A) θετικών στελεχών κυμαίνονται από 8 έως 64 µg / ml (MIC50 = 32 µg / ml, MIC90 = 64 µg / ml),
- των *mef*(E) θετικών στελεχών από 1 έως 64 µg / ml (MIC50 = 4 µg / ml, MIC90 = 8 µg / ml),
- των *erm*(B) θετικών στελεχών από 4 έως 256 µg / ml (MIC50 = 256 µg / ml, MIC90 = 256 µg / ml),
- των ταυτόχρονα *erm*(B) + *mef*(E) θετικών στελεχών ήταν 256 µg / ml (MIC90 = 256 µg / ml).

Μια σημαντική μείωση των *mef*(A) στελεχών σημειώθηκε σε όλη την περίοδο της μελέτης [Σχήμα 2]. Συγκεκριμένα, *mef*(A)-θετικά στελέχη πνευμονιοκόκκου των PCV7-οροτύπων αντιπροσώπευαν το 10,4% των στελεχών ανθεκτικών στις μακρολίδες το 2005, 1,6% το 2006 και 0% το 2007 και το 2009 ($P < 0,001$), ενώ *mef*(A)-θετικά στελέχη πνευμονιοκόκκου των μη PCV7 οροτύπων αντιπροσώπευαν το 0% των στελεχών ανθεκτικών στις μακρολίδες το 2005, 4,7% το 2006, 3,2% το 2007 και 0% το 2009 ($P = 0,993$) [Σχήμα 3].

Πίνακας 2 Καθοριστικός παράγοντας αντοχής στις μακρολίδες ανάλογα με τον ορότυπο

| Ορότυπος | Αριθμός στελεχών | Υπεύθυνο γονίδιο αντοχής στις μακρολίδες | | | |
|----------|------------------|--|---------------------------------|----------------|----------------|
| | | <i>erm</i> (B) | <i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E) | <i>mef</i> (E) | <i>mef</i> (A) |
| 6A | 69 | 0 | 0 | 64 (92,8) | 5 (7,2) |
| 6B | 12 | 11 (91,7) ^a | 0 | 1 (8,3) | 0 |
| 9V | 1 | 0 | 0 | 1 (100) | 0 |
| 10A | 5 | 5 (100) | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 17 | 8 (47,1) | 0 | 0 | 9 (52,9) |
| 15A | 3 | 3 (100) | 0 | 0 | 0 |
| 15B | 3 | 3 (100) | 0 | 0 | 0 |
| 15C | 1 | 1 (100) | 0 | 0 | 0 |
| 19A | 8 | 7 (87,5) | 0 | 1 (12,5) | 0 |
| 19F | 108 | 3 (2,8) | 64 (59,3) | 41 (38) | 0 |
| 23F | 30 | 30 (100) | 0 | 0 | 0 |
| 24F | 1 | 1 (100) | 0 | 0 | 0 |
| 35A | 2 | 0 | 0 | 2 (100) | 0 |
| 35F | 3 | 3 (100) | 0 | 0 | 0 |

Ποσοστό % ανθεκτικών στελεχών στις μακρολίδες



Σχήμα 2. Στελέχη πνευμονιοκόκκου ανθεκτικά στις μακρολίδες που φέρουν τα γονίδια αντοχής στις τέσσερις διαφορετικές χρονικές περιόδους επιτήρησης

Αρχικά, το γονίδιο *mef(E)* ήταν κοινό μεταξύ των στελεχών των PCV7-οροτύπων, αλλά από το 2007 η συχνότητα αυτού εμφανίστηκε να είναι υψηλότερη μεταξύ πνευμονιοκόκκων μη PCV7 οροτύπων (Σχήμα 3). Συγκεκριμένα, *mef(E)* θετικά στελέχη που ανήκουν στους οροτύπους PCV7 αντιπροσώπευαν το 19,5% των στελεχών ανθεκτικών στις μακρολίδες το 2005, 28,1% το 2006, 6,3% το 2007 και 10,2% το 2009 ($P = 0,018$), ενώ *mef(E)* θετικά στελέχη πνευμονιοκόκκου που ανήκουν σε μη PCV7 οροτύπους αντιπροσώπευαν το 11,7% των στελεχών ανθεκτικών στις μακρολίδες το 2005, 17,2% το 2006, 41,3% το 2007 και 35,6% το 2009 ($P < 0,001$).

Το γονίδιο *erm(B)* ήταν συχνό αρχικά, από το 2005 έως το 2007, μεταξύ των στελεχών που ανήκουν στους PCV7-οροτύπους και το 2009 μεταξύ στελεχών των μη PCV7-οροτύπων [Σχήμα 3]. Συγκεκριμένα, *erm(B)*-θετικά στελέχη που ανήκουν στους PCV7-οροτύπους αντιπροσώπευαν το 20,8% των ανθεκτικών στελεχών στις μακρολίδες που απομονώθηκαν το 2005, 32,8% το 2006, 23,8% το 2007 και 0% το 2009 ($P = 0,003$), ενώ *erm(B)*-θετικά στελέχη μη PCV7 οροτύπων αντιπροσώπευαν το 9,1% των ανθεκτικών στελεχών στις μακρολίδες το έτος 2005, 0% το 2006, 4,8% το 2007 και 22% το 2009 ($P = 0,013$).

Τα *erm(B) + mef(E)* θετικά στελέχη ανήκαν στον ορότυπο 19F [Πίνακας 2] και αντιπροσώπευαν το 28,6% των ανθεκτικών στελεχών στις μακρολίδες το 2005, το 15,6% το 2006, το 20,6% το 2007 και το 32,2% το 2009 ($P = 0,638$) [Σχήμα 4]. Μεταξύ των ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών πνευμονιοκόκκου, που απομονώθηκαν το 2005 και το 2006, ένα ποσοστό 53,9% έφερε το γονίδιο *erm(B)* μόνο του ή σε συνδυασμό με το γονίδιο *mef(E)*.

Το 2009, το 54,2% των ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών πνευμονιοκόκκου έφερε το γονίδιο *erm(B)* μόνο του ή σε συνδυασμό με το γονίδιο *mef(E)* [Σχήμα 2].

Τα ποσοστά πολυανθεκτικών στα αντιβιοτικά μεταξύ των απομονωθέντων 263 στελεχών πνευμονιοκόκκου με μοριακές τεχνικές αξιολόγησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Σύμφωνα τόσο με το CLSI αλλά και το EUCAST, μη ευαίσθησια σε έναν ή περισσότερους άλλους αντιμικροβιακούς

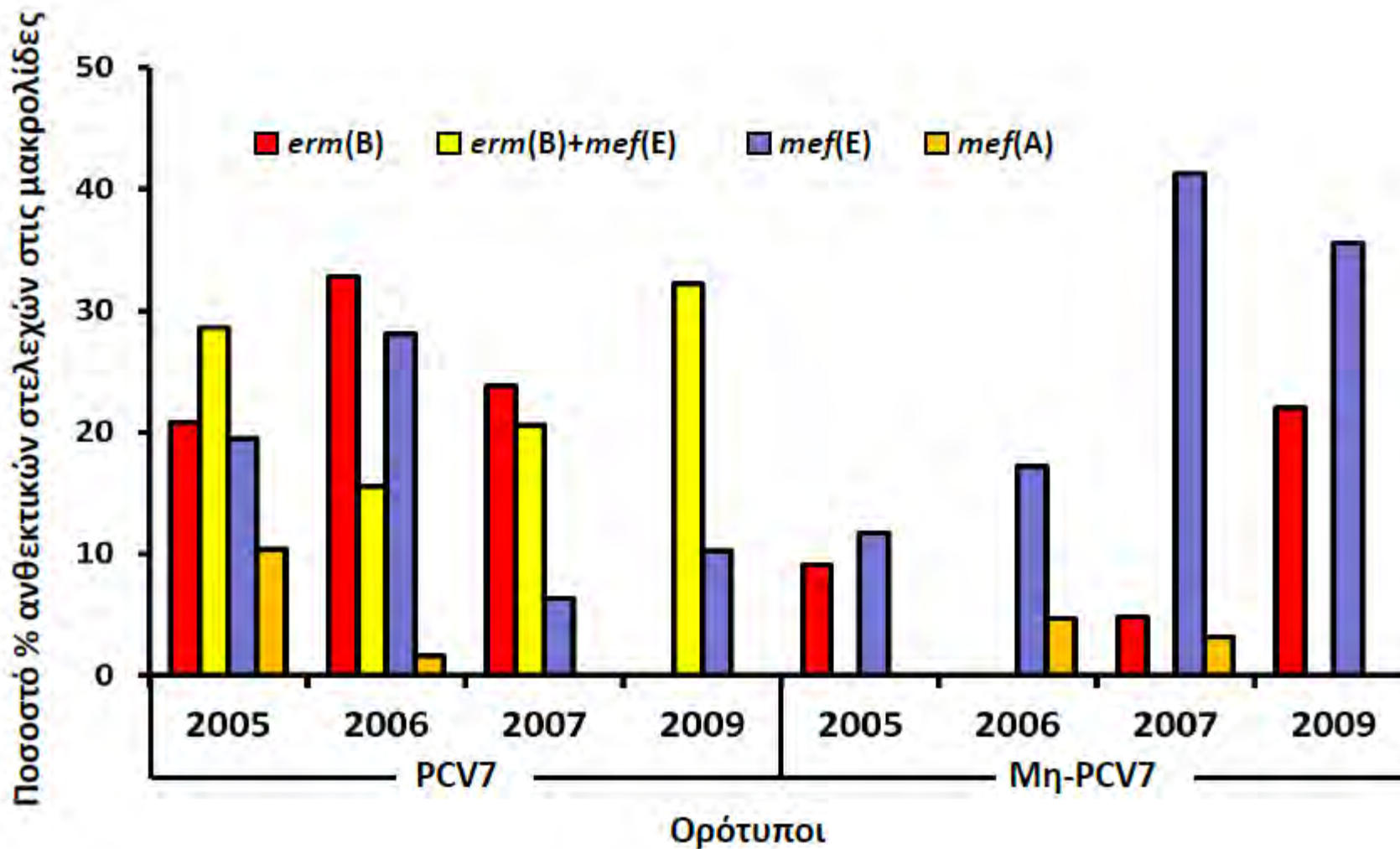
παράγοντες βρέθηκε σε 248 (94,3%) από τα 263 ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη, που ανήκαν σε 16 διαφορετικά μοτίβα αντίστασης.

Από αυτά τα 248 στελέχη, το 92,3% ήταν μη ευαίσθητα στην πενικιλίνη, το 70,2% (CLSI όρια ευαισθησίας) και το 68,5% (breakpoints του EUCAST) στην TMP-SMZ, το 63,7% στην τετρακυκλίνη, το 56% στην κλινδαμυκίνη και το 16,9% σε χλωραμφαινικόλη.

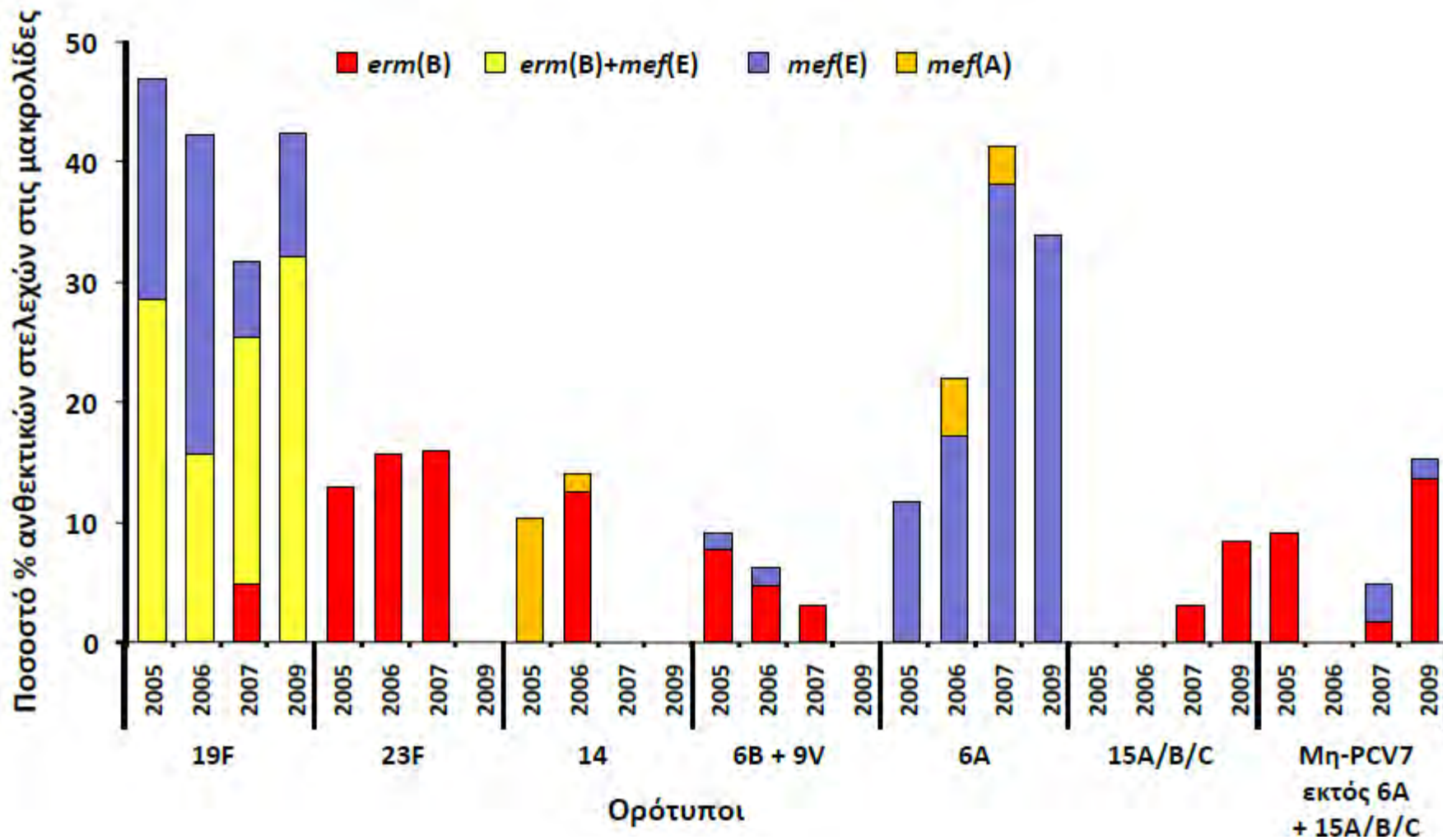
Πολλαπλή αντοχή στα αντιμικροβιακά ήταν σημαντικά πιο συχνή μεταξύ των στελεχών που έφεραν το *erm(B)* γονίδιο, είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με το *mef(E)*, σε αντιδιαστολή με τα στελέχη που φέρουν στο γονιδίωμά τους το *mef(E)* ή *mef(A)* μόνο ($P < 0,001$) [Πίνακας 3].

Τα στελέχη πνευμονιοκόκκου που έφεραν το γονίδιο *erm(B)* εξέφραζαν συνολικά 11 διαφορετικά μοτίβα αντίστασης. Ανθεκτικά στελέχη στις μακρολίδες που ανήκαν στον ορότυπο 14 και που έφεραν το γονίδιο *erm(B)* και εμφάνιζαν μη ευαισθησία στην πενικιλίνη (MICs 1-2 $\mu\text{g} / \text{ml}$, MIC90 = 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$) βρέθηκαν στην περίοδο επιτήρησης του 2006 σε 3 βρεφονηπιακούς σταθμούς. Τέλος, στελέχη που έφεραν είτε το *mef(E)* είτε το *mef(A)* γονίδιο εξέφραζαν πέντε διαφορετικά μοντέλα αντίστασης. Δεκατέσσερα ανθεκτικά στις μακρολίδες στελέχη είχαν MIC στην πενικιλίνη 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$; 12 (18,8%) από τα 64 στελέχη που έφεραν τα γονίδια *erm(B)* + *mef(E)* και 2 (1,8%) από τα 110 στελέχη που έφεραν το γονίδιο *mef(E)* [Πίνακας 3].

Από τα 265 ανθεκτικά στις μακρολίδες στελέχη πνευμονιοκόκκου, τα 188 ελέγχθηκαν για ευαισθησία στη λεβοφλοξασίνη και όλα βρέθηκαν να είναι ευαίσθητα (MICs 0.25-1 $\mu\text{g} / \text{ml}$, MIC50 = 0,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$, MIC90 = 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Μεταξύ των υπολοίπων στελεχών, 77 ελέγχθηκαν για ευαισθησία στη σιπροφλοξασίνη και δεν εντοπίστηκε αντοχή σε κανένα από αυτά. Αυτά τα 77 στελέχη πνευμονιοκόκκου είχαν για τη σιπροφλοξασίνη MICs 0,25 έως 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (MIC50 = 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$, MIC90 = 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$).



Σχήμα 3. Τα γονίδια αντοχής στις μακρολίδες στελεχών που ανήκουν ή όχι στο επταδύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο, στις αντίστοιχες περιόδους επιτήρησης



Σχήμα 4. Τα γονίδια ανθεκτικότητας στις μακρολίδες ανά ορότυπο κατά τη διάρκεια περιόδων φορείας

Πίνακας 3 Πολλαπλή αντοχή μεταξύ στελεχών πνευμονιοκόκκου ανθεκτικών σε μακρολίδες 2005-2009

| Μη ευαισθησία σε αντιβιοτικά | <i>erm</i> (B) | | <i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E) | | <i>mef</i> (E) | | <i>mef</i> (A) | |
|---|--------------------------|------------------------|---------------------------------|-----------|------------------|------------|----------------|--------|
| | (n=75) | | (n=64) | | (n=110) | | (n=14) | |
| | CLSI | EUCAST | CLSI | EUCAST | CLSI | EUCAST | CLSI | EUCAST |
| Μη ευαισθησία στην πενικιλίνη | | | | | | | | |
| MIC _{50/90} (εύρος) | 1/2 (0.125-2) | | 2/4 (0.25-4) | | 0,25/2 (0.125-4) | | | |
| Ενδιάμεση αντοχή | 43 (57,3) ^{a,b} | 58 (77,3) ^c | 21 (32,8) | 52 (81,2) | 85 (77,3) | 105 (95,5) | 0 | |
| Ανθεκτικότητα | 15 (20) | 0 | 43 (67,2) | 12 (18,8) | 22 (20) | 2 (1,8) | 0 | |
| Κλινδαμυκίνη | 75 (100) | 75 (100) | 64 (100) | 64 (100) | 0 | 0 | 0 | |
| Τετρακυκλίνη | 55 (73,3) | 55 (73,3) | 63 (98,4) | 63 (98,4) | 40 (36,4) | 40 (36,4) | 0 | |
| Χλωραμφενικόλη | 41 (54,7) | 41 (54,7) | 1 (1,6) | 1 (1,6) | 0 | 0 | 0 | |
| Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη | 62 (82,7) | 61 (81,3) | 64 (100) | 64 (100) | 48 (43,6) | 45 (40,9) | 0 | |
| Πολυανθεκτικά στελέχη | 74 (98,7) | 73 (97,3) | 64 (100) | 64 (100) | 48 (43,6) | 46 (41,8) | 0 | |
| ^a Ο αριθμός εντός παρενθέσεως είναι επί τοις εκατό, εκτός αν επισημαίνεται διαφορετικά ^b Όρια (breakpoints) από του στόματος πενικιλίνης V ^c Όρια (breakpoints) βενζυλπενικιλίνης (λοιμώξεις εκτός μηνιγγίτιδας) | | | | | | | | |

4. Συζήτηση

Στην Ελλάδα, η αύξηση του ποσοστού της αντοχής στις μακρολίδες μεταξύ των στελεχών του *Streptococcus pneumoniae* παρατηρήθηκε μετά την εισαγωγή των νεότερων μακρολίδων στη δεκαετία του 1990 και την εκτεταμένη χρήση τους στη συνέχεια. Έχει ήδη δημοσιευθεί, μεταξύ των ετών 1995 και 1999, η φαινοτυπική και μοριακή ανάλυση των ανθεκτικών στις μακρολίδες πνευμονιοκόκκων φορέας που απομονώθηκαν από μικρά παιδιά σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας [230,235,177].

Το συνολικό ποσοστό των ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών *S. pneumoniae* από ρινοφαρυγγικά δείγματα ήταν 18%, ενώ αυτά τα στελέχη ανήκαν κυρίως στους ορότυπους 23F, 6B, 19F, και 14 (κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας).

Στη συνέχεια, μελέτες σε κλινικά όσο και σε στελέχη φορέας από την Ελλάδα ανέφεραν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά αντοχής στις μακρολίδες (έως περίπου 50%) σε σχέση με αυτό που βρέθηκε στις αρχικές μελέτες [226,227,236].

Το υψηλότερο ποσοστό αντοχής στις μακρολίδες, έχει απομονωθεί από δείγματα παιδιών που ανάρρωσαν από μη διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις, ιδίως οξείας μέσης ωτίτιδας [226].

Στην τετραετή περίοδο επιτήρησης του πληθυσμού της παρούσας μελέτης και παράλληλα με την αύξηση του αριθμού των παιδιών που ανοσοποιήθηκαν με το εμβόλιο PCV7, η συχνότητα των στελεχών πνευμονιοκόκκου με αντοχή στις μακρολίδες δεν μεταβλήθηκε σημαντικά.

Συνολικά, το 24% του τυποποιησιμων στελεχών *S. pneumoniae* ήταν ανθεκτικά στις μακρολίδες. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με την αντίστοιχη μελέτη για τη φορεία μεταξύ των παιδιών που παρακολουθούσαν βρεφονηπιακούς σταθμούς στη Λισαβόνα [237].

Ωστόσο, το 2009, παρατηρήθηκε μια σημαντική αλλαγή στην κατανομή των ορότυπων στα ανθεκτικά στελέχη στις μακρολίδες. Μη PCV7-ορότυποι

αντικατέστησαν εκείνους που ανήκουν στο PCV7, σε στελέχη που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στις μακρολίδες. Αυτή η αλλαγή είναι σύμφωνη με μια πρόσφατη γαλλική μελέτη [205].

Ο εμβολιασμός με τους 7 ορότυπους του *S. pneumoniae* οδήγησε στην σχεδόν εξαφάνιση των οροτύπων του εμβολίου τόσο στην ασυμπτωματική φορεία όσο και στις λοιμώξεις από πνευμονιόκοκκο [205,209,237].

Όσον αφορά τη φορεία, ορότυποι του εμβολίου έχουν αντικατασταθεί από μη PCV7 ορότυπους.

Η κλωνική επέκταση και/ή ο μετασχηματισμός του οροτύπου συμβάλλουν ως μηχανισμοί σε αυτή την εξέλιξη [238].

Συνολικά, περισσότερο από το ήμισυ (52,9%) των ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών έφεραν το γονίδιο *erm(B)* είτε μόνο του ή σε συνδυασμό με το *mef(E)*.

Μια σημαντική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των PCV7-οροτύπων και την παρουσία του *erm(B)* γονιδίου, είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με το *mef(E)*, καθώς και μεταξύ των μη PCV7-οροτύπων και ένα *mef* γονίδιο ως το μοναδικό καθοριστικό υπεύθυνα παράγοντα αντοχής.

Μεταξύ των στελεχών πνευμονιοκόκκου που φέρουν ένα γονίδιο *mef* ως το μοναδικό παράγοντα αντοχής στις μακρολίδες, ο λόγος του *mef(E)*-θετικών προς τα *mef(A)*-θετικά στελέχη ήταν 7,9:1. Αυτή η αναλογία έρχεται σε αντιδιαστολή με τις προηγούμενες επιδημιολογικές παρατηρήσεις της φορείας κατά τη διάρκεια των ετών 1995-1999, η οποία ήταν 1:2,3 [177], και σε μελέτες από τη Γερμανία κατά την περίοδο 2005-2006 που ήταν 1:5 [221].

Γενικά, ο μηχανισμός αντίστασης στις μακρολίδες με την αντλία εξώθησης του αντιβιοτικού, που κωδικοποιούν τα γονίδια *mef*, υπήρξε η πιο κοινός μηχανισμός αντοχής σε στελέχη του *S. pneumoniae* στη Βόρεια Αμερική, ενώ στις περισσότερες από τις ευρωπαϊκές χώρες και την Άπω Ανατολή, η κύριος μηχανισμός είναι η μεθυλίωση του στόχου δράσης των μακρολιδών στην υπομονάδα του rRNA, που κωδικοποιεί το γονίδιο *erm(B)* [207].

Παρόλα αυτά, αυτό το μοτίβο των καθοριστικών παραγόντων της αντοχής στις μακρολίδες, δεν είναι στατικό και μπορεί να αλλάζει λόγω κλωνικής εξάπλωσης ορισμένων οροτύπων του *S. pneumoniae* και οριζόντια μεταφορά των γονιδίων ανθεκτικότητας *mef* μεταξύ των στρεπτοκόκκων [221,239]. Στην πραγματικότητα, σε πρόσφατες μελέτες, ο εκφραζόμενος με το *mef(A)* γονίδιο ήταν ο κύριος μηχανισμός αντοχής στη Νορβηγία (2001-2005) [240] και τη Γερμανία (2005-2006) [221], ενώ αυξημένη συχνότητα του γονιδίου *erm(B)*, καθώς και της συνύπαρξης των δύο μηχανισμών, βρέθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες (2005-2008) [211,241].

Στην προ-PCV7 περίοδο, στελέχη πνευμονιοκόκκου που ανήκαν στον ορότυπο 14 συνέβαλαν σημαντικά στην αντοχή στις μακρολίδες. Στα παιδιά, ο ορότυπος 14 είχε υψηλότερη ποσοστά σε πρόκληση διεισδυτικών λοιμώξεων παρά σε μη διεισδυτικές λοιμώξεις ή φορεία [226]. Έχει γίνει αναφορά στο παρελθόν στην κυκλοφορία των ανθεκτικών στις μακρολίδες και ευαίσθητων στις πενικιλίνες *mef(A)*-θετικών στελεχών του οροτύπου 14, με ένα γονότυπο πανομοιότυπο με το διεθνές κλώνο England-914 που εντοπίστηκε σε μελέτες φορείας σε νέους στην Ελλάδα [177]. Παρόμοιες απομονώσεις συνέχισαν να κυκλοφορούν στην περιοχή μας κατά τη διάρκεια των πρώτων 2 ετών της παρούσας μελέτης. Επιπλέον το 2006 βρήκαμε στελέχη πνευμονιοκόκκου ανθεκτικά στις μακρολίδες του ορότυπου 14 που φέρουν το γονίδιο *erm(B)* και εμφανίζουν μη ευαισθησία στην πενικιλίνη. Μετά την ανοσοποίηση με το PCV7, σημειώθηκε ταχεία μείωση στην φορεία του ορότυπου 14 και δεν αποτελεί πλέον ένα σημαντικό ορότυπο ανθεκτικότητας στις μακρολίδες τόσο στην Ελλάδα, όσο και σε άλλες χώρες [242,243].

Σε αυτή η μελέτη αναφέρεται μια υψηλή συχνότητα παρουσίας του οροτύπου 19F σε στελέχη πνευμονιοκόκκου φέροντα τα γονίδια *erm(B)* και *mef(E)* από φορείς σε διάφορους παιδικούς σταθμούς στην Κεντρική Ελλάδα σε όλες τις περιόδους δειγματοληψίας.

Από το 2001, έχουν αναφερθεί από πολλά μέρη του κόσμου στελέχη που φέρουν το διπλό μηχανισμό αντοχής στις μακρολίδες [211,221,241,244, 184, 186]. Έχουν κυρίως απομονωθεί από φορείς ή ασθενείς με μη διεισδυτική

πνευμονιοκοκκική νόσο, ιδιαίτερα οξεία μέση ωτίτιδα [241,186]. Παγκοσμίως, τα περισσότερα στελέχη με μηχανισμό διπλής αντοχής ανήκουν στους ορότυπους 19F ή 19A [241,244]. Αν και ο ορότυπος 19F περιέχεται στο εμβόλιο PCV7, προσφέρει χαμηλά επίπεδα προστασίας κατά των λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού, όπως η οξεία μέση ωτίτιδα [245] και έχει αποδειχθεί ότι είναι το λιγότερο ανοσογόνο από τους ορότυπους του εμβολίου [246]. Επιπλέον, λίγα στοιχεία δείχνουν ότι ο 19F προσφέρει διασταυρούμενη προστασία έναντι του ορότυπου 19A. Στην Ελλάδα, η πίεση της φυσικής επιλογής της ευρείας χρήσης των αντιβιοτικών μπορεί να συνέβαλε επίσης στη διατήρηση των πολυανθεκτικών αυτών στελεχών. Στη χώρα μας, στελέχη που να φέρουν διπλό μηχανισμό αντοχής απομονώθηκαν σε μικρά ποσοστά για πρώτη φορά μεταξύ των υγιών φορέων στην Αθήνα κατά τη διάρκεια του έτους 2003 [227].

Στην παρούσα μελέτη, η οποία διαφοροποίησε επιμέρους τα *mef(A)* γονίδια στην παρουσία των υποκλάσεων *mef(A)* και *mef(E)*, εντοπίστηκαν μόνο στελέχη που να φέρουν το *mef(E)* γονίδιο και δεν εντοπίστηκαν στελέχη που να φέρουν μόνο το *mef(A)*. Ωστόσο εντοπίστηκαν στελέχη που φέρουν το *erm(B)* γονίδιο. Η παρατήρηση αυτή, υπογραμμίζει το διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο των γονιδίων *mef(E)* και *mef(A)*. Τα ευρήματά μας είναι σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη από τις ΗΠΑ [241]. Στελέχη *S. pneumoniae*, που φέρουν την υποτάξη *mef(A)* του *mef(A)* γονιδίου, που μεταφέρεται γενετικά με το τρανσποζόνιο *Tn1207.1*, σε συνδυασμό με το γονίδιο *erm(B)* έχουν περιγραφεί σε ένα έγγραφο από την Αυστραλία [247].

5. Συμπεράσματα

Από το 2005 έως το 2009, η παρακολούθηση της φορέας στελεχών πνευμονιοκόκκου ανθεκτικών στις μακρολίδες ανέδειξε τα εξής:

- Ο ετήσιος ρυθμός στελεχών φορέας πνευμονιοκόκκου ανθεκτικών στις μακρολίδες δεν μεταβλήθηκε σημαντικά.
- Συνολικά, περισσότεροι από τους μισούς (52,9%) των ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών πνευμονιοκόκκου έφεραν το γονίδιο *erm(B)* είτε μόνο του ή σε συνδυασμό με το γονίδιο *mef(E)*.
- Πολυανθεκτικά στελέχη ήταν σημαντικά πιο συχνά μεταξύ των στελεχών *S. pneumoniae* που έφεραν το γονίδιο *erm(B)* από ό,τι μεταξύ εκείνων που έφεραν το γονίδιο *mef(E)*, ως το μοναδικό καθοριστικό παράγοντα αντοχής στις μακρολίδες.
- Μεταξύ των 4 περιόδων δειγματοληψίας, τα κυκλοφορούντα στελέχη, που διαθέτουν το γονίδιο *mef(A)* σταδιακά εξαφανίστηκαν.
- Σημαντικές μεταβολές παρατηρήθηκαν στην πιο πρόσφατη περίοδο επιτήρησης, καθώς η εμβολιαστική κάλυψη του πληθυσμού με το PCV7 αυξήθηκε. Το 2009 σημειώθηκε στροφή προς ανθεκτικά στις μακρολίδες στελεχών πνευμονιοκόκκου, που ανήκουν σε μη PCV7 ορότυπους. Οι ορότυποι 6A, 19A, 15A, 15B και 15C αντιπροσώπευαν το 54,1% των ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών πνευμονιοκόκκου.

Περαιτέρω τάσεις στη μεταφορά γενετικών τόπων υπεύθυνων για την αντοχή στις μακρολίδες, μεταξύ στελεχών πνευμονιοκόκκου που ανήκουν σε μη-PCV7-ορότυπους στη μετα-PCV7 περίοδο θα πρέπει να είναι το αντικείμενο προβληματισμού και παρατήρησης σε μελλοντικές μελέτες επιτήρησης.

Η ανάγκη της συνεχούς επιδημιολογικής επιτήρησης

Τόσο διεθνώς όσο και στη χώρα μας, η αύξηση της αντοχής του πνευμονιοκόκκου στην πενικιλίνη και τις μακρολίδες, καθώς και της πολυανθεκτικότητας, αυξάνει σταθερά. Η πολυανθεκτικότητα δεν περιορίζεται μόνο στα ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη αλλά και στα ευαίσθητα σε αυτήν, ενώ πολλά στελέχη ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη είναι επίσης πολυανθεκτικά.

Με αφορμή την σοβαρότητα των πολυανθεκτικών λοιμώξεων, το γεγονός ότι τα επίπεδα αντοχής διαφέρουν από χώρα σε χώρα, αλλά και το ότι η έγκαιρη αντιμετώπιση των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων συμβάλλει αποφασιστικά στην επιτυχή έκβαση της θεραπείας, είναι ανάγκη η κάθε χώρα να παρακολουθεί την αντοχή στην δική της επικράτεια και να διαθέτει σαφή και αντικειμενικά στοιχεία για το θέμα αυτό. Κατ' αυτόν τον τρόπο, παρέχεται η δυνατότητα σωστού συνδυασμού των εμπειρικών σχημάτων, σε κάθε χώρα ξεχωριστά. Ο καλύτερος τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι η οργάνωση και ο σχεδιασμός πολυκεντρικών μελετών σε εθνικό επίπεδο, ώστε πράγματι τα εμπειρικά σχήματα να είναι ασφαλή και αποτελεσματικά.

Η σχετική ανομοιογένεια των επιδημιολογικών δεδομένων που αφορούν στην αντοχή του πνευμονιοκόκκου στη χώρα μας, επιβεβαιώνει την ανάγκη οργάνωσης συστηματικής διερεύνησης σε εθνικό επίπεδο, ώστε να παρακολουθείται η εξέλιξη της αντοχής του πνευμονιοκόκκου στα επιμέρους αντιβιοτικά και να διαμορφώνονται σωστά τα εμπειρικά σχήματα.

6. Περίληψη / Summary

Ιστορικό

Επιδιώξαμε να παρακολουθήσουμε τις χρονικές τάσεις στη ρινοφαρυγγική φορεία των στελεχών πνευμονιοκόκκου, που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις μακρολίδες, σε μια περίοδο με αυξημένη κάλυψη με το επταδύναμο πνευμονιοκοκκικό συζευγμένο εμβόλιο (PCV7) στην Κεντρική Ελλάδα.

Μέθοδοι

Στελέχη *Streptococcus pneumoniae* απομονώθηκαν από 2649 ρινοφαρυγγικά δείγματα που ελήφθησαν από βρεφονηπιακούς σταθμούς στην Κεντρική Ελλάδα κατά το διάστημα 2005-2009. Ακολούθησε φαινοτυπική και γονοτυπική ανάλυση των στελεχών, συμπεριλαμβανομένης της ταυτοποίησης των γονιδίων αντοχής στις μακρολίδες *mef(A)*, τις υποκατηγορίες *mef(A)* και *mef(E)*, καθώς και *erm(B)*.

Background

We sought to characterize the temporal trends in nasopharyngeal carriage of macrolideresistant pneumococci during a period with increased heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) coverage in Central Greece.

Methods

Streptococcus pneumoniae isolates were recovered from 2649 nasopharyngeal samples obtained from day-care center attendees in Central Greece during 2005–2009.

A phenotypic and genotypic analysis of the isolates was performed, including the identification of macrolide resistance genes *mef(A)*, subclasses *mef(A)* and *mef(E)*, as well as *erm(B)*.

Αποτελέσματα

Από το 1105 τυποποιήσιμα στελέχη *S. pneumoniae*, 265 (24%) ήταν ανθεκτικά στις μακρολίδες 22% το 2005, 33,3% το 2006, 23,7% το 2007 και 20,5% το 2009 ($P = 0,398$). Μεταξύ αυτών των ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών πνευμονιοκόκκου, 28,5% κωδικοποιούσαν το γονίδιο *erm(B)*, 24,3% τα γονίδια *erm(B) + mef(E)*, το 41,8% το *mef(E)*, και το 5,3% το *mef(A)*. Μόνο το γονίδιο *mef* ως το μοναδικό προσδιοριστή αντίστασης περιείχε το 31% των ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών, που ανήκουν σε ορότυπους PCV7 και 75.8% των μη-PCV7 ορότυπους.

Κατά την διάρκεια των τεσσάρων ετών της μελέτης, τα στελέχη πνευμονιοκόκκου που έφεραν το γονίδιο *mef(A)* σταδιακά εξαφανίστηκαν, ενώ τα απομονωθέντα στελέχη με ορότυπο 19F που έφεραν τα γονίδια *erm(B)* και *mef(E)* συνέχισαν να φέρουν τα γονίδια αυτά, χωρίς σημαντικές ετήσιες διακυμάνσεις. Μεταξύ των στελεχών που ανήκουν σε οροτύπους που δεν περιλαμβάνονται στο PCV7, αντοχή στις μακρολίδες παρατηρήθηκε σε στελέχη των οροτύπων 6A, 19A, 10A, 15A, 15B / C, 35F, 35A, και 24F. Το 2009, δηλαδή 5 χρόνια μετά την εισαγωγή του PCV7 στη χώρα μας, το 59% των ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών

Results

Of the 1105 typeable *S. pneumoniae* isolates, 265 (24%) were macrolide-resistant; 22% in 2005, 33.3% in 2006, 23.7% in 2007, and 20.5% in 2009 ($P=0.398$). Among these macrolideresistant pneumococci, 28.5% possessed *erm(B)*, 24.3% *erm(B)+mef(E)*, 41.8% *mef(E)*, and 5.3% *mef(A)*. A *mef* gene as the sole resistance determinant was carried by 31% of macrolide-resistant isolates belonging to PCV7 serotypes and 75.8% of the non-PCV7 serotypes.

Across the 4 annual surveillances, pneumococci carrying *mef(A)* gradually disappeared, whereas serotype 19F isolates carrying both *erm(B)* and *mef(E)* persisted without significant yearly fluctuations. Among isolates belonging to non-PCV7 serotypes, macrolide-resistance was observed in those of serotypes 6A, 19A, 10A, 15A, 15B/C, 35F, 35A, and 24F. In 2009, ie 5 years after the introduction of PCV7 in our country, 59% of macrolide-resistant pneumococci belonged to non-PCV7 serotypes.

πνευμονιοκόκκου ανήκαν σε ορότυπους που δεν περιέχονταν στο εμβόλιο

Συμπεράσματα

Σε όλη τη διάρκεια της μελέτης, η ετήσια συχνότητα ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών δεν μεταβλήθηκε σημαντικά, αλλά το 2009 σημειώθηκε μια έντονη στροφή προς μη PCV7 ορότυπους. Συνολικά, περισσότερο από το ήμισυ των στελεχών που είναι ανθεκτικά στις μακρολίδες, κωδικοποιούν το γονίδιο *erm*(B) είτε μόνο του ή σε συνδυασμό με το γονίδιο *mef*(E). Το γονίδιο *erm*(B) κωδικοποιείται κατά κόρον μεταξύ των στελεχών που ανήκουν στους οροτύπους PCV7, αλλά όχι μεταξύ εκείνων των μη-PCV7 οροτύπων.

Conclusions

Across the study period, the annual frequency of macrolide-resistant isolates did not change significantly, but in 2009 a marked shift to non-PCV7 serotypes occurred. Overall, more than half of the macrolide-resistant isolates possessed *erm*(B) either alone or in combination with *mef*(E). *erm*(B) dominated among isolates belonging to PCV7 serotypes, but not among those of non-PCV7 serotypes.

7. Βιβλιογραφία- Αναφορές

1. Pasteur L. Note sur la maladie nouvelle provoquee par la salive d'un enfant mort de la rage. Bulletin de l'Academie de Medicine (Paris) series 21 1881;10:94-103.
2. Austrian R. *Pneumococcus*: the first one hundred years. Rev Infect Dis 1981;3:183-9.
3. Sternberg GM. A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. Annual Reports of the National Board of Health 1881a;3:87-10
4. Lister FS. An experimental study of prophylactic inoculation in the rabbit and in man. Publications of the South African Institute for Medical Research 1916;1:23 I-87.
5. Pasteur L. Chamberland MM, Roux. Sur une maladie nouvelle, provoquee par la salive d'un enfant mart de la rage. Compt Rend Acad d sci 1881;92:159-65
6. Sternberg GM. The pneumonia-coccus of Friedlander (Micrococcus Pasteuri. Sternberg). Am J Med Sci 1885;90: 106-23.
7. Klebs E. Beitrage zm Kenntniss der Schistomyceten. VII. Die Monadinen. Archiv Rir Experimentelle Pathologie und Pharmakologie (Leipzig) 1875;4:409-88.
8. Eberth CJ. Zur Kenntniss der mykotischen Processe. Deutsches Archiv ftr Klinische Medizin (Leipzig) 1880;28: I-42.
9. Friedlander C. Die Mikrokokken der Pneumonie. Fortschritte der Medizin (Munchen) 1883b;l:7 15-33.
10. Talamon C. Coccus de la pneumonie. Bulletin de la Societe Anatomique de Paris 1883;58:475-8 I
11. Fraenkel A. Die genuine Pneumonie. Verh Cong Inn Med 1884;3: 17-31.

12. Fraenkel A. Bakteriologische Mittheilungen. Zeitschrift für Klinische Medicin 1885;10:401-61.

13. Netter. De la meningite due au pneumocoque (avec ou sans pneumonie). Archives Gtnerales de Mtdecine [series 71 1887; 19:257-77.434-55.

14. Zaufal E. Mikroorganismen im Secrete der Otitis media acuta. Prager Medicinische Wochenschrift 1887; 12:225-7.

15. Fraenkel A. Weitere Beitrage zur Lehre von den Mikroccoccn der genuinen fibrinosen Pneumonie. Zeitschrift für Klinische Medicin 1886b; I 1:437-58.

16. Neufeld, F (1902). Ueber die Agglutination der Pneumokokken und uber die Theorien der Agglutination. Zeitschrift für Hygiene Infektionskrankheiten. pp. 54–72

17. Lister F.S. Specific serological reactions with pneumococci of different sources, Publ. S. Afr. Inst. Med Res I:1-14 (1913).

18. Sir Almroth E. Wright M.D., F.R.S. , W. Parry Morgan M.B. CANTAB. , L. Colebrook M.B. LOND. , R.W. Dodgson M.D. LOND.. Observations ON PROPHYLACTIC INOCULATION AGAINST PNEUMOCOCCUS INFECTIONS. AND ON THE RESULTS WHICH HAVE BEEN ACHIEVED BY IT. Lancet 1914;1:1-10, 87-95

19. Griffith F. The significance of pneumococcal types. J Hyg 1928;27:113-159

20. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J Exp Med 79: 137–158.

21. Smilie WG, Wornock GH, White HJ. A study of a type I pneumococcus epidemic at the State Hospital of Worcester. Mass. Am J Public Health 1938;28:293-302

22. MacLeod CM, Hodges RG, Heidelberger M, Bernhard WG. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *J Exp Med* 1945;82:445-465
23. Brito DA, Ramirez M, de Lencastre H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6):2378-2384
24. Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, et al. Genetic analysis of the capsular biosynthesis locus from all pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* 2006; 2(3):ε31.
25. Jourdain S, Dreze P, Vardeven J, et al. Sequential multiplex PCR assay for determining capsular serotypes of colonizing *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Infectious diseases* 2011; 11:100.
26. da Gloria Carvalho M, Pimenta FC, Jackson D, et al. Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. *J Clin Microbiol* 2010; 48(5):1611-1618.
27. Antonio M, Hakeem I, Sankareh K, et al. Evaluation of sequential multiplex PCR for direct detection of multiple serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions. *J Med Microbiol* 2009; 58(Pt 3):296-302.
28. Rosenow C, Ryan P, Weiser JN, Johnson A, Fontan P, Ortqvist A, Masure HR. 1997. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 25: 819–829.
29. Bean B, Tomasz A. 1977. Choline metabolism in pneumococci. *J Bacteriol* 130: 571–574.
30. Tong, H. H., Liu, X., Chen, Y., James, M. & Demaria, T. (2002). Effect of neuraminidase on receptor-mediated adherence of *Streptococcus pneumoniae* to chinchilla tracheal epithelium. *Acta Otolaryngol* 122, 413–419.
31. Berry, A. M. & Paton, J. C. (2000). Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin

and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun* 68, 133–140.

32. Long, J. P., Tong, H. H. & DeMaria, T. F. (2004). Immunization with native or recombinant *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase affords protection in the chinchilla otitis media model. *Infect Immun* 72, 4309–4313.

33. Shakhnovich, E. A., King, S. J. & Weiser, J. N. (2002). Neuraminidase expressed by *Streptococcus pneumoniae* desialylates the lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*: a paradigm for interbacterial competition among pathogens of the human respiratory tract. *Infect Immun* 70, 7161–7164.

34. King, S. J., Hippe, K. R., Gould, J. M., Bae, D., Peterson, S., Cline, R. T., Fasching, C., Janoff, E. N. & Weiser, J. N. (2004). Phase variable desialylation of host proteins that bind to *Streptococcus pneumoniae* in vivo and protect the airway. *Mol Microbiol* 54, 159–171.

35. King, S. J., Whatmore, A. M. & Dowson, C. G. (2005). NanA, a neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae*, shows high levels of sequence diversity, at least in part through recombination with *Streptococcus oralis*. *J Bacteriol* 187, 5376–5386.

36. Sebert, M. E., Palmer, L. M., Rosenberg, M. & Weiser, J. N. (2002). Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 70, 4059–4067.

37. Mascher, T., Zahner, D., Merai, M., Balmelle, N., de Saizieu, A. B. & Hakenbeck, R. (2003). The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J Bacteriol* 185, 60–70.

38. Ibrahim, Y. M., Kerr, A. R., McCluskey, J. & Mitchell, T. J. (2004). Role of HtrA in the virulence and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 72, 3584–3591.

39. Polissi, A., Pontiggia, A., Feger, G., Altieri, M., Mottl, H., Ferrari, L. & Simon, D. (1998). Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 66, 5620–5629.

40. Weiser, J. N., Bae, D., Fasching, C., Scamurra, R. W., Ratner, A. J. & Janoff, E. N. (2003). Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4215–4220.
41. Bethe, G., Nau, R., Wellmer, A., Hakenbeck, R., Reinert, R. R., Heinz, H. P. & Zysk, G. (2001). The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 205, 99–104.
42. Barocchi M, Ries J, Zogaj X, Albiger B, Kanth A, Dahlberg S, Moschioni M, Masignani V, Hultenby K, von Euler A, et al. 2006. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci* 103: 2857–2862.
43. Nelson AL, Ries J, Bagnoli F, Dahlberg S, Fälker S, Rounioja S, Tschöp J, Morfeldt E, Ferlenghi I, Hilleringmann M, et al. 2007. RrgA is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 66: 329–40.
44. Izoré T, Contreras-Martel C, El Mortaji L, Manzano C, Terrasse R, Vernet T, Di Guilmi AM, Dessen A. 2010. Structural basis of host cell recognition by the pilus adhesin of *Streptococcus pneumoniae*. *Structure* 18: 106–115.
45. Fälker S, Nelson AL, Morfeldt E, Jonas K, Hultenby K, Ries J, Melefors O, Normark S, Henriques-Normark B. 2008. Sortase mediate assembly and surface topology of adhesive pneumococcal pili. *Mol Microbiol* 70: 595–607.
46. Hammerschmidt S, Talay SR, Brandtzaeg P, Chhatwal GS. 1997. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol* 25: 1113–1124.
47. Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I, Tuomanen EI. 1995. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377: 435–438.
48. Radin JN, Orihuela CJ, Murti G, Guglielmo C, Murray PJ, Tuomanen EI. 2005. β -Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 73: 7827–7835.
49. Briles DE, Nahm M, Schroer K, Davie J, Baker P, Kearney J, Barletta R. . Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med* 1981; 153: 694–705.

50. Orihuela CJ, Mahdavi J, Thornton J, Mann B, Wooldridge KG, Abouseada N, Oldfield NJ, Self T, Ala'Aldeen DA, Tuomanen EI. 2009. Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. *J Clin Invest* 119: 1638–1646.
51. Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C. & Claverys, J. P. (1997). Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* 25, 727–739.
52. Brown, J. S., Gilliland, S. M. & Holden, D. W. (2001). A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol Microbiol* 40, 572–585.
53. Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Peterson S, Heidelberg J, DeBoy RT, Haft DH, Dodson RJ, et al. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293: 498–506.
54. Hiller NLAA, Powell E, Martin DP, Eutsey R, Earl J, Janto B, Boissy RJ, Hogg J, Barbadora K, Sampath R, et al. 2010. Generation of genic diversity among *Streptococcus pneumoniae* strains via horizontal gene transfer during a chronic polyclonal pediatric infection. *PLoS Pathog* 6: e1001108.
55. Croucher N, Harris S, Fraser C, Quail M, Burton J, van der Linden M, McGee L, von Gottberg A, Song J, Ko K, et al. 2011. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* 331: 430–434.
56. Lau GW, Haataja S, Lonetto M, Kensit SE, Marra A, Bryant AP, McDevitt D, Morrison DA, Holden DW. 2001. A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. *Mol Microbiol* 40: 555–571.
57. Hava DL, Camilli A. 2002. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* 45: 1389–1406.
58. van Opijnen T, Bodi KL, Camilli A. 2009. Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nat Methods* 6: 767–772.
59. Sorek R, Cossart P. 2010. Prokaryotic transcriptomics: A new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nat Rev Genet* 11: 9–16.
60. Orihuela CJ, Gao G, Francis KP, Yu J, Tuomanen EI. 2004. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J Infect Dis* 190: 1661–1669.

61. Paterson GK, Blue CE, Mitchell TJ. 2006. Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. J Med Microbiol 55: 355–363.
62. Dagerhamn J, Blomberg C, Browall S, Sjöström K, Morfeldt E, Henriques-Normark B. 2008. Determination of accessory gene patterns predicts the same relatedness among strains of *Streptococcus pneumoniae* as sequencing of housekeeping genes does and represents a novel approach in molecular epidemiology. J Clin Microbiol 46: 863–868.
63. Högberg L, Geli P, Ringberg H, Melander E, Lipsitch M, Ekdahl K. 2007. Age- and serogroup-related differences in observed durations of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant pneumococci. J Clin Microbiol 45: 948–952.
64. Weiser JN, Austrian R, Sreenivasan PK, Masure HR. 1994. Phase variation in pneumococcal opacity: Relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. Infect Immun 62: 2582–2589
65. Trappetti C, Ogunniyi A, Oggioni M, Paton J. 2011. Extracellular matrix formation enhances the ability of *Streptococcus pneumoniae* to cause invasive disease. PLoS ONE 6: e19844.
66. Zhang JR, Mostov KE, Lamm ME, Nanno M, Shimida S, Ohwaki M, Tuomanen E. 2000. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. Cell 102: 827–837.
67. Braathen R, Sandvik A, Berntzen G, Hammerschmidt S, Fleckenstein B, Sandlie I, Brandtzaeg P, Johansen F, Lauvrak V. 2006. Identification of a polymeric Ig receptor binding phage-displayed peptide that exploits epithelial transcytosis without dimeric IgA competition. J Biol Chem 281: 7075–7081.
68. Mann B, Orihuela C, Antikainen J, Gao G, Sublett J, Korhonen TET. 2006. Multifunctional role of choline binding protein G in pneumococcal pathogenesis. Infect Immun 74: 821–829.
69. Gosink KK, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure H. 2000. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 68: 5690–5695.
70. Weiser JN, Bae D, Fasching C, Scamurra RW, Ratner AJ, Janoff EN. 2003. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. Proc Natl Acad Sci 100: 4215–4220.
71. Sanchez CJ, Shivshankar P, Stol K, Trakhtenbroit S, Sullam PM, Sauer K, Hermans PW, Orihuela CJ. 2010. The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intra-species bacterial adhesin that promotes bacterial aggregation in vivo and in biofilms. PLoS Pathog 6: e1001044.

72. Tong HH, Blue LE, James MA, DeMaria TF. 2000. Evaluation of the virulence of a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect Immun* 68: 921–924.
73. Munoz-Elias E, Marcano J, Camilli A. 2008. Isolation of *Streptococcus pneumoniae* biofilm mutants and their characterization during nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 76: 5049–5061.
74. Bergmann S, Rohde M, Chhatwal GS, Hammerschmidt S. 2001. α -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 40: 1273–1287.
75. Kolberg J, Aase A, Bergmann S, Herstad T, Rødal G, Frank R, Rohde M, Hammerschmidt S. 2006. *Streptococcus pneumoniae* enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface. *Microbiology* 152: 1307–1317.
76. Sebert M, Palmer L, Rosenberg M, Weiser J. 2002. Microarray-based identification of htrA, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 70: 4059–4067.
77. McCool, Weiser JN. 2002. The immune response to pneumococcal proteins during experimental human carriage. *J Exp Med* 195: 359–365.
78. Lu Y, Gross J, Bogaert D, Finn A, Bagrade L, Zhang Q, Kolls J, Srivastava A, Lundgren A, Forte S, et al. 2008. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathog* 4: e1000159.
79. Cohen JM, Khandavilli S, Camberlein E, Hyams C, Baxendale HE, Brown JS. 2011. Protective contributions against invasive *Streptococcus pneumoniae* pneumonia of antibody and Th17-cell responses to nasopharyngeal colonisation. *PLoS ONE* 6: e25558.
80. Davis K, Nakamura S, Weiser JN. 2011. Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest* 121: 3666–3676.
81. Bergmann S, Hammerschmidt S. 2006. Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* 152: 295–303.
82. Nakamura S, Davis KM, Weiser JN. 2011. Synergistic stimulation of type 1 interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest* 121: 3657–3665.
83. Centers of Disease Control and Prevention. Pneumococcal Disease Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases The Pink Book: Course Textbook - 12th Edition Second Printing (May 2012)

84. Brueggemann A, Peto T. 2004. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *Infect Dis* 190: 1203–1211
85. Sandgren A, Sjöström K, Olsson Liljequist B, Christensson B, Samuelsson A, Kronvall G, Henriques Normark B. 2004. Effect of clonal and serotype-specific properties on the invasive capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 189: 785–796.
86. Sandgren A, Albiger B, Orihuela C, Tuomanen E, Normark S, Henriques-Normark B. 2005. Virulence in mice of pneumococcal clonal types with known invasive disease potential in man. *J Infect Dis* 192: 791–800.
87. Sjöström K, Spindler C, Ortvist A, Kalin M, Sandgren A, Kuhlmann-Berenzon S, Henriques-Normark B. 2006. Clonal and capsular types decide whether pneumococci will act as a primary or opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis* 42:451–459.
88. Lin TY, Shah NK, Brooks D, Garcia CS: Summary of invasive pneumococcal disease burden among children in the Asia-Pacific region. *Vaccine* 2010, 28:7589–7605.
89. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, Reingold A, Cieslak PR, Pilishvili T, Jackson D, et al. 2003. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med* 348: 1737–1746
90. Center KJ. Prevenar vaccination: review of the global data, 2006. *Vaccine* 2007; 25:3085-9.
91. Van der Linden M, Reinert R. Surveillance of IPD in children in Germany 2004-2008, before and after the introduction of the national immunization program for PCV7. Presented at 6th International Symposium on *Pneumococci* and Pneumococcal Diseases (ISPPD) Reykjavick, Iceland, 8-12 June 2008.
92. Aristegui J, Bernaola E, Pocheville I, Garcia C, Arranz L, Duran 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;26:303-10.

93. Vestrheim DF, Høiby EA, Bergsaker MR, Rønning K, Aaberge IS, Caugant DA. Indirect effect of conjugate pneumococcal vaccination in a 2+1 dose schedule. *Vaccine* 2010; 28: 2214–21.
94. Ingels H, Rasmussen J, Andersen PH, Harboe ZB, Glismann S, Konradsen H, Hoffmann S, Valentiner-Branth P, Lambertsen L; Danish Pneumococcal Surveillance Collaboration Group 2009-2010. Impact of pneumococcal vaccination in Denmark during the first 3 years after PCV introduction in the childhood immunization programme. *Vaccine* 2012; 30: 3944–50.
95. Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MP, George RC. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 760–8
96. 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 CG, Moore MR; 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
97. Lee GE, Lorch SA, Sheffler-Collins S, Kronman MP, Shah SS.. National hospitalization trends for pediatric pneumonia and associated complications. *Pediatrics* 2010; 126: 204–13
98. Durando P, Crovari P, Ansaldi F, Sticchi L, Sticchi C, Turello V, Marensi L, Giacchino R, Timitilli A, Carloni R, Azzari C, Icardi G; Collaborative Group for Pneumococcal Vaccination in Liguria.. Universal childhood immunisation against *Streptococcus pneumoniae*: the five-year experience of Liguria Region, Italy. *Vaccine* 2009; 27: 3459–62.
99. Stamboulidis K, Chatzaki D, Poulakou G, Ioannidou S, Lebessi E, Katsarolis I, Sypsa V, Tsakanikos M, Kafetzis D, Tsolia MN.. The impact of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on the epidemiology of acute otitis media complicated by otorrhea. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30: 551–5
100. Spijkerman J, van Gils EJ, Veenhoven RH, Hak E, Yzerman EP, van der Ende A, Wijmenga-Monsuur AJ, van den Dobbelsteen GP, Sanders EA. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* 3 years after start of vaccination program, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 584–91.
101. Munoz_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;46:174-82.

102. Έγγραφο Υπουργείου Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης, Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκου με Αρ. Πρωτ. 32156/3-6-2010 με θέμα: “Εκτακτη εισαγωγή του συζευγμένου πολυσακχαριδικού πνευμονιοκοκκικού εμβολίου PREVENAR 13 ενέσιμο εναιώρημα (BT x 1 προγεμισμένη σύριγγα) 0,5 ml + χωριστή βελόνα) από την εταιρεία Wyeth Hellas.

103. Syriopoulou V, Menegas D, Georgakopoulou T, Koutouzis E, Charissiadou A, Chrysaiki A, Pangalis A, Theodoridou M, Daikos GL. Pneumococcal disease in children: changing serotypes and antimicrobial resistance in a tertiary hospital in Greece (2002-2011). 8th International Symposium on *Pneumococci* and Pneumococcal Diseases (ISPPD), Iguacu Falls, Brazil, 12-15 March 2012. Poster No 195

104. Syriopoulou V, Syrogiannopoulos GA, Georgakopoulou T, Tsofia M, Menegas D, Koutouzis E, Galanakis E, Kavaliotis J, Tsilimigkaki A, Siamopoulou-Mavridou A, Maraki S, Michailidou E, Christaki M, Stavrou S, Charissiadou A, Roilides E, Daikos GI, Grivea IN, Kafetzis D. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* following introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in Greece. 30th Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), Thessaloniki, Greece, 8-12 May 2012.

105. Kaplan SL, Barson W, Lin P, Romero J, Bradley J, Tan T Hoffman J, Givner L, Hulten K, Mason E,. Early Trends for Invasive Pneumococcal Infections in Children Following the Introduction of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine. IDSA 49th Annual Meeting; Oct. 20-23, 2011; Boston. Presentation #LB-1

106. <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/Pneumococcal/EpidemiologicalDataPneumococcal/CurrentEpidemiologyPneumococcal/InPrevenar13NotInPrevenarPCV7/pneumo08Cummulativeweekly24IN13NOTIN7vacc/>

107. Andrews N Kaye P, Slack M, George R, Miller E. Effectiveness of the 13 valent pneumococcal conjugate vaccine against IPD in England and Wales 8th International Symposium on *Pneumococci* and Pneumococcal Diseases (ISPPD), Iguacu Falls, Brazil, 12-15 March 2012. Poster No 148.

108. Van der Linden M, von Kries R, Imöhl M. Effects of three years of immunization with higher valent pneumococcal conjugate vaccines on serotype distributions among reported IPD cases in German children and adults. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and

Chemotherapy (ICAAC), San Francisco, USA, 9-12 September 2012 Poster, G-863.

109. Georgakopoulou T, Menegas D, Tzanakaki G, Pipa E, Vernardaki A, Mavraganis P, Theodoridou M, Kremastinou J. Epidemiology of Bacterial Meningitis in Greece, in the Era of Conjugate Vaccines: A 7 years review 2005-2011. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Francisco, USA, 9-12 September 2012 Poster G3-1543.

110. Sjöström K, Blomberg C, Fernebro J, Dagerhamn J, Morfeldt E, Barocchi M, Andersson M, Browall S, Henriques F, Rappuoli R, et al. 2007. Clonal success of piliated penicillin non-susceptible pneumococci. *Proc Natl Acad Sci* 104:12907–12912.

111. Berry AM, Paton JC. 2000. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun* 68: 133–140.

112. Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M, Paton JC, Boulnois GJ, Andrew PW, Mitchell TJ. 1995. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis* 172: 119–123

113. Löfling J, Vimberg V, Battig P, Henriques-Normark B. 2011. Cellular interactions by LPxTG-anchored pneumococcal adhesins and their streptococcal homologues. *Cell Microbiol* 13: 186–197.

114. Jensch I, Gámez G, Rothe M, Ebert S, Fulde M, Somplatzki D, Bergmann S, Petruschka L, Rohde M, Nau R, et al. 2010. PavB is a surface-exposed adhesin of *Streptococcus pneumoniae* contributing to nasopharyngeal colonization and airways infections. *Mol Microbiol* 77: 22–43.

115. Bagnoli F, Moschioni M, Donati C, Dimitrovska V, Ferlenghi I, Facciotti C, Muzzi A, Giusti F, Emolo C, Sinisi A, et al. 2008. A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *J Bacteriol* 190: 5480–5492

116. Gould JM, Weiser JN. 2002. The inhibitory effect of C-reactive protein on bacterial phosphorylcholine platelet-activating factor receptor-mediated adherence is blocked by surfactant. *J Infect Dis* 186: 361–371.

117. Thornton JA, Durick-Eder K, Tuomanen EI. 2010. Pneumococcal pathogenesis: “Innate invasion” yet organ-specific damage. *J Mol Med (Berl)* 88: 103–107.

118. Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. 1999. Cutting edge: Recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163: 1–5.
119. Weber JR, Freyer D, Alexander C, Schroder NW, Reiss A, Kuster C, Pfeil D, Tuomanen EI, Schumann RR. 2003. Recognition of pneumococcal peptidoglycan: An expanded, pivotal role for LPS binding protein. *Immunity* 19: 269–279.
120. Girardin S, Boneca I, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott D, Sansonetti P. 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278: 8869–8872.
121. Moreira LO, ElKasmi KC, Smith AM, Finkelstein D, Fillon S, Kim YG, Nunez G, Tuomanen E, Murray PJ. 2008. The TLR2-MyD88-NOD2-RIPK2 signalling axis regulates a balanced pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory cytokine response to Gram-positive cell walls. *Cell Microbiol* 10: 2067–2077.
122. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT. 2003. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci* 100: 1966–1971.
123. Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H, Akira S, Normark S, Henriques-Normark B. 2007. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol* 9:633–644.
124. Brouwer M, de Gans J, Heckenberg S, Zwinderman A, van der Poll T, van de Beek D. 2009. Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 9: 31–44.
125. Doerschuk C, Tasaka S, Wang Q. 2000. CD11/CD18-dependent and -independent neutrophil emigration in the lungs: How do neutrophils know which route to take? *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 133–136.
126. Marks M, Burns T, Abadi M, Seyoum B, Thornton J, Tuomanen E, Pirofski LA. 2007. Influence of neutropenia on the course of serotype 8 pneumococcal pneumonia in mice. *Infect Immun* 75: 1586–1597.
127. Boulnois GJ, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew PW. 1991. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 5: 2611–2616.

128. Rossjohn J, Feil SC, McKinstry WJ, Tweten RK, Parker MW. 1997. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* 89: 685–692.
129. Berry AM, Yother J, Briles DE, Hansman D, Paton JC. 1989. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 57: 2037–2042.
130. Kadioglu A, Taylor S, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Andrew PW. 2002. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect Immun* 70:2886–2890.
131. Sato K, Quartey MK, Liebler CL, Le CT, Giebink GS. 1996. Roles of autolysin and pneumolysin in middle ear inflammation caused by a type 3 *Streptococcus pneumoniae* strain in the chinchilla otitis media model. *Infect Immun* 64:1140–1145.
132. Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, Walport MJ, Botto M. 2002. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci* 99: 16969–16974.
133. Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR. 2002. Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 109: 19–27.
134. Littmann M, Albiger B, Frentzen A, Normark S, Henriques-Normark B, Plant L. 2009. Pneumolysin expression allows evasion of human dendritic cell responses to *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Mol Med* 1: 211–222.
135. Briles DE, Crain MJ, Gray BM, Forman C, Yother J. 1992. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 60: 111–116.
136. Uchiyama S, Carlin A, Khosravi A, Weiman S, Banerjee A, Quach D, Hightower G, Mitchell T, Doran K, Nizet V. 2009. The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. *J Exp Med* 206:1845–1852.
137. Fillon S, Soulis K, Rajasekaran S, Benedict-Hamilton H, Radin JN, Orihuela CJ, ElKasmi KC, Murti G, Kaushal D, Gaber MW, et al. 2006. Platelet-activating factor receptor and innate immunity: Uptake of Gram-positive bacterial cell wall into host cells and cell-specific pathophysiology. *J Immunol* 177: 6182–6191.

138. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A. 1985. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis* 151: 859–868.
139. Tuomanen E, Hengstler B, Rich R, Bray MA, Zak O, Tomasz A. 1987. Nonsteroidal anti-inflammatory agents in the therapy for experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 155: 985–990
140. Tuomanen EI, Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wright SD. 1989. Reduction of inflammation, tissue damage, and mortality in bacterial meningitis in rabbits treated with monoclonal antibodies against adhesion-promoting receptors of leukocytes. *J Exp Med* 170: 959–969
141. Weber J, Angstwurm K, Bürger W, Einhäupl K, Dirnagl U. 1995. Anti ICAM-1 (CD 54) monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J Neuroimmunol* 63: 63–68.
142. Koedel U. 2009. Toll-like receptors in bacterial meningitis. *Curr Top Microbiol Immunol* 336: 15–40.
143. Koedel U, Klein M, Pfister H. 2010. Modulation of brain injury as a target of adjunctive therapy in bacterial meningitis. *Curr Infect Dis Rep* 12: 266–273.
144. Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wolpe S, Sherry B, Cerami A, Tuomanen E. 1990. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental Gram-positive meningitis. *J Exp Med* 171: 439–448.
145. Braun JS, Tuomanen EI. 1999. Molecular mechanisms of brain damage in bacterial meningitis. *Adv Pediatr Infect Dis* 14: 49–71
146. Odio C, Faingezicht I, Paris M, Nassar M, Baltodano A, Rogers J, Sáez-Llorens X, Olsen K, McCracken GJ. 1991. The beneficial effects of early dexamethasone administration in infants and children with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 324: 1525–1531.
147. Weber JR, Tuomanen EI. 2007. Cellular damage in bacterial meningitis: An interplay of bacterial and host driven toxicity. *J Neuroimmunol* 184: 45–52.
148. Mitchell L, Smith SH, Braun JS, Herzog KH, Weber JR, Tuomanen EI. 2004. Dual phases of apoptosis in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 190: 2039–2046
149. Orihuela CJ, Fillon S, Smith-Sielicki SH, El Kasmi KC, Gao G, Soulis K, Patil A, Murray PJ, Tuomanen EI. 2006. Cell wall-mediated neuronal damage in early sepsis. *Infect Immun* 74: 3783–3789.

150. Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI. 1999. Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* 5:298–302.
151. Hoffmann O, Zweigner J, Smith SH, Freyer D, Mahrhofer C, Dagand E, Tuomanen EI, Weber JR. 2006. Interplay of pneumococcal hydrogen peroxide and host-derived nitric oxide. *Infect Immun* 74: 5058–5066.
152. Sethi S, Evans N, Grant BJ, et al. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2002; 347:465-71.
153. Nunns D, Harkett R, Oppenheimer CA. Puerperal primary pneumococcal peritonitis. *J Obstet Gynecol* 1998; 18:395-396
154. Givner LB, Mason EO Jr, Tan tq, Barson WJ, Schutze GE, Wald ER, Brandley JS, Hoffman J, Yogev R, Kaplan SI. Pneumococcal endocarditis in children. *Clin Infect Dis* 2004; 38:1273-1278.
155. Baraboutis I, Skoutelis A. Streptococcus pneumonia septic arthritis in adults. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:1037-1039.
156. Kalouche I, Ghanem I, Kharrat K, Dagher F. Osteomyelitis of the rib due to *Streptococcus pneumoniae*: a very rare condition in children. *J Pediatr Orthop B* 2005;14:55-60
157. Medeiros MI, Neme SN, da Silva P, Silva JO, Carneiro AM, Carloni MC, Brandileone MC. *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenza* as etiological agents of conjunctivitis outbreaks in the region of Ribeirao Preto SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1998;40:7-9.
158. Newman N, Dagan R, Reuveni H, Cohen Z, Melamed R, Greenberg D. Superficial skin infections caused by *Streptococcus pneumonia* in children. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:937-939
159. Baquero F, Martinez-Beltran J, Loza E. A review of antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28(Suppl C):31-38.
160. McGowan JE, Metchock BG. Penicilli-resistant *pneumococci*: an emerging threat to successful therapy. *J Hosp Infect* 1995; 30(Suppl):472-482.
161. Karlowsky JA, Thornsberry C, Jones ME, Evangelista AT, Critchley IA. Factors associated with relative rates of antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: results from the TRUST Surveillance Program (1998-2002). *Clin Infect Dis* 2003; 36:963-970.

162. Karlowsky JA, Thornsberry C, Jones ME, Evangelista AT, Critchley IA. Factors associated with relative rates of antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: results from the TRUST Surveillance Program (1998-2002). Clin Infect Dis 2003; 36:963-970.
163. Bruinsma N, Kristinsson KG, Bronzwaer S, Schrijnemakers P, Degener J, Tiemersma E, Hryniewicz W, Monen J, Grundmann H; European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Trends of penicillin and erythromycin resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* in Europe. J Antimicrob Chemother 2004; 54:1045-1050.
164. Zhanel GG, Palatnick L, Nichol KA, Bellyou T, Low DE, Hoban DJ. Antimicrobial resistance in respiratory tract *Streptococcus pneumoniae* isolates: results of the Canadian Respiratory Organism susceptibility study, 1997 to 2002. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:1867-1874.
165. Juan J.Granizo, Lorenzo Aguilar, Julio Casal, Cesar Garcia-Rey, Rafael Dal-Re, Fernando Baquero. *Streptococcus pneumoniae* resistance to erythromycin and penicillin in relation to macrolide and β -lactam consumption in Spain (1979-1997) J Antimicrob Chem 2000; 46:767-773
166. Wóst J, Huf E, Kayser FH. Antimicrobial susceptibilities and serotypes of invasive *Streptococcus pneumoniae* strains in Switzerland. J Clin Microbiol 1995; 33:3159-3163.
167. Κουπάρη Γ, Τζουβελέκης ΛΣ, Τζελέπη Ε. Αντοχή του πνευμονιοκόκκου στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 1998; 43:22-33
168. Quintiliani R, Sahm DF, Courvalin P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, 7th edition, Washington 1999, chapter 117, p. 1505-1525.
169. Baquero F, Barrett JF, Courvalin P, Morrisey I, Piddock L, Novick J. Epidemiology and mechanisms of resistance among respiratory tract pathogens. Clin Microbiol Inf 1998; 4 (Suppl 2):2S19-2S26
170. Effects of new penicillin susceptibility breakpoints for *Streptococcus pneumoniae*-United States, 2006-2007. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2008;57:1353-1357
171. European Committee of Antimicrobial Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0 (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0.pdf)

172. Παρασκάκη Ε, Πάγκαλη Α. Μικροβιολογικές τεχνικές της αντοχής του πνευμονιοκόκκου στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής εταιρείας 2003; 48:357-366
173. Pallares R, Linares J, Vadillo M, Cabellos C, Manresa F, Viladrich PF, Martin R, Gudiol F. Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain. N Engl J Med 1995;333:474-480.
174. Crewe-Brown HH, Karstaedt AS, Saunders GL, Khoosal M, Jones N, Wasas A, Klugman KP. *Streptococcus pneumoniae* blood culture isolates from patients with and without Human Immunodeficiency Virus Infection: Alterations in penicillin susceptibilities and in serogroups or serotypes. Clin Infect Dis 1997;25:1665-1772
175. Ruhe JJ, Hasbun R. *Streptococcus pneumoniae* bacteremia: duration of previous antibiotic use and association with penicillin resistance. Clin Infect Dis 2003; 36:1132-1138.
176. Clavo-Sanchez AJ, Giron-Gonzales JA, Lopez-Prieto D, Canueto-Quintero J, Sanchez-Porto A, Vergana-Campos A, Marin-Casanova P, Cordoba-Dona A. Multivariate analysis of risk factors for infection due to penicillin-susceptible non b-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Greek children. J Clin Microbiol 2003; 41:5633-3639.
177. Bogaert D, Hermans PWM, Grivea IN, Katopodis G, Mitchell TJ, Sluijter M, de Groot R, Beratis NG, Syrogiannopoulos GA: Molecular epidemiology of penicillin-susceptible non- β-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Greek children. J Clin Microbiol 2003, 41:5633–5639.
178. Gherardi G, Del Grosso M, Scotto d’Abusco A, D’Ambrosio F, Dicuonzo G, Pantosti A. Phenotypic and genotypic characterization of two penicillin-susceptible serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* clones circulating in Italy. J Clin Microbiol 2003; 41:2855-2861.
179. Syrogiannopoulos GA, Ronchetti F, Dagan R, Grivea I, Ronchetti MP, Porat N, Davies TA, Ronchetti R, Appelbaum PC, Jacobs MR. Mediterranean clone of penicillin-susceptible, multidrug-resistant serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* in Greece, Italy and Israel. Int J Antimicrob Agents 2000; 16:219-224.
180. McDougall K, Tenover FC, Lee LN, Rasheed K, Patterson JE, Jorgensen JH, LeBlanc J. Detection of Tn917- like sequences within a Tn916-like conjugative transposon (Tn3873) in erythromycin-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:2312-2318.

181. Felmingham D, Washington J, the Alexander Project Group. Trends in the antimicrobial susceptibility of bacterial respiratory tract pathogens—findings of the Alexander Project 1992-1996. *J Chemother* 1999; 11:5-21.
182. Lynch III JP, Martinez FJ. Clinical relevance of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* for community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2002; 34(Suppl 1):S27-46.
183. Tomasz A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1997; 24(Suppl 1):S85-S88.
184. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Morris L, Buckridge S, Felmingham D. Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both *erm(B)* and *mef(A)* mediated macrolide resistance. *J Clin Microbiol* 2004; 42:764-768.
185. Waites KB, Jones KE, Kim KH, Moser SA, Johnson CN, Hollingshead SK, Kang ES, Hong KS, Benjamin WH. Dissemination of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates containing both *erm(B)* and *mef(A)* in South Korea. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5787-5791.
186. 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. *Emerg Infect Dis* 2005, 11:851-858.
187. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Vol II), 6th Edition, Elsevier Inc 2005, p 2392-2411.
188. Tait-Kamradt A, Davies T, Appelbaum PC, Depardieu F, Courvalin P, Petitras J, et al. The two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44: 3395-3401.
189. Descheemaeker P, Chapelle S, Lammens C, Hauchecorne M, Wijdooghe M, Vandamme P, et al. Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2000, 45: 167-173.
190. Montanari MP, Cochetti I, Mingoia M, Veraldo EP. Phenotypic and molecular characterization of tetracycline and erythromycin resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2236-2241.

191. Lonks JR, Garau J, Gomez L, et al. Failure of macrolide antibiotic treatment in patients with bacteremia due to erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Infect Dis 2002; 35:556-564.
192. Jorgensen JH, Crawford SA, McElmeel ML, Whitney CG. Activities of cethromycin and telithromycin against recent North American isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:605-607.
193. Ackermann G, Rodloff AC. Drugs of the 21st century: telithromycin (HMR 3647) - the first ketolide. J Antimicrob Chemother 2003; 51:497-511.
194. Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. Clin Microbiol Rev 1990;3:171-96
195. Hooper DC. Quinolones. In: mandell GL, Dolin R(eds). Principles and practice of infectious diseases, 5th ed. New York, NY: Churchill Livingstone, 2000;404-23.
196. Adrian PV, Klugman KP. Mutations in the dihydrofolate reductase gene of trimethoprim-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2406-13.
197. Papayachee T, Klugman KP. Novel expansions of the gene encoding dihydropteroate synthase in trimethoprim-sulfomethoxazole-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:2225-30.
198. Schrag SJ, Beall B, Dowel SF. Limiting the spread of resistant *pneumococci*: biological and epidemiologic evidence for the effectiveness of alternative interventions. Clin Microbiol Rev 2000; 13:588-601.
199. Leach AJ. Editorial response: multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: an opportunity to further understand pneumococcal ecology and to better predict intervention outcomes. Clin Infect Dis 1999; 29:1265-1267.
200. Klein JO: The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. Rev Infect Dis 1981, 3:246–253.
201. Gray BM, Converse GM 3rd, Dillon HC Jr: Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. J Infect Dis 1980, 142:923–933.
202. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y, Tonawanda/Williamsville Pediatrics: Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. J Infect Dis 1997, 175:1440–1445.

203. Bogaert D, De Groot R, Hermans PW: *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004, 4:144–154.
204. Dagan R, Givon-Lavi N, Zamir O, Fraser D: Effect of a nonavalent conjugate vaccine on carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in day-care centers. *Pediatr Infect Dis J* 2003, 22:532–540.
205. 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.
206. 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, 29:8882–8887.
207. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Felmingham D: Molecular characterization of macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated from the PROTEKT 1999–2000 study. *J Antimicrob Chemother* 2002, 50(Suppl. S1):39–47.
208. 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.
209. 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.
210. Farrell DJ, Couturier C, Hryniewicz W: Distribution and antibacterial susceptibility of macrolide resistance genotypes in *Streptococcus pneumoniae*: PROTEKT Year 5 (2003–2004). *Int J Antimicrob Agents* 2008, 31:245–249.
211. Jenkins SG, Farrell DJ: Increase in pneumococcus macrolide resistance, United States. *Emerg Infect Dis* 2009, 15:1260–1264.
212. Imöhl M, Reinert RR, Mutscher C, van der Linden M: Macrolide susceptibility and serotype specific macrolide resistance of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Germany from 1992 to 2008. *BMC Microbiol* 2010, 10:299.

213. Leclercq R, Courvalin P: Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46:2727–2734.
214. Weisblum B: Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39:577–585.
215. Ambrose KD, Nisbet R, Stephens DS: Macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae* is mediated by a dual efflux pump (mel and mef) and is erythromycin inducible. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49:4203–4209.
216. Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L: *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, 40:1817–1824.
217. Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, Dib-Hajj F, Wondrack L, Yuan W, Sutcliffe J: mefE is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997, 41:2251–2255.
218. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H: Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43:2823–2830.
219. Oster P, Zanchi A, Cresti S, Lattanzi M, Montagnani F, Cellesi C, Rossolini GM: Patterns of macrolide resistance determinants among community-acquired *Streptococcus pneumoniae* isolates over a 5-year period of decreased macrolide susceptibility rates. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43:2510–2512.
220. Del Grosso M, Iannelli F, Messina C, Santagati M, Petrosillo N, Stefani S, Pozzi G, Pantosti A: Macrolide efflux genes *mef(A)* and *mef(E)* are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2002, 40:774–778.
221. Bley C, van der Linden M, Reinert RR: mef(A) is the predominant macrolide resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in Germany. *Int J Antimicrob Agents* 2011, 37:425–431.
222. Santagati M, Iannelli F, Oggioni MR, Stefani S, Pozzi G: Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44:2585–2587.

223. Santagati M, Iannelli F, Cascone C, Campanile F, Oggioni MR, Stefani S, Pozzi G: The novel conjugative transposon Tn1207.3 carries the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pyogenes*. *Microb Drug Resist* 2003, 9:243–247.
224. Del Grosso M, Camilli R, Iannelli F, Pozzi G, Pantosti A: The *mef(E)*-carrying genetic element (mega) of *Streptococcus pneumoniae*: insertion sites and association with other genetic elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, 50:3361–3366.
225. Varaldo PE, Montanari MP, Giovanetti E: Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53:343–353.
226. Paraskakis I, Kafetzis DA, Chrisakis A, Papavasiliou H, Kirikou H, Pangalis A, Tzouveleki LS, Athanasiou T, Legakis NJ on behalf of the National Surveillance Network for Pneumococcal Resistance: Serotypes and antimicrobial susceptibilities of 1033 *pneumococci* isolated from children in Greece during 2001–2004. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12:490–493.
227. Souli M, Volonakis K, Kapaskelis A, Galani I, Grammelis V, Vorou R, Tzivra M, Chryssouli Z, Katsala D, Giamarellou H: Characterisation of macrolide–non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* colonising children attending day-care centres in Athens, Greece during 2000 and 2003. *Clin Microbiol Infect* 2007, 13:70–77.
228. 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.
229. Hellenic National Committee for Immunization Programs: National Immunization Program. *Paediatrici* 2006, 69:78–82.
230. 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.
231. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S18. Wayne, PA: CLSI; 2008.
232. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L: Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, 40:2562–2566.

233. Reinert RR, Lütticken R, Bryskier A, Al-Lahham A: Macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in the pediatric population in Germany during 2000–2001. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47:489–493.
234. American Academy of Pediatrics: Pneumococcal infections. In *Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases*. 28th edition. Edited by Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2009:524–535.
235. 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.
236. Maraki S, Samonis G, Galanakis E: Serotypes and susceptibilities of paediatric clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Crete, Greece, before and after the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010, 29:1449–1451.
237. Sá-Leão R, Nunes S, Brito-Avô A, Frazão N, Simões AS, Crisóstomo MI, Paulo ACS, Saldanha J, Santos-Sanches I, de Lencastre H: Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect* 2009, 15:1002–1007.
238. Hanage WP, Bishop CJ, Huang SS, Stevenson AE, Pelton SI, Lipsitch M, Finkelstein JA: Carried *pneumococci* in Massachusetts children. The contribution of clonal expansion and serotype switching. *Pediatr Infect Dis J* 2011, 30:302–308.
239. Ardanuy C, Fenoll A, Berrón S, Calatayud L, Liñares J, and the Spanish Pneumococcal Infection Study Network: Increase of the M phenotype among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Spain related to the serotype 14 variant of the Spain9V-3 clone. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, 50:3162–3165.
240. Sogstad MK, Littauer P, Aaberge IS, Caugant DA, Høiby A: Rapid spread in Norway of an erythromycin-resistant pneumococcal clone, despite low usage of macrolides. *Microb Drug Resist* 2007, 13:29–36.
241. Bowers JR, Driebe EM, Nibecker JL, Wojack BR, Sarovich DS, Wong AH, Brzoska PM, Hubert N, Knadler A, Watson LM, Wagner DM, Furtado MR, Saubolle M, Engelthaler DM, Keim PS: Dominance of multidrug

resistant CC271 clones in macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Arizona. BMC Microbiol 2012, 12:12.

242. Aguiar SI, Brito MJ, Gonçalo-Marques J, Melo-Cristino J, Ramirez M: Serotypes 1, 7F and 19A became the leading causes of pediatric invasive pneumococcal infections in Portugal after 7 years of heptavalent conjugate vaccine use. Vaccine 2010, 28:5167–5173.

243. Rückinger S, van der Linden M, Reinert RR, von Kries R, Burckhardt F, Siedler A: Reduction in the incidence of invasive pneumococcal disease after general vaccination with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in Germany. Vaccine 2009, 27:4136–4141.

244. McGee L, Klugman KP, Wasas A, Capper T, Brink A, and the Antibiotics Surveillance Forum of South Africa: 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.

245. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, Jokinen J, Haapakoski J, Herva E, Takala A, Käyhty H, Karma P, Kohberger R, Siber G, Mäkela PH: Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. N Engl J Med 2001, 344:403–409.

246. Ekström N, Åhman H, Verho J, Jokinen J, Väkeväinen M, Kilpi T, Käyhty H: Kinetics and avidity of antibodies evoked by heptavalent pneumococcal vaccines PncCRM and PncOMPC in the Finnish otitis media vaccine trial. Infect Immun 2005, 73:369–377.

247. Xu X, Cai L, Xiao M, Kong F, Oftadeh S, Zhou F, Gilbert GL: Distribution of serotypes, genotypes, and resistance determinants among macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2010, 54:1152–1159.