

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**



**Β΄ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
Διευθύντρια: Καθηγήτρια Μαρίζα Τσολιά**

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΟΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΤΟΥ
ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΤΟΥ
ΡΙΝΟΦΑΡΥΓΓΑ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ»**

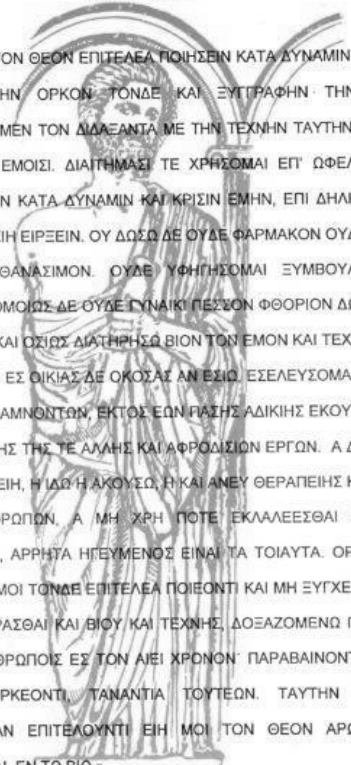
ΤΣΙΑΛΤΑ Θ. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2017

**ΕΚ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ ΟΡΚΟΥ
ΚΕΙΜΕΝΟ**



« ΟΜΝΥΜΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ. ΟΥΔΕ ΎΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΩΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ. ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΡΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, Η ΪΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΣΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΣΕΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΓΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ, ΤΑΥΤΗΝ ΤΗΝ ΕΠΑΓΓΕΛΙΑΝ ΕΠΙΤΕΛΟΥΝΤΙ ΕΙΗ ΜΟΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΑΡΩΓΟΝ ΚΤΗΣΑΣΘΑΙ ΕΝ ΤΩ ΒΙΩ ».

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΕΩΣ: 26.07.2010

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 20.01.2011

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΕΩΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 20.03.2017

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

- **ΜΑΡΙΖΑ ΤΣΟΛΙΑ** - Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας
- **ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ** - Καθηγητής Αλλεργιολογίας-Παιδιατρικής Αλλεργιολογίας
- **ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΠΑΠΑΕΥΑΓΓΕΛΟΥ** - Καθηγήτρια Παιδιατρικής

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- **ΜΑΡΙΖΑ ΤΣΟΛΙΑ** – Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας
- **ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ**- Καθηγητής Αλλεργιολογίας-Παιδιατρικής Αλλεργιολογίας
- **ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΠΑΠΑΕΥΑΓΓΕΛΟΥ**- Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας
- **ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΠΥΡΙΔΗΣ** – Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής
- **ΞΕΠΑΠΑΔΑΚΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ** - Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Αλλεργιολογίας
- **ΓΑΡΟΥΦΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ** – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής
- **ΜΙΧΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ** - Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΤΣΙΑΛΤΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: ΜΙΧΑΗΛ ΚΑΡΑΟΛΗ 68, ΞΑΝΘΗ, ΕΛΛΑΔΑ

ΤΗΛ: + 30-25410- 45004

ΚΙΝ: +30-6937260208

E-MAIL: tsialta.b@hotmail.com

ΗΜΕΡ. ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ: 18-08-1971

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ / ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

1998 - ΠΤΥΧΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΑΚΑΔΗΜΙΑ ΣΟΦΙΑΣ ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ με βαθμό πτυχίου: 4,73 «ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ» - ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΙΤΛΟΥ ΣΠΟΥΔΩΝ -ΔΙ.Κ.Α.Τ.Σ.Α με βαθμολογική αντιστοιχία: 6,73 «ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ» 09.07.2004

2004-2006 - Ειδικευόμενος Ιατρός για τρίμηνη υποχρεωτική εκπαίδευση (Παθολογία/ Καρδιολογία/ Χειρουργική) στο Γενικό Νοσοκομείο Καβάλας, Ιατρός υπηρεσίας υπαίθρου στο Π.Ι.Πέρνης, Κ.Υ.Χρυσούπολης του Γενικού Νοσοκομείου Καβάλας.

2006-2011 - Ειδικευόμενη Ιατρικής Βιοπαθολογίας στο Γενικό Νοσοκομείο Παιδων Αθήνας «Π & Α Κυριακού».

2012 - Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Ιατρικής Βιοπαθολογίας

2014-2015 – Ωρομίσθια εκπαιδευτικός του ΙΕΚ ΟΑΕΔ

2015 - έως σήμερα Επικουρική Ιατρός στην Μονάδα Υγείας Π.Ε.Δ.Υ. ΞΑΝΘΗΣ

ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ

2007-2010 - Μετεκπαιδευτικά μαθήματα (Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, Εταιρείας Κλινικής Μικροβιολογίας και Εργαστηριακής Διαγνωστικής, Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Βιοχημείας, Ελληνικής Ανοσολογικής Εταιρείας και ΕΕΕΑΑ).

2009 - Πρόγραμμα επιμόρφωσης επεξεργασίας ιατρικών δεδομένων με χρήση SPSS

2006 -2012 - Συμμετοχή σε συνέδρια, μετεκπαιδευτικά σεμινάρια, σεμινάρια εργασίας, ημερίδες και κλινικά φροντιστήρια.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ – ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

- **Associations Between Viral and Bacterial Potential Pathogens in the Nasopharynx of Children With and Without Respiratory Symptoms**

Skevaki, Chrysanthi L. MD, PhD; **Tsialta, Paraskevi MD**; Trochoutsou, Aikaterini I. MD, MSc; Logotheti, Ioanna MD, PhD; Makrinioti, Heidi MD; Taka, Styliani MD, MSc, PhD; Lebessi, Evangelia MD, PhD; Paraskakis, Irene MD, PhD; Papadopoulos, Nikolaos G. MD, PhD; Tsolia, Maria N. MD, PhD

Pediatric Infectious Disease Journal: December 2015 - Volume 34 - Issue 12 - p 1296–1301

- **The role of viral infections in nasopharyngeal bacterial colonisation in children: a case-control study**

C.L. Skevaki, A.I. Trochoutsou, **P. Tsialta**, I. Logotheti, C.N. Makrinioti, E. Lebessi, I. Paraskaki, N.G.Papadopoulos, M.N. Tsolia (Athens, GR)

22nd ECCMID, London-United Kingdom (31 March- 3 April 2012)

- **The impact of viral infections on nasopharyngeal bacterial colonization among children**

P. Tsialta¹, A.I. Trochoutsou², C.L. Skevaki², I. Logotheti², C.N. Makrinioti², E. Lebessi¹, I. Paraskaki¹, N.G.Papadopoulos², M.N. Tsolia²

¹Microbiology Laboratory, 'P & A Kyriakou' Children's Hospital,

²Second Department of Pediatrics, School of Medicine, NKUA, Athens, Greece

30th ESPID, annual meeting of the European society of paediatric infectious diseases, Thessaloniki, Greece, May 8-12, 2012

- **Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΟΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΛΛΕΡΓΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΙΣΤΟΡΙΚΟΥ ΣΤΟ ΡΙΝΟΦΑΡΥΓΓΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ**

Χρ.Α. Σκευάκη, ¹Αικ.Ι. Τροχούτσου,¹ **Π. Τσιάλτα**,² Ι. Λογοθέτη,¹ Χ.Ν. Μακρυνιώτη,¹ Ευ. Λεμπέση,² Ειρ. Παρασκάκη,² Στ. Τάκα,¹ Ν.Γ. Παπαδόπουλος,¹ Μ.Ν. Τσολιά¹

¹2η Παιδιατρική Κλινική (ΒΠΠΚ), Πανεπιστήμιο Αθηνών, Νοσοκομείο Παίδων «Π. & Α. Κυριακού»,
² Μικροβιολογικό Εργαστήριο, Νοσοκομείο Παίδων «Π. & Α. Κυριακού», Αθήνα

Ελληνική Αλλεργιολογία & Κλινική Ανοσολογία Περίοδος Β', Τόμος 6, Τεύχος 1-2, ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ-ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2013

ΑΛΛΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

- **DETECTION OF HUMAN METAPNEUMOVIRUS INFECTION IN A PAEDIATRIC HOSPITAL IN GREECE**

Antonaki G, Paleologou N, Tsiakta P, Gouriotis D, Kalergi K .

4TH Europaediatrics 2009 Moscow 3-6 July 2009

- **MURINE THYPHUS IN A PAEDIATRIC HOSPITAL IN GREECE**

Antonaki G, Tsiakta P, Sergiou Z, Ganouri T, Kalergi K .

European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinki, Finland 16-19 May 2009

- **PREVALENCE OF GASTROENTERITIS CAUSED BY ROTAVIRUS AND ADENOVIRUS IN A PAEDIATRIC POPULATION IN ATHENS, GREECE.**

Paleologou N, Lycou F, Tsiakta P, Zouni P, Dimitraka V, Sinodinou E, Lebesi E.

European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain 19-22 April 2008

- **Ανίχνευση λοίμωξης του αναπνευστικού από Metarnevovirus σε παιδιά.**

Αντωνάκη Γ, Παλαιολόγου Ν, Λεμπέση Ε, Τσιάκτα Π, Γκανούρη Θ, Καλλέργη Κ, Γουριώτης Δ.

Πανελλήνιο Παιδιατρικό συνέδριο, Χανιά, 19-21.06.2009

- **“Ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη στον ορό παιδιών με αλλεργία σε εισπνεόμενα»**

Παλαιολόγου Ν, Αντωνάκη Γ, Βραΐλα Β, Σκαλίδης Τ, Τσιάκτα Π, Καλλέργη Κ .

Πανελλήνιο Παιδιατρικό συνέδριο, Κέρκυρα 13-15.06.2008

- **«Η αύξηση του αριθμού των αιματογονίων στο μυελό δυσχεραίνει την τεκμηρίωση ύφεσης της οξείας λευχαιμίας στα παιδιά».**

Ντούνα Β, Χαρίση Μ, Μπάκα Μ, Τσιάκτα Π, Κοσμίδη Ε, Αναστασίου Θ.

1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας, 5-6.02.2010

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

2004 - 2006 Ωρομίσθια εκπαιδευτικός του Εθνικού Κέντρου Άμεσης Βοήθειας (Ε.Κ.Α.Β.) - Καβάλα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα από δυνητικά παθογόνα βακτήρια όπως είναι ο *Streptococcus pneumoniae* (SP), ο *Haemophilus influenzae* (HI), η *Moraxella catarrhalis* (MC), ο *Streptococcus pyogenes* (SPγo) και ο *Staphylococcus aureus* (SA) προηγείται της εκδήλωσης βακτηριακών λοιμώξεων του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος αλλά και διεισδυτικών λοιμώξεων. Οι ιογενείς λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος επηρεάζουν τη συχνότητα αλλά και το είδος των βακτηρίων που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα. Ταυτόχρονα, η χορήγηση των εμβολίων επηρεάζει το βακτηριακό αποικισμό του ρινοφάρυγγα γεγονός που καθιστά απαραίτητη τη συνεχή επιδημιολογική επιτήρηση των σοβαρών διεισδυτικών λοιμώξεων.

Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνήσει τη συχνότητα του βακτηριακού αποικισμού του ρινοφάρυγγα σε παιδιά με ή χωρίς συμπτώματα οξείας ιογενούς λοίμωξης του αναπνευστικού συστήματος και να εξετάσει πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών, οι οποίες ενδέχεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση νόσου από αυτούς.

Φτάνοντας λοιπόν στο τέλος αυτής της ερευνητικής προσπάθειας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνετέλεσαν στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά πρώτα από όλους την Καθηγήτρια κ. Μαρίζα Τσολιά, η οποία μου δίδαξε πως με υπομονή, επιμονή, προσπάθεια και συγκροτημένη σκέψη μπορεί κανείς να πετύχει τους στόχους του. Την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη, που μου έδειξε πολλές φορές, την επιστημονική, την ηθική και την πνευματική υποστήριξη, αλλά και για την υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής. Η βοήθεια και η καθοδήγησή της ήταν πολύτιμη για την επίλυση διαφόρων προβλημάτων, που προέκυπταν κατά τη διάρκεια της μελέτης. Η αγάπη της για την έρευνα και ο αγώνας της για την βελτίωση της υγείας των μικρών ασθενών δεν βρίσκουν εύκολα μιμητή. Της είμαι ευγνώμων που με οδήγησε σε δρόμους άγνωστους με σκοπό τη γνώση. Θέλω να ευχαριστήσω από την καρδιά μου τον άνθρωπο Μαρίζα Τσολιά, που παρά τις αναρίθμητες υποχρεώσεις της βρήκε το χρόνο, για να μου συμπαρασταθεί σε πρόβλημα υγείας που αντιμετώπισα. Θα μπορούσα να προσθέσω ακόμη ευχαριστίες και περιγραφές που χαρακτηρίζουν την κ. Μαρίζα Τσολιά, όμως εδώ οι λέξεις δεν είναι αρκετές ούτε για να περιγράψουν τον Άνθρωπο, την Επιστήμονα, τη Δασκάλα και την Καθηγήτρια, αλλά ούτε και για να αποδώσουν την ευγνωμοσύνη μου προς το πρόσωπό της.

Νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Αλλεργιολογίας - Παιδιατρικής Αλλεργιολογίας κ. Νικόλαο Παπαδόπουλο, του οποίου οι επισημάνσεις και οι διορθώσεις ήταν καίριες και ιδιαιτέρως ακριβείς κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στην Καθηγήτρια Παιδιατρικής κ. Βασιλική Παπαευαγγέλου για την αμέριστη στήριξη που μου προσέφερε ως μέλος της τριμελούς, όπως και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας.

Θέλω να ευχαριστήσω τις Διευθύντριες του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου κ. Κωνσταντινιά Καλλέργη και κ. Ευαγγελία Λεμπέση, οι οποίες με πρότειναν αβίαστα στην Καθηγήτρια κ. Μαρίζα Τσολιά για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Ακόμη ευχαριστώ την κ. Κωνσταντινιά Καλλέργη για την αμέριστη αγάπη της, την προτροπή της, αλλά και την συνεχή παρουσία της ως ηθική στυλοβάτης της προσπάθειας μου για να ολοκληρώσω την συγκεκριμένη εργασία. Οι γνώσεις της και η εμπειρία της θα με ακολουθούν στην καθημερινή μου πράξη. Ιδιαίτερος ευχαριστώ την κ. Ευαγγελία Λεμπέση, η οποία κατά την διάρκεια της εκπαίδευσής μου στην ειδικότητα με τροφοδότησε αφειδώς με τις πολυτιμότες γνώσεις και συμβουλές της. Την ευχαριστώ για την ανιδιοτελή βοήθειά της και την πίστη της σε μένα.

Ευχαριστώ τη συνάδελφο κ. Χρυσάνθη Σκευάκη, η συμβολή της οποίας στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αλλά και στη συγγραφή της διδακτορικής διατριβής ήταν καθοριστική και ανεκτίμητη.

Οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Διευθύντρια του Βιοχημικού Εργαστηρίου κ. Ειρήνη Παρασκάκη για την άοκνη διδαχή της κατά την διαδικασία ταυτοποίησης και οροτυπίας των στελεχών του πνευμονιόκοκκου. Χωρίς την συμβολή της μεγάλο μέρος της παρούσας διατριβής δεν θα είχε υλοποιηθεί.

Θα ήταν παντελώς αδικαιολόγητο από μέρους μου να μην ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους, που ήταν πάντοτε παρόντες στη συλλογή των δειγμάτων.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά την Υπεύθυνη της Μ.Υ.ΠΕΔΥ ΞΑΝΘΗΣ κ. Σοφία Παπαγεωργίου για την κατανόησή της και την ηθική στήριξή της, τον Φίλο και Εκπαιδευτικό κ. Νικόλαο Σαζακλίδη για την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της συγγραφής και την Φίλη και Καθηγήτρια Βιοχημείας κ. Nikolina Krusteva για την αμέριστη αγάπη και ηθική στήριξη.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά μου, η οποία είναι τα πάντα για μένα.

Τη Διδακτορική Διατριβή την αφιερώνω στη μαμά μου Ευδοκία και στο μπαμπά μου Θεοφάνη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

| | |
|--|----|
| 1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΙΟΓΕΝΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ | 15 |
| 1.1 ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ Η1Ν1 ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ | 19 |
| 1.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΝΕΡΓΕΙΑΣ ΙΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ | 20 |
| 1.2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΕΡΓΕΙΑ ΙΩΝ-ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ | 20 |
| 1.3.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΤΙΚΟΤΗΤΑ | 21 |
| 1.4 ΠΡΟΛΗΨΗ-ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ | 23 |
| 2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ | 25 |
| 3.ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 26 |
| 3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ | 26 |
| 3.2 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ | 26 |
| 3.3 ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ | 26 |
| 3.4 ΜΕΘΟΔΟΙ | 28 |
| 3.5 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ | 29 |
| 3.6 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ | 39 |
| 3.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ | 42 |
| 4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 43 |
| 4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ | 43 |
| 4.2 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ | 45 |
| 4.3 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΙΟΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ | 40 |
| 4.4 ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ | 53 |
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 59 |
| 6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 65 |

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΟΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΤΟΥ ΡΙΝΟΦΑΡΥΓΓΑ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ

Εισαγωγή: Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα από βακτήρια προηγείται της εκδήλωσης βακτηριακών λοιμώξεων του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος αλλά και διεισδυτικών. Σκοπός της μελέτης είναι να διερευνήσει τη συχνότητα του βακτηριακού αποικισμού του ρινοφάρυγγα σε παιδιά με ή χωρίς συμπτώματα οξείας ιογενούς λοίμωξης του αναπνευστικού συστήματος και να εξετάσει πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των ταυτοποιούμενων μικροοργανισμών.

Υλικό και μέθοδοι: Ελέγχθηκαν βρέφη και παιδιά ηλικίας 3 μηνών έως 5 ετών με και χωρίς συμπτώματα ιογενούς λοίμωξης του αναπνευστικού συστήματος και για κάθε παιδί που συμμετείχε στη μελέτη συμπληρώθηκε ειδικό ερωτηματολόγιο με δημογραφικά και κλινικά δεδομένα. Τα δείγματα ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος, που λήφθηκαν με στυλεό αλγινικού ασβεστίου, εξετάστηκαν για βακτηριακό αποικισμό με *Streptococcus pneumoniae* (SP), *Haemophilus influenzae* (HI), *Moraxella catarrhalis* (MC), και *Streptococcus pyogenes* (SPγo) και τα δείγματα ρινικού επιχρίσματος, που λήφθηκαν με βαμβακοφόρο στυλεό, από τις πρόσθιες ρινικές θαλάμες εξετάστηκαν για βακτηριακό αποικισμό με *Staphylococcus aureus* (SA). Η παρουσία ιού της γρίπης (IFV) και της παραγρίπης (PIV), αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (RSV), ρινοϊού (RV) και αδενοϊού (AV) εκτιμήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).

Αποτελέσματα: Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 386 βρέφη και παιδιά (216 αγόρια). Η μέση ηλικία των παιδιών ήταν 23,4 μήνες. Από τα 386 παιδιά, τα 127 δεν είχαν συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα. Σε ένα πολύ υψηλό ποσοστό ασυμπτωματικών παιδιών δεν απομονώθηκε κανένα από τα βακτήρια που εξετάστηκαν ($p < 0,01$). Ο *S. pneumoniae* ($p < 0,01$), η *M. catarrhalis* ($p = 0,001$) και οι συνδυασμοί των βακτηρίων, που εξετάστηκαν, απομονώθηκαν πιο συχνά από συμπτωματικά παιδιά ($p < 0,05$) συγκριτικά με τα ασυμπτωματικά παιδιά. Ο αποικισμός με *M. catarrhalis* παιδιών, που ήταν θετικά για ιούς, ήταν συχνότερος σε σύγκριση με τα παιδιά, στα οποία δεν διαπιστώθηκε ιογενής λοίμωξη ($p < 0,05$). Τα υψηλότερα ποσοστά αποικισμού με *H. influenzae* και *M. catarrhalis* παρατηρήθηκαν σε παιδιά, που ήταν θετικά για τον ιό της γρίπης. Μεταξύ των παιδιών που ήταν αποικισμένα με *S. pneumoniae*, ανιχνεύθηκε υψηλό ποσοστό αποικισμού και με *H. influenzae*. Παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ του *S. pneumoniae* και του *S. aureus* και μια αυξημένη πιθανότητα ανίχνευσης της *M. catarrhalis* παρουσία του *H. influenzae*. Ο αποικισμός με *H. influenzae* ήταν συχνότερος μεταξύ των παιδιών, στα οποία είχε απομονωθεί RSV και ο αποικισμός με *M. catarrhalis* συσχετίστηκε με την ανίχνευση του RV.

Συμπεράσματα: Οι ιογενείς λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος επηρεάζουν τη συχνότητα αλλά και το είδος των βακτηρίων που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα. Οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ δυνητικά παθογόνων

μικροοργανισμών ενδέχεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση νόσου από αυτούς. Η χορήγηση των εμβολίων επηρεάζει το βακτηριακό αποικισμό του ρινοφάρυγγα και για αυτό το λόγο απαιτείται συνεχής επιδημιολογική επιτήρηση των σοβαρών διεισδυτικών λοιμώξεων.

ASSOCIATIONS BETWEEN VIRAL AND BACTERIAL POTENTIAL PATHOGENS IN THE NASOPHARYNX OF CHILDREN WITH AND WITHOUT RESPIRATORY SYMPTOMS

Abstract

Background: Nasopharyngeal bacterial colonization is necessary for subsequent respiratory and/or invasive infection. Our study aimed at comparing nasopharyngeal bacterial colonization rates between children with and without symptoms of an acute viral respiratory tract infection (ARTI) and examining associations between identified microorganisms.

Methods: Children 3 months to 6 years of age with and without an acute viral respiratory tract infection were recruited and a questionnaire was filled. Nasopharyngeal samples were examined for *Streptococcus pneumoniae* (SP), *Haemophilus influenzae* (HI), *Moraxella catarrhalis* (MC), *Staphylococcus aureus* (SA) and *Streptococcus pyogenes* (SPyo) by culture. Viruses were detected with polymerase chain reaction (PCR).

Results: Median age of the 386 recruited children (216 males) was 23.4 months, and 127 had no respiratory symptoms. More asymptomatic subjects were found negative for all bacteria tested ($p < 0.01$). *S. pneumoniae* ($p < 0.01$), *M. catarrhalis* ($p = 0.001$) and mixed bacterial colonization patterns were more frequent among symptomatic children ($p < 0.05$). Colonization of symptomatic, virus-positive children with *M. catarrhalis* was higher than in asymptomatic and/or virus-negative children ($p = 0.005$). The highest *H. influenzae* and *M. catarrhalis* colonization rates were recorded in association with influenza virus (IFV). A strongly negative association between *S. pneumoniae* and *S. aureus*, a higher rate of *H. influenzae* detection among *S. pneumoniae* colonized children, and an increased likelihood of *M. catarrhalis* detection in the presence of *H. influenzae* were observed. *H. influenzae* colonization was more likely in the presence of respiratory syncytial virus (RSV) and *M. catarrhalis* colonization was associated with rhinovirus (RV) detection.

Conclusions: Viruses are associated with different nasopharyngeal bacterial colonization patterns. Observed pathogens' associations may play a role in disease, and continuous surveillance is required to follow possible effects of interventions such as vaccines.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ρινοφάρυγγας των παιδιών αποικίζεται συχνά από δυνητικά παθογόνα βακτήρια όπως είναι ο *Streptococcus pneumoniae* (SP), ο *Haemophilus influenzae* (HI), η *Moraxella catarrhalis* (MC), ο *Streptococcus pyogenes* (SPγo) και ο *Staphylococcus aureus* (SA)^{1,2}. Η χλωρίδα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος επηρεάζεται από την ηλικία, το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, τη χρήση αντιβιοτικών και τη χορήγηση εμβολίων.

Ο *S. pneumoniae* αποτελεί συχνό στοιχείο της φυσιολογικής χλωρίδας του ρινοφάρυγγα των υγιών παιδιών (20-40%) και ιδίως εκείνων που παρακολουθούν παιδικό σταθμό (μέχρι 65%)³. Η προσκόλληση του πνευμονιόκοκκου στα επιθηλιακά κύτταρα του ρινοφάρυγγα επιτυγχάνεται μέσω των βακτηριακών προσκολλητινών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με επιθηλιακούς υποδοχείς που έχουν το διασακχαρίτη GlcNAc₆-4Gal.

Επίσης, τα περισσότερα είδη του *H. influenzae*, είναι μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Συχνότερα αποικίζουν το ρινοφάρυγγα των υγιών παιδιών τα μη ελυτροφόρα στελέχη *H. influenzae*, που ανήκουν στους βιοτύπους II και III (60-90%)⁴. Ελυτροφόρα στελέχη *H. influenzae* μπορεί να αποτελούν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του ανώτερου αναπνευστικού στα παιδιά. Σε μη εμβολιασθέντες πληθυσμούς ο αποικισμός με *H. influenzae type b* ανευρίσκεται σε λιγότερο από 1% των υγιών νεογνών και βρεφών και σε 3-5% των παιδιών^{5,6,7}. Στην προσκόλληση του μικροβίου στα επιθηλιακά κύτταρα του ρινοφάρυγγα συμμετέχουν τα ινίδια ως παράγοντες προσκόλλησης. Η παραγωγή των ινιδίων ελέγχεται από τα γονίδια *hifA*, *hifB*, *hifC*, *hifD* και *hifE* και βρίσκονται σε στελέχη *H. influenzae type b* καθώς και σε μη ελυτροφόρα στελέχη *H. influenzae*.

Σύμφωνα με μελέτες η *M. catarrhalis* αποικίζει επίσης το ρινοφάρυγγα των υγιών παιδιών σε ποσοστό που κυμαίνεται από 7 έως 36% (Verhaegh et al., 2010). Αρκετοί συγγραφείς έχουν δείξει ότι παρατηρείται εποχιακή διακύμανση στον αποικισμό του ρινοφάρυγγα από την *M. catarrhalis* με υψηλότερα ποσοστά αποικισμού κατά τους χειμερινούς μήνες^{8,9,10}. Η ανάλυση επιδημιολογικών μελετών αποκαλύπτει σημαντικές διαφορές ανά περιοχές στα ποσοστά του αποικισμού των βρεφών από την *M. catarrhalis*.

Από τα υπόλοιπα δυνητικά παθογόνα βακτήρια ο *S. pyogenes* αποικίζει το ρινοφάρυγγα υγιών παιδιών σε ποσοστό, που τους χειμερινούς μήνες φτάνει το 20 % και ο *S. aureus* αποικίζει συχνότερα την πρόσθια ρινική κοιλότητα, όπου φαίνεται ότι μπορεί να γίνει εύκολα η προσκόλληση του μικροοργανισμού με τη βοήθεια του τείχοϊκού οξέος¹¹. Αξίζει να σημειωθεί, ότι στην προσκόλληση του *S. aureus* στο βλενογόνο της ρινικής κοιλότητας συμβάλλουν η πρωτεΐνη επιφανείας G (*SasG*), ο παράγοντας προσκόλλησης (*clumping factor*) και οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν την ινωδονεκτίνη. Η επιβίωση και η ανάπτυξη του *S. aureus* στις ρινικές εκκρίσεις οφείλεται στην ικανότητά του να αναπτύσσεται σε συνθήκες υψηλής ωσμωτικής πίεσης και χαμηλής υγρασίας. Σε

μια μελέτη στη νότια Ελλάδα σε παιδιά ηλικίας 14 μηνών έως 10 ετών βρέθηκε ότι το ποσοστό αποικισμού των παιδιών με στελέχη *S. aureus* ήταν υψηλό (59%), ενώ το ποσοστό αποικισμού με στελέχη MRSA ήταν 5,5%¹². Σε μια άλλη μελέτη που διεξήχθη στην Ιαπωνία η ρινική φορεία του *S. aureus* στα παιδιά ήταν 28% και το ποσοστό αποικισμού με στελέχη MRSA ήταν 4,3%¹³.

Τα δυνητικά παθογόνα βακτήρια του ρινοφάρυγγα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι σημαντικές για την ανάπτυξη νόσου. Ο βακτηριακός όμως αποικισμός του ρινοφάρυγγα συσχετίζεται τόσο με τις ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος όσο και με τις διεισδυτικές βακτηριακές λοιμώξεις¹⁴. Υπάρχουν μελέτες τα αποτελέσματα των οποίων βασίζονται κύρια σε επιδημιολογικές ή κλινικές παρατηρήσεις αλλά και σε πειραματικά δεδομένα και τονίζουν τη σημασία της αλληλεπίδρασης ιών – βακτηρίων καθώς και τη συσχέτιση των ιογενών λοιμώξεων με δευτεροπαθείς αναπνευστικές ή διεισδυτικές βακτηριακές λοιμώξεις.

1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΙΟΓΕΝΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Από επιδημιολογικές μελέτες είναι γνωστό ότι οι ιογενείς αναπνευστικές λοιμώξεις συσχετίζονται με αύξηση της συχνότητας των βακτηριακών λοιμώξεων^{15,16,17,18}. Συγκεκριμένα έχουν περιγραφεί επιδημικές εξάρσεις πνευμονιοκοκκικής βακτηριαμίας που ακολουθούν την ετήσια επιδημική έξαρση της εποχιακής γρίπης.

Σε μια μελέτη στην Iowa των ΗΠΑ αναφέρθηκε μία έξαρση πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας σε παιδιά (Νοέμβριος 1995 - Ιανουάριος 1996) με ταυτόχρονη έξαρση γρίπης με κύριο αίτιο τον IFV τύπου A (H1N1) για πρώτη φορά μετά το 1989. Οι ασθενείς με σοβαρή πνευμονιοκοκκική πνευμονία ανέφεραν συχνότερα συμπτώματα νόσου, που μοιάζει με γρίπη (influenza-like illness) 7-28 μέρες πριν την εισαγωγή τους, σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς πνευμονιοκοκκική λοίμωξη, ενώ ήταν και συχνότερα ορολογικά θετικοί για γρίπη. Επίσης, άτομα της οικογένειας αυτών των ασθενών ανέφεραν συχνότερα γριπώδη συνδρομή 28 μέρες πριν την εισαγωγή τους. Η μελέτη αυτή αποτέλεσε ένδειξη ότι η λοίμωξη από IFV οδήγησε σε σοβαρή πνευμονιοκοκκική πνευμονία σε αυτά τα παιδιά¹⁶, ενώ ο κίνδυνος για τα παιδιά που είχαν ιστορικό γριπώδους συνδρομής 7-28 ημέρες νωρίτερα να εκδηλώσουν σοβαρή διεισδυτική νόσο από πνευμονιόκοκκο υπολογίστηκε σε 12,4 φορές υψηλότερος σε σύγκριση με τα παιδιά που δεν είχαν εμφανίσει γριπώδη συνδρομή.

Η σχέση της λοίμωξης από τον ιό της γρίπης με την ανάπτυξη πνευμονίας αλλά και διεισδυτικών λοιμώξεων κυρίως από πνευμονιόκοκκο έχει μελετηθεί ιδιαίτερα. Υπάρχουν ευρήματα που καταδεικνύουν ότι η κύρια αιτία θανάτου κατά τη διάρκεια πανδημίας της γρίπης του 1918, αλλά και αυτής του 1957 και 1967 ήταν η διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσος^{19,20}. Υπολογίζεται ότι από την πανδημία της γρίπης του 1918 χάθηκαν 20-50 εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο, ενώ νόσησαν 200 εκατομμύρια έως 1 δις άνθρωποι. Σύγχρονοι ερευνητές διενήργησαν ιστολογική εξέταση σε πνευμονικό ιστό θυμάτων της γρίπης του 1918 σε δείγματα που είχαν φυλαχθεί και διαπίστωσαν σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις ευρήματα βαριάς βακτηριακής πνευμονίας που είτε αποτελούσαν το κύριο ιστολογικό εύρημα είτε συνυπήρχε με ιστολογικά ευρήματα που σήμερα θεωρούνται ότι οφείλονται στον ιό της γρίπης. Ο ιός της γρίπης πιστεύεται ότι προκαλεί νέκρωση και απόπτωση του αναπνευστικού επιθηλίου του τραχειοβρογχικού δένδρου και των βρογχιολίων, διάταση των κυψελιδικών πόρων και αναδόμηση του επιθηλίου. Οι ίδιοι σύγχρονοι ερευνητές, που διενήργησαν ιστολογικές επανεξετάσεις, μελέτησαν τα βακτηριολογικά αποτελέσματα σε σειρές αυτοψιών που έγιναν εκείνη την εποχή σε θύματα της γρίπης. Η καλλιέργεια αίματος ήταν θετική στο 70% των περιπτώσεων και η καλλιέργεια πλευριτικού υγρού στο 80%. Από τα αποτελέσματα των μελετών αυτών διαπιστώθηκε ότι ο πνευμονιόκοκκος ήταν το συχνότερο βακτήριο στο αίμα και ο πυογόνος στρεπτόκοκκος στο πλευριτικό υγρό. Επίσης, οι καλλιέργειες αίματος από τους ασθενείς που βρίσκονταν στη ζωή και είχαν νοσήσει από τον ιό της γρίπης κατά τη διάρκεια της πανδημίας του 1918 και δεν είχαν πνευμονία ήταν θετικές μόνο σε ποσοστό

1%. Αντίθετα, από τους ασθενείς με πνευμονία οι καλλιέργειες ήταν θετικές σε ποσοστό 16% και πιο συχνά ακόμη σε αυτούς που απεβίωσαν.

Ένα άλλο εύρημα σχετικά με τη γρίπη του 1918 που αξίζει να σημειωθεί είναι η κατανομή των οροτύπων του πνευμονιοκόκκου όπως αυτό διαπιστώθηκε με τους αντιορούς και το σύστημα κατάταξης της εποχής. Σε καλλιέργειες που ελήφθησαν από ζώντες πάσχοντες με πνευμονία διαπιστώθηκε αύξηση του οροτύπου IV σε σύγκριση με την προ – πανδημική εποχή. Οι πνευμονιόκοκοι οροτύπου IV ήταν λιγότερο παθογόνοι και ήταν πιο συχνοί σε στελέχη που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα. Το εύρημα αυτό είναι ένδειξη ότι η γρίπη αυξάνει την ευαισθησία στον πνευμονιόκοκκο, γιατί αυξάνει την ευαισθησία του ξενιστή σε δευτερογενή λοίμωξη από παθογόνα, τα οποία συνήθως αποικίζουν το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα και δεν είναι πολύ επιθετικά²⁰.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι τόσο η γρίπη όσο και η διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσος εμφανίζουν έξαρση το χειμώνα στις περισσότερες εύκρατες χώρες²¹, όμως η διάρκεια της αιχμής της δεύτερης είναι μεγαλύτερη, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στο ότι εκτός από τη γρίπη και άλλοι ιοί πιθανότατα συμβάλλουν στην εκδήλωση των επιδημικών αυτών εξάρσεων. Σε αναδρομική μελέτη (που διεξήχθη από τον Ιανουάριο του 1996 έως τον Ιούνιο του 2003) στη Δανία σε παιδιά ηλικίας <2 ετών παρατηρήθηκε ότι η νοσηλεία για λοίμωξη από RSV αυξάνει τον κίνδυνο για διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσο μέσα σε χρονικό διάστημα 30 ημερών από την εισαγωγή τους, ενώ το ίδιο ισχύει και για τη νοσηλεία για άλλες ιογενείς αναπνευστικές λοιμώξεις που δεν οφείλονται στον RSV¹⁰².

Σε μια άλλη μελέτη στο Houston του Texas στις ΗΠΑ παρατηρήθηκε ότι σε βρέφη και παιδιά η επίπτωση των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων ήταν μεγαλύτερη από τον Οκτώβριο μέχρι το Μάιο με σημαντική ελάττωση κατά τους θερινούς μήνες και συσχετίζεται με την απομόνωση των ιών RSV, IFV και AVs²². Σε παρόμοια μελέτη οι Talbot και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι η επίπτωση της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου είναι μεγαλύτερη όταν η κυκλοφορία στην κοινότητα των ιών RSV και IFV είναι αυξημένη²³.

Άλλα επιδημιολογικά δεδομένα επίσης δείχνουν ότι η λοίμωξη από RSV στα παιδιά σχετίζεται σημαντικά με διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις²⁴, ενώ η βαριά βρογχιολίτιδα από RSV που οδηγεί σε εισαγωγή στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο βακτηριακής πνευμονίας²⁵.

Σε μια μελέτη τα 70 από τα 165 παιδιά (42%) με βαριά βρογχιολίτιδα από RSV και ταυτόχρονη βακτηριακή λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος οδηγήθηκαν στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, αντίθετα από τα παιδιά που είχαν μόνο RSV λοίμωξη και δεν απαιτήθηκε αναπνευστική υποστήριξη²⁵. Ο RSV αναφέρεται ως προδιαθεσικός παράγοντας δευτερογενών βακτηριακών λοιμώξεων της αναπνευστικής οδού σε παιδιά με πιο κοινά παθογόνα αίτια τους *Streptococcus pneumoniae* και *Haemophilus influenzae*, με το τελευταίο να απαντά μόνο σε ασθενείς με προϋπάρχουσα πνευμονική νόσο²⁷.

Από την άλλη μεριά, σε αναδρομική μελέτη που διεξήχθη στο Kingsville των ΗΠΑ για χρονικό διάστημα 8 ετών (Ιούλιος 1991 – Ιούνιος 1998) διαπιστώθηκε ότι βρέφη και παιδιά που νοσηλεύτηκαν για λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος από RSV σπάνια παρουσίασαν ταυτόχρονα σοβαρή βακτηριακή λοίμωξη²⁸.

Τα πρώτα επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με την αλληλεπίδραση ιών-βακτηρίων προέρχονται από τις παρατηρήσεις των Straker και συνεργατών του και καταδεικνύουν την αύξηση της ρινικής φορέας του πνευμονιόκοκκου μετά την έναρξη του κοινού κρυολογήματος²⁹. Αργότερα σε άλλη μελέτη των Brimblecombe και συνεργατών για τη μετάδοση των ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος μεταξύ των μελών των οικογενειών διαπιστώθηκε ότι οι ιογενείς λοιμώξεις ευνοούν τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα με *Streptococcus pneumoniae*³⁰.

Σε ένα πλήθος πρόσφατων παρατηρήσεων διαπιστώθηκε ότι οι ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος σε παιδιά που προκαλούνται από τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV), τον ιό της γρίπης (IFV), τον ανθρώπινο μεταπνευμονοϊό (hMPV) και το ρινοϊό (RV) συσχετίζονται με αυξημένο αριθμό εισαγωγών στο νοσοκομείο για διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσο³¹, ενώ δεν παρατηρήθηκε παρόμοια σχέση για τον ιό παραινφλουέντσας (PIV) και τους αδενοϊούς (AVs)³¹.

Στη μελέτη των Kim και συνεργατών μελετήθηκαν 480 περιστατικά διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου (IPD) σε παιδιά και ενήλικες για μια περίοδο 3 ετών³³. Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι στους ενήλικες η διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσος συσχετίζεται με μόλυνση από τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV) και τον ιό της γρίπης (IFV), ενώ αντίθετα στα παιδιά παρατηρήθηκε μέτρια συσχέτιση της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου με μόλυνση από τους αδενοϊούς, τον RSV και τον IFV³³.

Σε άλλη μελέτη διάρκειας 1 έτους στην Αυστραλία, οι Watson και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι η διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσος στα παιδιά συσχετίζεται με τη λοίμωξη από τον RSV, αλλά όχι με τον IFV³⁴. Επιπλέον, σε πρόσφατη μελέτη από τη Φινλανδία, μελετήθηκε η συσχέτιση της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου με τη μόλυνση από τον RV μεταξύ των παιδιών ηλικίας κάτω των 5 ετών³⁵. Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής διαπιστώθηκε ότι τα περιστατικά διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου ήταν 2,9 περιπτώσεις ανά εβδομάδα σε περιόδους που η κυκλοφορία στην κοινότητα του RV ήταν αυξημένη.

Οι Talbot και συνεργάτες μελέτησαν 4.147 περιπτώσεις διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου στις ΗΠΑ, εκ των οποίων το 28,5% αφορούσε παιδιά³⁶. Οι ερευνητές παρατήρησαν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου και λοίμωξης από τον RSV τόσο στα παιδιά όσο και στους ενήλικες. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε επίσης συσχέτιση μεταξύ διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου και λοίμωξης από τον IFV, η οποία ήταν ισχυρότερη στους ενήλικες σε σύγκριση με τα παιδιά.

Άλλες μελέτες αποδεικνύουν ότι οι ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος συσχετίζονται με δευτεροπαθή βακτηριακή πνευμονία³⁷ και οξεία μέση ωτίτιδα³⁸. Στη Γερμανία αναφέρθηκε ότι περίπου 25% των παιδιών, που νοσηλεύονταν με δευτεροπαθή βακτηριακή λοίμωξη είχαν επιβεβαιωμένη λοίμωξη από IFV³⁹.

Πρόσφατες μελέτες που εξέτασαν την αιτιολογία της πνευμονίας της κοινότητας με την χρήση μη συμβατικών μεθόδων, όπως PCR για ιούς και ορολογικές μεθόδους για τον πνευμονιόκοκκο, ενισχύουν την υπόθεση της συνέργειας ιών και βακτηρίων στην εκδήλωση πνευμονίας. Σε μια μελέτη, το 30% των 254 παιδιών που νοσηλεύονταν για πνευμονία είχαν απόδειξη μικτής ιογενούς και βακτηριακής λοίμωξης⁴⁰. Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε με ορολογικές μεθόδους ότι το 39% των νοσηλευόμενων παιδιών με RSV λοίμωξη και πνευμονία ή οξεία μέση ωτίτιδα είχαν λοίμωξη από πνευμονιόκοκκο. Σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε ταυτόχρονη λοίμωξη από κάποιο ιό στο 23% των 154 περιπτώσεων πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας σε παιδιά, η οποία διαγνώσθηκε με την χρήση PCR⁴¹. Υπάρχει όμως και μια ελληνική μελέτη (Τσολιά Μ. και συνεργάτες, 2004) σύμφωνα με την οποία διαπιστώθηκε ότι περίπου 65% των παιδιών σχολικής ηλικίας, που νοσηλεύονταν με πνευμονία της κοινότητας είχαν επίσης προσβληθεί από κάποιον ιό⁴².

Επιπλέον, σε μια άλλη μελέτη που διεξήχθη στο βόρειο τμήμα της Ταϊβάν το 33% των παιδιών που νοσηλεύονταν με πνευμονία της κοινότητας είχαν απόδειξη μικτής ιογενούς και βακτηριακής λοίμωξης⁴³. Ενώ σε μια μελέτη από τη Νέα Ζηλανδία οι 45 από τους 304 (15%) ασθενείς που νοσηλεύονταν με πνευμονία της κοινότητας είχαν ταυτόχρονη λοίμωξη από κάποιο ιό. Οι ιοί που απομονώθηκαν συχνότερα ήταν οι ρινοϊοί (RVs) και ο ιός της γρίπης Α (IFV). Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι η συνέργεια των RVs και του πνευμονιόκοκκου προκαλεί σοβαρή νόσο. Στη Φινλανδία η συνέργεια των RVs και του πνευμονιόκοκκου ήταν η πιο συχνή (16%) μεταξύ των παιδιών που νοσηλεύονταν με πνευμονία της κοινότητας⁴⁴.

Υπάρχουν όμως και δεδομένα για την αλληλεπίδραση των ιών που προσβάλλουν το αναπνευστικό σύστημα με τα υπόλοιπα δυνητικά παθογόνα βακτήρια που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα⁴⁵. Συγκεκριμένα, σε παιδιά με λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (συμπεριλαμβανομένης της οξείας μέσης ωτίτιδας) διαπιστώθηκε μεγαλύτερη συχνότητα αποικισμού του ρινοφάρυγγα με *M. catarrhalis* (έως και 50%) (Bernier et al., 1996, Konno et al., 2006, Pettigrew et al., 2008).

Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η λοίμωξη με τον ιό της γρίπης τύπου Α ευνοεί την προσκόλληση του *S. aureus* στο ρινικό βλεννογόνο⁴⁶. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η λοίμωξη από *Staphylococcus aureus* μπορεί να εμφανιστεί ως δευτερογενής επιπλοκή της γρίπης, ιδιαίτερα σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε ότι η λοίμωξη από τον ιό της γρίπης επιδεινώνεται ύστερα από επιμόλυνση με *Staphylococcus aureus*^{47,48}.

1.2 ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ H1N1 ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Αξίζει να αναφερθεί, ότι από την ανάλυση των δεδομένων από 5032 ασθενείς με πνευμονία της κοινότητας στη Γερμανία προκύπτει, ότι η θνητότητα που παρατηρήθηκε ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς με πνευμονία και επιβεβαιωμένη λοίμωξη από IFV σε σύγκριση με τους ασθενείς, στους οποίους το αίτιο της πνευμονίας ήταν αποκλειστικά ο ιός της γρίπης (9% έναντι 3,2%)⁴⁹.

Πρόσφατα, συνοψίσθηκαν τα ευρήματα των 124 περιπτώσεων θανατηφόρου γρίπης H1N1 σε παιδιά στις Η.Π.Α.. Τα περιστατικά αυτά καταγράφηκαν κατά το πρώτο πανδημικό κύμα την άνοιξη και κατά μέρος του δευτέρου κύματος, που εκδηλώθηκε το φθινόπωρο του 2009. Οι 17/53 (32%) ασθενείς, από τους οποίους ελήφθησαν δείγματα από στείρα υγρά είχαν θετικές καλλιέργειες. Τα αίτια ήταν *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* και *Streptococcus pyogenes*⁵⁰. Θα πρέπει όμως να αναφερθεί, ότι κατά την πανδημία H1N1 ενήλικοι και παιδιά εμφάνισαν σε αρκετές περιπτώσεις βαριά πνευμονία για την οποία δεν αποδείχθηκε η συμμετοχή βακτηριακού παθογόνου και το αίτιο ήταν αποκλειστικά ο ιός της γρίπης.

Σε μια μελέτη στην Κορέα κατά την πανδημία H1N1 το 2009 καταγράφηκαν 115 θανατηφόρες περιπτώσεις. Οι καλλιέργειες αίματος και πτυέλων ήταν θετικές σε 34/115 (30%) ασθενείς από τους οποίους ελήφθησαν δείγματα και είχαν επιβεβαιωμένη λοίμωξη H1N1⁵¹. Σε άλλη μελέτη στη Συρία κατά την πανδημία H1N1 οι 34 από τους 80 ασθενείς (42.5%) οδηγήθηκαν στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας με δευτερογενή βακτηριακή πνευμονία⁵². Στην Καλιφόρνια οι 3 από τις 9 θανατηφόρες περιπτώσεις (33%), που αφορούσαν παιδιά και που νοσηλεύτηκαν με επιβεβαιωμένη λοίμωξη H1N1 είχαν και στοιχεία δευτερογενούς βακτηριακής λοίμωξης της αναπνευστικής οδού⁵³.

Επιπλέον, σε άλλη μελέτη περιγράφηκαν από το CDC τα χαρακτηριστικά 93 παιδιών και εφήβων (<18 ετών) που απεβίωσαν από γρίπη κατά τη διάρκεια της ετήσιας επιδημικής έξαρσης από εποχιακή γρίπη στις Η.Π.Α.. Η διάμεση ηλικία των παιδιών ήταν 4 έτη και το 38% είχε υποκείμενο νόσημα, ενώ τα 25 από τα 93 παιδιά είχαν πνευμονία. Η διεισδυτική βακτηριακή λοίμωξη διαπιστώθηκε σε 15 παιδιά και συσχετίστηκε με διάφορα βακτήρια⁵⁴.

Στην Ισπανία μελετήθηκαν 210 ασθενείς, που νοσηλεύτηκαν λόγω της πανδημίας της γρίπης του 2009. Οι 36/210 (17%) είχαν ταυτόχρονη βακτηριακή λοίμωξη. Το πιο συχνό αίτιο των βακτηριακών λοιμώξεων ήταν ο *S. pneumoniae* σε 26/36 (72%) ασθενείς. Κανένας από αυτούς τους ασθενείς δεν είχε εμβολιαστεί κατά του πνευμονιόκοκκου⁵⁵. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι στην πρώτη μετα-πανδημική περίοδο γρίπης καταγράφηκε υψηλή συχνότητα μικτών ιογενών και βακτηριακών λοιμώξεων (από 10% σε 21.7%) μεταξύ ενηλίκων και παιδιών που νοσηλεύθηκαν σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας στην Ισπανία⁵⁶.

1.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΝΕΡΓΕΙΑΣ ΙΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Ως πιθανοί μηχανισμοί αλληλεπίδρασης ιών – βακτηρίων έχουν θεωρηθεί η αύξηση της βακτηριακής προσκολλητικότητας λόγω καταστροφής του επιθηλίου της αναπνευστικής οδού από τον ιό, η καταστολή της ανοσολογικής απάντησης στη βακτηριακή λοίμωξη και η υπερέκφραση υποδοχέων για τα βακτήρια λόγω της φλεγμονώδους απάντησης στην ιογενή λοίμωξη⁵⁷. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι όταν οι ιοί καταστρέφουν το αναπνευστικό επιθήλιο η βασική μεμβράνη είναι εκτεθειμένη στον βακτηριακό αποικισμό.

1.3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΕΡΓΕΙΑ ΙΩΝ-ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί από τους Mc Cullers και συνεργάτες με την χρήση ποντικών ως πειραματικού μοντέλου μελέτης της συνέργειας του πνευμονιοκόκκου με τον ιό της γρίπης. Οι πρώτες από τις μελέτες της ομάδας αυτής έδειξαν ότι, εάν τα πειραματόζωα μολυνθούν με μη θανατηφόρο δόση πνευμονιοκόκκου 7 ημέρες μετά την αρχική έκθεση σε ιό γρίπης, παρατηρείται συνέργεια των δύο παθογόνων, η οποία οδηγεί σε υψηλή ευαισθησία στην πνευμονιοκοκκική πνευμονία⁵⁸, αυξημένο βακτηριακό φορτίο⁵⁹, μαζική αιμορραγία στον πνεύμονα⁶⁰, ή ακόμη και σε 100% θνητότητα^{60,61}. Σε πειράματα που προηγήθηκε ο ενοφθαλμισμός με πνευμονιόκοκκο και ακολούθησε η μόλυνση με τον ιό της γρίπης δεν παρατηρήθηκε συνέργεια στην πρόκληση θανάτου στα πειραματόζωα^{60,58,59,61}, αλλά αντίθετα διαπιστώθηκε προστασία από τον ιό και βελτιωμένη επιβίωση. Επιπλέον, η μόλυνση των ποντικών μόνο με IFV ή *S. pneumoniae* έχει δείχθει ότι επάγει μέτρια πνευμονία⁶⁰.

Πρόσφατα, παρατηρήθηκε ότι και η μόλυνση ποντικών από τον ανθρώπινο MPV⁶² και τον RV⁶³ σχετίζεται με την ανάπτυξη δευτερογενούς βακτηριακής λοίμωξης. Σε ένα άλλο πειραματικό μοντέλο παρατηρήθηκε ότι η μόλυνση ποντικών από σύμπλοκα RSV-πνευμονιόκοκκου συσχετίζεται με υψηλά ποσοστά βακτηριαιμίας, ενώ παράλληλα διαπιστώθηκε και αυξημένη προσκολλητικότητα των συμπλόκων στα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού των ποντικών.

Χρησιμοποιώντας το ίδιο πειραματικό μοντέλο της ομάδας των McCullers και συνεργατών, άλλοι ερευνητές έδειξαν ότι στα ποντίκια η προκαλούμενη από τη λοίμωξη με τον ιό της γρίπης αύξηση της παραγωγής ιντερφερόνης γ ευθύνεται για την ευαισθησία που εμφανίζουν τα πειραματόζωα στον πνευμονιόκοκκο για 7 ημέρες μετά τη γρίπη. Τα πειραματόζωα με ανεπάρκεια της ιντερφερόνης γ προστατεύονται από τη συνεργική δράση του ιού και του πνευμονιοκόκκου. Πιστεύεται ότι η ιντερφερόνη γ αναστέλλει τη λειτουργία των κυψελιδικών μακροφάγων μέσω αναστολής του υποδοχέα MARCO⁶⁴. Είναι πιθανό ότι με τον ίδιο μηχανισμό και άλλες ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος αυξάνουν την ευαισθησία στον πνευμονιόκοκκο. Επίσης, σε πειραματικό μοντέλο διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της παραγωγής ιντερφερόνης γ μετά από τη λοίμωξη με τον ιό της γρίπης αναστέλλει τη φαγοκυττάρωση του *S.aureus* από τα κυψελιδικά μακροφάγα⁶⁵.

Οι Didierlaurent και συνεργάτες⁸³ παρατήρησαν ότι ένας άλλος μηχανισμός συνέργειας είναι η απευαισθητοποίηση των Toll-like receptors σε μικροβιακά μόρια σύνδεσης (ligands) για αρκετούς μήνες μετά τη γρίπη ή μετά τη λοίμωξη από RSV και έχει ως συνέπεια τη μείωση της παραγωγής χημειοκινών και της ενεργοποίησης του NF-κΒ από τα κυψελιδικά μακροφάγα. Η απευαισθητοποίηση αυτή μπορεί να είναι ωφέλιμη, διότι μειώνει τη φλεγμονή, ταυτόχρονα όμως μειώνεται και η κινητοποίηση των πολυμορφοκυττάρων με αποτέλεσμα την αύξηση του βακτηριακού φορτίου κατά τη διάρκεια της δευτερογενούς λοίμωξης.

Όπως είναι γνωστό, μόρια του τοιχώματος του πνευμονιοκόκκου ενεργοποιούν TLR υποδοχείς (TLR 2 και TLR 4) με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών αλλά και της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10^{60,58}. Ο ιός της γρίπης επίσης ενεργοποιεί TLR υποδοχείς (TLR7, TLR8 και TLR3). Και τα δύο παθογόνα ενεργοποιούν τους ίδιους παράγοντες δημιουργώντας έτσι ευκαιρίες για αναστολή ή ενίσχυση της ανοσιακής απάντησης κατά τη διάρκεια ταυτόχρονης ή διαδοχικής λοίμωξης. Σε πειραματικά μοντέλα σε ποντίκια έχει δειχθεί μεγάλη αύξηση προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών κατά τη διάρκεια δευτερογενούς πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης μετά από γρίπη.

1.3.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΤΙΚΟΤΗΤΑ

Αυξημένη προσκολλητικότητα με *S. pneumoniae*, *S. aureus* και *S. pyogenes* έχει παρατηρηθεί in vivo και in vitro σε επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού, τα οποία είχαν μολυνθεί με αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (respiratory syncytial virus – RSV), ιό γρίπης (influenza virus - IFV), αδενοϊούς (adenoviruses – AVs) και ρινοϊούς (rhinoviruses - RVs)^{66,67,68,69}.

Η προσκολλητικότητα του *S. pneumoniae* στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος αυξάνεται μετά από λοίμωξη με RSV⁷⁰ λόγω της αυξημένης έκφρασης των επιθηλιακών υποδοχέων ICAM-1 και PAFR⁷¹. Επιπλέον, οι γλυκοπρωτεΐνες του RSV που εκφράζονται στην επιφάνεια μολυσμένων κυττάρων ενεργούν ως υποδοχείς του βακτηρίου και παίζουν ρόλο στην αυξημένη προσκολλητικότητα του *S. pneumoniae* στα επιθηλιακά κύτταρα. Επίσης, πειραματικά διαπιστώθηκε ότι η απευθείας σύνδεση του RSV με τον *S. pneumoniae* μέσω της πρωτεΐνης G του RSV είναι ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίον ο RSV μπορεί να διεγείρει τη σύνδεση του βακτηρίου με τα επιθηλιακά κύτταρα⁷⁰.

Σε μια μελέτη οι Avadhanula και συνεργάτες διαπίστωσαν in vitro αυξημένη προσκολλητικότητα του non-typeable *H. influenzae* (NTHI) και του *S. pneumoniae* σε αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα μετά από μόλυνση με τον ιό παραγρίπης (PIV-3), IFV και RSV⁷¹.

Οι AVs και πιο συγκεκριμένα οι ορότυποι 1,2,3 και 5, που συνήθως προκαλούν λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος αυξάνουν την προσκολλητικότητα στελεχών *S.*

pneumoniae στα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού. Ειδικότερα, έχει εκφραστεί η υπόθεση ότι η λοίμωξη με αυτούς τους οροτύπους ευνοεί τη σύνδεση των υποδοχέων των επιθηλιακών κυττάρων με τον *S. pneumoniae*⁷³.

Σε πιο πρόσφατη έρευνα μελετήθηκαν οι πιθανοί μηχανισμοί αύξησης της παθογονικότητας με την ταυτόχρονη λοίμωξη. Είναι γνωστό ότι τόσο ο ιός της γρίπης όσο και ο πνευμονιόκοκκος διαθέτουν το ένζυμο νευραμινιδάση. Η νευραμινιδάση αποκόπτοντας μόρια σιαλικού οξέος είναι πιθανό να αποκαλύπτει και να ενεργοποιεί υποδοχείς προσκόλλησης στην επιφάνεια του πνευμονιοκόκκου⁷⁴. Έτσι, τα βακτήρια προσκολλώνται πιο αποτελεσματικά στα κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου. Συνεπώς, η συνδυασμένη δράση βακτηριακής και ιικής νευραμινιδάσης μπορεί να είναι ένας σημαντικός παράγοντας συνέργειας μεταξύ των μικροοργανισμών αυτών.

Αντίθετα, η μόλυνση με τον ιό της παραγρίπης (PIV), ο οποίος φέρει επίσης τη γλυκοπρωτεΐνη νευραμινιδάση δεν οδηγεί σε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης δευτερογενούς βακτηριακής πνευμονίας⁷⁵.

Επιπλέον, σε ένα πειραματικό μοντέλο διαπιστώθηκε ότι ο IFV αυξάνει την προσκολλητικότητα του πνευμονιοκόκκου και τη διεισδυτικότητά του στους πνεύμονες μέσω διέγερσης των υποδοχέων του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor receptors – PAFr)⁶¹. Σε μια άλλη μελέτη αμφισβητήθηκε η σημασία των υποδοχέων του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAFR) στη συνέργεια του πνευμονιοκόκκου με τον ιό της γρίπης⁷⁷.

1.4 ΠΡΟΛΗΨΗ-ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Προκειμένου να ληφθούν προληπτικά μέτρα κατά των λοιμώξεων του αναπνευστικού, καθώς και κατά της διεισδυτικής νόσου είναι σημαντική η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δυνητικά παθογόνων βακτηρίων, που αποικίζουν το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα.

Αρκετές μελέτες καταδεικνύουν μια ανταγωνιστική σχέση μεταξύ *S. pneumoniae* και *S. aureus* στον αποικισμό του ρινοφάρυγγα των υγιών παιδιών^{78,79,80,81,82}. Σε άλλες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η σχέση μεταξύ *S. pneumoniae* και *H. influenzae* είναι συνεργική^{37,81,82}, αν και σε πειραματικές μελέτες παρατηρήθηκε ότι πρόκειται για ανταγωνιστική σχέση¹⁰⁴. Επιπλέον, αμοιβαία θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ *M. catarrhalis* και *H. influenzae*⁸⁴.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι σε μια μελέτη από τους van Gils και συνεργάτες (2011) παρατηρήθηκε μια παροδική αύξηση του αποικισμού με *S. aureus* σε νήπια 12 μηνών, που είχαν εμβολιαστεί με το 7-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο^{80,71}.

Για την πρόληψη και την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από τον *H. influenzae* type b και τον *S. pneumoniae* στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμού της χώρας μας περιλαμβάνονται συζευγμένα εμβόλια έναντι αυτών. Το συζευγμένο εμβόλιο έναντι του *H. influenzae* type b έχει συμπεριληφθεί στο πρόγραμμα από το 1994, ενώ το 7-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο έναντι του *S. pneumoniae* από το 2006. Αξίζει να σημειωθεί, ότι το 7-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε στη χώρα μας από το 2004, ενώ το 2010 συμπεριλήφθηκε στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμού και το 13-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο έναντι του *S. pneumoniae*. Σε μια πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στους παιδικούς σταθμούς του Δήμου Αθηναίων διαπιστώθηκε ότι το 90% των παιδιών είχαν εμβολιαστεί με το συζευγμένο εμβόλιο έναντι του *H. influenzae* type b και 73% των παιδιών με συζευγμένο εμβόλιο έναντι του *S. pneumoniae*²⁶.

Η πρόληψη και η θεραπεία της ιογενούς λοίμωξης έχει ιδιαίτερη σημασία για την αποτροπή και της δευτερογενούς βακτηριακής προσβολής. Σε ένα πειραματικό μοντέλο διαπιστώθηκε, ότι η αντιμετώπιση της λοίμωξης από τον IFV με χορήγηση εκλεκτικού αναστολέα της νευραμινιδάσης (οσελταμαβίρη) είναι δυνατόν να περιορίσει την έκταση της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας κατά την πρώιμη λοίμωξη και να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της αντιμικροβιακής θεραπείας έναντι της δευτερογενούς βακτηριακής πνευμονίας^{86,87}. Στη μελέτη αυτή επιβεβαιώθηκε και η σημασία της νευραμινιδάσης ως μορίου σημαντικού για τη συνεργική δράση του ιού της γρίπης με τον πνευμονιόκοκκο. Οι μελέτες σε ανθρώπους έχουν επιβεβαιώσει τα ευρήματα των δεδομένων στα πειραματόζωα. Η χορήγηση οσελταμιβίρης σε παιδιά με γρίπη είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συχνότητας εκδήλωσης οξείας μέσης ωτίτιδας και της χρήσης των αντιβιοτικών³².

Ο εμβολιασμός κατά της γρίπης είναι σημαντικός και προστατεύει από τη γρίπη και τις δευτερογενείς βακτηριακές επιπλοκές. Στα παιδιά με τον εμβολιασμό μειώνεται η συχνότητα της οξείας μέσης ωτίτιδας κατά 32% - 36%³². Η συνδυασμένη χορήγηση του εμβολίου της γρίπης και του 23-δύναμου πολυσακχαριδικού εμβολίου του πνευμονιοκόκκου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των εισαγωγών για πνευμονία, διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις και θνησιμότητα³².

Σύμφωνα και με τις συστάσεις για τον εμβολιασμό του πνευμονιοκόκκου για προφύλαξη από την πανδημία γρίπης θα πρέπει τα μικρά παιδιά (ηλικίας < 5 ετών) να εμβολιάζονται με το συζευγμένο εμβόλιο πνευμονιοκόκκου. Ένας σημαντικός αριθμός εισαγωγών σε νοσοκομείο παιδιών με λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού με πιθανή συμμετοχή του *S. pneumoniae* μπορεί να προληφθεί με τη χορήγηση συζευγμένου εμβολίου έναντι του πνευμονιοκόκκου⁸⁸. Σε μία κλινική μελέτη που διεξήχθη σε περίπου 37.000 παιδιά στη Ν. Αφρική, εξετάστηκε το αποτέλεσμα του εμβολιασμού με το 9-δύναμο εμβόλιο πνευμονιοκόκκου. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι το συζευγμένο εμβόλιο έναντι του πνευμονιοκόκκου, εκτός από προστασία έναντι των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, παρέχει κατά 30% προστασία έναντι της ιογενούς πνευμονίας που οφείλεται σε 7 διαφορετικούς ιούς. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι η αποτελεσματικότητα του PCV9 κατά της πνευμονίας σχετιζόμενης με λοίμωξη από τον ιό της γρίπης ήταν 45% άσχετα με την ύπαρξη ή όχι HIV λοίμωξης. Παρόμοια αποτελεσματικότητα διαπιστώθηκε και κατά της πνευμονίας που σχετίζεται με λοίμωξη από άλλους ιούς, όπως είναι ο ιός της παραϊνφλουέντσας (44% αποτελεσματικότητα) ή ο RSV¹⁸.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Με βάση αυτά τα δεδομένα της βιβλιογραφίας και δεδομένου ότι είναι επιτακτική ανάγκη να ληφθούν προληπτικά μέτρα κατά των λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος και κατά της διεισδυτικής νόσου θα είχε ενδιαφέρον να εξεταστεί η συχνότητα βακτηριακού αποικισμού του ανώτερου αναπνευστικού σε παιδιά με και χωρίς ιογενή αναπνευστική λοίμωξη.

Ο πρωταρχικός στόχος της μελέτης ήταν να εξετάσει το βακτηριακό αποικισμό του ρινοφάρυγγα με *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* και *S. pyogenes* και το ρινικό αποικισμό με *S. aureus* σε παιδιά με και χωρίς συμπτώματα ιογενούς λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος και να συγκρίνει τη συχνότητα αποικισμού στα παιδιά ανάλογα με την ταυτοποίηση ή όχι κάποιου ιού.

Ο δεύτερος στόχος της μελέτης ήταν να εξετάσει τη συχνότητα αποικισμού με τα παραπάνω βακτήρια ανάλογα με το είδος της ιογενούς λοίμωξης και τις πιθανές αλληλεπιδράσεις ιών – βακτηρίων. Κατά κύριο λόγο εξετάστηκε η συσχέτιση βακτηριακού αποικισμού και λοίμωξης από τους ιούς της γρίπης (IFV) και της παραγρίπης (PIV), του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (RSV), του ρινοϊού (RV) και των αδενοϊών (AVs).

Συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη θα προσδιοριστούν :

1. η συχνότητα απομόνωσης *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* και *S. pyogenes* σε δείγματα από τον ρινοφάρυγγα και *S. aureus* σε ρινικά επιχρίσματα σε παιδιά με και χωρίς συμπτώματα ιογενούς λοίμωξης του αναπνευστικού συστήματος.

2. η συχνότητα απομόνωσης ιών σε ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα στις παραπάνω δύο κατηγορίες παιδιών.

Τα ευρήματα μεταξύ των δύο κατηγοριών παιδιών θα συγκριθούν μεταξύ τους ώστε να ελεγχθεί η πιθανή συσχέτιση της παρουσίας ιών με τον αποικισμό του ανώτερου αναπνευστικού από *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pyogenes* και *S. aureus*.

3. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Πρόκειται για μια μελέτη, η οποία διεξήχθη από την 1η Φεβρουαρίου 2009 έως την 31 Μαρτίου 2012. Οι ασθενείς επιλέχθηκαν από το τμήμα επειγόντων περιστατικών του Νοσοκομείου Παιδών <<Π. & Α. Κυριακού>> και τα δείγματα συλλέγονταν μια ημέρα κατά την πρώτη εβδομάδα κάθε μήνα. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν τα παιδιά εκείνα για τα οποία κρίθηκε απαραίτητη η νοσηλεία. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν βρέφη και παιδιά ηλικίας 3 μηνών έως 6 ετών και ο έλεγχος έγινε κατά τη διάρκεια και των τεσσάρων εποχών του έτους, ούτως ώστε να μελετηθεί η επίδραση των διαφόρων ιών στον βακτηριακό αποικισμό του ρινοφάρυγγα. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη συμμετοχή στη μελέτη ήταν η μη λήψη αντιμικροβιακής αγωγής για χρονικό διάστημα 7 ημερών προ της συλλογής των δειγμάτων.

Η μελέτη διεξήχθη μετά από έγκριση της Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου Παιδών <<Π. & Α. Κυριακού>>. Οι γονείς ή κηδεμόνες των παιδιών ενημερώνονταν και έδιναν γραπτή συγκατάθεση για την συμμετοχή των παιδιών τους στη μελέτη.

3.2 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μελέτη εκπονήθηκε στο Νοσοκομείο Παιδών <<Π. & Α. Κυριακού>>, που είναι ένα από τα δύο μεγαλύτερα παιδιατρικά νοσοκομεία στην Αττική και εξυπηρετούν τον κύριο όγκο τόσο των ασθενών που επισκέπτονται τα εξωτερικά ιατρεία όσο και των νοσηλευόμενων ασθενών της Αττικής και της κεντρικής Ελλάδας.

3.3 ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν βρέφη και παιδιά ηλικίας μεγαλύτερης των 3 μηνών και μικρότερα των 6 ετών. Οι συμπτωματικοί ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη είχαν ρινόρροια, βήχα και ενδεχομένως, άλλα συμπτώματα και κλινικά ευρήματα οξείας λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (ARTI) για λιγότερο από 5 ημέρες. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν τα παιδιά με συμπτώματα βακτηριακής λοίμωξης όπως μέση ωτίτιδα ή πνευμονία. Τη δεύτερη ομάδα του πληθυσμού της μελέτης αποτέλεσαν βρέφη και παιδιά που ήταν άπύρετα και χωρίς συμπτώματα λοίμωξης από το αναπνευστικό σύστημα κατά τη διάρκεια της εβδομάδας πριν από την ένταξή τους στη μελέτη (ασυμπτωματικοί μάρτυρες). Τα ασυμπτωματικά βρέφη και παιδιά προσήλθαν στο παιδιατρικό ή χειρουργικό τμήμα των επειγόντων περιστατικών για άλλους λόγους.

Μετά την επιλογή των παιδιών που πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη, συμπληρώνονταν συγκεκριμένο ερωτηματολόγιο για κάθε ασθενή, που περιελάμβανε δημογραφικά στοιχεία, ιατρικό ατομικό ιστορικό του ασθενούς, συμπτώματα και σημεία από την αντικειμενική εξέταση, εργαστηριακά αποτελέσματα εάν υπήρχαν, τελική διάγνωση, θεραπευτική αγωγή και την τελική έκβαση. Συλλέχθηκαν ακόμη στοιχεία που

αφορούσαν το μέγεθος της οικογένειας, τον αριθμό των αδελφών, την έκθεση σε παθητικό κάπνισμα, την παρακολούθηση παιδικού σταθμού, την χρήση αντιβιοτικών και το ιστορικό ανοσοποίησης για γρίπη και πνευμονιόκοκκο.

3.4 ΜΕΘΟΔΟΙ

Από κάθε παιδί που συμμετείχε στη μελέτη συλλέχθηκαν τρία δείγματα, δύο ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα και ένα ρινικό επίχρισμα. Τα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα λαμβάνονταν σε υπερέκταση κεφαλής και για τη λήψη τους χρησιμοποιήθηκαν δύο στυλεοί, ένας στυλεός αλγινικού ασβεστίου διαμέτρου 0,9 χιλιοστών (Fisherbrand, Fisher Scientific, USA, 14-959-77) και ένας στυλεός ESwab (Copan Liquid Amies Elution Swab – Collection and Preservation System, 482CE, Copan Italia, Brescia, Italy). Οι στυλεοί εισάγονταν προσεκτικά στον οπίσθιο ρινοφάρυγγα διαμέσου της ρινός, περιστρέφονταν για 5-6 δευτερόλεπτα, απομακρύνονταν και τοποθετούνταν στο υλικό μεταφοράς.

Τα ρινικά επιχρίσματα για αναζήτηση φορέας από *S. aureus* συλλέχθηκαν με βαμβακοφόρο στυλεό, ο οποίος αφού υγραινόταν από πριν με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, εισαγόταν περίπου 1-2 cm στις ρινικές χοάνες, αφηνόταν μερικά δευτερόλεπτα, περιστρεφόταν με πίεση πάνω στο ρινικό βλεννογόνο, αφαιρούνταν και ενοφθαλμιζόταν σε ζωμό Brain Heart Infusion Broth (BHI) .

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων τα ρινοφαρυγγικά και ρινικά επιχρίσματα μεταφέρονταν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο όσο το δυνατόν συντομότερα και όχι πάνω από 2-4 ώρες, προκειμένου να ενοφθαλμιστούν στα θρεπτικά υλικά.

3.5 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Τα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα που λαμβάνονταν με στυλεό αλγινικού ασβεστίου τοποθετούνταν σε υλικό μεταφοράς Amies και μεταφέρονταν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του νοσοκομείου, όπου ενοφθαλμίζονταν σε εκλεκτικά και μη εκλεκτικά θρεπτικά υλικά και εξετάζονταν για βακτηριακό αποικισμό με *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* και *S. pyogenes*.

Συγκεκριμένα, όλα τα επιχρίσματα ενοφθαλμίζονταν σε αιματούχο άγαρ με αίμα προβάτου 5% (Columbia Agar with 5% Sheep Blood) με τοποθέτηση ενός δίσκου οπτοχίνης και ενός δίσκου βακιτρακίνης (0,04 U) και σε σοκολατόχρωμο άγαρ με τοποθέτηση ενός δίσκου βακιτρακίνης (10 U). Επιπλέον, επειδή τα δείγματα περιείχαν μεικτή χλωρίδα τα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα ενοφθαλμίζονταν και σε CNA - άγαρ (Columbia CNA Agar), που περιέχει 10 μg θειϊκή κολιστίνη και 15 μg ναλιδιξικό οξύ ανά ml. Πρόκειται για υλικό που χρησιμοποιείται για την επιλεκτική απομόνωση Gram θετικών κόκκων και αναστέλλει την ανάπτυξη των εντεροβακτηριακών. Κατόπιν τα παραπάνω θρεπτικά υλικά επωάζονταν σε θερμοκρασία 35°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 24-48 ώρες.

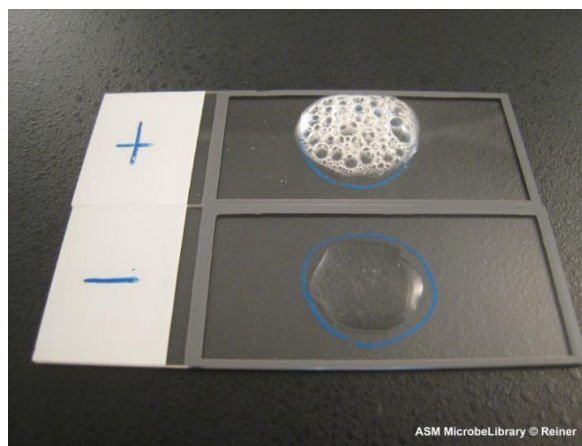
Στη συνέχεια, ακολουθούσε η ταυτοποίηση των βακτηρίων, που εξετάσαμε στην παρούσα μελέτη. Αρχικά γινόταν η ταυτοποίηση του *S. pneumoniae* με βάση τη μορφολογία των αποικιών στο αιματούχο και στο σοκολατόχρωμο άγαρ, την α-αιμόλυση στο αιματούχο άγαρ, τη χρώση κατά Gram, τη δοκιμασία καταλάσης, την ευαισθησία στην οπτοχίνη και τη δοκιμή διαλυτότητας στη χολή.

Ειδικότερα, στο αιματούχο άγαρ οι αποικίες του πνευμονιόκοκκου (**εικόνα 1**) ήταν α-αιμολυτικές (με πράσινη άλω γύρω από τις αποικίες), κυκλικές, γυαλιστερές, ημιδιαφανείς με χαρακτηριστική κεντρική κοίλανση λόγω αυτόλυσης. Επίσης, διαπιστώθηκαν και βλεννώδεις αποικίες από τα στελέχη που διέθεταν έλυτρο. Στο σοκολατόχρωμο άγαρ η πράσινη ζώνη ήταν πιο έντονη και παρατηρήθηκε ξάσπρισμα του υλικού κάτω από την αποικία λόγω παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), που οξειδώνει την αιμοσφαιρίνη σε πράσινη μεθαιμοσφαιρίνη.



ΕΙΚΟΝΑ 1. Αποικίες πνευμονιόκοκκου σε αιματούχο άγαρ

Στα δείγματα στα οποία απομονώθηκε πνευμονιόκοκκος έγινε χρώση κατά Gram, στην οποία οι πνευμονιόκοκκοι φαίνονταν ως Gram θετικοί λογχοειδείς κόκκοι σε ζεύγη (διπλόκοκκοι). Στη συνέχεια έγινε η δοκιμασία της καταλάσης (**εικόνα 2**) με την ενστάλλαξη σταγόνας διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου 3% πάνω σε αποικία του εξεταζόμενου μικροβίου σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η καταλάση είναι ένα ένζυμο, που διασπά το παραγόμενο κατά τη διάσπαση των υδατανθράκων υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) προς μοριακό οξυγόνο και νερό και απουσιάζει από τον πνευμονιόκοκκο. Η απουσία φυσαλίδων αποτελεί ένδειξη απουσίας του ενζύμου και η δοκιμασία χαρακτηρίστηκε ως αρνητική. Πρέπει να τονιστεί ότι η δοκιμασία δεν εκτελέστηκε πάνω σε αιματούχο άγαρ, επειδή τα ερυθροκύτταρα μπορούν να δώσουν από μόνα τους θετική την αντίδραση της καταλάσης.

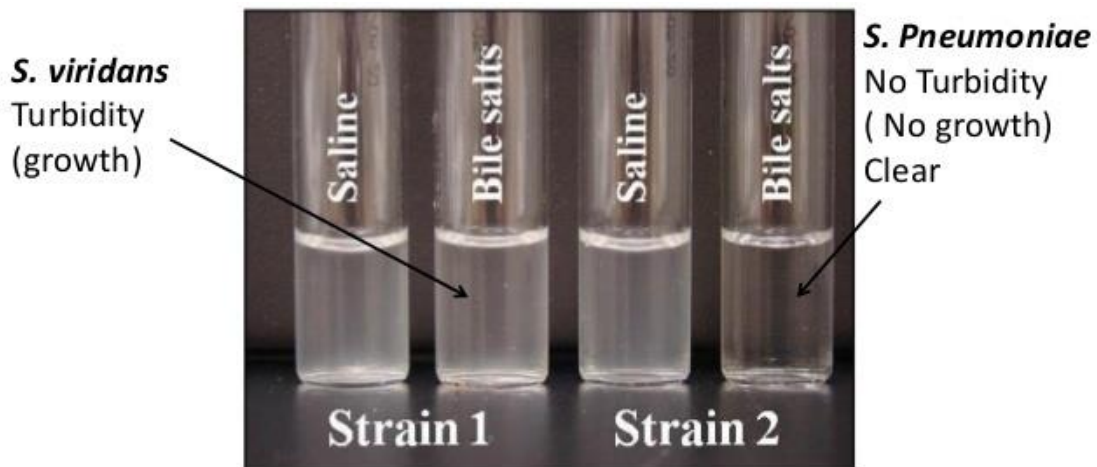


ΕΙΚΟΝΑ 2. Δοκιμασία καταλάσης

Ακολούθησε ο έλεγχος της ευαισθησίας του πνευμονιόκοκκου στην οπτοχίνη (ένα αντιβιοτικό που περιέχει χαλκό). Σε αιματούχο άγαρ, στο οποίο είχε ενοφθαλμισθεί το στέλεχος του πνευμονιόκοκκου, τοποθετήθηκε δισκίο οπτοχίνης (υδροχλωρική αιθυλουδροκουπρεΐνη) διαμέτρου 6 mm και περιεκτικότητας 5 μ g και παρατηρήθηκε ζώνη αναστολής >14 mm. Η οπτοχίνη προκαλεί τη λύση του πνευμονιόκοκκου ενεργοποιώντας τα αυτολυτικά ένζυμα του και έτσι ο πνευμονιόκοκκος χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητος στην οπτοχίνη. Στις ζώνες αναστολής <14 mm δεν αποκλείστηκε ο πνευμονιόκοκκος και πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον δοκιμασία ταυτοποίησης, η δοκιμή διαλυτότητας στη χολή.

Για τη δοκιμή διαλυτότητας στη χολή χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα αποικιών πνευμονιόκοκκου σε φυσιολογικό ορό NaCl. Η θολερότητα του εναιωρήματος ρυθμίσθηκε στο 0,5–1 της κλίμακας Mc Farland (pH=7). Σε δυο σωληνάρια τοποθετήθηκε από 0,5 ml εναιωρήματος. Στο ένα από αυτά προστέθηκε 0,5 ml δεσοξυχολικό Na (10%) και στο άλλο σωληνάριο, που ήταν ο μάρτυρας (control) προστέθηκε 0,5 ml φυσιολογικού ορού NaCl. Στη συνέχεια τα σωληνάρια αυτά επώαστηκαν στους 35 °C, για 5-15 λεπτά και συγκρίθηκε ο βαθμός της θολερότητάς τους. Το δεσοξυχολικό Na (χολή) ενεργοποιεί τα αυτολυτικά ένζυμα και ο πνευμονιόκοκκος λύεται. Στις περιπτώσεις που το διάλυμα του

πνευμονιόκοκκου ήταν διαυγές, ενώ το διάλυμα control παρέμενε θολερό η δοκιμασία ήταν θετική (**εικόνα 3**). Αξίζει να σημειωθεί, ότι η δοκιμασία είναι θετική στο 86 % των στελεχών.



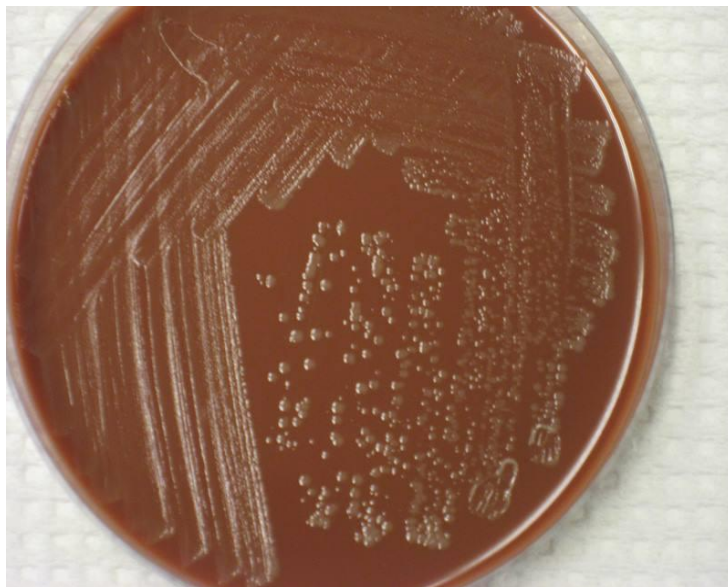
ΕΙΚΟΝΑ 3. Δοκιμή διαλυτότητας στη χολή

Μετά την ταυτοποίησή τους όλα τα στελέχη του πνευμονιόκοκκου φυλάσσονταν σε γάλα (skim milk) στους -70°C και σε δεύτερο χρόνο ανακαλλιεργήθηκαν σε αιματούχο άγαρ και επώαστηκαν στις γνωστές συνθήκες προκειμένου να γίνει η τυποποίησή τους. Η οροτυπία των στελεχών *S.pneumoniae* έγινε με την αντίδραση εξοιδήσεως του ελύτρου (Quellung reaction) στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Παιδών <<Π. & Α. Κυριακού>> και χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια latex (Pneumotest-latex Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) και αντιοροί (Pneumococcal Factor Antisera, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark). Πρόκειται για ιζηματοαντίδραση με την οποία ανιχνεύεται το αντιγόνο του ελύτρου με αντισώματα έναντι αυτού και περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Neufeld το 1902 στη Γερμανία.

Ειδικότερα για την αντίδραση εξοιδήσεως του ελύτρου (Quellung reaction) ετοιμάστηκε εναιώρημα αποικιών πνευμονιόκοκκου (ποσότητα μικρότερη από 10 μl) σε φυσιολογικό ορό NaCl από καθαρό καλλιέργημα πνευμονιόκοκκου που είχε καλλιεργηθεί σε αιματούχο άγαρ με αίμα προβάτου 5% και είχε επωασθεί σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 , στους 35 έως 37 $^{\circ}\text{C}$, για 24 ώρες. Η θολερότητα του εναιωρήματος ρυθμίστηκε στο 0,5 της κλίμακας Mc Farland. Σε αντικειμενοφόρο πλάκα αναμείχθηκαν 1-2 σταγόνες (λίγα μικρόλιτρα) εναιωρήματος πνευμονιόκοκκου με ίση ποσότητα πολυδύναμου αντιορού κουνελιού. Στη συνέχεια το μείγμα μικροσκοπήθηκε (μεγέθυνση $\times 1000$) με μικροσκοπία αντίθεσης φάσεως (Phase Contrast). Η αντίδραση είναι σταθερή για περίπου 5 λεπτά. Σε θετικό αποτέλεσμα το έλυτρο φαινόταν ως καθαρή άλως γύρω από τα βακτηριακά κύτταρα, επειδή αυξάνει ο δείκτης διαθλαστικότητας του ελύτρου. Αξίζει να σημειωθεί, ότι το Quellung test είναι η τυποποιημένη μέθοδος, που χρησιμοποιείται για την ορολογική ταυτοποίηση του *S. pneumoniae* στις επιδημιολογικές μελέτες.

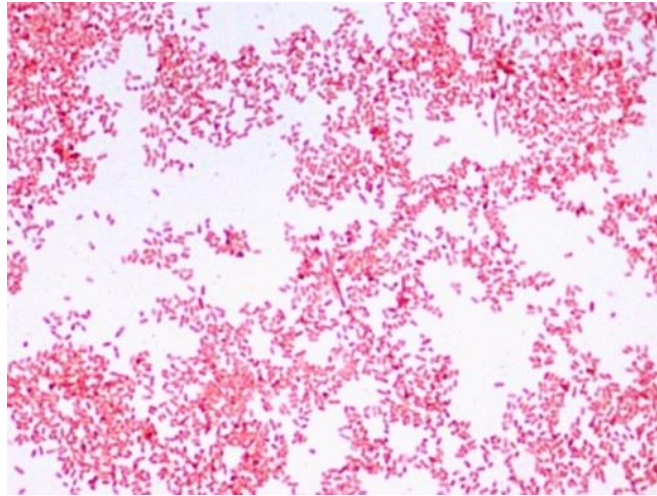
Το επόμενο από τα δυνητικά παθογόνα βακτήρια του ρινοφάρυγγα με το οποίο ασχοληθήκαμε ήταν ο *H. influenzae*. Είναι γνωστό ότι ο αιμόφιλος της γρίπης είναι απαιτητικό μικρόβιο και για την ανάπτυξή του χρειάζεται τον παράγοντα V (NAD, δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης – αδενίνης) και τον παράγοντα X (η αιμίνη, από τη διάσπαση της αιμοσφαιρίνης), οι οποίοι ανευρίσκονται στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Ο μεν παράγοντας V είναι απαραίτητος για τις οξειδοαναγωγικές διεργασίες του κυτταρικού μεταβολισμού, ενώ ο παράγοντας X προσφέρει στον αιμόφιλο το σιδηρούχο δακτύλιο για τη σύνθεση του κυτοχρώματος c και άλλων ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας. Έτσι, ο *H. influenzae* δεν αναπτύσσεται στο αιματούχο άγαρ, γιατί στο πλήρες αίμα (προβάτου, ίππου) υπάρχει μόνο ο παράγοντας X, ενώ ο παράγοντας V απελευθερώνεται όταν σπάσουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια (κατά τη θέρμανση). Προκειμένου για την καλλιέργεια του αιμόφιλου χρησιμοποιήθηκε το σοκολατόχρωμο άγαρ, το οποίο παρασκευάζεται με προσθήκη ερυθρών προβάτου σε εμπλουτισμένο άγαρ και θέρμανση στους 80 °C οπότε λύονται τα ερυθρά, απελευθερώνονται οι παράγοντες και αδρανοποιούνται τα ένζυμα υδρόλυσης του παράγοντα V.

Για την ταυτοποίηση λοιπόν του *H. influenzae* συνεκτιμήθηκαν η μορφολογία των αποικιών στο σοκολατόχρωμο άγαρ, η χρώση κατά Gram, η αντοχή στη βακιτρακίνη (10 U) και η δοκιμή εξάρτησης από τους παράγοντες V και X. Οι αποικίες του *Haemophilus influenzae* στο σοκολατόχρωμο άγαρ (**εικόνα 4**) είναι λείες, ημιδιαφανείς, γκριζωπές με χαρακτηριστική οσμή (ως βρώμικων αθλητικών υποδημάτων).



ΕΙΚΟΝΑ 4. Αποικίες *H.influenzae* σε σοκολατόχρωμο άγαρ

Στη χρώση κατά Gram, που έγινε σε όλα τα απομονωμένα στελέχη αιμόφιλου, ο *H. influenzae* φάνηκε ως Gram αρνητικό κοκκοβακτηρίδιο με πλειομορφισμό (εικόνα 5).



ΕΙΚΟΝΑ 5. Χρώση κατά Gram *H. influenzae*

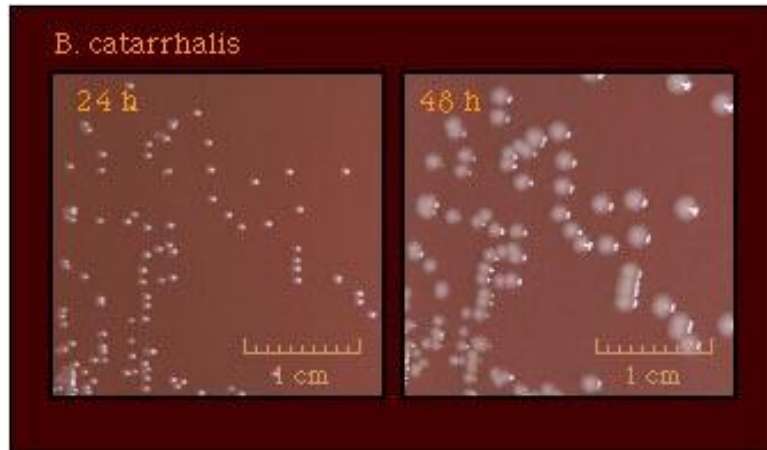
Ακολούθησε η δοκιμή ανάπτυξης του αιμόφιλου παρουσία των παραγόντων V και X. Η δοκιμή αυτή έγινε σε Mueller-Hinton άγαρ χωρίς τους παράγοντες V και X. Αρχικά το εναιώρημα του *H. influenzae* (θολρότητας 0,5 της κλίμακας McFarland) επιστρώθηκε στο Mueller-Hinton άγαρ και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 3 δισκία με παράγοντα V, X και V+X αντίστοιχα σε απόσταση μεγαλύτερη από 2 cm μεταξύ τους. Το Mueller-Hinton άγαρ επώαστηκε σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 24 h, στους 35 °C. Μετά την επώαση 24 ωρών ο *H. influenzae* αναπτύχθηκε γύρω από το δισκίο με τους παράγοντες που χρειάζεται (V και X) και όχι σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου (εικόνα 6).



ΕΙΚΟΝΑ 6. Δοκιμή ανάπτυξης αιμόφιλου παρουσία των παραγόντων X και V

Κατόπιν ακολούθησε η ταυτοποίηση της *M. catarrhalis*, η οποία έγινε με βάση τη μορφολογία των αποικιών στο αιματούχο άγαρ, τη χρώση κατά Gram, τη δοκιμασία οξειδάσης και την παραγωγή δεσοξυριβονουκλεάσης (DNase). Έτσι, η *M. catarrhalis* που αναπτύχθηκε και στο αιματούχο άγαρ, αλλά και στο σοκολατόχρωμο άγαρ είχε αποικίες,

που ήταν γκριζόλευκες, θολές, λείες και ξηρές (εικόνα 7). Χαρακτηριστικό για τις αποικίες της *M. catarrhalis* ήταν ότι με τον κρίκο μετακινούνταν όλη η αποικία. Στη χρώση κατά Gram που έγινε από τις απομονωμένες αποικίες οι μοραξέλλες φάνηκαν ως Gram αρνητικοί διπλόκοκκοι μεγάλου μεγέθους, οι οποίοι δεν αποχρωματιζόταν εύκολα και έμοιαζαν με σταφυλόκοκκο.



ΕΙΚΟΝΑ 7. Αποικίες *M. catarrhalis* σε σοκολατόχρωμο άγαρ

Με τη δοκιμασία της οξειδάσης διαπιστώθηκε η παρουσία της κυττοχρωμικής οξειδάσης, ένα ένζυμο που καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από δότες (NADH) σε δέκτες (O₂) και το οποίο το διαθέτουν η μοραξέλλα η καταρροϊκή και μερικοί άλλοι μικροοργανισμοί. Στη συγκεκριμένη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε ως δότης ηλεκτρονίων η διυδροχλωρική παραφαινυλενοδιαμίνη, η οποία παρουσία οξειδάσης της *M. catarrhalis*, οξειδώνεται και σχηματίζει την έγχρωμη ένωση, μπλε της ινδοφαινόλης (εικόνα 8). Οι αποικίες της μοραξέλλας τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια διηθητικού χαρτιού εμποτισμένου με διυδροχλωρική παραφαινυλενοδιαμίνη και μετά την πάροδο 10 δευτερολέπτων αναπτύχθηκε μπλε χρώμα στην επιφάνεια του χαρτιού.



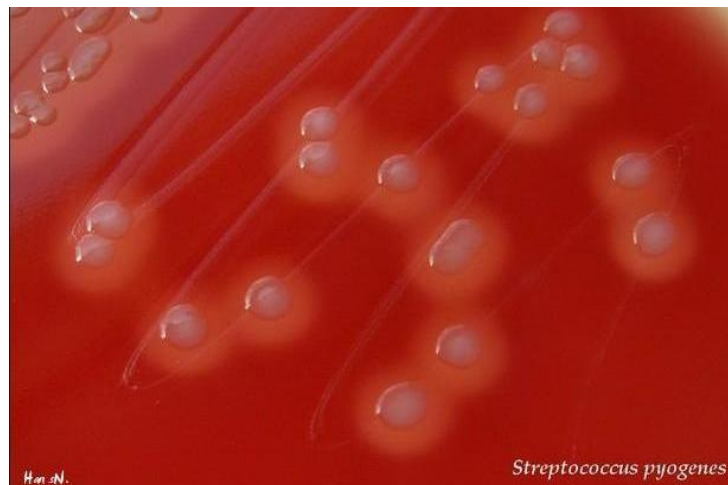
ΕΙΚΟΝΑ 8. Δοκιμασία οξειδάσης

Για να ολοκληρωθεί η ταυτοποίηση της *M. catarrhalis* ακολούθησε η δοκιμασία ανίχνευσης δεσοξυριβονουκλεάσης (DNase). Η δοκιμασία αυτή ελέγχει την παρουσία

της εξωκυττάριας δεσοξυριβονουκλεάσης, που υδρολύει το αδιάλυτο σε υδροχλωρικό οξύ (HCl) DNA, σε διαλυτά ολιγονουκλεοτίδια. Έτσι, οι προς εξέταση αποικίες εμβολιάστηκαν σε υλικό με DNA μαζί με ένα γνωστό στέλεχος DNAση θετικό (*S. aureus*), που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και επώαστηκε για 24 ώρες αεροβίως στους 37°C. Μετά την επώαση ακολούθησε το πλημμύρισμα του καλλιεργήματος με 2-3 ml 1N διαλύματος HCl (3,6%) για να καθιζήσει το DNA που δεν υδρολύθηκε. Το τρυβλίο παρέμενε για μερικά λεπτά και στη συνέχεια εξεταζόταν προσεκτικά κάτω από δυνατό έμμεσο φωτισμό, σε μαύρο φόντο. Οι DNAση θετικές αποικίες περιβάλλονταν από μια καθαρή ζώνη (διαυγή άλω), αφού το DNA είχε υδρολυθεί. Η δοκιμασία ήταν αρνητική όταν γύρω από το σημείο αναπτύξεως του μικροβίου δεν είχε εμφανισθεί διαυγής άλως ή αν είχε εμφανισθεί ήταν μικρότερη από την άλω του μάρτυρα.

Το τελευταίο από τα μικρόβια που απομονώθηκαν από τα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα και εξετάστηκε στη μελέτη μας ήταν ο *S. pyogenes*. Η ταυτοποίηση του έγινε με βάση τη μορφολογία των αποικιών στο CNA άγαρ, τη β-αιμόλυση, τη χρώση κατά Gram, την ευαισθησία στη βακιτρακίνη (0,04 U) και την ανίχνευση του αντιγόνου ομάδας A (αντιγόνο Lancefield A) με ειδικό αντιορό.

Συγκεκριμένα, οι αποικίες του *S. pyogenes* στο αιματούχο άγαρ ήταν μικρές (διαμέτρου 0,5-1 mm), λευκές, ημιδιαφανείς, θολωτές και περιβάλλονταν από ζώνη β-αιμόλυσης διαμέτρου 2-4 φορές μεγαλύτερης της αποικίας (**εικόνα 9**). Η β-αιμόλυση χαρακτηρίζεται από πλήρη διαύγαση του υλικού, γιατί η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι πλήρης.



ΕΙΚΟΝΑ 9. Αποικίες *S. pyogenes* σε αιματούχο άγαρ

Για την προκαταρκτική ταυτοποίηση του *S. pyogenes* χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή ευαισθησίας στη βακιτρακίνη και ελέγχθηκε η ευαισθησία του στο αντιβιοτικό βακιτρακίνη. Ο *Streptococcus pyogenes* αναστέλλεται από τη βακιτρακίνη 0,04 U (οποιαδήποτε ζώνη αναστολής), αλλά όχι από την οπτοχίνη (**εικόνα 10**). Για τη δοκιμή ευαισθησίας το εναιώρημα του εξεταζόμενου μικροοργανισμού επιστρώθηκε στην επιφάνεια αιματούχου άγαρ με αίμα προβάτου και αφού τοποθετήθηκε ο δίσκος

βακτηρακίνης (0,04 μονάδες) το άγαρ επωάστηκε για 24 ώρες. Η δοκιμασία ήταν θετική για την ανάπτυξη ζώνης αναστολής οποιασδήποτε διαμέτρου.



ΕΙΚΟΝΑ 10. Δοκιμή ευαισθησίας στη βακτηρακίνη

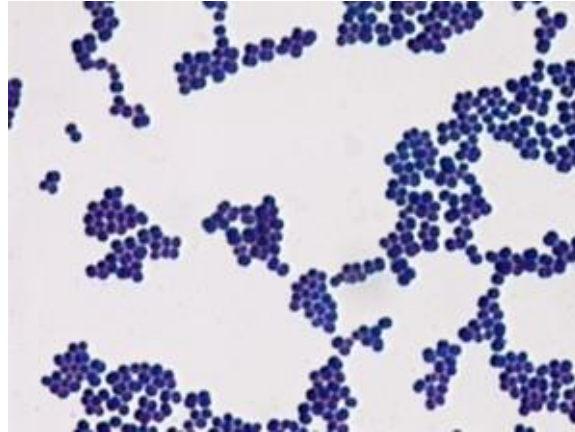
Εκτός όμως από τα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα, όπως αναφέρθηκε, συλλέχθηκαν και ρινικά επιχρίσματα για την αναζήτηση ρινικής φορέας από *S. aureus*. Τα επιχρίσματα αυτά ενοφθαλμιζόταν άμεσα σε ζωμό BHI και επωαζόταν σε αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία 35°C για 24 ώρες. Ακολουθούσε η ανακαλλιέργεια του ζωμού σε αλατούχο άγαρ μαννιτόλης (Mannitol Salt Agar - Charman) με τοποθέτηση δισκίου κεφοξιτίνης (30 µg) και επώαση για 24-48 ώρες σε αερόβιες συνθήκες στους 35°C. Το αλατούχο άγαρ μαννιτόλης είναι εκλεκτικό θρεπτικό υλικό, το οποίο περιέχει μαννιτόλη και 7,5% χλωριούχο νάτριο με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η ανάπτυξη άλλων μικροβίων. Ο *S. aureus* όμως αναπτύσσεται στο συγκεκριμένο υλικό και ζυμώνει τη μαννιτόλη παράγοντας οξύ. Η επακόλουθη πτώση του pH προκαλεί αλλαγή του χρώματος του δείκτη (ερυθρό της φαινόλης), ο οποίος από κόκκινος γίνεται κίτρινος (**εικόνα 11**).



ΕΙΚΟΝΑ 11. Ανάπτυξη *S. aureus* σε αλατούχο άγαρ Charman

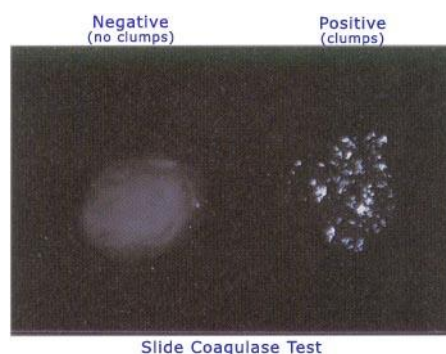
Για την ταυτοποίηση του *S. aureus* συνεκτιμήθηκαν η ζύμωση της μανιτόλης (αλλαγή του χρώματος του Mannitol Salt Agar), η χρώση κατά Gram, η δοκιμασία παραγωγής

κοαγκουλάσης και η παραγωγή θερμοανθεκτικής δεσοξυριβονουκλεάσης (DNase). Στη χρώση κατά Gram οι σταφυλόκοκκοι εμφανίζονταν ως Gram θετικοί κόκκοι, που διατάσσονταν σε μικρές ομάδες σαν τσαμπιά σταφυλιού, σε τετράδες ή σε σειρά από 4 το πολύ κόκκους (**εικόνα 12**).



ΕΙΚΟΝΑ 12. Χρώση κατά Gram *S. aureus*

Με τη δοκιμασία κοαγκουλάσης ανιχνεύτηκε η συνδεδεμένη στο κυτταρικό τοίχωμα του μικροβίου κοαγκουλάση (clumping factor). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία πλακός για τη συνδεδεμένη κοαγκουλάση (slide test) κατά την οποία στην επιφάνεια αντικειμενοφόρου πλάκας τοποθετήθηκε σταγόνα εναιωρήματος σταφυλοκόκκου και αμέσως μετά προστέθηκε σταγόνα αντιδραστηρίου με σωματίδια latex (**εικόνα 13**). Η παρουσία συνδεδεμένης κοαγκουλάσης προκαλεί πήξη του πλάσματος και συγκόλληση του μικροβίου (παραγωγή κροκίδων). Το αποτέλεσμα της συγκολλησεως αξιολογήθηκε μέσα σε 30 δευτερόλεπτα, γιατί πέρα του χρονικού αυτού ορίου μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα.



ΕΙΚΟΝΑ 13. Δοκιμασία παραγωγής συνδεδεμένης κοαγκουλάσης

Στις περιπτώσεις που το εξεταζόμενο στέλεχος *S. aureus* έδινε αρνητική τη δοκιμασία παραγωγής συνδεδεμένης κοαγκουλάσης (slide test) χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία παραγωγής θερμοανθεκτικής DNάσης. Η τεχνική της δοκιμασίας αυτής περιγράφηκε στην ταυτοποίηση της *M. catarrhalis*.

Αξίζει να αναφερθεί ότι το δισκίο κεφοξιτίνης τοποθετήθηκε στο αλατούχο άγαρ μαννιτόλης για να ελεγχθεί η ευαισθησία ή αντοχή των σταφυλοκόκκων στην οξακιλλίνη, καθώς η κεφοξιτίνη είναι ισχυρός επαγωγέας της έκφρασης της PBP2α των MRSA.

3.6 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ

Τα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα που λαμβάνονταν με στυλεό ESwab, τοποθετούνταν σε υλικό μεταφοράς Amies σε υγρή μορφή (Liquid Amies Medium). Η κατά προσέγγιση σύσταση του Liquid Amies Medium ανά λίτρο απεσταγμένου νερού είναι η ακόλουθη: χλωριούχο ασβέστιο (0,10 g), όξινο φωσφορικό νάτριο (1,15 g), χλωριούχο μαγνήσιο (0,10 g), μονοφωσφορικό κάλιο (0,20 g), χλωριούχο κάλιο (0,20 g), χλωριούχο νάτριο (3,00 g), θειογλυκολικό νάτριο (1,00 g).

Αυτά τα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα εξετάστηκαν για την ταυτοποίηση των ιών γρίπης (IFV), παραγρίπης (PIV), αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (RSV), ρινοϊού (RV) και αδενοϊών (AdVs) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR). Ο έλεγχος των δειγμάτων με τη μέθοδο της RT-PCR έγινε στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Με τη μέθοδο της RT-PCR πρώτα απομονώνεται το mRNA, αντιγράφεται σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase) και στη συνέχεια ακολουθεί η συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η εκχύλιση του RNA/DNA γινόταν από όλα τα δείγματα μέσα σε λίγες μέρες και το RNA/DNA διατηρούνταν στην κατάψυξη στους -70°C . Για την εκχύλιση του RNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Trizol (Invitrogen, CA, USA) και η εκχύλιση έγινε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων προσδιορίστηκαν με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (Thermo Scientific NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, DE 19810 USA). Εκατό νανογραμμάρια RNA αντιγράφηκαν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης (SuperScript II Reverse Transcriptase) και ενός μίγματος τυχαίων εξαμερών (random hexamers – Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο διαλύματος 50 μl . Τα αντιδραστήρια και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα της αντίδρασης για την PCR ήταν τα ακόλουθα : ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (0,2 μM κάθε εκκινητή-primer), που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτιδία (0,2mM κάθε dNTPs), που είναι απαραίτητα νουκλεοτιδία (ATP, TTP, CTP και GTP) για τη σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων, DNA πολυμεράση (Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen) (2Units στα 50 μl) για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA, συμπληρωματικό DNA (cDNA) σε πολύ μικρές ποσότητες, ιόντα μαγνησίου- Mg^{++} (3mM), που απαιτούνται για την ενζυματική δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης και ρυθμιστικό διάλυμα – buffer (1x) για τη διατήρηση του pH και της συγκέντρωσης των αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης.

Η αντίδραση PCR για το ρινοϊό (RV) πραγματοποιήθηκε με 6 μl cDNA και με εκκινητές τους OL26 και OL27⁸⁹. Για την ανίχνευση του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (RSV –type A and B) χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της βασικής αντίδρασης η εμφωλεύουσα PCR (nested-PCR) κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν 2 συνεχόμενες αντιδράσεις PCR. Στην πρώτη PCR στο διάλυμα της αντίδρασης προστέθηκαν 4 μl cDNA και πολλαπλασιάστηκε ένα τμήμα του cDNA με τη χρήση ενός ζεύγους (forward – reverse) εναρκτήριων εκκινητών. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η δεύτερη αντίδραση, κατά την οποία στα 48 μl του διαλύματος της αντίδρασης προστέθηκαν 2 μl από το προϊόν PCR του πρώτου σταδίου και χρησιμοποιήθηκε ένα δεύτερο ζεύγος (forward – reverse) εναρκτήριων εκκινητών, εσωτερικών στη σχεδίαση του πρώτου ζεύγους. Κατά τη δεύτερη αντίδραση πολλαπλασιάστηκε το προϊόν PCR του πρώτου σταδίου. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ο εμπρόσθιος (forward) εκκινητής ATG TCA CGA AGG AAT CCT TGC και ο αντίστροφος (reverse) εκκινητής TAG CTC TTC ATT GTC CCT CAG C και το μέγεθος του αμπλικονίου που δημιουργήθηκε ήταν 360 bp, ενώ στη δεύτερη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ο εμπρόσθιος (forward) εκκινητής GAG GTC ATT GCT TAA ATG G και ο αντίστροφος (reverse) εκκινητής GCA ACA CAT GCT GAT TGT και το μέγεθος του αμπλικονίου που δημιουργήθηκε ήταν 259 bp.

Για την ανίχνευση του ιού της γρίπης (IFV - type A: H1N1, H3N2 και type B) χρησιμοποιήθηκε η πολυπλεκτική RT-PCR (multiplex RT-PCR) και πραγματοποιήθηκαν 2 συνεχόμενες αντιδράσεις PCR σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Stockton J και συνεργάτες, 1998)⁹⁰. Η ανίχνευση του ιού της παραγρίπης (PIV1, PIV2 και PIV3) έγινε σε μία αντίδραση PCR κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν 2μl cDNA και 3 ζεύγη εκκινητών, CAG AAT TAA TCA GAC AAG AAG T και AGG ATA CAT ATC TGA ATT TAA G, GGA TTA TAC AAC AAT AAT CTG CTG και CAC AGG TTA TGT TGG GAT G, CTC GAG GTT GTC AGG ATA TAG και CTT TGG GAG TTG AAC ACA GTT. Το μέγεθος των αμπλικονίων που δημιουργήθηκαν ήταν 430, 370 και 180 bp, αντίστοιχα. Στο διάλυμα της αντίδρασης για τους αδενοϊούς (ADVs) προστέθηκαν 4 μl cDNA και η PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις συνθήκες διεξαγωγής που περιγράφονται στη βιβλιογραφία (Freymuth F και συνεργάτες, 1999)⁸⁴.

Οι αντιδράσεις PCR εκτελέστηκαν σε έναν θερμικό κυκλοποιητή PTC - 200 DNA Engine (MJ Research, MA, USA). Το πρώτο στάδιο της αποδιάταξης (denaturation) του δίκλωνου DNA πραγματοποιήθηκε, όταν αυξήθηκε η θερμοκρασία στο διάλυμα της αντίδρασης σε επίπεδο 94°C για 2 λεπτά ή για 5 λεπτά στην αντίδραση PCR για την ανίχνευση του ιού της παραγρίπης. Τα υπόλοιπα στάδια της PCR για την ανίχνευση των ιών RV, IFV και AdVs πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις συνθήκες διεξαγωγής που περιγράφονται στη βιβλιογραφία (Σπυριδάκη Ι. και συνεργάτες, 2009)⁹¹. Οι συνθήκες διεξαγωγής της πρώτης αντίδρασης PCR στο θερμικό κυκλοποιητή για την ανίχνευση του RSV δίνονται στον **Πίνακα 1**.

| Στάδια της PCR | Θερμοκρασία (° C) | Χρόνος |
|---|-------------------|--------|
| 1. Αποδιάταξη | 94 | 20 sec |
| 2. Υβριδισμός εκκινητών | 50 | 20 sec |
| 3. Επιμήκυνση | 72 | 30 sec |
| Επανάληψη σταδίων 1-3 για 30 φορές (κύκλοι) | | |
| 4. Τελική επιμήκυνση | 72 | 6 min |

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Συνθήκες διεξαγωγής της πρώτης PCR στο θερμικό κυκλοποιητή για την ανίχνευση RSV.

Η δεύτερη αντίδραση PCR για την ανίχνευση του RSV πραγματοποιήθηκε στις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής αλλά σε 25 κύκλους. Οι συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης PCR στο θερμικό κυκλοποιητή για την ανίχνευση του PIV δίνονται στον **Πίνακα 2**.

| Στάδια της PCR | Θερμοκρασία (° C) | Χρόνος |
|---|-------------------|--------|
| 1. Αποδιάταξη | 94 | 40 sec |
| 2. Υβριδισμός εκκινητών | 50 | 40 sec |
| 3. Επιμήκυνση | 72 | 1 min |
| Επανάληψη σταδίων 1-3 για 39 φορές (κύκλοι) | | |
| 4. Τελική επιμήκυνση | 72 | 8 min |

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Συνθήκες διεξαγωγής της PCR στο θερμικό κυκλοποιητή για την ανίχνευση του PIV

Οι ασθενείς στους οποίους ανιχνεύθηκε τουλάχιστον ένας από τους ιούς που εξετάστηκαν χαρακτηρίστηκαν ως θετικοί, ενώ οι ασθενείς στους οποίους δεν ανιχνεύθηκε κανένας από τους ιούς χαρακτηρίστηκαν ως αρνητικοί.

3.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κατηγορικά δεδομένα συγκρίθηκαν με τη χρήση της μεθόδου χ^2 ή ακριβείς αμφίπλευρες (two-tailed) δοκιμασίας Fisher's. Το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε στο $\alpha=5\%$. Μονοπαραγοντικές αναλύσεις (univariate analyses) χρησιμοποιήθηκαν για τη συσχέτιση των βακτηρίων, των ιών, των παραγόντων κινδύνου και των δημογραφικών χαρακτηριστικών με το βακτηριακό αποικισμό του ρινοφάρυγγα. Παρόμοιες αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν και για τη συσχέτιση των ιών, των βακτηρίων, των παραγόντων κινδύνου και των δημογραφικών χαρακτηριστικών με την παρουσία ιών στο ρινοφάρυγγα. Στους παράγοντες κινδύνου που αναζητήθηκαν και συμπεριλήφθηκαν στις αναλύσεις περιλαμβάνονται οι ακόλουθοι: προωρότητα, περιγεννητικές επιπλοκές, βρογχοπνευμονική δυσπλασία, χρόνια υποκείμενη νόσος, παθητικό κάπνισμα, παρακολούθηση παιδικού σταθμού, αδερφό σε βρεφονηπιακό σταθμό, θηλασμός, λήψη αντιβιοτικών κατά τους τελευταίους 3 μήνες, εμβολιασμός κατά του πνευμονιόκοκκου και της γρίπης, εποχή δειγματοληψίας και παρουσία συμπτωμάτων από το αναπνευστικό σύστημα. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά που συμπεριλήφθηκαν ήταν το φύλο, η ηλικία και η εθνικότητα. Στις αρχικές μονοπαραγοντικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε ως όριο στατιστικής σημαντικότητας η τιμή $p<0.1$ για να ανιχνευθούν οι μεταβλητές εκείνες που ήταν υποψήφιας για εισαγωγή στο μοντέλο πολλαπλής παλινδρόμησης, έτσι ώστε να περιορισθεί κατά το δυνατό ο κίνδυνος στατιστικού σφάλματος τύπου II. Στην τελική πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε ως όριο στατιστικής σημαντικότητας η τιμή $p<0.05$. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc, version 18.0 for Windows, IBM Statistics, Chicago, IL).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Κατά τη διάρκεια της περιόδου από την 1η Φεβρουαρίου 2009 έως και την 31 Μαρτίου 2012 εξετάστηκαν συνολικά 423 βρέφη και παιδιά ηλικίας 3 μηνών έως 6 ετών και από το καθένα συλλέχθηκαν δύο ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα και ένα ρινικό επίχρισμα. Συνολικά, υποβλήθηκαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο κατά το ως άνω χρονικό διάστημα 1266 καλλιέργειες. Εξαιρέθηκαν από τη μελέτη 36 παιδιά, γιατί στις καλλιέργειες των ρινοφαρυγγικών τους επιχρισμάτων δεν αναπτύχθηκε μικροβιακή χλωρίδα και τα δείγματα αυτά αποκλείστηκαν διότι η τεχνική της δειγματοληψίας θεωρήθηκε ακατάλληλη. Από τα 36 παιδιά που δε συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη τα δεκατρία ήταν ασυμπτωματικά (controls). Επίσης, ένα ακόμα δείγμα αποκλείστηκε λόγω ασαφούς ταυτοποίησης. Τελικά, στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 386 παιδιά (216 αγόρια), εκ των οποίων 259 (67%) είχαν συμπτώματα οξείας λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος για λιγότερο από 5 ημέρες και 127 (33%) ήταν ασυμπτωματικά. Στην ομάδα των συμπτωματικών παιδιών, τα 9 παιδιά είχαν βρογχικό άσθμα, ενώ σε 27 παιδιά η τελική διάγνωση ήταν βρογχιολίτιδα. Η μέση ηλικία των παιδιών της μελέτης ήταν 23,4 μήνες. Από το σύνολο των παιδιών το 55,96% ήταν αγόρια και το 44,04% ήταν κορίτσια. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και οι παράγοντες κινδύνου των παιδιών που συμμετείχαν στη μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Σημειώνεται πως τα περισσότερα δείγματα συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου (n=67), του χειμώνα (n=178) και της άνοιξης (n=120), ενώ μικρότερος αριθμός δειγμάτων συλλέχθηκε κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (n=21).

Πίνακας 1. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

| ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ | ΑΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟΙ | ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟΙ | N (Valid) | ΤΙΜΗ P |
|--|------------------------|------------------------|--------------|--------|
| | ΜΑΡΤΥΡΕΣ | ΑΣΘΕΝΕΙΣ | | |
| | (n=127) ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | (n=259) ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | | |
| Ηλικία (μήνες) | 27,5 | 26,9 | 371 | 0,808 |
| Κορίτσια | 55 (43,3) | 115 (44,4) | 386 | 0,839 |
| Εθνικότητα | | | 372 | 0.915 |
| Ελληνική | 60 (49,6) | 119 (47,4) | | |
| Αλβανική | 28 (23,1) | 66 (26,3) | | |
| Ρομά | 14 (11,6) | 26 (10,4) | | |
| Άλλη | 19 (15,7) | 40 (15,9) | | |
| Παιδικός σταθμός | 29 (24,0) | 75 (30,0) | 371 | 0,225 |
| Αδέλφια σε παιδικό σταθμό | 18 (14,9) | 57 (22,8) | 371 | 0,075 |
| Ιστορικό θηλασμού | 69 (57,0) | 145 (58,0) | 371 | 0,911 |
| Πρωωρότητα | 17 (14,0) | 38 (15,2) | 371 | 0,876 |
| Περιγεννητικές επιπλοκές | 7 (5,8) | 5 (2,0) | 371 | 0,065 |
| Βρογχοπνευμονική δυσπλασία | 0 (0,0) | 2 (0,8) | 371 | 1,000 |
| Χρόνια νοσήματα * | 3 (2,5) | 1 (0,4) | 371 | 0,104 |
| Κάπνισμα γονέων | 61 (50,4) | 136 (54,4) | 371 | 0,506 |
| Εμβολιασμός κατά γρίπης | 9 (7,4) | 21 (8,4) | 371 | 0,841 |
| Πλήρης | 8 (6,6) | 10 (4,1) | 366 | 0,311 |
| Εμβολιασμός κατά πνευμονιόκοκκου | 82 (67,8) | 179 (71,6) | 371 | 0,468 |
| Πλήρης | 46 (40,7) | 91 (41,4) | 333 | 1,000 |
| Λήψη αντιβιοτικού το τελευταίο τρίμηνο | 19 (15,7) | 62 (24,8) | 371 | 0,060 |

*ινοκυστική νόσος, συγγενής καρδιοπάθεια, ανοσοανεπάρκεια, χρόνια αιμολυτική αναιμία, συστηματικά κορτικοστεροειδή ή ανοσοκατασταλτικά

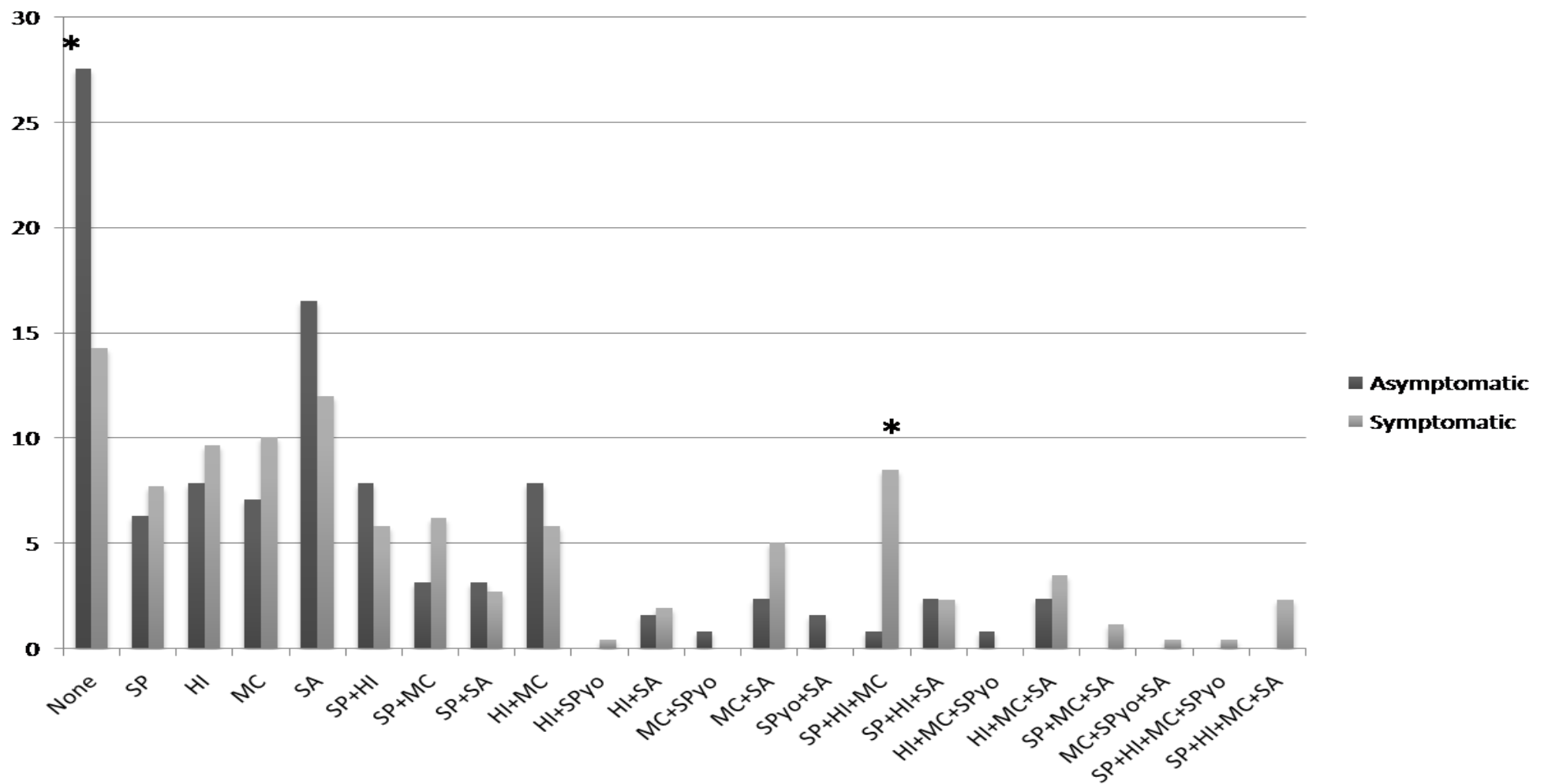
4.2 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ

Από την ομάδα των ασυμπτωματικών παιδιών (127 παιδιά), τα 92 (72,4%) είχαν αποικιστεί με ένα τουλάχιστον από τα βακτήρια που εξετάστηκαν, ενώ από την ομάδα των συμπτωματικών παιδιών (259 παιδιά), τα 222 (85,7%) ήταν αποικισμένα με ένα τουλάχιστον από τα βακτήρια. Η κατανομή των βακτηρίων που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα ανάμεσα στα συμπτωματικά και ασυμπτωματικά παιδιά παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται ο συνολικός αριθμός των παιδιών που ήταν αποικισμένα με οποιοδήποτε από τα πέντε βακτήρια της μελέτης (μεμονωμένα ή σε συνδυασμό) για τις δυο ομάδες των ασυμπτωματικών και συμπτωματικών παιδιών. Στην ομάδα των συμπτωματικών παιδιών ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με οποιοδήποτε από τα βακτήρια της μελέτης (μεμονωμένα ή σε συνδυασμό) ήταν συχνότερος σε σύγκριση με την ομάδα των ασυμπτωματικών παιδιών. Ο *S. pneumoniae* και η *M. catarrhalis* απομονώθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα ($p < 0.01$) από παιδιά με συμπτώματα λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού σε σύγκριση με τα παιδιά που δεν είχαν συμπτώματα.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης από το σύνολο των στελεχών *S. pneumoniae* που απομονώθηκαν έγινε οροτυπία σε 66 στελέχη, εκ των οποίων τα 8 ήταν μη τυποποιήσιμα στελέχη. Η οροτυπία των 58 στελεχών *S. pneumoniae* κατέδειξε ότι 8 ορότυποι (14%) περιλαμβάνονται στο PCV-7 και 21 ορότυποι (36%) στο PCV-13, ενώ 29 ορότυποι (50%) δεν περιλαμβάνονται στο PCV-13. Αξίζει να αναφερθεί ότι, ο ορότυπος 19A ήταν ο συχνότερος από τους ορότυπους του PCV-13 κατά την περίοδο μελέτης καθώς αντιστοιχεί στο 43% (9/21) των οροτύπων του εμβολίου. Επίσης, κατά τη διάρκεια της μελέτης απομονώθηκαν 119 στελέχη *S. aureus* από τις καλλιέργειες των ρινικών επιχρισμάτων. Για αντοχή στην οξακιλλίνη εξετάστηκαν 104 στελέχη *S. aureus* και 8 (7,7%) από αυτά βρέθηκαν ανθεκτικά (στελέχη MRSA).

Η επίδραση του καπνίσματος της μητέρας ή του πατέρα στο βακτηριακό αποικισμό του ρινοφάρυγγα των παιδιών τους εξετάστηκε τόσο για τα ασυμπτωματικά παιδιά όσο και για τα συμπτωματικά. Οι διαφορές όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Στην ομάδα των ασυμπτωματικών παιδιών η επίδραση του καπνίσματος ενός τουλάχιστον από τους γονείς στο βακτηριακό αποικισμό του ρινοφάρυγγα με *H. influenzae* ήταν σημαντική ($p = 0.015$). Επίσης, δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του θηλασμού και του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με οποιοδήποτε από τα βακτήρια που εξετάστηκαν.



ΣΧΗΜΑ 1. Βακτηριακός αποικισμός του ρινοφάρυγγα παιδιών με ή χωρίς συμπτώματα ιογενούς λοίμωξης του αναπνευστικού συστήματος.

Πίνακας 2. Σύγκριση του αριθμού παιδιών που ήταν αποικισμένα με οποιοδήποτε από τα βακτήρια της μελέτης (μεμονωμένα ή σε συνδυασμό) για τις δυο ομάδες των ασυμπτωματικών και συμπτωματικών παιδιών.

| ΒΑΚΤΗΡΙΑ | ΑΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ (n=127) ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ (n=259) ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | ΤΙΜΗΡ |
|----------------------|--|---|--------------|
| Κανένα βακτήριο | 35 (27,6) | 37 (14,3) | 0,002 |
| Οποιοδήποτε βακτήριο | 92 (72,4) | 222 (85,7) | 0,002 |
| Συνολικά SP | 30 (23,6) | 96 (37,1) | 0,008 |
| Συνολικά HI | 40 (31,5) | 105 (40,5) | 0,085 |
| Συνολικά MC | 32 (25,2) | 112 (43,2) | 0,001 |
| Συνολικά SPγo | 4 (3,1) | 3 (1,2) | 0,224 |
| Συνολικά SA | 38 (29,9) | 81 (31,3) | 0,787 |
| Μικτά SP | 22 (17,3) | 76 (29,3) | 0,011 |
| Μικτά HI | 30 (23,6) | 79 (30,5) | 0,158 |
| Μικτά MC | 23 (18,1) | 86 (33,2) | 0,002 |
| Μικτά SPγo | 4 (3,1) | 3 (1,2) | 0,224 |
| Μικτά SA | 17 (13,4) | 50 (19,3) | 0,693 |
| Συνδυασμός βακτηρίων | 44 (34,6) | 120 (46,3) | 0,029 |

SP: *Streptococcus pneumoniae*, HI: *Haemophilus influenzae*, MC: *Moraxella catarrhalis*, SA: *Staphylococcus aureus*, SPγo: *Streptococcus pyogenes*

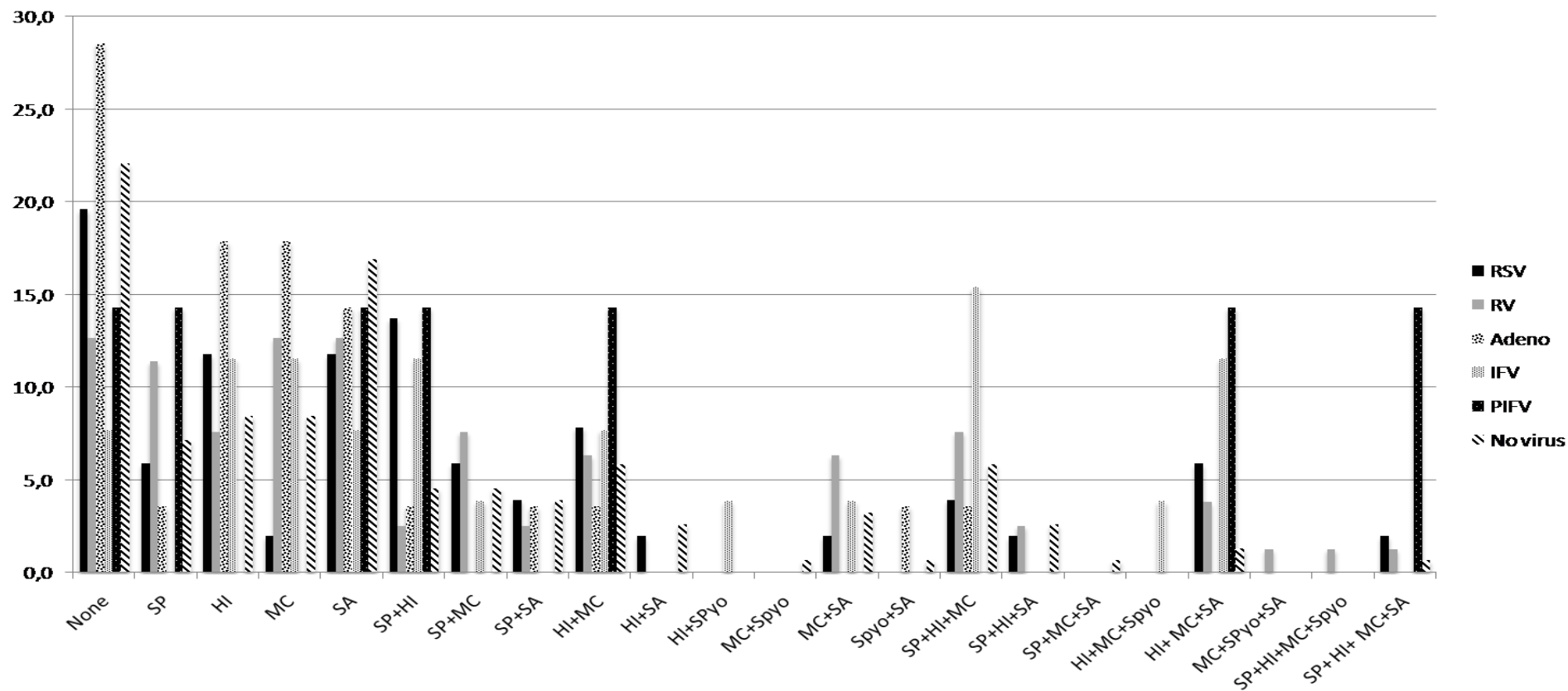
4.3 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΙΟΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Για την ανίχνευση των ιών εξετάστηκαν συνολικά 386 ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα. Ο έλεγχος για την ανίχνευση των προαναφερθέντων ιών πραγματοποιήθηκε στα 372 επιχρίσματα, μετά την εκχύλιση του RNA/DNA. Τα υπόλοιπα 14 ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα αποκλείστηκαν από τη μελέτη λόγω ανεπαρκούς ποσότητας του δείγματος. Τα 372 επιχρίσματα εξετάστηκαν με τη μέθοδο της RT-PCR και τα 218 (58,6%) βρέθηκαν θετικά για έναν τουλάχιστον από τους ιούς. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται ο συνολικός αριθμός των παιδιών, στα οποία ανιχνεύθηκε ένας τουλάχιστον από τους ιούς που μελετήθηκαν για τις δυο ομάδες των ασυμπτωματικών και συμπτωματικών παιδιών.

Από την ομάδα των ασυμπτωματικών παιδιών (120 παιδιά), τα 57 (47,5%) ήταν θετικά για έναν τουλάχιστον ιό, ενώ από την ομάδα των συμπτωματικών παιδιών (252 παιδιά), τα 164 (65,1%) βρέθηκαν θετικά για έναν τουλάχιστον ιό ($p=0,002$). Στα συμπτωματικά παιδιά οι λοιμώξεις από τους ιούς IFV, PIVs, RSV, RV και AdVs ήταν συχνότερες σε σχέση με τα ασυμπτωματικά, όμως η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για τον RSV. Ο βακτηριακός αποικισμός του ρινοφάρυγγα των παιδιών με λοίμωξη από οποιονδήποτε από τους ιούς που εξετάστηκαν ή χωρίς λοίμωξη παρουσιάζεται στο Σχήμα 2. Ο συνολικός αριθμός των ασυμπτωματικών και συμπτωματικών παιδιών, που ήταν αποικισμένα με οποιοδήποτε από τα βακτήρια, που εξετάστηκαν (μεμονωμένα ή σε συνδυασμό) για τις δυο ομάδες παιδιών θετικών και αρνητικών για κάποιον ιό παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Σημειώνεται πως ο βακτηριακός αποικισμός του ρινοφάρυγγα με ένα τουλάχιστον από τα βακτήρια που μελετήθηκαν ήταν συχνότερος μεταξύ των συμπτωματικών παιδιών, τα οποία βρέθηκαν θετικά για έναν τουλάχιστον από τους ιούς. Συγκεκριμένα στα παιδιά που βρέθηκαν θετικά για έναν τουλάχιστον από τους ιούς ο αποικισμός με *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ή *M. catarrhalis* ήταν συχνότερος, όμως η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για τη *M. catarrhalis* ($p=0.005$). Οι διαφορές του βακτηριακού αποικισμού του ρινοφάρυγγα στα παιδιά που βρέθηκαν θετικά για οποιονδήποτε από τους ιούς (IFV, PIVs, RSV, RV και AdVs) που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Στα παιδιά με λοίμωξη από τον ιό της γρίπης ήταν συχνότερος ο αποικισμός με *H. influenzae* και *M. catarrhalis* ($p<0.05$). Επίσης, συχνός ήταν ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με *H. influenzae* στα παιδιά με λοίμωξη από τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό, ενώ στα παιδιά που είχαν μολυνθεί από τον ρινοϊό ήταν συχνός ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με *M. catarrhalis*. Οι υπόλοιπες διαφορές του βακτηριακού αποικισμού του ρινοφάρυγγα δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 3. Σύγκριση του αριθμού παιδιών, στα οποία ανιχνεύθηκε ένας τουλάχιστον από τους ιούς που μελετήθηκαν για τις δυο ομάδες των ασυμπτωματικών και συμπτωματικών παιδιών.

| ΙΟΙ | ΑΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ (n=120) ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ (n=252) ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | ΤΙΜΗ P |
|---------------------|--|---|-------------------|
| RSV | 13 (10,8) | 53 (20,7) | 0,019 |
| RV | 30 (25,0) | 70 (27,3) | 0,632 |
| AdV | 10 (8,3) | 33 (12,9) | 0,196 |
| IFV | 7 (5,8) | 23 (9,1) | 0,275 |
| PIV | 3 (2,5) | 7 (2,7) | 1,000 |
| Οποιοσδήποτε ιός | 57 (47,5) | 164 (64,1) | 0,002 |
| Συνδυασμός ιών | 6 (5,0) | 22 (8,6) | 0,216 |



Σχήμα 2. Βακτηριακός αποικισμός του ρινοφάρυγγα παιδιών με λοίμωξη από τους παρακάτω ιούς: αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV), ρινοϊό (RV), αδενοϊό (AdV), ιό της γρίπης (IFV), ιό της παραγρίπης (PIV) ή χωρίς ιό.

Πίνακας 4. Σύγκριση του βακτηριακού αποικισμού για τις δύο ομάδες των ασυμπτωματικών και συμπτωματικών παιδιών, τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως θετικά ή αρνητικά για κάποιον ιό.

| ΒΑΚΤΗΡΙΑ | ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΑ | | ΑΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΑ | | ΤΙΜΗ P |
|----------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------|
| | Θετικά για ιό (n=161) | Αρνητικά για ιό (n=91) | Θετικά για ιό (n=57) | Αρνητικά για ιό (n=63) | |
| | ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | |
| Κανένα βακτήριο | 19 (11,8) | 15 (16,5) | 13 (22,8) | 19 (30,2) | 0,009 |
| Συνολικά SP | 62 (38,5) | 32 (35,2) | 15 (26,3) | 14 (22,2) | 0,077 |
| Συνολικά HI | 72 (44,7) | 31 (34,1) | 20 (35,1) | 18 (28,6) | 0,099 |
| Συνολικά MC | 74 (46,0) | 35 (38,5) | 19 (33,3) | 13 (20,6) | 0,005 |
| Συνολικά SPγo | 3 (1,9) | 0 (0,0) | 2 (3,5) | 2 (3,2) | 0,372 |
| Συνολικά SA | 51 (31,7) | 29 (31,9) | 15 (26,3) | 21 (33,3) | 0,849 |

Πίνακας 5. Σύγκριση του αριθμού των παιδιών, που ήταν αποικισμένα με οποιοδήποτε (ή κανένα) από τα βακτήρια που εξετάστηκαν (μεμονωμένα ή σε συνδυασμό) για τα παιδιά που απομονώθηκε RSV, RV, AdV, IFV, PIV.

| | RSV (n=51) ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | RV (n=79) ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | AdV (n=28) ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | IFV (n=26) ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | PIV (n=7) ΑΡΙΘΜΟΣ (%) | ΤΙΜΗ P |
|--------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------|
| Κανένα βακτήριο | 10 (19,6) | 10 (12,7) | 8 (28,6) | 2 (7,7) | 1 (14,3) | 0,221 |
| Συνολικά SP | 19 (37,3) | 29 (36,7) | 4 (14,3) | 8 (30,8) | 3 (42,9) | 0,222 |
| Συνολικά HI | 25 (49,0) | 26 (32,9) | 8 (28,6) | 17 (65,4) | 3 (42,9) | 0,020 |
| Συνολικά MC | 15 (29,4) | 38 (48,1) | 7 (25,0) | 15 (57,7) | 2 (28,6) | 0,028 |
| Συνολικά SPγo | 0 (0,0) | 2 (2,5) | 1 (3,6) | 2 (7,7) | 0 (0,0) | 0,338 |
| Συνολικά SA | 15 (29,4) | 24 (30,4) | 7 (25,0) | 6 (23,1) | 2 (28,6) | 0,951 |

SP: *Streptococcus pneumoniae*, HI: *Haemophilus influenzae*, MC: *Moraxella catarrhalis*, SA: *Staphylococcus aureus*, SPγo: *Streptococcus pyogenes*

Για τη σύγκριση ενός ποιοτικού χαρακτηριστικού μεταξύ δύο ή περισσότερων ομάδων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 . Σε περίπτωση που η μικρότερη αναμενόμενη τιμή των παρατηρήσεων ήταν μικρότερη του 5 χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Fischer (Fischer's exact test). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (τιμή p) εμφανίζονται με έντονη γραφή.

4.4 ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ

Τα αποτελέσματα των πολυπαραγοντικών αναλύσεων παλινδρόμησης (multivariate logistic regression analyses) παρουσιάζονται στους Πίνακες 6, 7, 8 και 9. Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με *S. pneumoniae* παρουσίασε θετική συσχέτιση με την παρουσία *H. influenzae* και την εκδήλωση συμπτωμάτων από το ανώτερο αναπνευστικό. Ο αποικισμός με *H. influenzae* ήταν πιο πιθανός με την παρουσία λοίμωξης από τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό και παρουσίασε θετική συσχέτιση με την ύπαρξη ενός αδελφού που παρακολουθούσε παιδικό σταθμό. Ο αποικισμός με *M. catarrhalis* συσχετίστηκε με την παρουσία *H. influenzae*, την ανίχνευση του ρινοϊού και την εκδήλωση συμπτωμάτων από το ανώτερο αναπνευστικό. Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με *S. pyogenes* παρουσίασε θετική συσχέτιση με την παρουσία λοίμωξης από τον ιό της γρίπης. Αξίζει να σημειωθεί η ισχυρή, αμφίδρομη και αρνητική συσχέτιση μεταξύ του *S. pneumoniae* και του *S. aureus*. Ο αποικισμός με *S. aureus* ήταν λιγότερο πιθανός στα παιδιά που είχαν λάβει αντιβιοτικά κατά τους τελευταίους 3 μήνες.

Η παρουσία αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (RSV) παρουσίασε θετική συσχέτιση με την πολλαπλή μόλυνση από τους ιούς που ανιχνεύθηκαν και την εκδήλωση συμπτωμάτων από το ανώτερο αναπνευστικό και αρνητική συσχέτιση με την παρουσία ρινοϊού (RV) και την ύπαρξη ενός αδελφού που παρακολουθούσε παιδικό σταθμό. Η παρουσία ρινοϊού (RV) παρουσίασε θετική συσχέτιση με τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα με *M. catarrhalis* και αρνητική συσχέτιση με την παρουσία αναπνευστικού συγκυτιακού ιού και ιού της γρίπης. Η παρουσία αδενοϊού (AVs) συσχετίστηκε με την πολλαπλή μόλυνση από ιούς, ενώ η παρουσία ιού της γρίπης (IFV) συσχετίστηκε με τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα με *H. influenzae* και *S. pyogenes* και αμοιβαίως με την παρουσία ρινοϊού (RV). Η παρουσία ιού της παραγρίπης (PIV) συσχετίστηκε θετικά με την πολλαπλή μόλυνση από τους ιούς που ανιχνεύθηκαν. Σημειώνεται πως ο εμβολιασμός κατά του πνευμονιόκοκκου (μερικός ή πλήρης) και της γρίπης και οι παράγοντες κινδύνου όπως η προωρότητα, οι περιγεννητικές επιπλοκές και η υποκείμενη χρόνια νόσος δεν παρουσίασαν σημαντική συσχέτιση με τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα με οποιοδήποτε από τα βακτήρια που εξετάστηκαν ή με την παρουσία οποιουδήποτε από τους ιούς που μελετήθηκαν. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι, ένας μικρός αριθμός των παιδιών (n=29) ήταν εμβολιασμένα κατά της γρίπης. Από τις συσχετίσεις των δημογραφικών χαρακτηριστικών με τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα με οποιοδήποτε από τα βακτήρια που εξετάστηκαν προέκυψε η αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αποικισμού με *S. aureus* και της αλβανικής καταγωγής (adjusted Odds Ratio, aOR: 0,492, με 95% όρια εμπιστοσύνης, OE: 0,245-0,986). Τα παιδιά των Ρομά ήταν πιο πιθανό να αποικιστούν με *H. influenzae* (aOR: 6,94, 95% OE: 1,90-25,33). Η συσχέτιση της εποχής που έγινε η δειγματοληψία με τον αποικισμό με *S. aureus* ανέδειξε το φθινόπωρο ως την εποχή, κατά τη διάρκεια

της οποίας ο αποικισμός με *S. aureus* ήταν πιο συχνός (aOR: 2,32, 95% ΟΕ: 1,17-4,62). Οι λοιμώξεις από τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV) ήταν λιγότερο συχνές κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου σε σύγκριση με την άνοιξη (aOR: 0,253, 95% ΟΕ: 0.07-0.95).

ΠΙΝΑΚΕΣ 6. Συσχέτιση των βακτηρίων που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα μεταξύ τους και με τους ιούς που ανιχνεύθηκαν.

| | SP | HI | MC | SPγιο | SA | RSV | RV | AdV | IFV | PIV |
|-----------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|--------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|--------------|-------------------------------|--------------|
| ΣΥΜΜΕΤΑΒΛΗΤΗ | aOR (95% OE) | aOR(95%OE) | aOR (95% OE) | aOR (95% OE) | aOR (95% OE) | aOR (95% OE) | aOR (95% OE) | aOR (95% OE) | aOR (95% OE) | aOR (95% OE) |
| ΒΑΚΤΗΡΙΑ | | | | | | | | | | |
| SP | - | 1.705 (0.777-3.741) | | ΔΙ | 0.539 (0.312-0.929) | ΔΙ | 1.531 (0.903-2.597) | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ |
| HI | 1.931 (1.178-3.164) | - | 1.805 (1.099-2.967) | ΔΙ | 0.602 (0.351-1.034) | 1.615 (0.832-3.136) | ΔΙ | ΔΙ | 2.756 (1.053-7.216) | ΔΙ |
| MC | ΔΙ | 1.328 (0.595-2.964) | - | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | 2.056 (1.220-3.465) | ΔΙ | 1.611 (0.627-4.140) | ΔΙ |
| SPγιο | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | - | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | 19.140 (1.747-209.726) | ΔΙ |
| SA | 0.522 (0.303-0.898) | 1.263 (0.526-3.029) | ΔΙ | ΔΙ | - | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ |

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Συσχέτιση των ιών που ανιχνεύθηκαν μεταξύ τους και με τα βακτήρια που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα.

| | SP | HI | MC | SPyo | SA | RSV | RV | AdV | IFV | PIV |
|------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| ΣΥΜΜΕΤΑΒΛΗΤΗ | aOR (95% ΟΕ) | aOR(95%ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) |
| ΙΟΙ | | | | | | | | | | |
| RSV | ΔΙ | 3.104 (1.017-9.474) | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | - | 0.333 (0.145-0.766) | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ |
| RV | 1,377 (0,802-2,365) | ΔΙ | 2.501 (1.298-4.821) | ΔΙ | ΔΙ | 0.069 (0.015-0.323) | - | ΔΙ | 0.174 (0.038-0.807) | ΔΙ |
| AdV | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | - | ΔΙ | ΔΙ |
| IFV | ΔΙ | 2.032 (0.152-27.116) | 1.856 (0.715-4.816) | 16.068 (1.608-160.550) | ΔΙ | ΔΙ | 0.161 (0.035-0.730) | ΔΙ | - | ΔΙ |
| PIV | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | - |
| ΟΠΟΙΟΣΔΗΠΟΤΕ ΙΟΣ | ΔΙ | 0.930 (0.388-2.227) | 0.803 (0.438-1.470) | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ |
| ΠΟΛΛΑΠΛΟΙ ΙΟΙ | 2.116 (0.885-5.059) | ΔΙ | 1.577 (0.652-3.816) | ΔΙ | ΔΙ | 39.933 (8.023-198.764) | ΔΙ | 22.769 (4.711-110.053) | ΔΙ | 6.581 (1.305-33.179) |

ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Συσχέτιση των παραγόντων κινδύνου με τα βακτήρια που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα.

| | SP | HI | MC | SPyo | SA |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|
| ΣΥΜΜΕΤΑΒΛΗΤΗ | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) |
| ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ | | | | | |
| ΗΛΙΚΙΑ (ΜΗΝ) | 1,006 (0.994-1.018) | 1.010 (0.988-1.032) | 1.007 (0.995-1.019) | 0.996 (0.952-1.041) | 1.009 (0.996-1.023) |
| ΦΥΛΟ(ΑΡΡΕΝ) | 0.977 (0.612-1.559) | 1.079 (0.504-2.311) | 1.430 (0.896-2.281) | 1.683 (0.301-9.415) | 1.039 (0.645-1.675) |
| ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΠΑΙΔΙΚΟΥ ΣΤΑΘΜΟΥ | ΔΙ | 2.757 (0.966-7.873) | ΔΙ | ΔΙ | 0.591 (0.308-1.135) |
| ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΔΕΡΦΩΝ | ΔΙ | 3.188 (1.192-8.528) | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ |
| ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΟΣ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | 0.696 (0.391-1.239) |
| ΛΗΨΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΤΟΥΣ ΤΕΛΕΥΤΑΙΟΥΣ 3 ΜΗΝΕΣ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | 0.509 (0.270-0.962) |
| ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ | 1.736 (1.016-2.963) | 1.108 (0.475-2.584) | 2.250 (1.319-3.835) | 0.626 (0.114-3.453) | 1.195 (0.710-2.010) |

ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Συσχέτιση των παραγόντων κινδύνου με τους ιούς που ανιχνεύθηκαν.

| | RSV | RV | AdV | IFV | PIV |
|------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| ΣΥΜΜΕΤΑΒΛΗΤΗ | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) | aOR (95% ΟΕ) |
| ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ | | | | | |
| ΚΙΝΔΥΝΟΥ | | | | | |
| ΗΛΙΚΙΑ (ΜΗΝ) | 0.987 (0.967-1.007) | 1.004 (0.990-1.018) | 1.016 (0.986-1.048) | 1.025 (0.999-1.052) | 0.974 (0.932-1.019) |
| ΦΥΛΟ(ΑΡΡΕΝ) | 1.144 (0.604-2.166) | 0.790 (0.477-1.310) | 0.858 (0.264-2.786) | 0.523 (0.202-1.357) | 0.553 (0.125-2.440) |
| ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ | | | | | |
| ΠΑΙΔΙΚΟΥ | 0.402 (0.148-1.091) | ΔΙ | ΔΙ | 2.313 (0.745-7.185) | 5.276 (0.961-28.976) |
| ΣΤΑΘΜΟΥ | | | | | |
| ΠΑΡΟΥΣΙΑ | 0.300 (0.109-0.825) | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ | ΔΙ |
| ΑΔΕΡΦΩΝ | | | | | |
| ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΟΣ | ΔΙ | 0.701 (0.380-1.292) | ΔΙ | 1.730 (0.390-7.676) | ΔΙ |
| ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ | | | | | |
| ΛΗΨΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΤΟΥΣ | | | | | |
| ΤΕΛΕΥΤΑΙΟΥΣ 3 ΜΗΝΕΣ | | | | | |
| ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ | | | | | |
| ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΩΤΕΡΟ | 2.129 (1.018-4.453) | 1.193 (0.678-2.097) | 3.224 (0.739-14.061) | 2.306 (0.687-7.736) | 0.731 (0.166-3.216) |
| ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ | | | | | |

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε ο βακτηριακός αποικισμός του ρινοφάρυγγα με *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* και *S. pyogenes* και ο ρινικός αποικισμός με *S. aureus* σε ένα σημαντικό αριθμό βρεφών και μικρών παιδιών με και χωρίς συμπτώματα ιογενούς λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος που επισκέφθηκαν τα εξωτερικά ιατρεία του νοσοκομείου και συγκρίθηκε η συχνότητα αποικισμού στα παιδιά ανάλογα με την ταυτοποίηση ή όχι κάποιου ιού. Σε αντίθεση με τις περισσότερες προηγούμενες μελέτες, στη δική μας μελέτη συμπεριλήφθηκαν εκτός από τα παιδιά με συμπτώματα οξείας λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού και ασυμπτωματικά παιδιά. Η πλειονότητα των παιδιών και στις δύο ομάδες της μελέτης είχε αποικιστεί με ένα τουλάχιστον από τα βακτήρια που εξετάστηκαν, ενώ και στις δυο ομάδες ήταν συχνή η ανίχνευση ενός τουλάχιστον από τους ιούς που μελετήθηκαν. Ως εκ τούτου, η μελέτη μας εξέτασε την επίδραση των ιογενών λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος στο βακτηριακό αποικισμό του ρινοφάρυγγα, καθώς επίσης και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιών και των δυνητικά παθογόνων βακτηρίων που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα.

Ο *S. pneumoniae* απομονώθηκε σε ποσοστό 37,1% από τα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα των συμπτωματικών παιδιών και σε ποσοστό 27,6% από τα επιχρίσματα των ασυμπτωματικών παιδιών. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και σε επιδημιολογικές μελέτες που διεξήχθησαν στην Ελλάδα μεταξύ υγιών παιδιών πριν ή λίγο μετά την εφαρμογή του 7-δύναμου συζευγμένου εμβολίου^{92,93,94}. Τα ποσοστά αποικισμού του ρινοφάρυγγα με *S. pneumoniae*, *H. influenzae* και *M. catarrhalis* είναι επίσης, παρόμοια με εκείνα που καταγράφηκαν σε προηγούμενη μελέτη⁹⁵. Ο *S. aureus* απομονώθηκε σε ποσοστό 29,9% από τα ρινικά επιχρίσματα των συμπτωματικών παιδιών και σε ποσοστό 31,3% από τα επιχρίσματα των ασυμπτωματικών παιδιών. Αξιοσημείωτο εύρημα της μελέτης μας είναι το υψηλό ποσοστό ρινικής φορέας από *S. aureus* σε σύγκριση με άλλες μελέτες^{96,97,98}. Είναι πιθανό αυτό το υψηλό ποσοστό ρινικής φορέας να οφείλεται στη λήψη του ρινικού επιχρίσματος από τις πρόσθιες ρινικές θαλάμες⁹⁹ γεγονός που έδωσε τη δυνατότητα για την παρατήρηση της αλληλεπίδρασης του *S. aureus* με τα άλλα βακτήρια που εξετάστηκαν.

Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με οποιοδήποτε βακτήριο ή με συνδυασμό των βακτηρίων που εξετάστηκαν στη μελέτη μας ήταν πιο συχνός μεταξύ των παιδιών με συμπτώματα ιογενούς λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος σε σύγκριση με τα παιδιά που δεν είχαν παρόμοια συμπτώματα. Συγκεκριμένα ο αποικισμός με *S. pneumoniae* ή *H. influenzae* ή *M. catarrhalis* ήταν συχνότερος μεταξύ των συμπτωματικών παιδιών σε σύγκριση με τα ασυμπτωματικά, ωστόσο καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων για τον *S. pneumoniae* και τη *M. catarrhalis*. Σε μια μελέτη από τους Faden και συνεργάτες αναφέρονται υψηλότερα ποσοστά αποικισμού του ρινοφάρυγγα με *S. pneumoniae*,

H. influenzae και *M. catarrhalis* κατά τη διάρκεια ιογενούς λοίμωξης του αναπνευστικού στα παιδιά¹⁰⁰. Σε άλλη μελέτη σημειώνεται ότι ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με *S. pneumoniae* συνδέεται με αύξηση του αριθμού των επισκέψεων στο γιατρό για ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος¹⁰¹. Σε μια μελέτη που έγινε στην Κένυα η παρουσία συμπτωμάτων από το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο αποικισμού του ρινοφάρυγγα από *S. pneumoniae* και *H. influenzae*³⁷. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη από τους Rodrigues F. και συνεργάτες καταγράφηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των συμπτωμάτων ρινίτιδας και της παρουσίας του *H. influenzae*. Στην ίδια μελέτη σημειώνεται ότι η συσχέτιση μεταξύ των συμπτωμάτων ρινίτιδας και του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με *S. pneumoniae* ήταν αδύναμη⁹⁶.

Παρόμοια ευρήματα από τη δική μας και άλλες μελέτες καταδεικνύουν τη σημασία που έχει η συνεχής μελέτη των βακτηρίων που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα και υποστηρίζουν την άποψη ότι η εφαρμογή αποτελεσματικών εμβολίων μπορεί να τροποποιήσει τον αποικισμό από δυνητικά παθογόνα βακτήρια και ως εκ τούτου να επηρεάσει την εκδήλωση ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος.

Σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών αναφέρεται ότι οι ιοί που προσβάλλουν το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα αλληλεπιδρούν με τα βακτήρια μέσω ποικιλίας μηχανισμών, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται η αλλοίωση του αναπνευστικού βλεννογόνου και η καταστολή της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή στη βακτηριακή λοίμωξη διευκολύνοντας το βακτηριακό αποικισμό αλλά και την πρόκληση διευσδυτικής νόσου². Σε παλαιότερες και πρόσφατες επιδημιολογικές παρατηρήσεις σημειώνεται η συσχέτιση μεταξύ ιογενούς και δευτερογενούς βακτηριακής λοίμωξης^{19,20,25,31,102}. Αξίζει να σημειωθεί, ότι είναι δυνατόν η δευτερογενής βακτηριακή λοίμωξη να επιτείνει την εκδήλωση των συμπτωμάτων από το ανώτερο αναπνευστικό μεταξύ των παιδιών με ιογενή λοίμωξη⁹⁶. Σε μια μελέτη στη Νότια Αφρική μελετήθηκε η επίδραση του εμβολιασμού με το 9-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο κατά του πνευμονιοκόκκου και σημειώθηκε ότι το εμβόλιο εκτός από προστασία έναντι των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, παρέχει επιπλέον κατά 30% προστασία έναντι της ιογενούς πνευμονίας¹⁸.

Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με οποιοδήποτε από τα βακτήρια, που εξετάστηκαν στη μελέτη μας, ήταν πιο συχνός μεταξύ των παιδιών που βρέθηκαν θετικά για έναν τουλάχιστον από τους ιούς, σε σύγκριση με τα παιδιά που βρέθηκαν αρνητικά. Ωστόσο, δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων. Ο αποικισμός με *M. catarrhalis* ήταν συχνότερος στα συμπτωματικά παιδιά που βρέθηκαν θετικά για έναν τουλάχιστον από τους ιούς που μελετήθηκαν. Επιπλέον η μελέτη μας έδειξε ότι, τα υψηλότερα ποσοστά αποικισμού του ρινοφάρυγγα, τόσο με τη *M. catarrhalis* όσο και με τον *H. influenzae* συσχετίστηκαν με την παρουσία του ιού της γρίπης, ενώ τα χαμηλότερα ποσοστά αποικισμού και για τα δύο βακτήρια συσχετίστηκαν με την παρουσία του αδενοϊού (AV).

Η πολυπαραγοντική ανάλυση της μελέτης μας ανέδειξε την ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του ιού της γρίπης (IFV) και του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με *S. pyogenes*. Επιπλέον, η ανίχνευση του ιού της γρίπης ήταν πιο συχνή σε παιδιά, που ήταν αποικισμένα με *H. influenzae*. Παρόμοια ευρήματα αναφέρονται σε πρόσφατες επιδημιολογικές παρατηρήσεις όπου σημειώνεται η σημασία των δευτερογενών βακτηριακών λοιμώξεων ως αιτία σημαντικής νοσηρότητας και θνησιμότητας κατά τη διάρκεια της εποχικής γρίπης^{105,106}. Ωστόσο, στη μελέτη μας δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του ιού της γρίπης και του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με *S. pneumoniae* ή *S. aureus*, όπως σημειώθηκε σε άλλες μελέτες⁸². Επιπρόσθετα, η πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε την ισχυρή συσχέτιση τόσο μεταξύ της παρουσίας του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού και του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με *H. influenzae*, όσο και μεταξύ του ρινοϊού και του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με *M. catarrhalis*. Αξίζει να σημειωθεί ότι, και στα ασυμπτωματικά παιδιά παρουσιάστηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού και του αποικισμού του ρινοφάρυγγα με *H. influenzae*⁸². Σε μια μελέτη έχει παρατηρηθεί *in vitro* ότι η παρουσία του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (RSV) προάγει την προσκόλληση των βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου και του *H. influenzae*, σε επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού¹⁰⁷. Σε προηγούμενη μελέτη αναφέρεται η συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του ρινοϊού (RV) και του υψηλού ποσοστού αποικισμού του ρινοφάρυγγα με *M. catarrhalis* σε ασυμπτωματικά παιδιά¹⁰⁸. Επιπλέον, σε μια άλλη μελέτη σημειώνεται ότι τα παιδιά με υψηλό ποσοστό αποικισμού του ρινοφάρυγγα με *M. catarrhalis* είναι περισσότερο επιρρεπή στην ωτίτιδα¹⁰⁹. Επιπλέον, η πολυπαραγοντική ανάλυση της μελέτης μας ανέδειξε και μια έντονα ανταγωνιστική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του ιού της γρίπης (IFV) και του ρινοϊού (RV), καθώς η ανίχνευση του ενός ιού ήταν λιγότερο πιθανή με την παρουσία του άλλου.

Στη δική μας μελέτη το ποσοστό των συμπτωματικών παιδιών, που βρέθηκαν θετικά σε έναν τουλάχιστον από τους ιούς που ανιχνεύθηκαν ανέρχεται στο 64%. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και σε προηγούμενες μελέτες, στις οποίες η ανίχνευση των ιών έγινε επίσης, με τη χρήση μοριακών μεθόδων^{110,111,112}. Σε μια μελέτη που διεξήχθη σε παιδιατρικό πληθυσμό με συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα στο 73% των περιπτώσεων που εξετάστηκαν διαπιστώθηκε η παρουσία τουλάχιστον ενός ιού που προσβάλλει το αναπνευστικό ή η παρουσία *Mycoplasma pneumoniae* με τη χρήση PCR¹¹⁰. Αξίζει να σημειωθεί, ότι στη μελέτη μας καταγράφεται και υψηλό ποσοστό ασυμπτωματικών παιδιών (47,5%), που βρέθηκαν θετικά σε έναν τουλάχιστον από τους ιούς που ανιχνεύθηκαν. Η διαφορά όμως μεταξύ των δύο ομάδων ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,002$). Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες¹¹². Επιπλέον, στις δυο ομάδες της μελέτης συγκρίθηκαν τα ποσοστά ανίχνευσης των ιών που μελετήθηκαν και διαπιστώθηκε πως η διαφορά ήταν σημαντική μόνο για την ανίχνευση του

αναπνευστικού συγκυτιακού ιού ($p=0.019$). Δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων όσον αφορά τους υπόλοιπους ιούς. Τα υψηλά ποσοστά ανίχνευσης των ιών που μελετήθηκαν στα ασυμπτωματικά παιδιά μπορούν να αποδοθούν σε παράγοντες που σχετίζονται με τη χρήση των μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση των ιών, στα κριτήρια σύμφωνα με τα οποία τα παιδιά χαρακτηρίστηκαν ως ασυμπτωματικά, στη χαμηλή παθογονικότητα κάποιων ιών, όπως οι ρινοϊοί και στο χαμηλότερο ποσοστό κάθαρσης του ιού σε μικρά παιδιά.

Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ του *S. pneumoniae* και του *S. aureus* που παρατηρήθηκε στη μελέτη μας συμφωνεί με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών. Αξίζει να σημειωθεί ότι, αυτή η ανταγωνιστική συσχέτιση μεταξύ των δύο βακτηρίων παρατηρήθηκε στον πληθυσμό της μελέτης μας αρκετά χρόνια μετά την εφαρμογή του 7-δύναμου συζευγμένου εμβολίου κατά του πνευμονιόκοκκου (PCV-7) το 2004. Αρκετές προηγούμενες μελέτες που διεξήχθησαν πριν από την εφαρμογή του PCV-7 έδειξαν την αρνητική συσχέτιση μεταξύ αυτών των δύο βακτηρίων όσον αφορά το βακτηριακό αποικισμό του ρινοφάρυγγα σε υγιή παιδιά^{78,79,80,81,82}. Αυτή η ανταγωνιστική συσχέτιση ήταν πιο έντονη με τους ορότυπους που περιλαμβάνονται στο PCV-7^{78,80}. Σε δύο μελέτες που διεξήχθησαν στην Ολλανδία καταγράφεται μια παροδική αύξηση του αποικισμού με *S. aureus* σε νήπια 11 μηνών, που είχαν εμβολιαστεί με το 7-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο και στους γονείς τους. Δεν καταγράφηκε όμως, αύξηση του αποικισμού με *S. aureus* σε παιδιά ηλικίας 24 μηνών. Το εύρημα αυτό παρατηρήθηκε 4,5 χρόνια μετά την εφαρμογή του PCV-7^{97,98}. Άλλες μελέτες που έγιναν μετά τον εμβολιασμό με το 7-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο δεν κατέγραψαν αύξηση του αποικισμού με *S. aureus*¹¹³. Σε παρόμοια μελέτη παρατηρήθηκε μείωση της ρινοφάρυγγικής φορέας των ορότυπων του *S. pneumoniae* που περιλαμβάνονται στο 13-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο¹¹⁴. Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ του *S. pneumoniae* και του *S. aureus* που καταγράφεται στην παρούσα μελέτη και σε άλλες παρόμοιες, έχει σημασία γιατί παρατηρήθηκε αρκετά χρόνια μετά την εισαγωγή του PCV-7 και διαπιστώθηκε μεταξύ μεγαλύτερων σε ηλικία παιδιών. Συνεπώς η παραπάνω παρατήρηση καθώς και η αύξηση του αποικισμού με *S. aureus* καταδεικνύουν τη σημασία που έχει η συνεχής μελέτη και επιτήρηση τόσο των ορότυπων του *S. pneumoniae* όσο και του *S. aureus*. Η επιτήρηση του *S. aureus* αποκτά ακόμη μεγαλύτερη σημασία λόγω της αύξησης του επιπολασμού των λοιμώξεων από τον MRSA.

Επιπρόσθετα, στη μελέτη μας ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με *S. pneumoniae* ήταν πιο συχνός μεταξύ των παιδιών που είχαν αποικιστεί με *H. influenzae*. Αντίθετα, ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με *H. influenzae* δεν ήταν πιο συχνός μεταξύ των παιδιών που είχαν αποικιστεί με *S. pneumoniae*. Η θετική συσχέτιση μεταξύ αυτών των δύο βακτηρίων έχει παρατηρηθεί και σε

προηγούμενες μελέτες^{37,81,82}. Σε μια μελέτη που διεξήχθη στο Περού διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ του *S. pneumoniae* και του *H. influenzae* όσον αφορά τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα σε υγιή παιδιά, με τη χρήση της ποσοτικής PCR⁷⁹. Επιπλέον, η απομόνωση της *M. catarrhalis* ήταν πιο συχνή με την παρουσία του *H. influenzae*. Σε μια πρόσφατη μελέτη από την Ολλανδία παρατηρήθηκε ότι ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με συνδυασμό των βακτηρίων ήταν συχνότερος σε σύγκριση με τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα μόνο με *M. catarrhalis* ή *H. influenzae*¹⁰³. Πρόσφατες παρατηρήσεις καταδεικνύουν τη θετική συσχέτιση μεταξύ του *S. pneumoniae* και του *H. influenzae* καθώς και μεταξύ του *H. influenzae* και της *M. catarrhalis*, αλλά και το ρόλο των μικτών μολύνσεων με δυο ή περισσότερα παθογόνα σε λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος όπως η μέση ωτίτιδα⁷². Επιπλέον, σε άλλες παρόμοιες επιδημιολογικές παρατηρήσεις διαπιστώνεται ότι η ανοσοποίηση με συζευγμένα εμβόλια έναντι του πνευμονιοκόκκου μπορεί να έχει μια ευρύτερη επίδραση οδηγώντας σε μείωση των περιστατικών μέσης ωτίτιδας⁷⁶. Πιο συγκεκριμένα σε μια μελέτη από το Ισραήλ μετά την εφαρμογή του PCV-13 καταγράφεται μείωση κατά 46% των περιστατικών μέσης ωτίτιδας που οφείλονται σε *S. pneumoniae* και κατά 43% των περιστατικών που οφείλονται σε άλλα παθογόνα⁸⁵.

Παρά τα παραπάνω σημαντικά ευρήματα η συγκεκριμένη μελέτη έχει ορισμένους περιορισμούς, οι οποίοι θα πρέπει να αναφερθούν. Η συμμετοχή μεγαλύτερου αριθμού ασθενών στη μελέτη και η εξέταση του βακτηριακού αποικισμού του ρινοφάρυγγα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μπορεί να παρέχει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση των διαφορετικών ιών και των βακτηρίων που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα των μικρών παιδιών. Επίσης, η χρήση της ποσοτικής PCR για την ανίχνευση των βακτηρίων θα μπορούσε να παρέχει περισσότερες πληροφορίες για το βακτηριακό αποικισμό του ρινοφάρυγγα⁷⁹. Επιπλέον, στη μελέτη μας εξετάστηκε μόνο ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* και *S. pyogenes* και ο ρινικός αποικισμός με *S. aureus*. Στον αποικισμό όμως του ρινοφάρυγγα συμμετέχουν και άλλα βακτήρια και είναι πολύ πιθανό αυτά να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθώς και με τους ιούς που προσβάλλουν το αναπνευστικό σύστημα. Τα βακτήρια αυτά δεν εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Επίσης, οι ιοί όπως ο ανθρώπινος μεταπνευμονοϊός, οι κοροναϊοί και οι εντεροϊοί που δεν μελετήθηκαν στη δική μας μελέτη θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν σε μια νέα μελέτη.

Παρά τους παραπάνω περιορισμούς, τα ευρήματά μας επιβεβαιώνουν την επίδραση των ιογενών λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος στο βακτηριακό αποικισμό του ρινοφάρυγγα σε παιδιά, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιών που προσβάλλουν το αναπνευστικό σύστημα και των δυνητικά παθογόνων βακτηρίων που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα σε μικρά παιδιά, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των βακτηρίων. Επιπλέον, η μελέτη μας

επιβεβαιώνει και το υψηλό ποσοστό αποικισμού του ρινοφάρυγγα μεταξύ των συμπτωματικών παιδιών.

Απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να κατανοήσουμε καλύτερα τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυνητικά παθογόνων βακτηρίων, αλλά και μεταξύ των μη παθογόνων βακτηρίων που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα. Στις μελλοντικές μελέτες πρέπει να συμπεριλαμβάνονται τόσο οι επιπτώσεις του εμβολιασμού στη ρινοφαρυγγική φορεία όσο και οι μεταβολές στην επιδημιολογία των βακτηρίων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bogaert D, Keijser B, Huse S, et al. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis. *PLoS One*. 2011;6:e17035.
2. Bosch AA, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EA, Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003057.
3. Pilishvili T, Noggle B, Moore MR. Pneumococcal disease In: Centers for Disease Control and Prevention, Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases. Roush SW, McIntyre L, Baldy LM, eds. 4th ed. CDC, Atlanta, GA, 2008.
4. Faden H, L Duffy, A Williams, DA Krystofik, and J. Wolf. Epidemiology of nasopharyngeal colonization with non typable *Haemophilus influenzae* in the first 2 years of life. *J Infect Dis*. 1995;172:132-135.
5. Raymond J., L. Armand-Lefevre, F. Moulin, H. Dabernat, A. Commeau, D. Gendrel and P. Berche. Nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* in children living in an orphanage. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20:779-784.
6. Turk D. C. The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol*. 1984;18:1-16.
7. Aniansson, G., B. Alm, B. Andersson, P. Larsson, O. Nylen, H. Peterson, P. Rigner, M. Svanborg, and C. Svanborg. Nasopharyngeal colonization during the first year of life. *J Infect Dis*. 1992;165(Suppl. 1):S38–S42.
8. Boyle, F. M., P. R. Georghiou, M. H. Tilse, and J. G. McCormack.. *Branhamella (Moraxella) catarrhalis*: pathogenic significance in respiratory infections. *Med J Aust*. 1991;154:592–596.
9. Davies, B. I., and F. P. V. Maesen. Epidemiological and bacteriological findings on *Branhamella catarrhalis* respiratory infections in The Netherlands. *Drugs*. 1986;31:28–33.
10. Van Hare, G. F., P. A. Shurin, C. D. Marchant, N. A. Cartelli, C. E. Johnson, D. Fulton, S. Carlin, and C. H. Kim. Acute otitis media caused by *Branhamella catarrhalis*: biology and therapy. *Rev Infect Dis*. 1987;9:16–27.
11. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In Mandell, Douglas, Bennett (ed) Principles and Practice of Infectious Diseases, Third Edition 1990,p.1489-1510.
12. Sdougkos G¹, Chini V, Papanastasiou DA, Christodoulou G, Stamatakis E, Vris A, Christodoulidi I, Protopapadakis G, Spiliopoulou I. Community-associated *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage among

- children: molecular microbial data and clinical characteristics. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:995-1001.
13. Hisata, K, Kuwahara-Arai, K, Yamanoto, M et al. Dissemination of *methicillin-resistant staphylococci* among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3364–3372.
 14. Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, et al. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet.* 2004;363:1871-1872.
 15. Hament JM, Kimpen JL, Flier A, Wolfs TF. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;26:189-95.
 16. O'Brien KL, Walters MI, Sellman J, Quinlisk P, Regnery H, Schwartz B, Dowell SF. Severe pneumococcal pneumonia in previously healthy children: the role of preceding influenza infection. *Clin Infect Dis.* 2000;30:784-789.
 17. Peltola VT, McCullers JA. Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: the role of neuraminidase. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23(1 Suppl):87-97.
 18. Madhi SA, Klugman KP; Vaccine Trialist Group. A role for *Streptococcus pneumoniae* in virus-associated pneumonia. *Nat Med.* 2004;10:811-813.
 19. Klugman KP, Madhi SA. Pneumococcal vaccines and flu preparedness. *Science.* 2007;316:49-50.
 20. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis.* 2008;198:962-970.
 21. Smillie WG, Warnock GH, White HJ. A Study of a Type I Pneumococcus Epidemic at the State Hospital at Worcester, Mass. *Am J Public Health Nations Health.* 1938;28:293-302.
 22. Kim PE, Musher DM, Glezen WP, Rodriguez-Barradas MC, Nahm WK, Wright CE. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric condition, air pollution and the isolation of respiratory viruses. *Clin Infect Dis.* 1996;22:100-106.
 23. Talbot TR, Poehling KA, Hartert TV, Arbogast PG, Halasa NB, Edwards KM, Schaffner W, Craig AS, Griffin MR. Seasonality of invasive pneumococcal disease: temporal relation to documented influenza and respiratory syncytial viral circulation. *Am J Med.* 2005;118:285-291.
 24. Watson M, Gilmour R, Menzies R, Ferson M, McIntyre P; New South Wales Pneumococcal Network. The association of respiratory viruses, temperature and other climatic parameters with the incidence of invasive pneumococcal disease in Sydney, Australia. *Clin Infect Dis.* 2006 15;43:266-268.

25. Thorburn K, Harigopal S, Reddy V, Taylor N, van Saene HK. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Thorax*. 2006;61:611-615.
26. Pavlopoulou ID, Michail KA, Samoli E, Tsiftis G, Tsoumakas K. Immunization coverage and predictive factors for complete and age-appropriate vaccination among preschoolers in Athens, Greece: a cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2013;13:908.
27. Korppi M, Leinonen M, Koskela M, Makela PH, Launiala K. Bacterial coinfection in children hospitalized with respiratory syncytial virus infections. *Pediatr Infect Dis J*. 1989;8:687-692.
28. Purcell K, Fergie J. Concurrent serious bacterial infections in 2396 infants and children hospitalized with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2002;156:322-324.
29. Health GBMo, Straker EA. A Study of Nasopharyngeal Bacterial Flora of Different Groups of Persons Observed in London and South-East England During the Years 1930 to 1937: Together with Some Observations on the Occurrence of H. Influenza in the Trachea ; by A.B. Rosher and W.T. Cole 1939.
30. Brimblecombe FS, Cruickshank R, Masters PL, Reid DD, Stewart GT. Family studies of respiratory infections. *BMJ*. 1958;1:119-128.
31. Ampofo K, Bender J, Sheng X, Korgenski K, Daly J, Pavia A, Byington C. Seasonal invasive pneumococcal disease in children: role of preceding respiratory viral infection. *Pediatrics*. 2008;122:229-237.
32. McCullers JA. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:571-582.
33. Kim PE, Musher DM, Glezen WP, Rodriguez-Barradas MC, Nahm WK, Wright CE. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution, and the isolation of respiratory viruses. *Clin Infect Dis*. 1996;22:100-106.
34. Watson M, Gilmour R, Menzies R, Ferson M, McIntyre P. The association of respiratory viruses, temperature, and other climatic parameters with the incidence of invasive pneumococcal disease in Sydney, Australia. *Clin Infect Dis*. 2006;42:211-215.
35. Peltola V, Heikkinen T, Ruuskanen O, Jartti T, Hovi T, Kilpi T, et al. Temporal association between rhinovirus circulation in the community and invasive pneumococcal disease in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30:456-461.
36. Talbot TR, Poehling KA, Hartert TV, Arbogast PG, Halasa NB, Edwards KM, et al. Seasonality of invasive pneumococcal disease: temporal relation to

- documented influenza and respiratory syncytial viral circulation. *Am J Med* 2005;118:285-291.
37. Abdullahi O, Nyiro J, Lewa P, Slack M, Scott JA. The descriptive epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* nasopharyngeal carriage in children and adults in Kilifi district, Kenya. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27:59-64.
 38. Chonmaitree T, Revai K, Grady JJ, et al. Viral upper respiratory tract infection and otitis media complication in young children. *Clin Infect Dis*. 2008;46:815-823.
 39. Streng A, Grote V, Liese JG. Severe influenza cases in paediatric intensive care units in Germany during the pre-pandemic seasons 2005 to 2008. *BMC Infect Dis*. 2011;11:233.
 40. Juven T, Mertsola J, Waris M, Leinonen M, Meurman O, Roivainen M, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19:293-298.
 41. Michelow IC, Olsen K, Lozano J, Rollins NK, Duffy LB, Ziegler T, et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics*. 2004;113:701-707.
 42. Tsolia MN, Psarras S, Bossios A, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized school-age children: evidence for high prevalence of viral infections. *Clin Infect Dis*. 2004;39:681-686.
 43. Chen CJ, Lin PY, Tsai MH, Huang CG, Tsao KC, Wong KS, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized children in northern Taiwan. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31:e196-201.
 44. Honkinen M, Lahti E, Osterback R, Ruuskanen O, Waris M. Viruses and bacteria in sputum samples of children with community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:300-307.
 45. O'Brien KL, Walters MI, Sellman J, Quinlisk P, Regnery H, Schwartz B, et al. Severe pneumococcal pneumonia in previously healthy children: the role of preceding influenza infection. *Clin Infect Dis*. 2000;30:784-789.
 46. Davison VE, Sanford BA. Factors influencing adherence of staphylococcus aureus to influenza A virus-infected cell cultures. *Infect Immun*. 1982;37:946.
 47. Jakab GJ, Warr GA, Knight ME. Pulmonary and systemic defenses against challenge with *Staphylococcus aureus* in mice with pneumonia due to influenza A virus. *J Infect Dis*. 1979;140:105-108.
 48. Iverson AR, Boyd KL, McAuley JL, Plano LR, Hart ME, McCullers JA. Influenza virus primes mice for pneumonia from *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2011;203:880-888.
 49. von Baum H, Schweiger B, Welte T, Marre R, Suttorp N, Pletz MW, et al. How deadly is seasonal influenza-associated pneumonia? The German

- Competence Network for Community-Acquired Pneumonia. *Eur Respir J*. 2011;37:1151-1157.
50. Weinberger DM, Simonsen L, Jordan R, Steiner C, Miller M, Viboud C. Impact of the 2009 influenza pandemic on pneumococcal pneumonia hospitalizations in the United States. *J Infect Dis*. 2012;205:458-465.
 51. Kim HS, Kim JH, Shin SY, Kang YA, Lee HG, Kim JS, et al. Fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Korea. *J Korean Med Sci*. 2011;26:22-27.
 52. Alsadat R, Dakak A, Mazlooms M, Ghadhban G, Fattoom S, Betelmal I, et al. Characteristics and outcome of critically ill patients with 2009 H1N1 influenza infection in Syria. *Avicenna J Med*. 2012;2:34-37.
 53. Louie JK, Gavali S, Acosta M, Samuel MC, Winter K, Jean C, et al. Children hospitalized with 2009 novel influenza A(H1N1) in California. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2010;164:1023-1031.
 54. Influenza-associated pediatric deaths--United States, September 2010--August 2011. *MMWR* 2011;60:1233-1238.
 55. Viasus D, Pano-Pardo JR, Pachon J, Riera M, Lopez-Medrano F, Payeras A, et al. Pneumonia complicating pandemic (H1N1) 2009: risk factors, clinical features, and outcomes. *Medicine*. 2011;90:328-336.
 56. Poulakou G, Souto J, Balcells J, Perez M, Laborda C, Roca O, et al. First influenza season after the 2009 pandemic influenza: characteristics of intensive care unit admissions in adults and children in Vall d'Hebron Hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:374-380.
 57. Bosch AA, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EA, Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003057.
 58. van der Sluijs KF, van Elden LJ, Nijhuis M, Schuurman R, Pater JM, Florquin S, et al. IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection. *J Immunol*. 2004;172:7603-7609.
 59. LeVine AM, Koeningsknecht V, Stark JM. Decreased pulmonary clearance of *S. pneumoniae* following influenza A infection in mice. *J Virol Methods*. 2001;94:173-186.
 60. Seki M, Yanagihara K, Higashiyama Y, Fukuda Y, Kaneko Y, Ohno H, et al. Immunokinetics in severe pneumonia due to influenza virus and bacteria coinfection in mice. *ERJ* 2004;24:143-149.
 61. McCullers JA, Rehg JE. Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor. *J Infect Dis*. 2002;186:341-350.
 62. Faden, H., Y. Harabuchi, J. J. Hong, and Tonawanda/Williamsville Pediatrics. Epidemiology of *Moraxella catarrhalis* in children during the

- first 2 years of life: relationship to otitis media. *J Infect Dis.* 1994;169:1312–1317.
63. Lundgren, K., and L. Ingvarsson. Acute otitis media in Sweden. Role of *Branhamella catarrhalis* and the rationale for choice of antimicrobial therapy. *Drugs.* 1986;31:125–131.
 64. Sun K, Metzger DW. Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection. *Nat Med.* 2008;14:558-564.
 65. Chen WH, Toapanta FR, Shirey KA, Zhang L, Giannelou A, Page C, et al. Potential role for alternatively activated macrophages in the secondary bacterial infection during recovery from influenza. *Immunol Lett.* 2012;141:227-234.
 66. Hakansson A, Kidd A, Wadell G, Sabharwal H, Svanborg C. Adenovirus infection enhances in vitro adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1994;62:2707-2714.
 67. McCullers JA, Bartmess KC. Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 2003;187:1000-1009.
 68. Saadi AT, Blackwell CC, Raza MW, James VS, Stewart J, Elton RA, et al. Factors enhancing adherence of toxigenic *Staphylococcus aureus* to epithelial cells and their possible role in sudden infant death syndrome. *Epidemiol Infect.* 1993;110:507-517.
 69. Ishizuka S, Yamaya M, Suzuki T, Takahashi H, Ida S, Sasaki T, et al. Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells. *J Infect Dis.* 2003;188:1928-1239.
 70. Hament JM, Aerts PC, Fler A, van Dijk H, Harmsen T, Kimpen JL, et al. Direct binding of respiratory syncytial virus to pneumococci: a phenomenon that enhances both pneumococcal adherence to human epithelial cells and pneumococcal invasiveness in a murine model. *Pediatr Res.* 2005;58:1198-1203.
 71. Regev-Yochay G, Trzcinski K, Thompson CM, Malley R, Lipsitch M. Interference between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: in vitro hydrogen peroxide-mediated killing by *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 2006;188:4996–5001.
 72. Dagan R, Leibovitz E, Greenberg D, Bakaletz L, Givon-Lavi N. Mixed pneumococcal-nontypeable *Haemophilus influenzae* otitis media is a distinct clinical entity with unique epidemiologic characteristics and pneumococcal serotype distribution. *J Infect Dis.* 2013;208:1152-60
 73. Hakansson A, Kidd A, Wadell G, Sabharwal H, Svanborg C. Adenovirus infection enhances in vitro adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1994;62:2704-2714.

74. Krivan, H. C., D. D. Roberts, and V. Ginsburg. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAcb1-4Gal found in some glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988;85:6157–6616.
75. Peltola VT, Murti KG, McCullers JA. Influenza virus neuraminidase contributes to secondary bacterial pneumonia. *J Infect Dis.* 2005;192:249-257.
76. Zhou F, Shefer A, Kong Y, Nuorti JP. Trends in acute otitis media-related health care utilization by privately insured young children in the United States, 1997-2004. *Pediatrics.* 2008;121:253-260.
77. McCullers JA, Iverson AR, McKeon R, Murray PJ. The platelet activating factor receptor is not required for exacerbation of bacterial pneumonia following influenza. *Scand J Infect Dis.* 2008;40:11-17.
78. Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, et al. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet.* 2004;363:1871-1872.
79. Chien YW, Vidal JE, Grijalva CG, et al. Density interactions among *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in the nasopharynx of young Peruvian children. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32:72-77.
80. Regev-Yochay G, Dagan R, Raz M, et al. Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in Children. *JAMA.* 2004;292:716-720.
81. Shiri T, Nunes MC, Adrian PV, Van Niekerk N, Klugman KP, Madhi SA. Interrelationship of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* colonization within and between pneumococcal-vaccine naive mother-child dyads. *BMC Infect Dis.* 2013;13:483.
82. van den Bergh MR, Biesbroek G, Rossen JW, et al. Associations between pathogens in the upper respiratory tract of young children: interplay between viruses and bacteria. *PLoS One.* 2012;7:e47711.
83. Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, Bebien M, et al. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med.* 2008;205:323-9.
84. Freymuth F, Vabret A, Brouard J, et al. Detection of viral, *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in exacerbations of asthma in children. *J Clin Virol.* 1999;13:131-139.
85. Ben-Shimol S, Givon-Lavi N, Leibovitz E, Raiz S, Greenberg D, Dagan R. Near-elimination of otitis media caused by 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV) serotypes in southern Israel shortly after sequential introduction of 7-valent/13-valent PCV. *Clin Infect Dis.* 2014 15;59:1724-32.

86. McCullers JA. Effect of antiviral treatment on the outcome of secondary bacterial pneumonia after influenza. *J Infect Dis.* 2004 Aug 1;190:519-26.
87. McCullers JA, Bartmess KC. Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 2003;187:1000-9.
88. Madhi SA, Ludewick H, Kuwanda L, Niekerk N, Cutland C, Little T, Klugman KP. Pneumococcal coinfection with human metapneumovirus. *J Infect Dis.* 2006;193:1236-1243
89. Papadopoulos NG, Bates PJ, Bardin PG, et al. Rhinoviruses infect the lower airways. *J Infect Dis.* 2000;181:1875-1884.
90. Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2990-2995.
91. Spyridaki IS, Christodoulou I, de Beer L, et al. Comparison of four nasal sampling methods for the detection of viral pathogens by RT-PCR-A GA(2)LEN project. *J Virol Methods.* 2009;156:102-106.
92. Katsarolis I, Poulakou G, Analitis A, et al. Risk factors for nasopharyngeal carriage of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from a nation-wide surveillance study in Greece. *BMC Infect Dis.* 2009;9:120.
93. Paraskakis I, Kafetzis DA, Chrisakis A, et al. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of 1033 pneumococci isolated from children in Greece during 2001-2004. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:490-493.
94. Poulakou G, Katsarolis I, Matthaiopoulou I, et al. Nationwide surveillance of *Streptococcus pneumoniae* in Greece: patterns of resistance and serotype epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;30:87-92.
95. Garcia-Rodriguez JA, Fresnadillo Martinez MJ. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50 Suppl S2:59-73.
96. Rodrigues F, Foster D, Nicoli E, et al. Relationships between rhinitis symptoms, respiratory viral infections and nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in children attending daycare. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32:227-232.
97. Spijkerman J, Prevaes SM, van Gils EJ, et al. Long-term effects of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae* and *M. catarrhalis*. *PLoS One.* 2012;7:e39730.
98. van Gils EJ, Hak E, Veenhoven RH, et al. Effect of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine on *Staphylococcus aureus* colonisation in a randomised controlled trial. *PLoS One.* 2011;6:e20229.

99. Thomson R. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology
In Murray PR, ed. *Manual of Clinical Microbiology* 2007:191-233.
100. Faden H, Waz MJ, Bernstein JM, Brodsky L, Stanievich J, Ogra PL.
Nasopharyngeal flora in the first three years of life in normal and otitis-prone children. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1991;100:612-615.
101. Sleeman KL, Daniels L, Gardiner M, et al. Acquisition of *Streptococcus pneumoniae* and nonspecific morbidity in infants and their families: a cohort study. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24:121-127.
102. Stensballe LG, Hjuler T, Andersen A, et al. Hospitalization for respiratory syncytial virus infection and invasive pneumococcal disease in Danish children aged <2 years: a population-based cohort study. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1165-1171.
103. Verhaegh SJ, Snippe ML, Levy F, et al. Colonization of healthy children by *Moraxella catarrhalis* is characterized by genotype heterogeneity, virulence gene diversity and co-colonization with *Haemophilus influenzae*. *Microbiology.* 2011;157:169-178.
104. Pericone CD, Overweg K, Hermans PW, Weiser JN. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun.* 2000;68:3990-3997.
105. Blyth CC, Webb SA, Kok J, et al. The impact of bacterial and viral co-infection in severe influenza. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013;7:168-176.
106. Wang XY, Kilgore PE, Lim KA, et al. Influenza and bacterial pathogen coinfections in the 20th century. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2011;2011:146376.
107. Avadhanula V, Rodriguez CA, Devincenzo JP, et al. Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species -and cell type- dependent manner. *J Virol.* 2006;80:1629-1636.
108. Moore HC, Jacoby P, Taylor A, et al. The interaction between respiratory viruses and pathogenic bacteria in the upper respiratory tract of asymptomatic Aboriginal and non-Aboriginal children. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29:540-545.
109. Pitkaranta A, Roivainen M, Blomgren K, et al. Presence of viral and bacterial pathogens in the nasopharynx of otitis-prone children. A prospective study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006;70:647-654.
110. Huijskens EG, Biesmans RC, Buiting AG, Obihara CC, Rossen JW. Diagnostic value of respiratory virus detection in symptomatic children

- using real-time PCR. *Virology*. 2012;9:276.
111. Kouni S, Karakitsos P, Chranioti A, Theodoridou M, Chrousos G, Michos A. Evaluation of viral co-infections in hospitalized and non-hospitalized children with respiratory infections using microarrays. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:772-777.
 112. van der Zalm MM, van Ewijk BE, Wilbrink B, Uiterwaal CS, Wolfs TF, van der Ent CK. Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. *J Pediatr*. 2009;154:396-400, 400 e391.
 113. Lee GM, Huang SS, Rifas-Shiman SL, et al. Epidemiology and risk factors for *Staphylococcus aureus* colonization in children in the post-PCV7 era. *BMC Infect Dis*. 2009;9:110.
 114. Ricketson LJ, Wood ML, Vanderkooi OG, et al. Trends in asymptomatic nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* after introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in Calgary, Canada. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33:724-730.