



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Β΄ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΣΟΛΙΑ ΜΑΡΙΑ

*Ανάπτυξη μεθόδου αλληλούχισης γονιδίου για τη διερεύνηση οροτύπων
Streptococcus pneumoniae απ' ευθείας σε κλινικά δείγματα*

ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ Ν. ΜΑΡΜΑΡΑΣ

ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ - ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2023



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Β΄ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΣΟΛΙΑ ΜΑΡΙΑ

*Ανάπτυξη μεθόδου αλληλούχισης γονιδίου για τη διερεύνηση οροτύπων
Streptococcus pneumoniae απ' ευθείας σε κλινικά δείγματα*

ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ Ν. ΜΑΡΜΑΡΑΣ

ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ - ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2023

Μέλη τριμελούς επιτροπής: Καθηγήτρια κ. Μαρία Τσολιά (επιβλέπουσα)
Καθηγήτρια κ. Βασιλική Παπαευαγγέλου
Καθηγήτρια κ. Ευθυμία Πετεινάκη

Ημερομηνία αίτησης για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής: 04/10/2017

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 31/10/2017

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 23/02/2018

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 12/10/2023

Ημερομηνία παρουσίασης διδακτορικής διατριβής: 19/12/2023

Μέλη επταμελούς επιτροπής: Καθηγήτρια κ. Μαρία Τσολιά
Καθηγήτρια κ. Βασιλική Παπαευαγγέλου
Καθηγήτρια κ. Ευθυμία Πετεινάκη
Καθηγήτρια κ. Γεωργία Τζανακάκη
Καθηγητής κ. Αθανάσιος Μίχος
Καθηγήτρια κ. Βασιλική Σπούλου
Αν. Καθηγήτρια κ. Αλεξάνδρα Σολδάτου

Προέδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής κ. Νικόλαος Αρκαδόπουλος

Βαθμός διδακτορικής διατριβής: ΑΡΙΣΤΑ

Ἱπποκράτειος Ὀρκος στην Αρχαία Ελληνική

Ὁμνυμι Ἀπόλλωνα ἱητρὸν καὶ Ἀσκληπιὸν καὶ Ὑγίαν καὶ Πανάκειαν καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἱστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἰοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἱητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνωσ δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρὴ ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὀρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. Παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Ιπποκράτειος Όρκος στη Νέα Ελληνική

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και τον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σε όλους τους Θεούς επικαλούμενος τη μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό.

Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτήν την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί του τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου, αν έχει ανάγκη φροντίδας.

Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τα αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο.

Και να μεταδώσω με παραγγελιές, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου που με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σε αυτούς που έχουν ορκιστεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο.

Και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και κατά την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω.

Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω και αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή, ομοίως, να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για να αποβάλλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου καθαρή και αγνή, και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους, αλλά να αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σε όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους.

Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το κρατήσω μυστικό.

Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είτε να απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: **ΜΑΡΜΑΡΑΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ**

Ιατρός Βιοπαθολόγος/Μικροβιολόγος

Ημερομηνία γεννήσεως: 12 Οκτωβρίου 1973

E-mail: marmarasn@gmail.com

Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμος (2 παιδιά)

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

17/5/21 – σήμερα	Βιοπαθολόγος/ Μικροβιολόγος – Υπεύθυνος Μικροβιολογικού τμήματος Κεντρικό εργαστήριο Όμιλος Ιατρικού Αθηνών
16/3/21 – 14/5/21	Βιοπαθολόγος/ Μικροβιολόγος – Κεντρικό εργαστήριο Όμιλος ΙΑΣΩ
14/10/2020 – 13/3/21	Επιστημονικός συνεργάτης Βιοπαθολόγος/ Μικροβιολόγος στη Βιοϊατρική Μενιδίου.
1/10/2019 – 30/9/2020	Κλινικός συνεργάτης (Clinical Fellow in Microbiology/Infection Prevention) University Hospitals of Leicester NHS Trust.
16/5/2016 – 27/9/2019	Επιστημονικά υπεύθυνος Βιοπαθολόγος/ Μικροβιολόγος στη Βιοϊατρική Μενιδίου.
3/8/2015 – 31/12/2015	Επιστημονικός συνεργάτης: Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας – Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας. Επιστημονική υποστήριξη του έργου « MenCarr2 »
1/6/2014 – 31/12/2014	Επιστημονικός συνεργάτης: Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας – Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας. Επιστημονική υποστήριξη του έργου « Meningococcal carriage studies in Greece during a pre-serogroup B vaccination era»
21/5/2013 – 15/5/16	Επιστημονικός συνεργάτης: Βιοϊατρική Αμπελοκήπων – Αιματολογικό/ Μικροβιολογικό τμήμα

1/10/12 – 15/1/13	Εκπαιδευτής στο ΙΕΚ ΕΚΑΒ (χειμερινό εξάμηνο – 2012-2013 και εαρινό ταχύρρυθμο 2013). Στοιχεία Μικροβιολογίας – Λοιμώξεις
18/7/2011 – 8/2/2012	Επιστημονικά Υπεύθυνος Ιατρός στο Διαγνωστικό κέντρο Βόλου «ΒΙΟΕΡΕΥΝΑ ΙΑΤΡΙΚΗ Ε.Ε. » (Φορέας Π.Φ.Υ)
14/1/2011 – 15/5/2011	Άμισθος Επιστημονικός Συνεργάτης στο Μικροβιολογικό εργαστήριο του Γ.Ν. Πατησίων
14/1/2010 – 13/1/2011	Επιμελητής Β΄ - Επικουρικός στο Μικροβιολογικό εργαστήριο του Γ.Ν. Πατησίων
4/11/2008 – 3/11/2009	Επιμελητής Β΄ - Επικουρικός στο Μικροβιολογικό εργαστήριο του Γ.Ν. Πατησίων
Ιούνιος 2008	Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Ιατρικής Βιοπαθολογίας
9/1/2008 – 31/3/2008	Γ.Ν.Θ.Π. «Παμμακάριστος» - Παράταση παραμονής σε θέση ειδικευόμενου Ιατρικής Βιοπαθολογίας
4/7/2007 – 8/1/2008	Ανοσολογικό εργαστήριο. Στα πλαίσια της ειδικότητας παρακολούθησα από 1/10/2007 έως 31/12/2008 τις εργασίες του Ανοσολογικού τμήματος του Νοσοκομείου «Ευαγγελισμός» (τμήματα Ανοσοχημείας, Ιστοσυμβατότητας, Αυτοαντισωμάτων)
4/7/2006 – 3/7/2007	Αιματολογικό εργαστήριο – Αιμοδοσία
13/12/2005 – 3/7/2006	Παθολογική κλινική
13/6/2004 – 12/12/2005	Μικροβιολογικό εργαστήριο
13/6/2003 – 12/6/2004	Βιοχημικό εργαστήριο
2003 – 2008	Ειδικευόμενος Ιατρικής Βιοπαθολογίας Γ.Ν.Θ.Π. «Παμμακάριστος»
29/10/2002 – 8/1/2003	Γ.Ν.Ν. Ιονίας «Κωνσταντοπούλειο» (Α΄ Παθολογική κλινική) – Ειδικευόμενος Παθολογίας
22/1/2001 – 22/5/2002	Εκπλήρωση στρατιωτικής υποχρέωσης – Ιατρός άνευ ειδικότητας (23 ^η Επιλαρχία Υποστήριξης – Αλεξανδρούπολη). Μετά την ολοκλήρωση της θητείας ορκίστηκε Έφεδρος Ανθυπολοχαγός Υγειονομικού (Ιατρών)

20/12/1999 – 20/12/2000 Υπηρεσία υπαίθρου: Π.Ι. Σαμοθράκης - Κ.Υ. Σουφλίου
3/9/1999 – 2/12/1999 Π.Γ.Ν. Αλεξανδρούπολης – (3μηνη εκπαίδευση)
1993 – 1999 Φοιτητής Ιατρικής - Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα
Ιατρικής Α.Π. Θεσσαλονίκης - Πτυχίο Ιατρικής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ:

19/12/2023 Παρουσίαση της διδακτορικής διατριβής με τίτλο
«Ανάπτυξη μεθόδου αλληλούχησης γονιδίου για τη
διερεύνηση οροτύπων Streptococcus pneumoniae απ’
ευθείας σε κλινικά δείγματα» ενώπιον της επταμελούς
επιτροπής

25/1/2020 The role of Antifungal Stewardship - BSAC
(εξ’ αποστάσεως πρόγραμμα e-learning, προσφερόμενο
από: Future Learn)

26/7/2019 Challenges in Antibiotic Resistance: Gram negative Bacteria
– BSAC (εξ’ αποστάσεως πρόγραμμα e-learning,
προσφερόμενο από: Future Learn)

16/6/2019 Stories of Infection: online course - Stanford University
(εξ’ αποστάσεως πρόγραμμα e-learning, προσφερόμενο
από: Coursera)

31/7/2018 Antimicrobial resistance – theory and methods: online
course – Technical University of Denmark (εξ’ αποστάσεως
πρόγραμμα e-learning, προσφερόμενο από: Coursera)

31/10/2017 Αποδοχή θέματος και ορισμός τριμελούς
Συμβουλευτικής Επιτροπής για την εκπόνηση
διδακτορικής διατριβής

4/10/2017 Κατάθεση πρότασης για εκπόνηση διδακτορικής
διατριβής με θέμα “*Ανάπτυξη μεθόδου αλληλούχησης
γονιδίου για την διερεύνηση οροτύπων Streptococcus
pneumoniae απ’ ευθείας σε κλινικά δείγματα*”. Σε
συνεργασία της Β’ Παιδιατρικής κλινικής της Ιατρικής
Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και του Εθνικού

	Κέντρου Αναφοράς Μηνιγγίτιδας της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας (ΕΣΔΥ).
18/11/2014	Απόκτηση μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης στη Δημόσια Υγεία
1/7/2013 – 3/11/2014	Εκπόνηση Διπλωματικής εργασίας: Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας Θέμα διπλωματικής εργασίας: <i>Ταυτόχρονη ανίχνευση 8 ορότυπων Streptococcus pneumoniae απ' ευθείας σε βιολογικά υλικά</i>
1/10/2012 – 3/11/2014	Μεταπτυχιακός φοιτητής στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας: “Δημόσια Υγεία - Λοιμώδη Νοσήματα”
20/11/2006 – 18/12/2006	Εργαστηριακή υποστήριξη της δημόσιας υγείας (πρόγραμμα κατάρτισης που διενεργήθηκε στην Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας)
5/6/2006 – 20/6/2006	Σύγχρονες μέθοδοι επιτήρησης της Μικροβιολογικής αντοχής στα αντιβιοτικά (πρόγραμμα κατάρτισης που διενεργήθηκε στην Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας)

MEDICAL APPRAISAL

Ως Ιατρός, μέλος του GMC (General Medical Council - Βρετανικός Ιατρικός Σύλλογος) και εργαζόμενος στο Βρετανικό NHS (National Health Service – Βρετανικό Δημόσιο σύστημα Υγείας), συμμετείχα τον Ιούλιο του 2020, στην ετήσια διαδικασία ‘appraisal’

Είναι μια διαδικασία που δίνει τη δυνατότητα σε κάθε γιατρό να επικεντρωθεί, με έναν ειδικά εκπαιδευμένο συνάδελφο, στο πεδίο εργασίας του.

Αυτό περιλαμβάνει:

- Απολογισμό των επιτευγμάτων, των προκλήσεων, των διδαγμάτων καθώς επίσης και των στόχων του σχεδίου προσωπικής ανάπτυξης του προηγούμενου έτους
- Καταγραφή των προσδοκιών και των νέων στόχων του προσωπικού σχεδίου ανάπτυξης.

ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ISO 15189

Τα παρακάτω εργαστήρια στα οποία έχω εργαστεί, είναι πιστοποιημένα κατά ISO 15189

- Όμιλος Ιατρικού Αθηνών - Κεντρικό Εργαστήριο (Πιστοποίηση ΕΣΥΔ)
- University Hospitals of Leicester NHS Trust – Microbiology Department (UKAS Accreditation)
- Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (Πιστοποίηση ΕΣΥΔ)
- Βιοϊατρική Αμπελοκήπων – Κεντρικό Εργαστήριο (Πιστοποίηση ΕΣΥΔ)

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:

Αγγλικά: IELTS academic. Band score 8 – Μάρτιος 2017
Proficiency in English. Michigan University – Ιούνιος 2017

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΕΣ:

Πολύ καλό χειρισμό Word, Excel, Windows, Internet, LIS

ΆΛΛΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ:

Μέλος του επιστημονικού συμβουλίου του Ν.Θ.Π. Παμμακάριστος ως εκπρόσωπος των ειδικευομένων ιατρών από τον Σεπτέμβριο του 2005 έως και Σεπτέμβριο 2007 και μέλος των επιτροπών:

- έρευνας και εκπαίδευσης
- βιβλιοθήκης

**ΜΕΛΟΣ ΣΕ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΥΣ/ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥΣ
ΣΥΛΛΟΓΟΥΣ:**

4/9/2020 – σήμερα	British Society for Antimicrobial Chemotherapy Membership No: P0002418
1/1/2020 – σήμερα	The Royal College of Pathologists (Affiliate Membership) Membership No: 20013502
6/12/2017 – σήμερα	General Medical Council GMC Ref No: 7588067
15/2/2012 – σήμερα	Ιατρικός Σύλλογος Αθηνών AM: 073628

Ημερομηνία πρώτης εγγραφής σε Ιατρικό Σύλλογο:
29 Ιουλίου 1999 (Ιατρικός Σύλλογος Έβρου)

**ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ
ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΔΗΜΟΣΙΕΥΘΕΙ:**

- **Pneumococcal meningitis in Greece: A retrospective serotype surveillance study in the post-PCV13 era (2010-2020)**
Athanasia Xirogianni, Nektarios Marmaras, Theano Georgakopoulou *et al.*
Vaccine, Volume 40, Issue 34, 12 August 2022, Pages 5079-5087
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.015>
- **Pneumococcal Serotype Identification by Capsular Sequence Typing (CST): A Modified Novel Approach for Serotyping Directly in Clinical Samples.**
Marmaras, N.; Xirogianni, A.; Papandreou, A.; Petinaki, E.; Papaevangelou, V.; Tsolia, M.; Tzanakaki, G.
Diagnostics 2021, 11, 2353, <https://doi.org/10.3390/diagnostics11122353>

- **Ταυτόχρονη ανίχνευση οκτώ ορότυπων *Streptococcus pneumoniae* σε βιολογικά υλικά με τη μέθοδο της *stepdown multiplex PCR*.**
Μαρμαράς Ν., Ξηρογιάννη Α., Κεσανόπουλος Κ., Τζανακάκη Τ.
Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική
Περίοδος Β, 2015 20 (1): 7-15
- **Μικροβιολογική ανάλυση των κερατοειδικών ελκών**
Τερζίδου Χ., Μαρμαράς Ν., Γιανέλλη Μ., Δαλιάνης Γ., Πετούνης Α.
Οφθαλμολογικά χρονικά τεύχος 3, έτος: 2010 σελίδα 269-275
- **Κυτταροκίνες και *NON-HODGKIN* Λέμφωμα**
Ρέγκλη Αρετή, Κωνσταντινίδης Πολύδωρος, Μαρμαράς Νεκτάριος, Μάτσης Κωνσταντίνος.
e-Περιοδικό Επιστήμης & Τεχνολογίας τεύχος 1, τόμος: 3, έτος: 2008 σελίδα 81-88
- ***IL-1β* και αιματολογικά νοσήματα**
Ρέγκλη Αρετή, Κωνσταντινίδης Πολύδωρος, Γκούμας Γεώργιος, Βαρθαλίτου Χριστίνα, Μαρμαράς Νεκτάριος, Μάτσης Κων/νος.
e-Περιοδικό Επιστήμης & Τεχνολογίας έτος: 2007, τόμος: 2, τεύχος 3 σελίδα 61-68

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

Προφορικές ανακοινώσεις:

- **Ταυτόχρονη ανίχνευση 8 ορότυπων *Streptococcus pneumoniae* απ' ευθείας σε βιολογικά υλικά με τη μέθοδο της *stepdown multiplex PCR***
Μαρμαράς Ν., Ξηρογιάννη Α., Κεσανόπουλος Κ., Τζανακάκη Τ. (7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, τόμος πρακτικών του συνεδρίου σελ. 39)

Αναρτημένες ανακοινώσεις:

- **Μελέτη φορείας του Μηγιγιτιδόκοκκου σε φοιτητές και νεοσύλεκτους στρατιώτες πριν την εισαγωγή του νέου εμβολίου για την ορομάδα B**
Κεσανόπουλος Κ., Τρυφινόπουλου Κ., Παπανδρέου Α., Ξηρογιάννη Α., Μαρμαράς Ν., Σύγγελου Α., Μητρογιώργου Μ., Παπαευαγγέλου Β., Τσολιά Μ., Τζανακάκη Τ. (11^ο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας και υπηρεσιών Υγείας)
- **Επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων σε ασθενείς με εγκεφαλικό επεισόδιο και σε βαρέως πάσχοντες**
Σίλλελη Χ., Κοσιώνη Ε., Θεοδωρίδης Π., Μαρμαράς Ν., Δούκας Π., Δρόσος Φ., Κωνσταντινίδης Ι., Παρασκευοπούλου Α. (3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, τόμος πρακτικών του συνεδρίου σελ. 163)
- **Μελέτη των Αιμοκαλλιεργειών της τελευταίας διατίας**
Λυγούρα Π., Μαρμαράς Ν., Θεοδωρίδης Π., Στεργιοπούλου Ε., Σίλλελη Χ., Παρασκευοπούλου Α. (4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, τόμος πρακτικών του συνεδρίου σελ. 153)
- **Επιδημιολογική μελέτη των αλλοδαπών ως προς τη δερμοαντίδραση Mantoux**
Λυγούρα Π., Μαρμαράς Ν., Σαμέλη Β., Ράγκου Μ., Χατζηφόρος Δ., Ζωγράφος Π., Κοσιώνη Ε. (6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας και Υπηρεσιών Υγείας, τόμος πρακτικών του συνεδρίου σελ. 98)
- **Ανίχνευση και μελέτη ειδικών αυτοαντισωμάτων στο πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren**
Τσιρογιάννη Αλ., Σουφλερός Κ., Σφουντούρης Χ., Κάππου Π., Μαρμαράς Ν., Παπουτσίδου Ελ., Μπάμπαλη Π., Παπαστεριάδη Χρ. (5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, τόμος πρακτικών του συνεδρίου σελ. 75)

- **Συχνότητα και ευαισθησία απομονωθέντων μικροοργανισμών σε οφθαλμικά δείγματα**
Γολεγού Σ., Κωνσταντοπούλου Π., Σειμένης Ν., Μαρμαράς Ν., Βετούλη Ε., Γκέκα Ι., Γιαννέλη Μ., Δαλιάνης Γ., Τερζίδου Χ.
- **Επιπολασμός *Klebsiella spp.* που παράγουν ένζυμα τύπου KPC στο Γ.Ν. Πατησίων**
Κυριαζόπουλος Π., Μαρμαράς Ν., Ρανέλλου Κ., Λεμονή Μ., Γολεγού Σ. (6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, τόμος πρακτικών συνεδρίου σελ. 164)
- **Μελέτη της αντοχής των στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* που απομονώθηκαν κατά τη διετία 2008-2009 στο γενικό νοσοκομείο «Η Παμμακάριστος»**
Σίλλελη Χ., Φλέσσας Μ., Τσέτρη Ζ., Γεροντάρα Γ., Κοσιώνη Ε., Σαλούστρου Μ., Μαρμαράς Ν., Καραμπογιά-Καραφυλλίδη Π. (36^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, τόμος πρακτικών σελ. 19, αριθμός ανακοίνωσης: 68)
- **Καταγραφή και μελέτη της αντοχής στελεχών *Acinetobacter baumannii* κατά τα έτη 2008-2009**
Σίλλελη Χ., Φλέσσας Μ., Τσέτρη Ζ., Γεροντάρα Γ., Κοσιώνη Ε., Σαλούστρου Μ., Μαρμαράς Ν., Καραμπογιά-Καραφυλλίδη Π. (36^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, τόμος πρακτικών σελ. 20, αριθμός ανακοίνωσης: 68)

ΒΡΑΒΕΙΑ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

- **Ταυτόχρονη ανίχνευση 8 ορότυπων *Streptococcus pneumoniae* απ' ευθείας σε βιολογικά υλικά με τη μέθοδο της stepdown multiplex PCR**

Βραβείο καλύτερου δημοσιευμένου άρθρου στο περιοδικό της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής Μικροβιολογίας και Εργαστηριακής Διαγνωστικής για το έτος 2015

- **Μελέτη φορέας του Μηνιγγιτιδόκοκκου σε φοιτητές και νεοσύλεκτους στρατιώτες πριν την εισαγωγή του νέου εμβολίου για την ορομάδα B**

Βραβείο Δημήτριος Τριχόπουλος για την 3^η καλύτερη ελεύθερη ανακοίνωση στο 11^ο Πανελλήνιο συνέδριο Δημόσιας Υγείας και Υπηρεσιών Υγείας

ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **Pneumococcal serotype identification by capsular sequence typing (CST): a modified novel approach for serotyping directly in clinical samples**

Nektarios Marmaras, Athanasia Xirogianni, Anastasia Papandreou, Panagiotis Poulidakos, Stelmos Simantirakis, Efthimia, Vana Papaevangelou, Maria Tsolia, Georgina Tzanakaki.

32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases
Lisbon, 23-26 April 2022

- **Evaluation of Aspergillus Lateral Flow Device in the diagnosis of Invasive Fungal Infections**

Karunasekara H C I, Marmaras N, Cooper M, Elsanousi F & Perera N

Department of Microbiology, University Hospitals of Leicester

FIS / HIS International 2020. 9-11/11/2020

- **Pneumococcal meningitis: a 4 year epidemiological data in the post PCV-13 vaccination era (2011-2014)**

G. Tzanakaki, A. Xirogianni, K. Kesanopoulos, N. Marmaras (13th congress EMGM European Meningococcal Disease Society, 14-17 September 2015 Novotel Amsterdam City The Netherlands: σελ. 76, αριθμός ανακοίνωσης: P64)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Διευθύντρια του Εργαστηρίου Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων (ΕΕΛΝΟ) και Επιστημονική Υπεύθυνη του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Μηνιγγίτιδας Καθηγήτρια κ. Τζωρτζίνα Τζανακάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την επιλογή και ανάθεση σε μένα του θέματος, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ σε ένα τόσο υψηλό επίπεδο. Η καθοδήγηση και η συνεχής υποστήριξη που μου προσέφερε, υπήρξε ανεκτίμητη.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Λοιμωξιολογίας και Διευθύντρια της Β` Παιδιατρικής Κλινικής του ΕΚΠΑ κ. Τσολιά Μαρίζα που αποδέχτηκε να είναι επιβλέπουσα καθηγήτρια κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη συνεργάτη μου στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας, κ. Αθανασία Ξηρογιάννη για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξη που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Στη γυναίκα μου Ειρήνη και τα παιδιά μου Αφροδίτη και Εύη

Περιεχόμενα

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	4
3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	7
4. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΔΟΜΗ.....	8
4.1. Πρωτεϊνικοί Παράγοντες Λοιμογονικότητας.....	10
4.1.1. Πνευμολυσίνη.....	10
4.1.2. Χολινοδεσμευτικές πρωτεΐνες.....	11
4.1.3. PspA.....	12
4.1.4. PspC.....	12
4.1.5. LytA.....	12
4.1.6. Λιποπρωτεΐνες που δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα.....	13
4.1.7. PsaA.....	13
4.1.8. Νευραμινιδάσες.....	13
5. ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΗ ΚΑΨΑ.....	15
5.1. Ιστορική αναδρομή.....	15
5.2. Οροομάδες, ορότυποι και η ανάπτυξη του δανέζικου συστήματος τυποποίησης.....	15
5.3. Δομή, σύνθεση και λειτουργία.....	18
5.4. Παθογένεια.....	21
6. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΔΙΑΘΕΤΟΥΝ ΣΕ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΗ ΛΟΙΜΩΣΗ.....	23
7. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ.....	26
7.1. Πνευμονία.....	26
7.2. Μηνιγγίτιδα.....	27
7.3. Οξεία μέση ωτίτιδα.....	28
7.4. Βακτηραιμία.....	29
7.5. Παραρινοκολπίτιδα.....	29
7.6. Οξεία έξαρση χρόνιας βρογχίτιδας.....	30
7.7. Άλλες λοιμώξεις.....	30

8.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ	31
8.1.	Καλλιέργεια – μορφολογία – βιοχημικές ιδιότητες.....	31
8.2.	Τυποποίηση.....	34
8.2.1.	Ορολογική τυποποίηση	34
8.2.2.	Βιοχημική τυποποίηση.....	35
8.2.3.	Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης.....	36
8.2.3.1.	Βασικές αρχές μεθόδων.....	36
8.2.3.2.	Εφαρμογή μεθόδων PCR για την τυποποίηση του <i>S. pneumoniae</i>	44
8.2.3.3.	Μέθοδοι βασισμένες στην αλληλούχηση γενετικού υλικού.....	45
8.2.3.4.	Άλλες Μέθοδοι.....	53
9.	ΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	54
9.1.	Αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.....	55
9.2.	Αντοχή στις μακρολίδες.....	56
10.	ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ (ΦΟΡΕΙΑ)	57
10.1.	Μηχανισμοί αποικισμού.....	57
10.2.	Παράγοντες που επηρεάζουν τη φορεία.....	60
10.3.	Η επίδραση του ανταγωνισμού	61
11.	ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ – ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	62
11.1.	Πολυσακχαριδικό εμβόλιο	63
11.2.	Συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια	64
11.3.	Συστάσεις για εμβολιασμό στη χώρα μας.....	65
11.4.	Στρατηγικές για την ανάπτυξη νέων εμβολίων κατά του <i>S. pneumoniae</i>	66
11.4.1.	Νέα συζευγμένα εμβόλια	68
11.4.2.	Πρωτεϊνικά εμβόλια.....	69
11.4.3.	Ολοκυτταρικά εμβόλια	72
12.	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	73

B. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

ΣΚΟΠΟΣ.....	85
ΣΤΟΧΟΙ.....	87

Γ. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΟ.....	89
2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	90
2.1. Καλλιέργεια και επώαση.....	90
2.1.1. Παρασκευή αιματούχου άγαρ (5% v/v αίμα αλόγου).....	90
2.2. Συντήρηση βακτηριακών στελεχών.....	90
2.2.1. Παρασκευή θρεπτικού ζωμού συντήρησης.....	90
2.3. Απομόνωση γενετικού υλικού.....	91
2.3.1. Απομόνωση γενετικού υλικού απο βακτηριακό στέλεχος.....	91
2.3.2. Απομόνωση γενετικού υλικού απο βιολογικά υλικά.....	91
2.4. Πρωτόλλο CST – Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα.....	92
2.4.1. PCR.....	92
2.4.2. Ηλεκτροφόρηση.....	96
2.4.3. Καθαρισμός και αλληλούχηση προϊόντων.....	96
2.4.4. Ανάλυση αλληλουχιών.....	96
2.4.5. Πρόσθετα πρωτόκολλα PCR.....	97
2.5. Ειδικότητα της μεθόδου.....	98
2.6. Πειραματικά στάδια για την ανάπτυξη της μεθόδου.....	99
2.7. Έλεγχος ευαισθησίας, ειδικότητας και κατώτερου ορίου ανίχνευσης για τις 2 αντιδράσεις.....	116
2.8. Εφαρμογή των δύο νέων αντιδράσεων σε κλινικά δείγματα.....	116

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	119
2. ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ (ΘΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ).....	119
3. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΟΡΟΤΥΠΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	120
3.1. Ορότυποι που ταυτοποιήθηκαν απευθείας από την εφαρμογή του CST... 121	
3.2. Ορότυποι που ταυτοποιήθηκαν από την εφαρμογή επιπρόσθετων μεμονωμένων PCR.....	121

3.3. Ορότυποι για τους οποίους δεν υπάρχει δυνατότητα επιπλέον ταυτοποίησης	121
4. ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ CST ΣΤΗΝ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΟΥ <i>Streptococcus pneumoniae</i> ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ	123
4.1. Επιδημιολογική εικόνα <i>Streptococcus pneumoniae</i>	123
4.2. Αποτελέσματα της τεχνικής από την εφαρμογή σε δείγματα για την επιδημιολογική επιτήρηση της μηνιγγίτιδας στην Ελλάδα	124
4.3. Αποτελέσματα τεχνικής στην εφαρμογή δειγμάτων ασθενών με σηψαιμία	131
4.4. Αποτελέσματα τεχνικής στην εφαρμογή σε δείγματα ασθενών με πνευμονία ή/και εμπύημα	132
4.5. Αποτελέσματα τεχνικής στην εφαρμογή δειγμάτων ασθενών με ωτίτιδα	134
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	136
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	140
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	142
ΣΤ. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	179

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μικροοργανισμός *Streptococcus pneumoniae* (πνευμονιόκοκκος) είναι ένα από τα πιο συχνά και κοινά παθογόνα μικρόβια. Συνολικά κάθε χρόνο 1,6 εκατ. άνθρωποι στον κόσμο πεθαίνουν από ασθένειες που προκαλούνται από τον πνευμονιόκοκκο, από τους οποίους περίπου 700.000-1.000.000 είναι παιδιά κάτω των 5 ετών. Υψηλού κινδύνου για πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις θεωρούνται τα παιδιά κάτω των 5 ετών, τα άτομα τρίτης ηλικίας, καθώς και αυτά με ανοσιακό έλλειμμα.

Πρόκειται για ένα Gram+ βακτήριο, που προκαλεί ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων, λόγω της άμεσης επέκτασης από το ρινοφάρυγγα ή της αιματογενούς διασποράς του. Η μετάδοση γίνεται μόνο από άνθρωπο σε άνθρωπο, με σταγονίδια κατά την ομιλία, το βήχα και τον πταρμό ή αυτοενοφθαλμισμό.

Ο πνευμονιόκοκκος ευθύνεται για μια ποικιλία λοιμώξεων: διεισδυτικές, όπως βακτηριαιμία, σηψαιμία, μηνιγγίτιδα και τις πιο συχνές και κλινικά ηπιότερες μη διεισδυτικές, οξεία μέση ωτίτιδα, παραρρινοκολπίτιδα και φαρυγγοαμυγδαλίτιδα.

Η λοιμογόνος δύναμη του βακτηρίου αποδίδεται στην αντιγονική δομή των πολυσακχαριτών της κάψας του, με βάση την οποία, χωρίζεται σε περίπου 100 διαφορετικούς ορότυπους.

Η αυξημένη συχνότητα και η ιδιαίτερη βαρύτητα των διεισδυτικών και μη πνευμονιοκοκκικών νόσων αποτελούν τους κυριότερους λόγους για τους οποίους η επιδημιολογική επιτήρηση των παθογόνων οροτύπων κρίνεται επιβεβλημένη. Ο εμβολιασμός είναι σημαντικός όχι μόνο για λόγους πρόληψης, αλλά και λόγω της συνεχούς αυξανόμενης αντοχής στην πενικιλίνη. Το 13-δύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (PCV-13) περιλαμβάνει τους ορότυπους του 7-δύναμου εμβολίου (4, 9V, 19F, 14, 23F, 18C, 6B) και επιπρόσθετα τους ορότυπους 1, 5, 7, 19A, 3, 6A.

Όπως γίνεται άμεσα αντιληπτό, αυτά τα εμβόλια καλύπτουν μόνο μερικούς ορότυπους και δεν είναι σε θέση να προστατεύσουν από τους ορότυπους που δεν υπάρχουν στο εμβόλιο ή από στελέχη που δεν εκφράζουν καψιδικό αντιγόνο. Το γεγονός αυτό οδήγησε σε ταχεία αύξηση των μη εμβολιακών οροτύπων, κάποιοι από τους οποίους είναι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά. Ως εκ τούτου, υπάρχει επείγουσα ανάγκη για την ανάπτυξη νέων και αποτελεσματικών εμβολίων για τον πνευμονιόκοκκο, τα οποία θα έχουν τη δυνατότητα να καλύψουν ένα ευρύ φάσμα ορότυπων.

Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι η έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση και τυποποίηση του πνευμονιοκόκκου ως προς τους οροτύπους του, είναι κριτικής σημασίας. Εργαλεία για αναγνώριση του μικροοργανισμού αποτελούν η κλασική καλλιέργεια, οι βιοχημικές μέθοδοι (δοκιμασία ευαισθησίας στην οπτοχίνη, διαλυτότητα στα χολικά άλατα κτλ.) και η τυποποίηση. Τα τελευταία χρόνια οι μοριακές τεχνικές έφεραν μια πραγματική επανάσταση καθότι γίνεται δυνατή η ανίχνευση του μικροοργανισμού. Η εφαρμογή μοριακών μεθόδων (PCR) είναι ζωτικής σημασίας, στον επιτυχή εντοπισμό των μικροοργανισμών που προκαλούν λοιμώξεις, σε ένα σημαντικό ποσοστό των κλινικών δειγμάτων με αρνητική καλλιέργεια. Η ακριβής διάγνωση και η αναγνώριση του παθογόνου είναι σημαντική για την αντιμετώπιση του ασθενή και τη στοχευμένη αντιμικροβιακή θεραπεία. Προηγούμενη θεραπεία με αντιβιοτικά μπορεί, εν μέρει, να ευθύνεται για την παρατηρούμενη χαμηλή αποτελεσματικότητα των καλλιεργειών στην ανίχνευση του παθογόνου μικροοργανισμού.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν αφ' ενός μεν η δημιουργία μιας τεχνικής που στηρίζεται στις μεθόδους της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και της αλληλούχισης γενετικού υλικού (Sequencing), και η οποία να έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης των οροτύπων του μικροοργανισμού *Streptococcus pneumoniae* τόσο σε στελέχη όσο και σε βιολογικά υλικά – όπου η καλλιέργεια και απομόνωση του μικροοργανισμού δεν είναι εύκολη, αφ' ετέρου, η επιδημιολογική διερεύνηση των οροτύπων του *Streptococcus pneumoniae* που προκαλούν τις διάφορες λοιμώξεις και αν αυτοί οι ορότυποι έχουν αλλάξει με τη πάροδο των ετών.

Αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος - CST, που διαμορφώθηκε σε δύο στάδια αντιδράσεων, και η οποία φάνηκε ότι έχει εξαιρετική απόδοση σε μια πληθώρα βιολογικών υλικών που εφαρμόστηκε.

Με τη νέα μέθοδο, το ποσοστό των τυποποιημένων δειγμάτων ανήλθε στο 92,8% από περίπου 50% που ήταν πριν την εφαρμογή της νέας μεθόδου. Επίσης με την ολοκλήρωση της τυποποίησης των μη-τυποποιημένων δειγμάτων κατέστη δυνατή η αναδρομική μελέτη των οροτύπων *Streptococcus pneumoniae* στην Ελλάδα για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα, από το 2010, μετά την εισαγωγή του εμβολίου PCV-13, έως το 2020.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae (pneumococcus) is one of the most frequent and common pathogens. A total of 1.6 million people worldwide die from pneumococcal diseases each year, of which approximately 700,000-1,000,000 are children under the age of 5. Children under the age of 5, the elderly, and those with an immune deficiency are considered to be at higher risk for pneumococcal infections.

Streptococcus pneumoniae is responsible for a variety of infections: invasive, such as bacteremia, septicemia, meningitis, and the more common and clinically milder non-invasive, acute otitis media, sinusitis, and pharyngotonsillitis.

The virulence of the microorganism is attributed to the antigenic structure of the polysaccharides of its capsule, on the basis of which it is divided into approximately 100 different serotypes.

The increased frequency and the severity of invasive pneumococcal diseases are the main reasons why the epidemiological surveillance of pathogenic serotypes is considered imperative. Vaccination is important not only for prevention, but also due to the ever-increasing resistance to penicillin. The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV-13) includes the serotypes of the 7-valent vaccine (4, 9V, 19F, 14, 23F, 18C, 6B) and additionally serotypes 1, 5, 7, 19A, 3, 6A.

These vaccines cover only a few serotypes and are unable to protect against serotypes not present in the vaccine or strains that do not express capsular antigen. This has led to a rapid increase in non-vaccine serotypes, some of which are resistant to antibiotics. Therefore, there is an urgent need to develop new and effective pneumococcal vaccines that could cover a wide range of serotypes.

Valid and timely diagnosis and characterization of the pneumococcus in terms of its serotypes is of critical importance. Tools for identifying the microorganism are classical culture, biochemical methods (optochin sensitivity test and solubility in bile salts, etc.) and serotyping. In recent years molecular techniques have brought about a real revolution as it becomes possible to detect the microorganism. The application of molecular methods (PCR) is crucial in the successful identification of the microorganisms causing infections in a significant proportion of culture-negative clinical samples attributed also to previous antibiotic treatment. Accurate diagnosis and identification of the pathogen is important for patient management and targeted antimicrobial therapy.

The aim of the present study was, to create a technique based on the methods of polymerase chain reaction (PCR) and Sequencing, which has the possibility of detecting the serotypes of the microorganism *Streptococcus pneumoniae* from isolates as well as from biological materials – where the culture and isolation of the microorganism is not easy, the epidemiological investigation of the *Streptococcus pneumoniae* serotypes that cause the various infections and whether these serotypes have changed over the years.

A new method - CST, formulated in two reaction steps, was developed and shown to have excellent performance on a wide range of applied biological materials.

With the new method, the percentage of samples that a serotype can be attributed, rose to 92.8% from about 50% before the implementation of the new method. Also, with the completion of the serotyping of the non-typed samples, it became possible to retrospectively study *Streptococcus pneumoniae* serotypes in Greece for a long period of time, from 2010, after the introduction of the PCV-13 vaccine, until 2020.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο *Streptococcus pneumoniae* αποτελεί μέρος της μικροβιακής χλωρίδας του ρινοφάρυγγα υγιών ατόμων, με τη μέγιστη συχνότητα αποικισμού να παρατηρείται σε παιδιά ηλικίας 3 ετών (Bogaert D. *et al.*, 2004). Ο πνευμονιόκοκκος μπορεί να εξαπλωθεί από το ρινοφάρυγγα και να προκαλέσει αναπνευστική ή συστηματική νόσο ή να αποικίσει άλλα άτομα. Το μικρόβιο προκαλεί ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, που κυμαίνονται από λοιμώξεις όπως η μέση ωτίτιδα, η ιγμορίτιδα και η πνευμονία έως σοβαρές και απειλητικές για τη ζωή διεισδυτικές λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένης της μηνιγγίτιδας και της βακτηραιμίας (Musher DM., 2010). Τα παιδιά, οι ενήλικες με ιατρικές συννοσηρότητες και οι ηλικιωμένοι (ηλικίας >65 ετών), θεωρούνται ότι διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πνευμονιοκοκκικής νόσου (Marrie T.J. *et al.*, 2018, Shea K.M. *et al.*, 2014). Η πνευμονιοκοκκική πνευμονία, με ή χωρίς βακτηραιμία αποτελεί μεγάλη επιβάρυνση για την υγεία των ενηλίκων (Said M.A. *et al.*, 2013). Έχει υπολογιστεί ότι η πνευμονιοκοκκική πνευμονία ευθύνεται για περισσότερους από 1,5 εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο, παγκοσμίως (GBD 2015, LRI Collaborators 2017). Η θνησιμότητα της πνευμονίας της κοινότητας (Community Acquired Pneumonia - CAP) λόγω *S. pneumoniae* έχει αναφερθεί ότι είναι 4% σε εξωτερικούς ασθενείς και μεταξύ 10% έως 20% σε ασθενείς που χρειάζονται νοσηλεία (Welte T. *et al.*, 2012).

Η εισαγωγή του εμβολιασμού είχε σαν στόχο τη μείωση της επίπτωσης της νόσου. Τα συζευγμένα εμβόλια πνευμονιόκοκκου (PCV) που εισήχθησαν στα προγράμματα ανοσοποίησης βρεφών έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά αποτελεσματικά στην πρόληψη των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων όχι μόνο σε παιδιά, αλλά και σε ενήλικες λόγω του φαινομένου της ανοσίας της αγέλης (Klugman K.P., 2014).

Σήμερα, υπάρχουν 2 διαφορετικοί τύποι εμβολίων για τον πνευμονιόκοκκο, πολυσακχαριδικά και συζευγμένα. Τα πολυσακχαριδικά εμβόλια περιέχουν αντιγόνα (πολυσακχαρίτες) της κάψας ενώ τα συζευγμένα περιέχουν μια ανοσογόνο μη πνευμονιοκοκκική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με πολυσακχαρίτες του πνευμονιόκοκκου. Το Φεβρουάριο του 2007 ένα 7- δύναμο συζευγμένο εμβόλιο (PCV-7) εγκρίθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration – USA) των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής για χρήση σε βρέφη και παιδιά.

Την εισαγωγή του εμβολίου ακολούθησε η δραματική πτώση της επίπτωσης των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών νόσων (IPDs) που οφείλονταν στους συγκεκριμένους 7 ορότυπους του εμβολίου σε παιδιά ηλικίας <5 ετών. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών νόσων σε μεγαλύτερα παιδιά και ενήλικες εξ αιτίας της μειωμένης μετάδοσης των ορότυπων του εμβολίου (φαινόμενο συλλογικής ανοσίας) (Ladhani, S.N. *et al.*, 2018, Azzari C. *et al.*, 2016). Τον Φεβρουάριο του 2010, ένα νέο 13-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο (PCV-13) εγκρίθηκε και αντικατέστησε το 7-δύναμο. Με την εισαγωγή του νέου εμβολίου παρατηρήθηκε επίσης πτώση των διεισδυτικών νόσων που οφείλονται στους 6 επιπλέον ορότυπους που περιλαμβάνονται στο νέο εμβόλιο (Ladhani, S.N. *et al.*, 2018). Ωστόσο, παρά τα εκτεταμένα προγράμματα εμβολιασμού, το βάρος των πνευμονιοκοκκικών ασθενειών εξακολουθεί να είναι υψηλό σε αρκετές χώρες, με αυξημένη νοσηρότητα, θνησιμότητα και κόστος υγειονομικής περίθαλψης (Welte T. *et al.*, 2012, Huang S.S. *et al.*, 2011).

2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η πρώτη απομόνωση του μικροοργανισμού *Streptococcus pneumoniae* (πνευμονιόκοκκος) έγινε σχεδόν ταυτόχρονα το 1881 από τον Luis Pasteur στη Γαλλία, που τον ονόμασε *Microbe septicémique du salive* και από τον George Miller Sternberg στις ΗΠΑ, που τον ονόμασε *Micrococcus pasteurii* (Sternberg G., M., 1881, Pasteur L., 1881).

Το 1886 χρησιμοποιήθηκε από τον Fraenkel ο όρος *pneumococcus* (πνευμονιόκοκκος) καθότι ο μικροοργανισμός αναγνωρίστηκε ως το κυριότερο αίτιο της λοβώδους πνευμονίας (Fraenkel A., 1886).

Ο *Streptococcus pneumoniae* ήταν ο πρώτος εξωκυττάριος μικροοργανισμός που ανακαλύφθηκε και περιγράφηκε η ικανότητά του να ανθίσταται στη φαγοκυττάρωση και να πολλαπλασιάζεται εξωκυττάρια.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1890 οι Felix και Klempner έδειξαν ότι η ανοσοποίηση με νεκρούς πνευμονιοκόκκους προστάτευε τα ζώα από επακόλουθες λοιμώξεις και επιπλέον η εν λόγω προστασία μπορούσε να μεταφερθεί με έγχυση ορού ανοσοποιημένων ποντικών σε επίνουσα ζώα (Klempner G., 1891). Αργότερα οι ερευνητές έδειξαν ότι ορός από άτομα που ανέρρωσαν από πνευμονιοκοκκική πνευμονία παρέχει ιδίου βαθμού προστασία. Οι Neufeld και Rimpau απέδωσαν την ανοσία σε παρουσία παραγόντων στον ορό που διεκολύνουν τη φαγοκυττάρωση από τα λευκά αιμοσφαίρια, διαδικασία που ονομάστηκε οψονοποίηση. Η θεραπευτική αντιμετώπιση με ορό από ανοσοποιημένα άτομα δε κράτησε πολύ καθώς άρχισε να αποδίδει αποτελέσματα η έρευνα για χημειοθεραπευτικές ουσίες.

Αναγνωρίστηκαν επίσης και οι διάφοροι ορότυποι μετά από παρατήρηση ότι η έγχυση νεκρών μικροοργανισμών σε κουνέλια διέγειρε την παραγωγή αντισωμάτων στον ορό, τα οποία συγκολλούσαν και επέφεραν εξοίδηση του ελύτρου μόνο στα στελέχη που είχαν χρησιμοποιηθεί για την ανοσοποίηση. Το 1900 ο Neufeld (Austrian R., 1999) παρατήρησε τη λυτική δράση της χολής έναντι του πνευμονιόκοκκου, διευκολύνοντας την ταυτοποίηση του μικροβίου και το 1902 περιγράφει την αντίδραση Quellung (Austrian R., 1999), όμως η αντίδραση αυτή δεν έπαιξε κανένα ρόλο στην αναγνώριση των πρώτων 30 οροτύπων. Με την αναβίωση της αντίδρασης Quellung από τον ίδιο και τους συνεργάτες του 3 δεκαετίες αργότερα έγινε ένα πολύ σημαντικό εργαλείο στην οροτυπία του μικροβίου.

Το 1910 αναγνωρίστηκαν οι πρώτοι δύο ορότυποι 1 και 2 από τους Neufeld και Handel (Austrian R., 1999).

Την πρώτη δεκαετία του 20ου αιώνα οι Maynard, Lister και Wright άρχισαν να εφαρμόζουν τις βασικές αρχές της χυμικής ανοσίας για την αντιμετώπιση της επιδημίας λοβώδους πνευμονίας που κάθε χρόνο προσέβαλλε αρκετούς Αφρικανούς μεταλλωρύχους. Ο εμβολιασμός τους με αδρανοποιημένα στελέχη πνευμονιόκκοκου προκάλεσε σημαντική μείωση του ποσοστού εμφάνισης της νόσου (Wright A.E. *et al.*, 1914). Την δεκαετία του 1920 οι Heidelberg και Avery απέδειξαν ότι το αντίσωμα που προκαλεί ανοσία, αντιδρούσε με επιφανειακά πολυσακχαριδικά αντιγόνα.

Το 1926 ο μικροοργανισμός, ονομάστηκε *Diplococcus* λόγω της εμφάνισης του στη χρώση κατά Gram παρασκευάσματος πτυέλων.

Ο *Streptococcus pneumoniae* έπαιξε επίσης σημαντικό ρόλο στην ανακάλυψη του DNA. Πειράματα του Griffith την δεκαετία του 1920 έδειξαν ότι ενδοπεριτοναϊκή έγχυση σε ποντίκια στελεχών πνευμονιοκκόκων χωρίς κάψα μαζί με αδρανοποιημένα στελέχη πνευμονιοκκόκου με κάψα, οδηγούσε στην ανάπτυξη στελεχών με κάψα (Griffith F., 1928). Την διαδικασία αυτή την ονόμασε μεταμόρφωση (transformation). Η παρατήρηση αυτή εξελίχθηκε όταν ο Avery και οι συνεργάτες του (1940) απέδειξαν ότι το DNA είναι υπεύθυνο για τη μεταμόρφωση και ότι το γενετικό υλικό κωδικοποιεί τον φαινότυπο (Avery O. T *et al.*, 1944).

Το 1938 ο Felton παρασκεύασε κεκαθαρισμένο πνευμονιοκοκκικό πολυσακχαρίτη για ανοσοποίηση, που χρησιμοποιήθηκε στη Μασαχουσέτη για να αποτρέψει επιδημία πνευμονίας (Smillie W.G. *et al.*, 1938). Μετά από αυτή τη διαδικασία οι ερευνητές θεώρησαν ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένα πολυσακχαριδικό αντιγόνο ώστε να διεγείρει την παραγωγή αντισωμάτων που θα παρείχε ανοσία σε επιδημικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις. Αυτό αποδείχθηκε στο Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο, όταν ο εμβολιασμός στρατιωτών με υλικό του ελύτρου μείωσε σημαντικά την συχνότητα της πνευμονίας από τους ορότυπους αυτούς, αλλά όχι από άλλους ορότυπους (MacLeod C.M. *et al.*, 1945).

Το 1974 ο μικροοργανισμός μετονομάστηκε σε *Streptococcus pneumoniae* λόγω της μορφολογίας του κατά την ανάπτυξή του σε υγρό θρεπτικό υλικό (Deibel R.H. *et al.*, 1974).

Οι προσπάθειες για ανάπτυξη αποτελεσματικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από τον πνευμονιόκοκκο χρονολογούνται από τη 2^η δεκαετία του 20^{ου} αιώνα. Η αποτυχία της κινίνης να δράσει αποτελεσματικά οδήγησε στην έρευνα και

για άλλα φάρμακα μεταξύ των οποίων και η οπτοχίνη. Αν και η οπτοχίνη έδειξε σημαντική αποτελεσματικότητα κατά τις δοκιμές σε πειραματόζωα, πολύ γρήγορα ανακαλύφθηκαν ανθεκτικά στην οπτοχίνη στελέχη πνευμονιόκοκκου (Moore H.F. *et al.*, 1917, Moore H.F. *et al.*, 1918). Επίσης το γεγονός ότι το φάρμακο είχε τοξική δράση στον οφθαλμό οδήγησε στην εγκατάλειψη του τελικά ως θεραπευτική επιλογή. Οι σουλφοναμίδες ήταν ο πρώτος θεραπευτικός παράγοντας ο οποίος ήταν αποτελεσματικός στην αντιμετώπιση της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης ανεξαρτήτως του τύπου της κάψας. Ωστόσο δεν χρησιμοποιήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα αφού το 1944 οι Tillet και συνεργάτες (Tillet W.S. *et al.*, 1944) περιέγραψαν την εξαιρετική αποτελεσματικότητα της πενικιλίνης σε δόσεις 40.000 - 100.000 U/ημέρα στην αντιμετώπιση της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας. Η χρήση της πενικιλίνης μείωσε τη θνητότητα σε πρωτοφανή ποσοστά και έκανε την επιστημονική κοινότητα να πιστέψει ότι η νόσος αντιμετωπίστηκε.

Στη δεκαετία του 1970 άρχισαν να εμφανίζονται οι πρώτες μελέτες για αυξημένα ποσοστά αντοχής στην πενικιλίνη καθώς και σε άλλα αντιβιοτικά όπως τετρακυκλίνες, χλωραμφενικόλη, μακρολίδες και κοτριμοξαζόλη.

Με την έλευση της πενικιλίνης τη δεκαετία του 1940, το ενδιαφέρον για το εμβόλιο μειώθηκε, έως ότου παρατηρήθηκε ότι πολλοί ασθενείς εξακολουθούν να πεθαίνουν παρά τη θεραπεία με αντιβιοτικά. Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1960, έγιναν και πάλι προσπάθειες για την ανάπτυξη ενός πολυδύναμου εμβολίου κατά του πνευμονιόκοκκου. Το πρώτο εμβόλιο κατά του πνευμονιόκοκκου πήρε άδεια στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1977, ενώ το πρώτο συζευγμένο εμβόλιο πήρε άδεια κυκλοφορίας το 2000. Σήμερα σε πολλές χώρες στον κόσμο, και στην Ελλάδα το εμβόλιο κατά του πνευμονιοκόκκου έχει ενταχθεί στο βασικό πρόγραμμα εμβολιασμού.

3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ο μικροοργανισμός *S. pneumoniae* είναι ένας gram-θετικός κόκκος που διατάσσεται σε κοντές αλυσίδες όταν αναπαράγεται σε υγρό μέσο, αλλά εμφανίζεται ως διπλόκοκκος με σχήμα λογχοειδές και με τις αμβλείες πλευρές του αντικρυστές στα κλινικά δείγματα. Ο οργανισμός δεν παράγει καταλάση (καταλάση αρνητικός), αλλά παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω ενός συστήματος φλαβοενζύμων και αναπτύσσεται καλύτερα παρουσία μιας πηγής καταλάσης, όπως είναι τα ερυθρά αιμοσφαίρια (Janoff E.N., Musher D.M., 2015). Οι πνευμονιόκοκκοι παράγουν πνευμονολυσίνη (παλαιότερα ονομαζόταν α-αιμολυσίνη), η οποία διασπά την αιμοσφαιρίνη σε μια πράσινη χρωστική ουσία που περιβάλλει τις αποικίες κατά την ανάπτυξη σε αιματούχο και σοκολατόχρωμο άγαρ, ένα φαινόμενο που ονομάζεται α-αιμόλυση (Janoff E.N., Musher D.M., 2015). Είναι διπλόκοκκος ακίνητος, ασπορογόνος, αερόβιος και εκλεκτικά αναερόβιος. Η ανάπτυξή του ευνοείται από την παρουσία 5-10% CO_2 . Περιβάλλεται από παχύ έλυτρο. Σε παλαιά καλλιεργήματα το έλυτρο είναι λεπτότερο πράγμα το οποίο μπορεί να οδηγήσει στο να φανεί στη κατά Gram χρώση ως Gram-αρνητικός (Αρσένη Α., 1994)

Μια σημαντική ιδιότητα του *S. Pneumoniae* είναι η ικανότητά του, ως μέρος των μηχανισμών αλληλεπίδρασης με το εξωτερικό του περιβάλλον, να εκφράζει πρωτεΐνες που του επιτρέπουν να προσλαμβάνει γενετικό υλικό το οποίο έχει προκύψει από τη λύση άλλων βακτηρίων και βρίσκεται βρισκείται “ελεύθερο” στο περιβάλλον. Το ξένο DNA εισέρχεται στο κύτταρο - δέκτη, όπου ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα σχηματίζοντας με ανασυνδυασμό τα “μωσαϊκά” γονίδια. Το γενετικό αυτό υλικό μπορεί να προέρχεται από άλλους πνευμονιόκοκκους ή από άλλα βακτηριακά είδη (Peterson S. *et al.*, 2000). Αυτή η οριζόντια μεταφορά γενετικής πληροφορίας στους πνευμονιόκοκκους ονομάζεται βακτηριακή μεταμόρφωση και επιτρέπει στους πνευμονιόκοκκους να αποκτήσουν νέα χαρακτηριστικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένας πνευμονιόκοκκος ενός ορότυπου μπορεί να αποκτήσει DNA που κωδικοποιεί έναν διαφορετικό καψιδικό πολυσακχαρίτη, αλλάζοντας έτσι τον ορότυπο του.

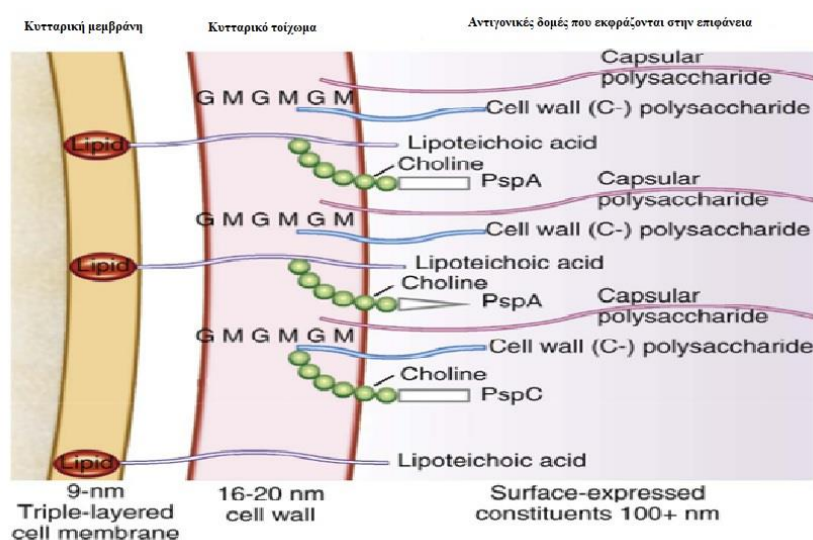
Αυτή η ανταλλαγή γενετικών πληροφοριών λαμβάνει χώρα τόσο υπό πειραματικές συνθήκες και, το πιο σημαντικό, επίσης στη φύση (Coffey T.J. *et al.*, 1998).

4. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΔΟΜΗ

Το εξωτερικό τοίχωμα του πνευμονιοκόκκου αποτελείται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, το κυτταρικό τοίχωμα και το πολυσακχαριδικό έλυτρο. Η σύνθεση του ελύτρου χαρακτηρίζει τον μικροοργανισμό και σχετίζεται με την παθογόνο του δράση και με τη μορφολογία των αποικιών.

Η πεπτιδογλυκάνη και το τειχοϊκό οξύ είναι τα κύρια συστατικά του πνευμονιοκοκκικού κυτταρικού τοιχώματος (Sorensen U.B., 1995) (Εικόνα 1).

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της εξωτερικής επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου.



Πηγή: Janoff E.N., Musher D.M., 2015

Η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από μακριές αλυσίδες εναλλασσόμενων πεπτιδίων N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος, το τελευταίο από τα οποία χρησιμεύει επίσης ως θέση προσκόλλησης για το λεγόμενο στελεχιαίο πεπτίδιο, που αποτελείται συνήθως από L-αλανίνη, D-ισογλουταμίνη, L-λυσίνη και δύο υπολείμματα D-αλανίνης (-L-Ala – D-iGln – L-Lys – D-Ala– D-Ala). Τα πεπτίδια αυτά διασυνδέονται με γέφυρες, οι οποίες παρέχουν σημαντική αντοχή στο κυτταρικό τοίχωμα. Το τειχοϊκό οξύ, ένα πολυμερές υδατάνθρακα που περιέχει φωσφορυλοχολίνη, συνδέεται ομοιοπολικά με την πεπτιδογλυκάνη στην εξωτερική επιφάνεια του βακτηριακού τοιχώματος και προεξέχει μέσα στην κάψα. Το τειχοϊκό οξύ και τα στενά προσκολλημένα τμήματα πεπτιδογλυκάνης συνθέτουν τον C-πολυσακχαρίτη, μια ουσία που υπάρχει σε όλους τους πνευμονόκοκκους αλλά μόνο

σε λίγα είδη πρασινίζοντων στρεπτόκοκκων (viridans). Ο C-πολυσακχαρίτης αντιδρά με τις πρωτεΐνες οξείας φάσης του αίματος κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.

Πολλές πρωτεΐνες εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια του πνευμονιόκοκκου. Ιδιαίτερη σημασία στην παθογένεση της πνευμονιοκοκκικής νόσου έχουν αυτές που συνδέονται με τη χολίνη, συμπεριλαμβανομένων των επιφανειακών πρωτεϊνών A και C (PspA, PspC), της επιφανειακής προσκολλητίνης (πρωτεΐνη που δεσμεύει τη χολίνη) A (CbpA), της πρωτεΐνης C που δεσμεύει τη χολίνη καθώς και αυτές που εμπλέκονται στη πρόσληψη εξωκυττάριου DNA (Πίνακας -1).

Πίνακας 1: Ο ρόλος ορισμένων πνευμονιοκοκκικών επιφανειακών συστατικών ως παραγόντων λοιμογονικότητας.

Συστατικό	Μηχανισμός λοιμογόνου δράσης
Πολυσακχαρίτης κάψας	Αποτρέπει τη φαγοκυττάρωση, ενεργοποιεί το συμπλήρωμα
Πολυσακχαρίτης κυτταρικού τοιχώματος	Διεγείρει τη φλεγμονή ενεργοποιώντας το συμπλήρωμα και διεγείροντας την απελευθέρωση κυτοκινών
Πνευμολυσίνη	Κυτταροτοξική, ενεργοποίηση συμπληρώματος και κυτοκινών
PspA	Αναστέλλει τη φαγοκυττάρωση εμποδίζοντας την ενεργοποίηση και την εναπόθεση του συμπληρώματος στην βακτηριακή επιφάνεια
PspC	Αναστέλλει τη φαγοκυττάρωση δεσμεύοντας τον παράγοντα H του συμπληρώματος
PsaA	Ευνοεί την προσκόλληση
LytA (Αυτολυσίνη)	Προκαλεί βακτηριακή αποδόμηση, απελευθερώνει συστατικά
Νευραμινιδάση	Ευνοεί την προσκόλληση

Πηγή: Janoff E.N., Musher D.M., 2015

4.1. Πρωτεϊνικοί Παράγοντες Λοιμογονικότητας

Κατά τα τελευταία 20 χρόνια έχει αναγνωριστεί η σπουδαιότητα των πρωτεϊνών του *S. pneumoniae* για τη λοιμογόνο δύναμη του. Η έρευνα σ' αυτόν το τομέα έχει προωθηθεί από την αναγνώριση του γεγονότος ότι οι πνευμονιοκοκκικές πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν ένα υποσχόμενο πεδίο στη δημιουργία εμβολίων που θα είναι κοινά για όλους τους ορότυπους. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα ο αριθμός των πιθανών λοιμογόνων παραγόντων που έχουν αναγνωριστεί, να έχει αυξηθεί κατακόρυφα τα τελευταία χρόνια.

4.1.1. Πνευμολυσίνη

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η πνευμολυσίνη είναι ένας ισχυρός και ευρέως φάσματος λοιμογόνος παράγοντας. Αναυρίσκεται πρακτικά σε όλα τα απομονωθέντα στελέχη πνευμονιόκοκκου και η αλληλουχία των αμινοξέων της είναι καλά συντηρημένη, αν και έχει περιγραφεί και ένας μικρός αριθμός παραλλαγών (Lock R.A. *et al.*, 1996, Kirkham L.A.S. *et al.*, 2006).

Η πνευμολυσίνη ανήκει στην οικογένεια των χοληστερολο-εξαρτώμενων κυτταρολυσινών που παράγονται από τα Gram (+) βακτήρια. Σχηματίζει στην επιφάνεια των κυττάρων, ένα μεγάλο δακτυλιοειδούς σχήματος διαμεμβρανικό πόρο που αποτελείται από περίπου 40 δομικές υποομάδες (Tilley S. *et al.*, 2005).

Τα ολιγομερή πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνα για την κυτταρολυτική δραστηριότητα της τοξίνης και την πληθώρα των κυτταρορυθμιστικών δράσεων που παρατηρούνται σε συγκεντρώσεις μικρότερες από αυτές που απαιτούνται για λυτική δράση.

Αυτές οι δράσεις περιλαμβάνουν:

- Αναστολή της κίνησης των κροσσών του αναπνευστικού επιθηλίου και των επενδυματικών κυττάρων του εγκεφάλου.
- Αναστολή έκκρισης οξειδωτικών ουσιών από τα φαγοκύτταρα.
- Επαγωγή σύνθεσης κυτταροκινών, ενεργοποίηση των CD4+ T-κυττάρων και επαγωγή της χημειοταξίας.

Η πνευμολυσίνη ενεργοποιεί επίσης την κλασσική οδό του συμπληρώματος (Mitchell T.J. *et al.*, 1991).

Υπάρχουν αποδείξεις ότι η πνευμολυσίνη είναι σημαντικός (λοιμογόνος) παράγοντας στη πρόκληση πνευμονίας (Rubins J. *et al.*, 1996, Alexander J.E. *et al.*, 1998, Jounblat

R. *et al.*, 2003, Berry A.M. *et al.*, 1995, Canvin J.R. *Et al.*, 1995) αν και η συμμετοχή της στη πρόκληση νόσου μπορεί να ποικίλει από στέλεχος σε στέλεχος.

Υπάρχουν επίσης επαρκείς αποδείξεις ότι η πνευμονολυσίνη είναι απαραίτητη για την εξάπλωση του μικροβίου από τους πνεύμονες στην αιματική κυκλοφορία. (Kadioglou A. *et al.*, 2002, Orihuela C.J. *et al.*, 2004, Berry A.M. *et al.*, 1989, Berry A.M. *et al.*, 1999). Σε περιπτώσεις βακτηριαιμίας, εάν η πνευμονολυσίνη εκφράζεται από το μικρόβιο, μεγάλοι αριθμοί μικροβίων ανευρίσκονται στο αίμα και ο ξενιστής υποκύπτει στη λοίμωξη (Berry A.M. *et al.*, 1999, Orihuela C.J. *et al.*, 2004). Ωστόσο επί απουσίας της πρωτεΐνης παρόλο που ανευρίσκεται μεγάλος αριθμός μικροβίων, δεν υπάρχουν εμφανή σημεία νόσου (Kadioglou A. *et al.*, 2000) και μπορεί να αναπτυχθεί χρόνια βακτηριαιμία (Benton K.A. *et al.*, 1995).

Στις περιπτώσεις μηνιγγίτιδας επίσης μελέτες υποστηρίζουν ότι η πνευμονολυσίνη είναι καθοριστικός παράγοντας στη πρόκληση νόσου. (Braun J. *et al.*, 2002, Wellmer A. *et al.*, 2002) Επιπλέον έχει ανευρεθεί ότι ο ρόλος της πνευμονολυσίνης είναι σημαντικός στη πρόκληση κώφωσης στις περιπτώσεις μηνιγγίτιδας (Winter A. *et al.*, 1996) και στις βλάβες που προκαλούνται στα επενδυματικά κύτταρα του εγκεφάλου (Hirst R.A. *et al.*, 2000, Hirst R. *et al.*, 2004).

4.1.2. Χολινοδесμευτικές πρωτεΐνες

Οι πνευμονιόκοκκοι εκφράζουν την φωσφορυλοχολίνη (ChoP) σαν συστατικό των τειχοϊκών οξέων του κυτταρικού τους τοιχώματος και των λιποτειχοϊκών οξέων που είναι δεσμευμένα στη μεμβράνη τους.

Η ChoP είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση μιας ομάδας πρωτεϊνών – των χολιδοδεσμευτικών πρωτεϊνών στο κυτταρικό τοίχωμα. Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες περίπου 20 αμινοξέων που μεσολαβούν στη προσκόλληση τους στην κυτταρική επιφάνεια διαμέσου της ChoP. Η αμινοτελική (-N) αλληλουχία έχει μεγάλη ποικιλομορφία και είναι υπεύθυνη για την ειδική δράση των διαφόρων πρωτεϊνών. (Jedrzejewski M.J., 2001). Ο *S. pneumoniae* κωδικοποιεί 10-15 χολινοδесμευτικές πρωτεΐνες (Bergmann S. *et al.*, 2006), όπως τις PspA, PspC και LytA.

4.1.3. PspA

Η πρωτεΐνη PspA παρεμβαίνει στην εναπόθεση του C₃ παράγοντα του συμπληρώματος στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου και έτσι αναστέλλει τη μεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα οψονοποίηση. Επίσης η PspA είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύει τη λακτοφερίνη και μέσω αυτής της δραστηριότητας πιστεύεται ότι προστατεύει το βακτήριο από τη βακτηριοκτόνο δράση της απολακτοφερίνης. (Shaper A. *et al.*, 2004, Briles D.E., et Mirza S., 2006)

4.1.4. PspC

Η PspC είναι μια επιφανειακή πρωτεΐνη με πολλές λειτουργίες που είναι γνωστή με πολλά άλλα ονόματα τα οποία αντικατοπτρίζουν αυτές τις λειτουργίες.

Για παράδειγμα είναι γνωστή σαν χολινοδεσμευτική πρωτεΐνη A (CbpA) επειδή ήταν η κυρίαρχη πρωτεΐνη που ανιχνευόταν με τη μέθοδο της χρωματογραφίας (Rosenow C. *et al.*, 1997).

Ευνοεί την προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα και στο σιαλικό οξύ *in vitro* (Rosenow C. *et al.*, 1997) ενώ δεσμεύει επίσης τον πολυμερή μεταφορέα της ανοσοσφαιρίνης IgA (εκκριτικός παράγων). Ως εκ τούτου ονομάζεται και SpSA (secretory pneumococcal surface protein A) (Hammerschmidt S. *et al.*, 2000, Zhang J. *et al.*, 2000). Αυτή η δραστηριότητα φαίνεται να είναι το πρώτο στάδιο στη διαδικασία αποικισμού κατά μήκος του αναπνευστικού επιθηλίου (Jounblat R. *et al.*, 2003)

Μια επιπλέον ιδιότητα της PspC είναι η ικανότητα της να προσδένεται στο παράγοντα Η του συμπληρώματος (Janulczyk R., *etal.*, 2000, DaveS. *et al.*, 2004) και να αποτρέπει τη δημιουργία του συμπλόκου C3b κατά την εναλλακτική οδό ενεργοποίησης του συμπληρώματος αποτρέποντας έτσι την οψονοποίηση του βακτηρίου. Η PspC δεσμεύει επίσης τον παράγοντα C3 (Cheng Q. *et al.*, 2000).

4.1.5. LytA

Η LytA είναι μια αμιδάση που διασπά το δεσμό N-ακετυλομουραμικό – αλανίνη της πεπτιδογλυκάνης του πνευμονιόκοκκου. Η αυτολυτική δράση του ενζύμου οδηγεί σε καταστροφή των κυττάρων που παρατηρείται τυπικά σε βακτήρια που αναπτύσσονται σε καλλιέργειες, αλλά επίσης το ένζυμο αυτό συμμετέχει στην ανάπτυξη και αναδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος (Canvin J.R. *et al.*, 1995, Orihuella C.J. *et al.*, 2004, Berry A., et Paton J., 2000, Berry A. *et al.*, 1989).

Η συμβολή της LytA στη λοιμογονικότητα φαίνεται να διαμεσολαβείται εν μέρει από τη δράση της στην απελευθέρωση πνευμονολυσίνης και τμημάτων πεπτιδογλυκάνης και τειχοϊκών οξέων από τα κατεστραμμένα κύτταρα τα οποία προκαλούν φλεγμονώδη αντίδραση.

4.1.6. Λιποπρωτεΐνες που δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα

Έχουν περιγραφεί περισσότερες από 45 πνευμονιοκοκκικές λιποπρωτεΐνες στη κυτταρική επιφάνεια. Πολλές από αυτές φαίνεται να παίζουν ρόλο στη λοιμογονικότητα του μικροβίου (Overweg K. *et al.*, 2000, Hermans P.W.M. *et al.*, 2006).

Επιπλέον διάφορες μεταλλοδεσμευτικές πρωτεΐνες φαίνεται να είναι απαραίτητες για τη λοιμογονικότητα όπως είναι οι: PsaA (pneumococcal surface antigen A), PiuA (pneumococcal iron uptake A) και PiaA (pneumococcal iron acquisition A).

4.1.7. PsaA

Έλλειψη του γονιδίου της πρωτεΐνης PsaA αναστέλλει τη λοιμογονικότητα, όπως έχει φανεί από μελέτες σε μοντέλα ποντικών για πνευμονία, βακτηριαμία και αποικισμό (Berry A.M., et Paton J.C., 1996, Marra A. *et al.*, 2002, Johnson S.E. *et al.*, 2002).

Στελέχη πνευμονιόκκοκου με μεταλλαγμένη PsaA είχαν ελαττωμένη ικανότητα σύνδεσης σε κύτταρα θηλαστικών *in vitro* (Berry A.M., et Paton J.C., 1996, Briles D.E. *et al.*, 2000), και επίσης έχει παρατηρηθεί ότι αντισώματα έναντι της PsaA αναστέλλουν τη προσκόλληση του μικροβίου (Romero-Steiner S. *et al.*, 2003).

Η δομική ανάλυση της PsaA έδειξε ότι υπάρχει μια περιοχή δέσμευσης δισθενών ιόντων που μπορεί να φιλοξενήσει ιόντα μαγγανίου ή ψευδαργύρου (Lawrence M.C. *et al.*, 1998) και φαίνεται η πρόσληψη μαγγανίου να είναι απαραίτητη για την αντίσταση του μικροβίου στο οξειδωτικό stress που μπορεί να προκύψει από την παραγωγή H₂O₂ κατά τον μεταβολισμό του μικροβίου, καθώς επίσης και κατά την παραγωγή οξειδωτικών ουσιών από το ανοσιακό σύστημα του ξενιστή.

4.1.8. Νευραμινιδάσες

Οι νευραμινιδάσες – επίσης γνωστές σαν σιαλιδάσες, αποσπών σιαλικό οξύ από γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια και επιφανειακούς ολιγοσακχαρίτες (King S.J. *et al.*, 2004). Ο *S. pneumoniae* φέρει τουλάχιστον 3 γονίδια για νευραμινιδάσες: nanA, nanB

και nanC. Όλα τα στελέχη φέρουν το nanA και τα περισσότερα και το nanB ωστόσο μόνο το 50% φέρει το γονίδιο για το nanC (King S.J. *et al.*, 2004).

Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι οι νευραμινιδάσες αυτές είναι σημαντικές για την επιβίωση του μικροβίου στο αναπνευστικό σύστημα και στην αιματική κυκλοφορία καθώς ευνοούν την προσκόλληση (Manco S. *et al.*, 2006).

5. ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΗ ΚΑΨΑ

5.1. Ιστορική αναδρομή

Αμέσως μόλις ο πνευμονιόκοκκος αναγνωρίστηκε ως κύρια αιτία πνευμονίας, ο άνοσος ορός διερευνήθηκε ως τρόπος θεραπείας σε ασθενείς με πνευμονιοκοκκική πνευμονία (Geno K.A. *et al.*, 2015). Μελέτες με χορήγηση πλάσματος από ασθενείς που είχαν αναρρώσει από τη νόσο έδειξαν ότι υπάρχει ορολογική ετερογένεια μεταξύ των πνευμονιοκόκκων και ήδη από το 1899 είχε διαπιστωθεί η ύπαρξη πολλαπλών ομάδων πνευμονιόκοκκου. Πρόσθετες μελέτες στις αρχές του 20ου αιώνα έδειξαν την ύπαρξη μεγάλου αριθμού ορολογικών ομάδων και καθιέρωσαν τη γνώση ότι η ανοσολογική προστασία έναντι του πνευμονιόκοκκου είναι πρωτίστως ειδική του ορότυπου (Geno K.A. *et al.*, 2015).

Η χημική φύση της κάψας αποσαφηνίστηκε ότι είναι πολυσακχαρίτης (PS) μέσω μελετών σε υπερκείμενα καλλιέργειας (διαλυτή ειδική ουσία –soluble specific substance– SSS), που περιείχαν υλικό που αντιδρά με ορούς οροτυποποίησης (Geno K.A. *et al.*, 2015),

5.2. Οροομάδες, ορότυποι και η ανάπτυξη του δανέζικου συστήματος τυποποίησης

Η ευρεία χρήση ειδικών για τον ορότυπο αντιορών η οποία χρησιμοποιήθηκε ευρέως για τη θεραπεία ασθενών στις αρχές του 20ού αιώνα, οδήγησε στην ανακάλυψη μεγάλου αριθμού οροτύπων. Το 1932, οι Cooper και συνεργάτες περιέγραψαν 32 ορότυπους, οι οποίοι ήταν επαρκείς για να τυποποιήσουν τα περισσότερα από τα μέχρι τότε απομονωθέντα κλινικά στελέχη (Cooper G. *et al.*, 1932).

Ωστόσο οι ειδικοί αντιοροί δεν ήταν διαθέσιμοι για όλους τους ορότυπους, και δεν ήταν πάντα αποτελεσματικοί. Ο περιορισμός αυτός έγινε εμφανής κατά τον θάνατο του Δανού πρίγκιπα Βαλντεμάρ το 1939, που παρείχε ένα ισχυρό ερέθισμα για τη μελέτη των πνευμονιοκοκκικών οροτύπων καθώς διαπιστώθηκε ότι έπασχε από πνευμονιοκοκκική πνευμονία που προκλήθηκε από οροομάδα 9, αλλά δεν ανταποκρίθηκε στη θεραπεία με αντιορό 9L, και με αντιορό 9N. Πρόσθετες μελέτες μετά τον θάνατό του έδειξαν ότι η πνευμονία του προκλήθηκε από έναν νέο ορότυπο

στην οροομάδα 9, ο οποίος τότε ονομάστηκε 9V από το όνομά του (Geno K.A. *et al.*, 2015).

Η περίπτωση του πρίγκιπα Βαλντεμάρ έδειξε ξεκάθαρα την ανάγκη να γίνει με ακρίβεια η οροτυπία για τον πνευμονιόκοκκο και να διακριθούν όλοι οι ορότυποι μέσα σε μια οροομάδα.

Για τη διευκόλυνση της θεραπείας με αντιορό, πολλές διαδικασίες οροτυπίας αναπτύχθηκαν, όπως δοκιμές κατακρημνίσεως, συγκόλλησης και η αντίδραση Quellung που είχε περιγραφεί από τον Neufeld το 1902 και αργότερα υιοθετήθηκε ευρέως ως η προτιμώμενη μέθοδος τυποποίησης της κάψας.

Περαιτέρω έρευνες στην Αμερική οδήγησαν στην περιγραφή 75 ορότυπων από τον Eddy κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου, οι οποίοι απλώς αριθμήθηκαν με τη σειρά της ανακάλυψής τους (Eddy B. 1944). Ωστόσο, νεότερες έρευνες στη Δανία οδήγησαν σε ένα σύστημα που διέκρινε τις οροομάδες από τους ορότυπους και αυτό το σύστημα (Δανέζικο) έχει γίνει ευρέως αποδεκτό σε όλο τον κόσμο. Ορίστηκε ως ορότυπος: τα πνευμονιοκοκκικά στελέχη που παράγουν ένα πολυσακχαρίτη (PS) με μοναδική χημική δομή και ορολογικές (ανοσολογικές) ιδιότητες. Μια οροομάδα περιλαμβάνει ορότυπους που μοιράζονται κοινές ορολογικές ιδιότητες (διασταυρούμενες αντιδράσεις).

Η ανάπτυξη και εξέλιξη αναλυτικών τεχνολογιών, όπως η αέρια-υγρή χρωματογραφία, ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) και η φασματομετρία μάζας (MS), έχουν φέρει επανάσταση στις δομικές μελέτες των πολυσακχαριτών.

Με την τεράστια πρόοδο που έχει επιτευχθεί στις τεχνολογίες αυτές, έχει καθοριστεί η δομή περίπου 100 οροτύπων του μικροβίου (Πίνακας 2).

Πέρα των παρακάτω οροτύπων, τα τελευταία χρόνια έχουν προσδιοριστεί επιπλέον οι ορότυποι:

- 35D (Geno K.A., 2017)
- 7D (Kjeldsen C., 2018)
- 10D (Ganaie F. *et al.*, 2020)

Πίνακας 2: Οροομάδες και ορότυποι του *Streptococcus pneumoniae*.

Οροομάδα	Ορότυπος	Ορότυπος	Οροομάδα	Ορότυπος	Ορότυπος
	Δανέζικο σύστημα ταξινόμησης	Αμερικάνικο σύστημα ταξινόμησης		Δανέζικο σύστημα ταξινόμησης	Αμερικάνικο σύστημα ταξινόμησης
1	1	1	19	19F	19
2	2	2		19A	57
3	3	3		19B	58
4	4	4		19C	59
5	5	5	20	20A	20
6	6A	6		20B	ND
	6B	26	21	21	21
	6C	6C	22	22F	22
	6D	6D		22A	63
	6E	ND	23	23F	23
	6F	6F		23A	46
	6G	6G		23B	64
	6H	6H	24	24F	24
7	7F	51		24A	65
	7A	7		24B	60
	7B	48	25	25F	25
	7C	50		25A	-
8	8	8	27	27	27
9	9A	33	28	28F	28
	9L	49		28A	79
	9N	9	29	29	29
	9V	68	31	31	31
10	10F	10	32	32F	32
	10A	34		32A	67
	10B	ND	33	33F	70
	10C	ND		33A	40
11	11F	11		33B	42
	11A	43		33C	39
	11B	76		33D	ND
	11C	53		33E	-
	11D	ND	34	34	41
	11E	ND	35	35F	35
12	12F	12		35A	47/62
	12A	83		35B	66
	12B	ND		35C	61
13	13	13	36	36	36
14	14	14	37	37	37
15	15F	15	38	38	71
	15A	30	39	39	69

Οροομάδα	Ορότυπος	Ορότυπος	Οροομάδα	Ορότυπος	Ορότυπος
	Δανέζικο σύστημα ταξινόμησης	Αμερικάνικο σύστημα ταξινόμησης		Δανέζικο σύστημα ταξινόμησης	Αμερικάνικο σύστημα ταξινόμησης
	15B	54	40	40	45
	15C	77	41	41F	38
16	16F	16		41A	74
	16A	ND	42	42	80
17	17F	17	43	43	75
	17A	78	44	44	81
18	18F	18	45	45	72
	18A	44	46	46	73
	18B	55	47	47F	52
	18C	56		47A	84
			48	48	82

Πηγή: Geno K.A., 2015

5.3. Δομή, σύνθεση και λειτουργία

Η πολυσακχαριδική κάψα αποτελεί την εξώτατη στοιβάδα του μικροβίου και έχει πάχος 100-400 nm (Sorensen U.B.S. *et al.*, 1988). Αποτελείται από επαναλαμβανόμενους ολιγοσακχαρίτες που συντίθενται εντός του κυτταροπλάσματος, πολυμερίζονται και μεταφέρονται στην βακτηριακή επιφάνεια με τρoσφεράσες της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτοί οι πολυσακχαρίτες συνδέονται ομοιοπολικά με την πεπτιδογλυκάνη και τον C-πολυσακχαρίτη.

Ο καθορισμός της δομής του πολυσακχαρίτη (PS) της κάψας, προϋποθέτει τον προσδιορισμό των διαφόρων δομικών επαναλαμβανόμενων μονάδων. Αυτό περιλαμβάνει την αναγνώριση των σακχάρων, τη σειρά με την οποία είναι τοποθετημένα αλλά και το πώς συνδέονται μεταξύ τους οι επαναλαμβανόμενες μονάδες (Calix J. *et al.*, 2012).

Η δυνατότητα μεταμόρφωσης των πνευμονιόκοκκων από τον ένα καψιδικό τύπο στον άλλο που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια των κλασικών μελετών των Griffith, και Avery (Griffith F., 1928, Avery O.T. *et al.*, 1944) υποδείκνυαν ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ειδικά για τον ορότυπο συστατικά ήταν στενά συνδεδεμένα στο χρωμόσωμα. Πρόσθετες γενετικές και βιοχημικές μελέτες από τους Austrian και Bernheimer (Austrian R *et al.*, 1959, Bernheimer H.P. *et al.*, 1967), απέδειξαν ότι κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης, τα γονίδια της βιοσύνθεσης του CPS μεταφέρονται ως κασέτα.

Από τη δεκαετία του 1990, έχει καταβληθεί σημαντική προσπάθεια για την αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών σύνθεσης της πνευμονιοκοκκικής κάψας καθώς και τη ρύθμιση των μηχανισμών αυτών.

Ο επίτοπος για τον ορότυπο 3 (Dillard J.P., Yother J., 1994., García E. *et al.*, 1993) και ο επίτοπος για τον ορότυπο 19F (Guidolin A. *et al.*, 1994) ήταν οι πρώτοι που αλληλουχήθηκαν πλήρως και αποδείχθηκε ότι βρίσκονται στην ίδια θέση στο χρωμόσωμα, μεταξύ των γονιδίων dexB και aliA (Guidolin A. *et al.*, 1994, Dillard P. *et al.*, 1995, Arrecubieta C. *et al.*, 1995, Morona J.K. *et al.*, 1997)

Το 2006, το Ινστιτούτο Sanger ολοκλήρωσε την αλληλούχιση του cps επιτόπου των αρχικών 90 πνευμονιοκοκκικών οροτύπων (Bentley *et al.*, 2006).

Οι επίτοποι του cps γονιδίου από όλους τους άλλους ορότυπους εκτός του ορότυπου 37 έχουν επίσης εντοπιστεί στην ίδια θέση στο χρωμόσωμα - μεταξύ των γονιδίων dexB και aliA. Ο τύπος 37 έχει ένα 'σιωπηλό' αντίγραφο cps του ορότυπου 33F που βρίσκεται μεταξύ των dexB και aliA που περιέχει πολλές διαγραφές και σημειακές μεταλλάξεις και δεν συμμετέχει στην παραγωγή CPS τύπου 37. Αντί αυτού, η βιοσύνθεση του CPS ορότυπου 37 κατευθύνεται από ένα γονίδιο, το tts, που βρίσκεται σε άλλη θέση στο χρωμόσωμα (Llull D. *et al.*, 1999). Ο μηχανισμός της βιοσύνθεσης CPS στον τύπο 37 είναι παρόμοιος με αυτόν του τύπου 3, και αυτός ο μηχανισμός διαφέρει από τον μηχανισμό όλων των άλλων οροτύπων που έχουν αναλυθεί μέχρι σήμερα.

Ο CPS τύπου 3 έχει μια απλή επαναλαμβανόμενη μονάδα δισακχαρίτη που περιλαμβάνει γλυκόζη (Glc) και γλυκουρονικό οξύ (GlcA).

Η δομή του CPS για τους περισσότερους άλλους ορότυπους είναι πιο πολύπλοκη σε σχέση με τους τύπους 3 και 37, με την επαναλαμβανόμενη μονάδα του ολιγοσακχαρίτη να αποτελείται από τουλάχιστον τρία σάκχαρα. Αυτές οι επαναλαμβανόμενες μονάδες μπορεί επίσης να περιέχουν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, πυρουβικό, γλυκερόλη, φωσφορυλοχολίνη και/ή ριβιτόλη. Σε ορισμένους ορότυπους ένα ή περισσότερα σάκχαρα μπορεί επίσης να είναι ακετυλιωμένα (Geno K.A. *et al.*, 2015). Οι αντίστοιχοι επίτοποι cps είναι επίσης πολύ περισσότερο πολύπλοκοι από αυτούς των τύπων 3 και 37, γεγονός που αντικατοπτρίζει τους πιο πολύπλοκους βιοσυνθετικούς μηχανισμούς. Οι επίτοποι ποικίλλουν σε μήκος από περίπου 13 έως 30 kb και αποτελούνται από 10 έως και περισσότερα από 20 γονίδια που φαίνεται να είναι διατεταγμένα ως ενιαία μεταγραφική μονάδα (Bentley S.D *et al.*, 2006).

Τα πρώτα τέσσερα γονίδια (*cpsA*, *B*, *C*, *D*) –επίσης αναφέρονται ως *wzg*, *wzh*, *wzd* και *wze*, αντίστοιχα (Yother J., 2011)– αποτελούν το 5' άκρο κάθε επιτόπου *cps* και τα προϊόντα τους εμπλέκονται στη ρύθμιση της παραγωγής CPS.

Το κεντρικό τμήμα του επιτόπου *cps* κωδικοποιεί τις υπεύθυνες γλυκοζυλοτρανσφεράσες για τη συναρμολόγηση των επαναλαμβανόμενων μονάδων ολιγοσακχαρίτη, το μεταφορέα των επαναλαμβανόμενων μονάδων (*Wzx*) και την πολυσακχαριδική πολυμεράση (*Wzy*). Οι περιοχές στο 3' άκρο των διαφόρων επιτόπων *cps* κωδικοποιούν ένζυμα για τη σύνθεση των πρόδρομων ουσιών των μονοσακχαριτών που απαιτούνται για τη σύνθεση του CPS, ακετυλοτρανσφεράσες και ένζυμα τροποποίησης των σακχάρων (Bentley S.D. *et al.*, 2006).

Οι πλήρεις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των επιτόπων *cps* όλων των γνωστών ορότυπων είναι διαθέσιμοι και παρόλο που οι λειτουργίες πολλών από τα γονίδια σε αυτούς τους επιτόπους αναμένουν επιβεβαίωση από συμβατικές βιοχημικές και γενετικές αναλύσεις, η πρόσβαση στο τεράστιο σύνολο πληροφοριών σε συνδυασμό με τη γνώση των χημικών δομών πολλών από τις επαναλαμβανόμενες μονάδες CPS, έχουν επιτρέψει με ακρίβεια προβλέψεις της λειτουργίας για ένα σημαντικό ποσοστό από αυτά τα γονίδια. Ήταν επίσης δυνατό να προβλεφθούν οι μηχανισμοί της βιοσύνθεσης CPS σε πνευμονιόκοκκους κατ' αναλογία με εκείνους που υπάρχουν σε Gram-αρνητικά βακτήρια. Ωστόσο, μένουν πολλά να μάθουμε για το ακριβές μοριακό υπόβαθρο των διαδικασιών που εμπλέκονται και στις δύο οδούς βιοσύνθεσης της κάψας (Paton J C, Trappetti C., 2019).

Η παραγωγή της κάψας είναι απαραίτητη για τη λοιμογονικότητα του μικροβίου και έχει ισχυρή αντιφαγοκυτταρική δράση σε μη ανοσοποιημένους ξενιστές. (Austrian R., 1981). Παρόλο που στελέχη χωρίς κάψα έχουν συσχετιστεί με επιφανειακές λοιμώξεις όπως επιπεφυκίτιδα (Martin M. *et al.*, 2003, Crum N.F. *et al.*, 2004), κλινικά στελέχη που απομονώθηκαν από άλλες στείρες περιοχές βρέθηκαν να έχουν κάψα ενώ στελέχη χωρίς κάψα που προέρχονται από τέτοιες περιοχές είναι μή λοιμογόνα.

Οι περισσότεροι τύποι καψιδίου έχουν υψηλό ηλεκτρικό φορτίο σε φυσιολογικό pH και αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με τα φαγοκύτταρα (Lee C.J. *et al.*, 1991). Η κάψα σχηματίζει μια ασπίδα που φαίνεται να αποτρέπει τόσο το Fc τμήμα της IgG όσο και το συστατικό C3b του συμπληρώματος - το οποίο προσδένεται σε βαθύτερες δομές της επιφάνειας του μικροβίου (όπως τειχοϊκά οξέα και πρωτεΐνες κυτταρικής επιφάνειας) να αλληλεπιδράσουν με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους στα φαγοκύτταρα (Winkelstein J.A., 1981, Musher D.M., 1992).

Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η κάψα ελαττώνει τη συνολική ποσότητα του συμπληρώματος που εναποτίθεται στη βακτηριακή επιφάνεια (Abeyta M. *et al.*, 2003) και ελαττώνει επίσης και την παγίδευση των μικροβίων από τα ουδετερόφιλα (Wartha F. *et al.*, 2007).

Η λοιμογονικότητα του πνευμονιόκκοκου σχετίζεται με το πάχος της κάψας για κάθε συγκεκριμένο στέλεχος και ορότυπο (MacLeod C.M., *et Krauss* M.R., 1950). Ωστόσο διαφορετικοί ορότυποι διαφέρουν σημαντικά στην ικανότητα τους να προκαλούν νόσο (Austrian R., 1981). Αυτό πιθανώς αντανακλά την διαφορετική ικανότητα που έχουν να ανθίστανται στη φαγοκυττάρωση, καθώς επίσης και διαφορές στην ικανότητα τους να πυροδοτούν τη χυμική ανοσιακή απάντηση.

Τέλος οι Fernebro και συνεργάτες (Fernebro J. *et al.*, 2004) αναφέρουν ότι η κάψα προσφέρει ένα βαθμό αντίστασης σε ενδογενή ή προκαλούμενη από αντιβιοτικά αυτόλυση, συμβάλλοντας έτσι στην αντίσταση των κλινικών στελεχών στα αντιβιοτικά. Το ενδιαφέρον είναι ότι και αυτή η ιδιότητα ποικίλει μεταξύ των διαφόρων οροτύπων.

5.4. Παθογένεια

Όταν τα βακτήρια διαφύγουν των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή και διεισδύσουν στους ιστούς, προκαλείται λοίμωξη. Αυτό συμβαίνει συχνότερα όταν οι πνευμονιόκοκκοι μεταφέρονται στα παραρρίνια, στην ευσταχιανή σάλπιγγα ή στους βρόγχους.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η δράση των κροσσών του επιθηλίου και οι αμυντικοί μηχανισμοί του οργανισμού απομακρύνουν ταχύτατα τους πνευμονιοκόκκους. Αν όμως συνυπάρχει αλλεργία ή ιογενής λοίμωξη, το προκαλούμενο οίδημα αποφράσσει την ευσταχιανή σάλπιγγα και τα εγκλωβισμένα μικρόβια πολλαπλασιάζονται και προκαλούν λοίμωξη. Ομοίως, στον πνεύμονα βλάβη του κροσσώτου επιθηλίου, η αυξημένη παραγωγή βλέννης είτε χρόνια (λόγω καπνίσματος ή επαγγέλματος) είτε οξεία (λόγω γρίπης ή άλλης ιογενούς λοίμωξης), εμποδίζει την απομάκρυνση των εισπνευσθέντων μικροοργανισμών και οδηγεί σε λοίμωξη.

Ο πνευμονιόκοκκος προκαλεί νόσο λόγω της ικανότητάς του να διαφεύγει της φαγοκυττάρωσης και της ενδοκυττάριας μικροβιοκτονίας. Βασικό ρόλο σε αυτό, διαδραματίζει το πολυσακχαριδικό του έλυτρο. Αιτίες που συμβάλλουν στη διαφυγή της φαγοκυττάρωσης είναι α) η απουσία στα φαγοκύτταρα υποδοχέων που

αναγνωρίζουν τους πολυσακχαρίτες του ελύτρου και β) η παρουσία ηλεκτροχημικών δυνάμεων που απωθούν τα φαγοκύτταρα (Musher D.M., 2000).

Ο μικροοργανισμός πολλαπλασιάζεται στους ιστούς και διεγείρει ισχυρή φλεγμονώδη απάντηση του ξενιστή με ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος από τα συστατικά του ελύτρου και του κυτταρικού τοιχώματος, αλλά και της κλασσικής οδού από αντισώματα έναντι πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος (Winkelstein J.A. *et al.*, 1976, Rodriguez-Barradas M.C. *et al.*, 1993).

Η πνευμονυσίνη, οι πρωτεΐνες επιφανείας, και η αυτολυσίνη συντελούν επίσης στην παθογένεια των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων (Boulnois G.J., 1992).

6. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΔΙΑΘΕΤΟΥΝ ΣΕ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΗ ΛΟΙΜΩΞΗ

Ποικίλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ανοσολογική άμυνα του ξενιστή, προδιαθέτουν σε πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις όπως:

- **Ο ανεπαρκής σχηματισμός αντισωμάτων**, οποιασδήποτε αιτιολογίας, είτε συγγενής είτε επίκτητος, ασκεί μέγιστη επίδραση στην ευαισθησία έναντι των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων. Ο αποικισμός οδηγεί σε ανοσολογική απάντηση του ξενιστή με παραγωγή ειδικών για τον ορότυπο αντισωμάτων μέσα σε 30 ημέρες από την εγκατάσταση του μικροβίου στο ρινοφάρυγγα (Musher DM. *et al.*, 1993). Ο τίτλος των αντισωμάτων είναι υψηλός, όμοιος με αυτόν που ακολουθεί μετά από λοίμωξη. Σε περιπτώσεις που δεν υπάρχουν παράγοντες που προδιαθέτουν σε λοίμωξη, τότε τα αντικαψιδικά αντισώματα που εμφανίζονται μετά τον αποικισμό δρουν προστατευτικά και δεν αναπτύσσεται λοίμωξη. Σε ενήλικες όμως με μειωμένους μηχανισμούς κάθαρσης του κατώτερου αναπνευστικού, η λοίμωξη εγκαθίσταται πριν την παραγωγή αντισωμάτων. Άτομα με συγγενή αγαμμασφαιριναιμία ή υπογαμμασφαιριναιμία ή ανεπάρκεια ορισμένων υποτάξεων IgG έχουν μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης (Umetsu D.T. *et al.*, 1985). Ομοίως ο πνευμονιόκοκκος αποτελεί από τα συχνότερα παθογόνα σε άτομα με πολλαπλούν μυέλωμα, χρόνια λεμφογενή λευχαιμία, λέμφωμα και HIV λοίμωξη (Savage D.G. *et al.*, 1982, Cunningham-Rundles C. 1989). Με την πρόοδο της HIV λοίμωξης και την πτώση των CD4+ λεμφοκυττάρων κάτω από 500/mm³ μειώνεται και η ικανότητα παραγωγής αντισωμάτων έναντι του πνευμονιοκόκκου (Janoff E.N. *et al.*, 1993).
- **Η συγγενής ή επίκτητη ανεπάρκεια στους παράγοντες C1, C2 και C4** του συμπληρώματος συνδέεται με αυξημένη ευαισθησία σε πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις (Figueroa J.E., Densen P., 1991).
- **Η ουδετεροπενία** ή η δυσλειτουργία των πολυμορφοκυττάρων προδιαθέτουν σε πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις (Anderson D. C *et al.*, 1985).
- **Ο σπλήνας**. Επί λειτουργικής ή ανατομικής ασπληνίας αυξάνεται το ποσοστό των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων (π. χ. σε παιδιά με δρεπανοκυτταρική αναιμία) (Adamkiewicz T.V. *et al.*, 2003). Ο σπλήνας αποτελεί το κύριο όργανο στο οποίο γίνεται η κάθαρση του αίματος από τον

πνευμονιόκοκκο. Η βραδεία διέλευση του αίματος μέσω του σπλήνα και η παρατεταμένη επαφή με τα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος στις χορδές του Billroth και στους κόλπους του σπλήνα επιτρέπουν την κάθαρση των μη οψονοποιηθέντων σωματιδίων (Wara D.W., 1981, Schutze G.E. *et al.*, 2002). Για τον παραπάνω λόγο παρατηρούνται θανατηφόρες πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις κυρίως σε σπληνεκτομηθέντες και σε άτομα με πλημμελή λειτουργία του σπλήνα.

- **Η ηλικία.** Αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης έχουν τα βρέφη στα οποία δεν είναι ακόμα αναπτυγμένο το ανοσοποιητικό σύστημα και οι ηλικιωμένοι. Η ευαισθησία των ηλικιωμένων στην πνευμονιοκοκκική πνευμονία οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Η έκπτωση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος οδηγεί σε μείωση της παραγωγής των ανοσοσφαιρινών (Musher D.M., 2000).
- **Σακχαρώδης διαβήτης** η προδιάθεση σε λοιμώξεις από *Streptococcus pneumoniae* οφείλεται στην μειωμένη χημειοταξία των πολυμορφοπύρηνων καθώς και στην μειωμένη φαγοκυτταρική τους ικανότητα, ειδικά όταν συνυπάρχει νεφρική ανεπάρκεια (Thomsen R.W. *et al.*, 2004).
- **Οι ιογενείς λοιμώξεις** προδιαθέτουν σε πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις καθώς και τα νοσήματα στα οποία **παρεμποδίζεται η πνευμονική κάθαρση**, όπως το άσθμα, η χρόνια βρογχίτιδα, και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (Jones E.E. *et al.*, 1998).
- **Χρόνια νοσήματα**, αλκοολισμός, παρατεταμένη νοσηλεία, συμπεριλαμβάνονται στους παράγοντες που προδιαθέτουν σε πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις (Young C.L., MacGregor R.R., 1989).
- **Συγχρωτισμός.** Αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης έχουν άτομα, τα οποία διαβιούν σε συνθήκες μεγάλης έκθεσης στο μικρόβιο, όπως σε βρεφονηπιακούς σταθμούς, στρατώνες, φυλακές, και ιδρύματα.
- Εκτός των ανωτέρω ένας άλλος παράγοντας που προδιαθέτει και επηρεάζει την έκβαση της πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης είναι ο **ορότυπος του μικροβίου** (Weinberger D.M. *et al.*, 2010). Υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ συχνότητας φορέας ενός συγκεκριμένου ορότυπου και διεισδυτικότητας αυτού του ορότυπου. Ορότυποι που ανευρίσκονται λιγότερο συχνά σε μελέτες φορέας φαίνεται να προκαλούν συχνότερα διεισδυτική νόσο, ενώ οι ορότυποι

που είναι πιο διαδεδομένοι στη φορεία είναι λιγότερο διεισδυτικοί (Brueggemann A.B. *et al.*, 2004). Επίσης, έχει περιγραφεί ότι οι ορότυποι που έχουν μικρότερο κίνδυνο πρόκλησης διεισδυτικής νόσου συνδέονται με πιο σοβαρή ασθένεια και μεγαλύτερη θνησιμότητα όταν προκαλέσουν νόσο, ακόμη και σε υγιή άτομα (Dietl B. *et al.*, 2021). Σύμφωνα με τις μελέτες των Brueggemann και συνεργατών, οι ορότυποι 1, 3, 4, 5, 7F, 8, 9A, 9V, 12F, 14, 18C και 19A θεωρούνται ορότυποι υψηλής διεισδυτικότητας (Brueggemann A.B. *et al.*, 2003)

7. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

Ο *Streptococcus pneumoniae* είναι παθογόνο της κοινότητας και προκαλεί ποικίλες λοιμώξεις. Συχνότερα προκαλεί λοιμώξεις των ωτών, των παραρρινίων κόλπων, της τραχείας, των βρόγχων και των πνευμόνων μέσω άμεσης επέκτασης από το σημείο του αρχικού αποικισμού, που είναι ο ρινοφάρυγγας.

Η λοίμωξη των καρδιακών βαλβίδων, των οστών και των αρθρώσεων προκαλείται μόνο μέσω της αιματογενούς οδού, ενώ λοίμωξη του περιτοναίου, του υπεζωκότα, καθώς και του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) μπορεί να γίνει είτε μέσω άμεσης εξάπλωσης, είτε μέσω της αιματογενούς οδού. Συνήθως δεν είναι εφικτό να διευκρινιστεί ο ακριβής τρόπος μετάδοσης του μικροοργανισμού. Η μικροβιαμία χωρίς εστία λοίμωξης αποκαλείται πρωτοπαθής. Εάν δεν έχει χορηγηθεί άμεσα θεραπευτική αγωγή, η πιθανότητα να αποκαλυφθεί η εστία της λοίμωξης είναι μεγαλύτερη.

7.1. Πνευμονία

Η πνευμονία δημιουργείται όταν οι προστατευτικοί μηχανισμοί του ξενιστή δεν καταφέρουν να παρεμποδίσουν την είσοδο του πνευμονιόκοκκου στις πνευμονικές κυψελίδες, και κατ' επέκταση τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό του. Τα μικρόβια πολλαπλασιάζονται στον κυψελιδικό χώρο και διεισδύουν στο κυψελιδικό διάφραγμα όπου διεγείρεται η φλεγμονώδης διεργασία με ενεργοποίηση του συμπληρώματος και παραγωγή κυτοκινών. Αυξάνεται η διαπερατότητα των αγγείων και η παραγωγή εξιδρωματικού υγρού και λευκοκυττάρων που συσσωρεύονται στις κυψελίδες.

Η κλινική διάγνωση της πνευμονίας γίνεται όταν η συσσώρευση του υγρού στις κυψελίδες είναι τέτοια ώστε να οδηγεί και στην ακτινολογική εικόνα της πνευμονίας με τη μορφή πύκνωσης (Klein JO., 2004).

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

Λιγότερο συχνά ο πνευμονιόκοκκος προκαλεί πνευμονικό απόστημα διότι δεν παράγει τοξίνες και ένζυμα οι οποίες προκαλούν βλάβη στους ιστούς.

Η διάγνωση μπορεί να τεθεί σε ενήλικες και μεγάλα παιδιά με μικροσκοπική εξέταση των πτυέλων (κατά Gram χρώση) και την καλλιέργεια. Η εξέταση πτυέλων δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί διαγνωστικά σε παιδιά < 5 ετών γιατί αυτά συνήθως καταπίνουν τις εκκρίσεις τους. Η καταλληλότητα του δείγματος πτυέλων ορίζεται από την ύπαρξη 10 ή περισσότερων πολυμορφοπυρήνων και λιγότερο από 25 επιθηλιακών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο (x100). Η διάγνωση θεωρείται βέβαιη όταν απομονώνεται πνευμονιόκοκκος στην κ/α αίματος και μπορεί να βοηθήσει η ανίχνευση αντιγόνων του πνευμονιόκοκκου στα ούρα. Στα παιδιά μπορεί να είναι θετική η εξέταση και στην περίπτωση αποικισμού του ρινοφάρυγγά τους, οπότε και δε θεωρείται διαγνωστική (Michelow I.C. *et al.*, 2002). Τέλος, με την ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων διάγνωσης (PCR) έχει υπάρξει πρόοδος σε ότι αφορά την ανεύρεση του υπεύθυνου παθογόνου.

7.2. Μηνιγγίτιδα

Ο πνευμονιόκοκκος αποτελεί σημαντικό αίτιο βακτηριακής μηνιγγίτιδας. Στην Ελλάδα και στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες όπου εφαρμόζεται εμβολιαστικό πρόγραμμα για τον αιμόφιλο της ινφλουένζας, καθώς και εμβολιαστικά προγράμματα για τον μηνιγγιτιδόκοκκο και τον πνευμονιόκοκκο, η πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα εμφανίζεται πλέον περίπου με την ίδια συχνότητα όσο και η μηνιγγιτιδοκοκκική μηνιγγίτιδα σε παιδιά πέραν της νεογνικής ηλικίας. Στους ενήλικες αντίθετα, ο πνευμονιόκοκκος από τελεί το κύριο αίτιο μηνιγγίτιδας (D. vandeBeek *et al.*, 2016).

Η μηνιγγίτιδα μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε άμεσης επέκτασης από τους παραρρίνιους κόλπους και το μέσο ους, είτε το αποτέλεσμα αιματογενούς εξάπλωσης. Παρόλο που αρχικά για την παθογένεση είχε ενοχοποιηθεί η αιματογενής διασπορά από το χοριοειδές πλέγμα (Quagliarello V., Scheld W.M., 1992), πλέον υπάρχει η άποψη ότι ενεργοποιούνται τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών που εκκρίνουν κυττοκίνες και διεγείρουν την παραγωγή του παράγοντα για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (PAF) (Fillion S. *et al.*, 2006). Ο πνευμονιόκοκκος δεσμεύεται από τους υποδοχείς του PAF μέσω της φωσφορυλχολίνης του κυτταρικού τοιχώματος. Μέσω της σύνδεσής αυτής, διατρέχει το ενδοθήλιο και οδεύει στον εξωκυττάριο χώρο όπου πολλαπλασιάζεται και διασπείρεται στο ΕΝΥ.

Δεν υπάρχουν κλινικά σημεία ή συμπτώματα που μπορούν να διακρίνουν την πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα από τη μηνιγγίτιδα που οφείλεται σε άλλα παθογόνα

αίτια. Χρησιμοποιώντας τόσο τις συμβατικές μικροβιολογικές τεχνικές όσο και τις σύγχρονες μοριακές προσεγγίσεις, σήμερα υπάρχει η δυνατότητα της σωστής διάγνωσης σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Η ανίχνευση του αντιγόνου του πνευμονιόκοκκου στο κλινικό δείγμα του ΕΝΥ είναι σημαντικό βοηθητικό εργαλείο σε συνδυασμό με την Gram χρώση (Alter S.J., 2009). Ωστόσο, με την πάροδο 3-6 ωρών από την χορήγηση στον ασθενή αντιμικροβιακής αγωγής, υπάρχει ικανή συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο ΕΝΥ, με αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των μικροβίων και αδυναμία απομόνωσης του βακτηρίου στις καλλιέργειες. Στις περιπτώσεις αυτές η χρήση των μοριακών τεχνικών βοηθά σημαντικά στην ανίχνευση και ταυτοποίηση του γενετικού υλικού του παθογόνου αιτίου.

7.3. Οξεία μέση ωτίτιδα

Η οξεία μέση ωτίτιδα (ΟΜΩ) είναι από τις συχνότερες λοιμώξεις της παιδικής ηλικίας. Κλινικά χαρακτηρίζεται από την οξεία εμφάνιση συμπτωμάτων και σημείων λόγω της φλεγμονής του μέσου ωτός σε συνδυασμό με ωτοσκοπικά ευρήματα όπως ερυθρότητα, προβολή και μειωμένη κινητικότητα του τυμπανικού υμένα.

Ο πνευμονιόκοκκος είναι υπεύθυνος για το 30-50% των περιπτώσεων ΟΜΩ, ο αιμόφιλος της ινφλουέντζας για το 15-30%, ενώ η *Moraxella catarrhalis* για το 5-15%. Στις μελέτες που αφορούσαν παιδιά ηλικίας 6 μηνών έως 4 ετών και πραγματοποιήθηκαν πριν από την ευρεία εφαρμογή του 7-δύναμου εμβολίου, ο πνευμονιόκοκκος ανευρέθη στο 40-50% των περιπτώσεων στις οποίες απομονώθηκε μικρόβιο (Jacobs M.R. *et al.*, 1998).

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

Μελέτες καταδεικνύουν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του αποικισμού του ρινοφάρυγγα και των λοιμώξεων του μέσου ωτός. Παρόλο που οι περισσότερες περιπτώσεις αποικισμού δεν συνοδεύονται από νόσο, προοπτικές μελέτες έχουν δείξει ότι η πνευμονιοκοκκική ΟΜΩ έπεται του αποικισμού με καινούργιο ορότυπο (Faden H. *et al.*, 1997). Παιδιά με ΟΜΩ έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι αποικισμένα στο ρινοφάρυγγα τη στιγμή της διάγνωσης.

Ο αποικισμός διαφέρει ανάμεσα στους υγιείς και σε αυτούς με ιογενείς λοιμώξεις και ΟΜΩ. Οι ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της οξείας μέσης ωτίτιδας. Οι αναπνευστικοί ιοί παρεμβαίνουν στο σύστημα της βλεννοκροσσωτής κάθαρσης με αποτέλεσμα την δυσλειτουργία της πρωταρχικής άμυνας του ξενιστή απέναντι στην μικροβιακή εισβολή. Επίσης, οι ιογενείς λοιμώξεις προκαλούν δυσλειτουργία της ευσταχιανής σάλπιγγας και ελάττωση της πίεσης στο μέσο ους. Αποτέλεσμα αυτών είναι να ωθούνται στο μέσο ους, βλέννα, εκκρίσεις του ρινοφάρυγγα και μικρόβια που τον αποικίζουν. Συνήθως η ΟΜΩ εμφανίζεται 2-5 μέρες μετά από μία ιογενή λοίμωξη του αναπνευστικού (Revaï K. *et al.*, 2008).

Είναι σημαντικό το γεγονός ότι η πλειονότητα των στελεχών του πνευμονιόκοκκου που σχετίζεται με ΟΜΩ είναι νέα στελέχη και όχι αυτά που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα κατά την περίοδο που τα παιδιά είναι υγιή (Alter S.J., 2009, Rodgers G.L., 2009).

7.4. Βακτηριαμία

Η συχνότερη εκδήλωση διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου στα παιδιά είναι η βακτηριαμία χωρίς εμφανή εστία λοίμωξης (Alpem E. *et al.*, 2001). Το μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων παρατηρείται σε ηλικίες <2 ετών και η συχνότητα εμφάνισής της υπολογίζεται σε ποσοστό 2%. Μετά την εφαρμογή του εμβολίου για τον αιμόφιλο της ινφλουέντζας τύπου b, ο πνευμονιόκοκκος είναι ο συχνότερος μικροοργανισμός που απομονώνεται σε καλλιέργειες αίματος παιδιών με εικόνα λανθάνουσας βακτηριαμίας (83-92%) (Lee G.M., Harper M.B., 1998). Ως λανθάνουσα βακτηριαμία ορίζεται η ύπαρξη θετικής αιμοκαλλιέργειας σε παιδί με πυρετό χωρίς εμφανή εστία λοίμωξης.

Πριν την εφαρμογή του επταδύναμου συζευγμένου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου οι συχνότεροι ορότυποι που απομονώνονταν ήταν οι 14, 6B και 23F (Alpem E. *et al.*, 2001).

7.5. Παραρινοκολπίτιδα

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

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

7.6. Οξεία έξαρση χρόνιας βρογχίτιδας

Προσεκτική μικροβιολογική ανάλυση έχει επιβεβαιώσει την κλινική υποψία ότι ο πνευμονιόκοκκος ευθύνεται, σε συνδυασμό με τον αιμόφιλο της ινφλουέντζας, για τις εξάρσεις σε ασθενείς με χρόνια βρογχίτιδα. Επίσης, η κλινική αναγνώριση έξαρσης της χρόνιας νόσου συσχετίζεται σημαντικά με την παρουσία νέου πνευμονιοκοκκικού στελέχους (Sethi S. *et al.*, 2002).

7.7. Άλλες λοιμώξεις

Λιγότερο συχνές μορφές πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης αποτελούν η σηπτική αρθρίτιδα, η οστεομυελίτιδα, η ενδοκαρδίτιδα καθώς και οι λοιμώξεις μαλακών μορίων (Alter S.J., 2009).

Μία σπάνια επιπλοκή πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης αποτελεί και το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. Παιδιά με νεφρωσικό σύνδρομο κινδυνεύουν από πνευμονιοκοκκική διεισδυτική λοίμωξη λόγω απώλειας ανοσοσφαιρινών και της επακόλουθης διαταραχής τόσο στην οψωνοποίηση, όσο και στη λειτουργία των λεμφοκυττάρων. Αποτέλεσμα αυτών είναι η περιτονίτιδα, η σήψη, η πνευμονία, αλλά και λοιμώξεις μαλακών μορίων.

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

8. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

8.1. Καλλιέργεια – μορφολογία – βιοχημικές ιδιότητες

Ο πνευμονιόκοκκος αναπτύσσεται σε αιματούχο άγαρ, όχι όμως και στο σκέτο θρεπτικό άγαρ. Οι αποικίες του μετά από 24ωρη επώαση είναι κυκλικές, γυαλιστερές, ημιδιαφανείς με φουσκωτή περιφέρεια και ελαφρώς χαμηλότερο κέντρο. Αν το καλλιέργημα επωασθεί για 1 επιπλέον 24ωρο, η κοίλανση γίνεται εντονότερη και οι αποικίες παίρνουν τη χαρακτηριστική μορφή «σαν πιατάκια» (εικόνα 2).

Εικόνα 2: Αποικίες *S. pneumoniae* και *S. viridans* σε αιματούχο άγαρ.



Πηγή: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt08-id-characterization-streppneumo.pdf>

Ο πνευμονιόκοκκος παράγει μια αιμολυσίνη γνωστή ως πνευμολυσίνη, που διασπά ατελώς την αιμοσφαιρίνη. Αυτό φαίνεται καθαρότερα όταν καλλιεργείται σε τρυβλία με αιματούχο άγαρ, όπου οι αποικίες περιβάλλονται από μία πράσινη άλω, τη ζώνη α-αιμόλυσης (α-αιμόλυση) (Εικόνα 3).

Εικόνα 3: Αποικίες *S. pneumoniae* σε αιματούχο άγαρ όπου φαίνεται η ζώνη α-αιμόλυσης.



Πηγή: <http://www.bacteriainphotos.com>

Όταν αναπτυχθεί σε σοκολατόχρωμο άγαρ το πράσινο χρώμα είναι εντονότερο και παράλληλα αρχίζει αποχρωματισμός του υλικού κάτω από την αποικία, που οφείλεται στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Αναπτύσσεται επίσης σε ζωμό και προκαλεί ομοιόμορφη θόλωση. Οι αποικίες του γρήγορα αυτολύονται από τα αυτολυτικά ένζυμα του μικροβίου και στη θέση τους παραμένουν τα ίχνη της αποικίας ως “αποικία - φάντασμα” (phantom colonies) (Αρσένη Α., 1994).

Η μορφολογία των αποικιών ποικίλει ανάλογα με τον ορότυπο. Αποικίες που ανήκουν στον ορότυπο 3 είναι χαρακτηριστικά πολύ μεγάλες (>3 mm) και βλεννώδεις, κάποιες

του ορότυπου 19 είναι επίσης βλεννώδεις αλλά μικρότερου μεγέθους, ενώ αποικίες των οροτύπων 1 και 14 συνήθως είναι πολύ μικρότερες (<1 mm). Οι αποικίες του ίδιου στελέχους μπορεί να διαχωριστούν σε διαφανείς και αδιαφανείς, όταν αναπτυχθούν σε διαφανές θρεπτικό υλικό και διέλθει φως μέσα από αυτές (Weiser J. N *et al.*, 1996). Μελέτες έδειξαν ότι οι διαφανείς αποικίες έχουν μεγαλύτερη ικανότητα να αποικίζουν τον ρινοφάρυγγα σε σύγκριση με τις αδιαφανείς (Gray B.M. *et al.*, 1980)

Ο πνευμονιόκοκκος διασπά διάφορα σάκχαρα με παραγωγή οξέος όπως τη γλυκόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη, λακτόζη, μαλτόζη, ραφινόζη και την ινουλίνη όχι όμως τη δουλσιτόλη και τη σορβιτόλη (Αρσένη Α., 1994).

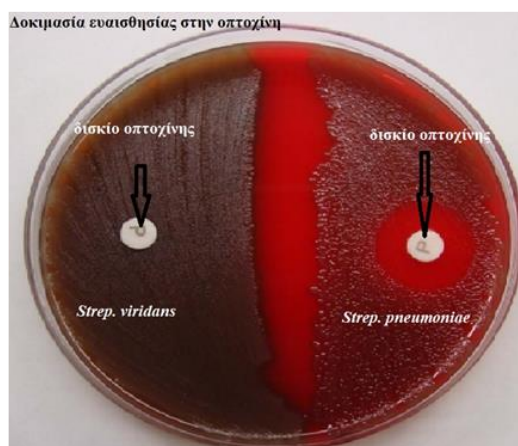
Οι πνευμονιόκοκκοι ταυτοποιούνται στο εργαστήριο με βάση τα εξής:

- α) τη ζώνη α-αιμόλυσης σε αιματούχο άγαρ (Εικόνα 3).
- β) την αρνητική δοκιμασία καταλάσης
- γ) την ευαισθησία στην οπτοχίνη (Εικόνα 4).

Το βακτήριο καλλιεργείται στην επιφάνεια τρυβλίου αιματούχου άγαρ. Πάνω στη περιοχή αυτή τοποθετείται δίσκιο εμποτισμένο με οπτοχίνη. Μετά από 24ωρη επώαση παρουσία CO₂ 5% στους 37°C παρατηρείται ζώνη αναστολής ανάπτυξης γύρω από τον δίσκο με διάμετρο 16-18 mm ή και μεγαλύτερη αν το εξεταζόμενο μικρόβιο είναι πνευμονιόκοκκος όχι όμως αν είναι πρασινίζων στρεπτόκοκκος. Αν η ζώνη αναστολής είναι μικρότερη θα πρέπει να γίνουν και κάποιες άλλες δοκιμές.

Περιστασιακά μπορεί κάποιοι άλλοι στρεπτόκοκκοι να έχουν ευαισθησία στην οπτοχίνη ή και κάποιοι πνευμονιόκοκκοι να παρουσιάζουν αντοχή στην οπτοχίνη (Munoz R. *et al.*, 1999). Σε αυτές τις περιπτώσεις, προκειμένου να αναγνωριστούν τα στελέχη πνευμονιόκοκκου, ελέγχεται και η διαλυτότητα στα χολικά άλατα (Pikis A. *et al.*, 2001).

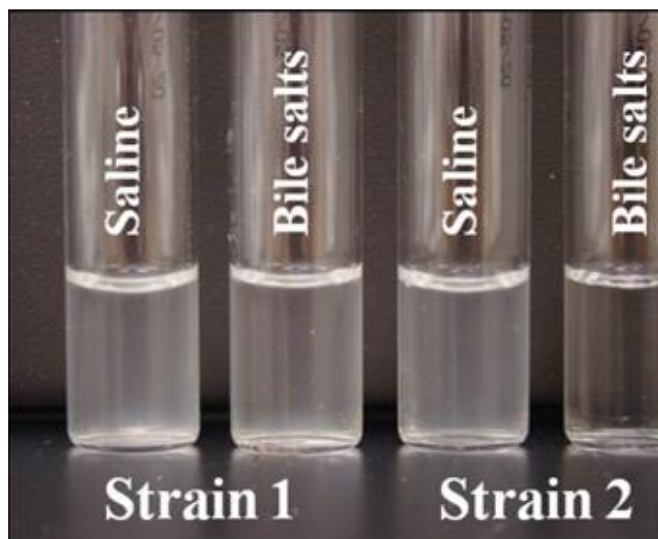
Εικόνα 4: Δοκιμασία ευαισθησίας στην οπτοχίνη.



Πηγή: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt08-id-characterization-streppneumo.pdf>

δ) δοκιμασία διαλυτότητας στα χολικά άλατα (Εικόνα 5).

Εικόνα 5: Δοκιμασία διαλυτότητας στα χολικά άλατα – Το στέλεχος 2 είναι *S. pneumoniae*.



Πηγή: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt08-id-characterization-streppneumo.pdf>

δεσοξυχολικό νάτριο και στο άλλο που είναι ο μάρτυρας 0,5 ml φυσιολογικός ορός. Τα σωληνάρια επωάζονται στους 35°C για 2 ώρες και συγκρίνεται ο βαθμός θολερότητας μεταξύ τους. Αν το εξεταζόμενο μικρόβιο είναι πνευμονιόκοκκος το διάλυμα θα διαυγάσει. Ψευδώς αρνητικό ή ασαφές αποτέλεσμα παίρνουμε αν το καλλιέργημα δεν ήταν καθαρό ή αν δεν είχε γίνει ρύθμιση του pH.

Υπάρχουν διάφορες τροποποιήσεις της μεθόδου και η δοκιμή μπορεί να γίνει και πάνω σε τρυβλίο τοποθετώντας χάρτινο δίσκο εμποτισμένο με χολή ή ταυροχολικό νάτριο. Σπανίως, έχουν αναφερθεί και στελέχη αδιάλυτα στα χολικά άλατα (Mundy L.S. *et al.*, 1998).

ε) Χρώση Gram (Εικόνα 6).

Στη χρώση Gram, ο πνευμονιόκοκκος εμφανίζεται ως gram θετικός διπλόκοκκος.

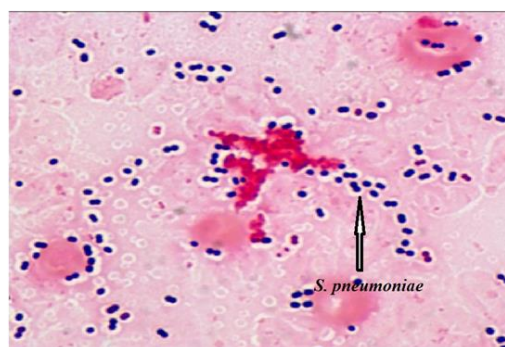
Ο πνευμονιόκοκκος είναι από τα πιο ευαίσθητα μικρόβια. Καταστρέφεται στους 52°C σε 15 min καθώς και με αυτόλυση στα καλλιεργήματα. Είναι ευαίσθητος στα απολυμαντικά όπως:

1% υποχλωριώδες νάτριο, 70% αιθανόλη, 2% γλουταραλδεΐδη, και φορμαλδεΐδη.

Η δοκιμασία αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα που έχουν τα χολικά άλατα να ενεργοποιούν αυτολυτικά ένζυμα και να καταστρέφουν το μικρόβιο.

Καλλιέργημα πνευμονιοκόκκου σε ζωμό η εναιώρημα καλλιέργηματος σε άγαρ διαυγάζεται αν σε αυτό προστεθεί χολή. Σε 2 μικρά σωληνάρια τοποθετούνται από 0,5ml από το εξεταστέο υγρό (καλλιέργημα σε ζωμό ή εναιώρημα). Στο ένα από αυτά προστίθενται 0,5ml

Εικόνα 6: Χρώση Gram σε καλλιέργεια αίματος.



Πηγή: <https://microbe-canvas.com/>

στ) Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι PCR που επιτρέπουν την ανίχνευση του μικροβίου σε κλινικά δείγματα. (Marchese *et al.*, 2011, Moore *et al.*, 2010, Ξηρογιάννη Α. 2010)

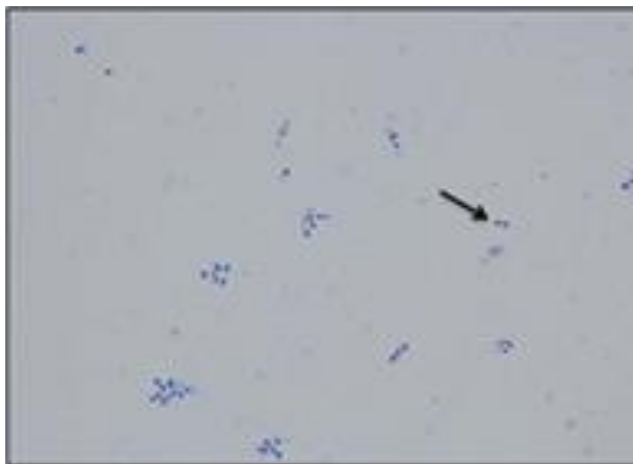
8.2. Τυποποίηση

8.2.1. Ορολογική τυποποίηση

Κυρίαρχη θέση στην ορολογική τυποποίηση των στελεχών του *S. pneumoniae* κατέχει η μέθοδος της εξοίδησης του ελύτρου (Quellung reaction). Πρωτοπεριγράφηκε το 1902 και παραμένει η μέθοδος αναφοράς. (Austrian 1976, Sorensen 1993).

Όταν έρθει σε επαφή μικροβιακό εναιώρημα με ορό που περιέχει αντίσωμα έναντι του πολυσακχαριδικού αντιγόνου του ελύτρου, προκαλείται συνένωση του αντιγόνου με το ομόλογο αντίσωμα. Το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος σχηματίζει ίζημα στην περιφέρεια του κυττάρου και διαχωρίζεται σαφώς από το υπόλοιπο κύτταρο λόγω της

Εικόνα 7: Αντίδραση Quellung.



Πηγή: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt08-id-characterization-streppneumo.pdf>

διαφορετικής διαθλαστικής του ικανότητας. Επιπλέον παρατηρείται συγκόλληση των μικροβιακών κυττάρων (Εικόνα 7).

Αυτή η προσέγγιση απλοποιήθηκε πολύ με την εισαγωγή 12 ομαδοποιημένων αντιορών, δεδομένου ότι επέτρεψε την ταυτοποίηση ενός ορότυπου σχετικά γρήγορα με μόνο 12 αντιδραστήρια (Sorensen U.B.S. 1993). Ωστόσο, η μέθοδος είναι αργή και κοπιώδης στην εκτέλεση.

Έτσι, διερευνήθηκαν νέες προσεγγίσεις, όπως: μέθοδοι dotblot (Fenoll A. *et al.*, 1997), δοκιμασία ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (Lankinen K.S. *et al.*, 2004) καθώς και μια δοκιμασία συγκόλλησης λατέξ που χρησιμοποιεί σωματίδια λάτεξ επικαλυμμένα με αντικαψιδικά αντισώματα από ορό κουνελιού (Lafong A.C., Crothers E. 1988, Slotved H.C. *et al.*, 2004).

Μια πολύ επιτυχημένη εκδοχή της μεθόδου συγκόλλησης λατέξ αναπτύχθηκε με την επικάλυψη σφαιριδίων λατέξ με αντιορό κουνελιού που αναγνωρίζει πολλαπλούς ορότυπους/οροομάδες. Αυτή η δοκιμασία, που ονομάζεται Pneumotest-Latex, είναι εύκολη στη χρήση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί από άτομα με λιγότερη εκπαίδευση. Κατά συνέπεια, αυτή η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς (Konradsen H.B. 2005, Kuch A. *etal.* 2014) και συνιστάται ως πιο πρακτική.

Μια άλλη προσέγγιση ήταν η αντικατάσταση των αντιορών κουνελιού με μονοκλωνικά αντισώματα (MAbs) ειδικά για τη κάψα. Τα MAbs επέτρεψαν την ανακάλυψη νέων πνευμονιοκοκκικών ορότυπων που δεν είχαν αναγνωριστεί προηγουμένως. Ένα παράδειγμα είναι ο ορότυπος 6C, ο οποίος τυποποιούνταν ως 6A στο παρελθόν (Park I. H *et al.*, 2007). Ωστόσο, τα μονοκλωνικά αντισώματα (MAbs) δεν έχουν αναπτυχθεί για όλους τους ορότυπους και περιορίζονται να καλύπτουν περίπου 30 διαφορετικούς ορότυπους που σχετίζονται με τα εμβόλια. Επίσης, τα MAbs δεν είναι ευρέως διαθέσιμα και το γεγονός αυτό έχει περιορίσει τη χρήση τους (Geno K.A. *et al.*, 2015).

8.2.2. Βιοχημική τυποποίηση

Μια εντελώς διαφορετική προσέγγιση στον εντοπισμό συγκεκριμένων πολυσακχαριτών (PS) είναι η βιοχημική προσέγγιση. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μορφές φασματομετρίας όπως: η Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR), και η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF (ιονισμός εκρόφησης με τη βοήθεια χημικού υποστρώματος-μήτρας). Η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF είναι μια αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα δείγματα ιονίζονται σε φορτισμένα μόρια και μπορεί να μετρηθεί η αναλογία μάζας προς φορτίο.

Γενικά όμως η περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Nuclear magnetic resonance - NMR) (Geno K.A. *et al.*, 2015) που βασίζεται σε ένα φυσικό φαινόμενο κατά το οποίο οι πυρήνες των ατόμων μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.

Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι απαιτούν τον καθαρισμό του καψικού πολυσακχαρίτη (PS) από τη βακτηριακή καλλιέργεια και δεν είναι ακόμη αρκετά πρακτικές για να είναι γενικά χρήσιμες (Geno K.A. *et al.*, 2015).

8.2.3. Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης

Οι μέθοδοι αυτές στηρίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έφερε επανάσταση στις βιολογικές τεχνικές όταν πρωτοαναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980. Εφευρέτης της μεθόδου αυτής είναι ο Kerry Mullis, ο οποίος παρουσίασε την ανακάλυψη του το 1984 και τιμήθηκε γι' αυτήν με βραβείο Νόμπελ το 1993.

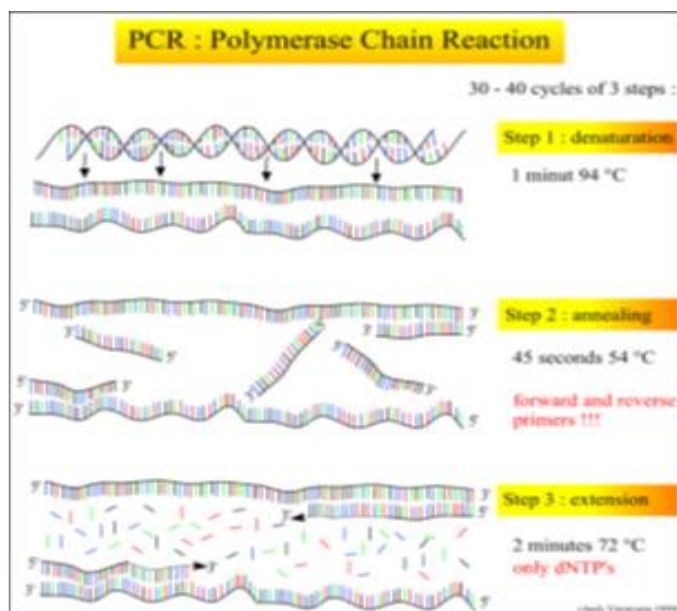
8.2.3.1. Βασικές αρχές μεθόδων

α) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η PCR αποτελεί μια τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής.

Η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται

Εικόνα 8: Τα βασικά στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).



Πηγή: Vierstraete, 1999

από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler).

Υπάρχει η δυνατότητα να ενισχυθούν καθορισμένα τμήματα DNA, με τη βοήθεια δύο εκκινητών και μιας DNA-πολυμεράσης. Η

αντίδραση χωρίζεται σε τρία στάδια (Εικόνα 8). Το πρώτο αφορά την αποδιάταξη, του δίκλωνου μορίου DNA, στις δύο συμπληρωματικές του με θέρμανση στους 94°C. Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται, και κάθε ένας από τους εκκινητές προσδένεται

στο συμπληρωματικό του κομμάτι στην αρχική αλυσίδα-μήτρα. Το επόμενο βήμα είναι η σύνθεση της νέας αλυσίδας με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης.

Το μέγεθος του τμήματος DNA που συντίθεται καθορίζεται από την απόσταση ανάμεσα στο τμήμα που έχουν υβριδιστεί οι εκκινητές. Στον επόμενο κύκλο τα δύο υπάρχοντα δίκλιωνα μόρια θα αποδιαταχθούν και τώρα θα υπάρχουν τέσσερα μόρια-μήτρες για την πρόσδεση των εκκινητών. Έτσι, τα παραγόμενα μόρια, αυξάνονται με εκθετικό ρυθμό. Να σημειωθεί ότι η αύξηση δεν είναι εκθετική μετά από αρκετούς κύκλους, καθώς τα αντιδραστήρια του μίγματος ελαττώνονται. Αντίθετα, τα παραγόμενα μόρια που δεν έχουν το ζητούμενο μέγεθος, αυξάνονται με γραμμικό τρόπο, και έτσι δεν επηρεάζουν το τελικό προϊόν της αντίδρασης.

Η ειδικότητα της μεθόδου οφείλεται στην επιλεκτική πρόσδεση των εκκινητών στις συμπληρωματικές, ως προς την αλληλουχία τους, περιοχές του γονιδιώματος.

Εκτός από τη βασική μέθοδο PCR, έχουν αναπτυχθεί και πολυάριθμες παραλλαγές:

- **Hot-start PCR:** Οι μέθοδοι θερμής εκκίνησης- Hot Start PCR χρησιμοποιούν έναν τροποποιητή του ενζύμου (όπως π.χ. ένα αντίσωμα) για να επιτύχουν την αναστολή της δραστηριότητας της DNA-πολυμεράσης σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτή η τροποποίηση αποτρέπει τη μη ειδική ενίσχυση λόγω της πρόσδεσης των εκκινητών σε κομμάτι της αρχικής αλυσίδα-μήτρας με χαμηλή ομολογία (λανθασμένη εκκίνηση) και της δέσμευσης των εκκινητών μεταξύ τους.
- **Nested PCR:** Η Nested («εμφωλιασμένη») PCR είναι μια παραλλαγή της τυπικής PCR που ενισχύει την ειδικότητα και την απόδοση του προϊόντος. Σε αυτή τη μέθοδο, σχεδιάζονται δύο ζεύγη εκκινητών PCR. Το πρώτο ζεύγος (εξωτερικοί εκκινητές) πλαισιώνει μια περιοχή DNA που περιέχει το προς εξέταση τμήμα του γενετικού υλικού, ενώ ένα δεύτερο ζεύγος (φωλιασμένοι εκκινητές) αντιστοιχεί στην ακριβή περιοχή του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Οι εξωτερικοί εκκινητές χρησιμοποιούνται σε μια πρώτη αντίδραση PCR για την ενίσχυση του στόχου. Το προϊόν αυτό της πρώτης αντίδρασης στη συνέχεια χρησιμεύει ως δείγμα (template) σε μια δεύτερη αντίδραση PCR με τους ένθετους εκκινητές.
- **Touchdown PCR:** Μια άλλη προσέγγιση για την αύξηση της ειδικότητας της αντίδρασης είναι η τροποποίηση των παραμέτρων των κύκλων της PCR. Στην touchdown PCR, η θερμοκρασία υβριδισμού των πρώτων κύκλων ορίζεται να

είναι μερικούς βαθμούς υψηλότερη από την υψηλότερη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες βοηθούν στην αποφυγή σχηματισμού συμπλόκων των εκκινητών και αποτρέπουν τη δημιουργία μη ειδικών συνδέσεων των εκκινητών με το δείγμα, ελαχιστοποιώντας έτσι την ανεπιθύμητη ενίσχυση. Ως εκ τούτου, οι υψηλότερες θερμοκρασίες υβριδισμού μειώνουν τα μη ειδικά προϊόντα PCR και προάγουν την ειδική ενίσχυση κατά την έναρξη της PCR. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες υβριδισμού όμως μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλότερη απόδοση PCR λόγω αυξημένης διάστασης (αποσύνδεσης) των εκκινητών από τον επιδιωκόμενο στόχο. Για να ξεπεραστεί αυτή η πρόκληση, η θερμοκρασία υβριδισμού συχνά μειώνεται κατά 0,5 ή 1°C σε κάθε κύκλο των αρχικών λίγων κύκλων για να παραχθεί επαρκής απόδοση του επιθυμητού τμήματος. Μόλις η θερμοκρασία πλησιάσει ή φτάσει στη βέλτιστη θερμοκρασία (συνήθως 3-5°C πιο χαμηλή από τη χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών $-T_m$), διατηρείται σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια των υπόλοιπων κύκλων. Με αυτόν τον τρόπο, τα επιθυμητά προϊόντα PCR αυξάνονται επιλεκτικά με μικρή ή καθόλου ενίσχυση των μη ειδικών στόχων κατά τη διάρκεια της PCR.

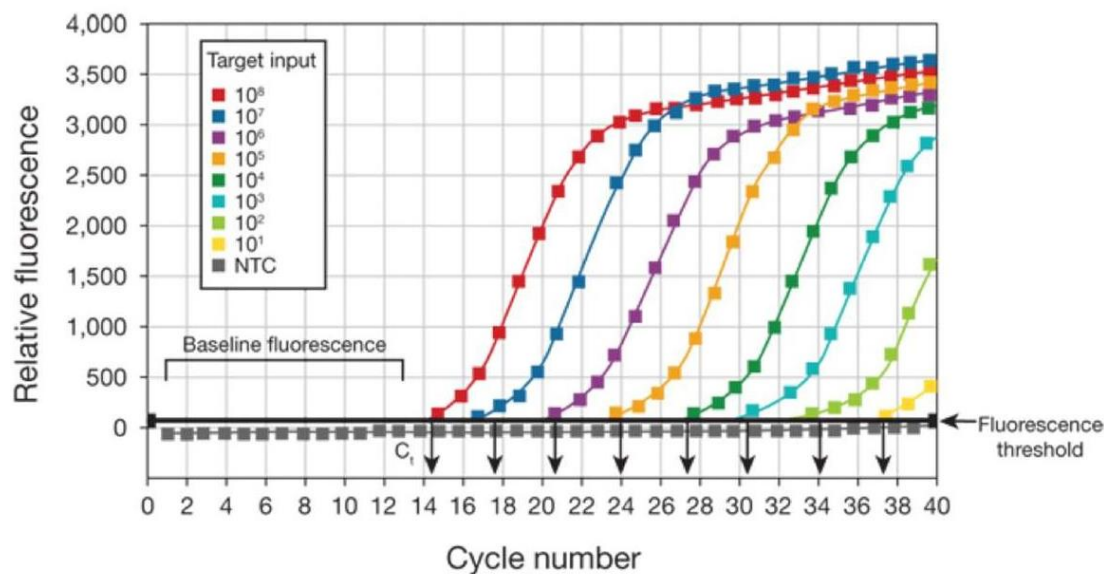
- **Πολυπλεκτική αντίδραση - multiplex PCR:** Η multiplex PCR επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση διαφορετικών στόχων σε μια αντίδραση PCR. Η αντίδραση αυτή όχι μόνο εξοικονομεί χρόνο, αντιδραστήρια και δείγματα, αλλά καθιστά επίσης δυνατή την ταυτόχρονη σύγκριση πολλαπλών τμημάτων. Όταν υπάρχουν πολλαπλά ζεύγη εκκινητών σε μια μόνο αντίδραση, όπως στην πολυπλεκτική PCR, η μη ειδική ενίσχυση και η μειωμένη απόδοση μπορεί να αποτελούν προβλήματα, ενώ δεν μπορεί να γίνει προσπάθεια βελτιστοποίησης για ένα μόνο ζεύγος εκκινητών και στόχο αλλά για όλους τους εκκινητές και στόχους. Επομένως, ο σχεδιασμός εκκινητών είναι κρίσιμος για την ελαχιστοποίηση της λανθασμένης εκκίνησης που θα οδηγούσε σε μη ειδική ενίσχυση. Οι αλληλουχίες εκκινητών θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μοναδικές για τον στόχο τους και η θερμοκρασία τήξης (T_m) όλων των εκκινητών θα πρέπει να είναι εντός ενός εύρους 5°C. Κάθε σετ εκκινητών θα πρέπει να δοκιμάζεται σε μια αντίδραση single-plex για την ειδικότητα και την αποτελεσματικότητά του. Επιπλέον, τα τμήματα στόχοι θα πρέπει να είναι διαφορετικών μεγεθών έτσι ώστε μπορούν να αναλυθούν με ηλεκτροφόρηση γέλης για αναγνώριση.

- **Real-time PCR:** Ενώ στην παραδοσιακή αντίδραση PCR τελικού σημείου, η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της ενισχυμένης αλληλουχίας εκτελούνται στο τέλος της αντίδρασης μετά τον τελευταίο κύκλο PCR και περιλαμβάνουν ανάλυση μετά την PCR, όπως π. χ ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης και ανάλυση της εικόνας, στην αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) ή ποσοτική PCR, (που συχνά αναγράφεται ως PCR πραγματικού χρόνου ή qPCR πραγματικού χρόνου), το προϊόν της PCR μετράται σε κάθε κύκλο.

Η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot - Εικόνα 9), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος (Kubista M. *et al.*, 2006).

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους (Kubista M. *et al.*, 2006).

Εικόνα 9: Γραφική παράσταση ενίσχυσης στόχων, διαφορετικής αρχικής συγκεντρώσεως με Rt-PCR.



Πηγή: Thermo Fisher Scientific Inc. 2020/2021

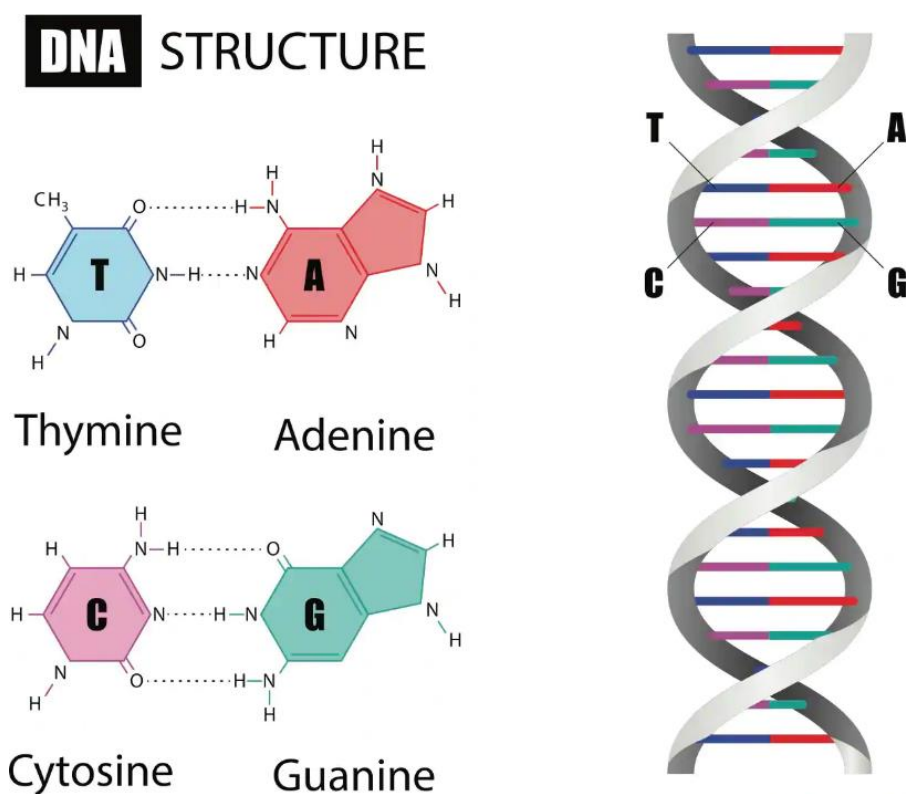
Εικόνα 9: Τα διαγράμματα ενίσχυσης δημιουργούνται όταν το σήμα φθορισμού από κάθε δείγμα συσχετίζεται με τον αριθμό του κύκλου. Επομένως, τα διαγράμματα ενίσχυσης αντιπροσωπεύουν τη συσσώρευση προϊόντος κατά τη διάρκεια του πειράματος PCR σε πραγματικό χρόνο. Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία των διαγραμμάτων σε αυτό το σχήμα είναι μια σειρά αραιώσεων της αλληλουχίας DNA στόχου.

β) Αλληλούχηση γενετικού υλικού (Sequencing)

Η αλληλούχηση DNA, είναι η χρήση μεθόδων και τεχνολογιών για τον προσδιορισμό της ταυτότητας και της σειράς των τεσσάρων βάσεων νουκλεοτιδίων (αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη και θυμίνη) σε ένα τμήμα του DNA.

Η τρισδιάστατη δομή διπλής έλικας του DNA καθορίστηκε το 1953 από τους James Watson και Francis Crick (εικόνα 10), με βάση κρυσταλλογραφικά δεδομένα που παρήγαγαν οι Rosalind Franklin και Maurice Wilkins. Ένα βασικό χαρακτηριστικό του μοντέλου Watson-Crick ήταν ότι ο καθένας από τους δύο κλώνους, αποτελούνται από ένα γραμμικό πολυμερές νουκλεοτιδίων. Αυτό το μοντέλο οδήγησε αργότερα σε ανακαλύψεις για το πώς η σύνθεση και η σειρά των αζωτούχων βάσεων των νουκλεοτιδίων θα μπορούσαν να κωδικοποιήσουν πληροφορίες που ήταν και κληρονομήσιμες και είχαν την ικανότητα να καθορίσουν τη δομή των πρωτεϊνών (Thermo Fisher Scientific Inc. 2020/2021).

Εικόνα 10: Δομή DNA – Μοντέλο Watson και Crick.



Πηγή: Thermo Fisher Scientific Inc. 2020/2021

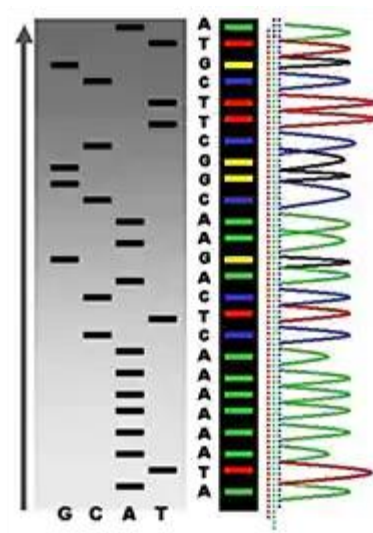
Δεδομένου ότι η αλληλουχία των βάσεων φέρει τις οδηγίες για την παραγωγή πρωτεϊνών και επίσης ρυθμίζει τις λειτουργίες των γονιδίων, η ικανότητα ανάγνωσης γενετικών αλληλουχιών είναι εξαιρετικά πολύτιμη για τη βιολογική έρευνα.

Οι αρχικές προσπάθειες προσδιορισμού της αλληλουχίας επικεντρώθηκαν σε τμήματα RNA, επειδή τα μόρια RNA είναι μονόκλινα και μικρότερα από τα μόρια DNA. Στα μέσα της δεκαετίας του 1970, χρησιμοποιήθηκε ο διαχωρισμός με βάση το μέγεθος (δηλαδή, το μήκος πολυνουκλεοτιδίου) μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου και εφαρμόστηκε στο DNA. Το DNA υποβάλλεται σε χημική επεξεργασία για να σπάσει η αλυσίδα σε συγκεκριμένες βάσεις. Μετά από ηλεκτροφόρηση του διασπασμένου DNA, τα σχετικά μήκη των θραυσμάτων - και επομένως οι θέσεις συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων - μπορούν να προσδιοριστούν και να συναχθεί η αλληλουχία. Αυτή η διαδικασία θεωρείται η γέννηση της αλληλούχισης πρώτης γενιάς. Ωστόσο, η εμφάνιση της μεθόδου τερματισμού αλυσίδας του Sanger το 1977 ήταν η σημαντική ανακάλυψη που ώθησε την τεχνική της αλληλούχισης στο μέλλον (Thermo Fisher Scientific Inc. 2020/2021).

- **Μεθόδος τερματισμού αλυσίδας ή Αλληλούχιση κατά Sanger (Sanger sequencing)**

Ο προσδιορισμός αλληλουχίας κατά Sanger στοχεύει μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA χρησιμοποιώντας έναν ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή, ο οποίος συνδέεται με το DNA δίπλα στην περιοχή ενδιαφέροντος. (Πρέπει να υπάρχει μια περιοχή γνωστής αλληλουχίας κοντά στο DNA στόχο.) Για να προσδιοριστεί η αλληλουχία, η μέθοδος χρησιμοποιεί χημικά ανάλογα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων του DNA. Από αυτά τα ανάλογα, που ονομάζονται διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs), λείπει η ομάδα 3' υδροξυλίου που απαιτείται για την επέκταση 5' έως 3' μιας πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας DNA. Με την ανάμειξη ddNTP που έχουν επισημανθεί με διαφορετικό χρώμα για κάθε βάση, μη επισημασμένων dNTP και DNA στόχου (δείγμα) σε μια αντίδραση πολυμεράσης, παράγονται κλώνοι κάθε πιθανού μήκους καθώς τα ddNTP ενσωματώνονται τυχαία και τερματίζουν την αλυσίδα. Τα προϊόντα επέκτασης στη συνέχεια διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση και ταξινομούνται κατά μέγεθος (με μονονουκλεοτιδικές διαφορές). Τα θραύσματα που τερματίζουν την αλυσίδα ανιχνεύονται από τους φθορίζοντες ιχνηθέτες τους, με κάθε χρώμα να ταυτοποιεί ένα από τα ddNTP που τερματίζουν το τμήμα του DNA. Η αλληλουχία του κλώνου DNA του στόχου μπορεί έτσι να προκύψει μετά την ανάλυση (Thermo Fisher Scientific Inc. 2020/2021) (εικόνα 11).

Εικόνα 11: Διαχωρισμός θραυσμάτων DNA και προσδιορισμός αλληλουχίας.



Πηγή: Thermo Fisher Scientific Inc. 2020/2021

Τα τελευταία χρόνια, για τον διαχωρισμό των σημασμένων με φθορισμό θραυσμάτων DNA χρησιμοποιείται η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis - CE). Με αυτήν την τεχνολογία, τα επισημασμένα θραύσματα DNA διαχωρίζονται κατά μέγεθος μέσα σε μακριά, λεπτά τριχοειδή σωληνάρια από ακρυλικό υλικό τα οποία είναι γεμάτα με γέλη. Ένα δείγμα που περιέχει τα επισημασμένα θραύσματα εγχέεται ηλεκτροκινητικά στο τριχοειδές και εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό πεδίο για να τραβήξει τα θραύσματα προς τα πάνω. Καθώς περνούν ένα λέιζερ ανίχνευσης μέσα στο όργανο, οι ιχνηθέτες ανιχνεύονται και προσδιορίζεται η αλληλουχία (Thermo Fisher Scientific Inc. 2020/2021).

Η αλληλούχιση κατά Sanger είναι ιδανική για την ανάλυση μικρού αριθμού γονιδιακών στόχων και δειγμάτων και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (μία μόνο ημέρα). Θεωρείται επίσης το «gold-standard» των τεχνολογιών αλληλούχισης (Thermo Fisher Scientific Inc. 2020/2021).

- **Αλληλούχιση επόμενης γενιάς - Next-generation sequencing (NGS)**

Ενώ έχουν γίνει αρκετές βελτιώσεις στη μέθοδο αλληλούχισης Sanger με την πάροδο των ετών, έχουν επίσης εμφανιστεί και νέες τεχνικές υψηλής απόδοσης, που ονομάζονται τεχνολογίες αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS). Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) είναι ένα σύνολο τεχνολογιών για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA ή του RNA. Αυτές οι μέθοδοι, που εισήχθησαν για εμπορική χρήση το 2005, ονομάστηκαν αρχικά «μαζική παράλληλη αλληλούχιση», επειδή επέτρεψαν τον προσδιορισμό της αλληλουχίας πολλών κλώνων DNA ταυτόχρονα, αντί για μία κάθε φορά όπως με την παραδοσιακή αλληλούχιση Sanger με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (CE) (Thermo Fisher Scientific Inc. 2020/2021). Καθεμιά από αυτές χρησιμοποιεί διαφορετική χημεία και διαφορετικό τρόπο ανίχνευσης της αλληλουχίας των βάσεων του DNA. Κοινό χαρακτηριστικό όλων είναι η μαζικά παράλληλη φύση της αλληλούχισης, δηλαδή η ταυτόχρονη αλληλούχιση πολλών μορίων DNA και στη συνέχεια η συναρμολόγηση των επιμέρους αλληλουχιών με εξελιγμένους αλγόριθμους πληροφορικής (Thermo Fisher Scientific Inc. 2020/2021).

8.2.3.2. Εφαρμογή μεθόδων PCR για την τυποποίηση του *S. pneumoniae*

Η παραγωγή της κάψας στον πνευμονιόκοκκο ελέγχεται από την ομάδα γονιδίων *cps* (capsular polysaccharide synthesis) που εντοπίζεται μεταξύ των γονιδίων *dexB* και *aliA* τα οποία δεν συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της κάψας και πολύ κοντά στα γονίδια για τις PBPs (πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες) *pbp2x* και *pbp1a* (Garcia *et al.*, 2000). Ο ορότυπος 37 αποτελεί εξαίρεση καθώς ο επίτοπος για το *cps* είναι ελαττωματικός. Σ' αυτή την περίπτωση ο ορότυπος καθορίζεται από το γονίδιο *tts* που βρίσκεται σε άλλη θέση στο χρωμόσωμα. (Llull *et al.*, 1999).

Η ομάδα γονιδίων *cps* περιλαμβάνει γονίδια υπεύθυνα για τη σύνθεση του ειδικού του ορότυπου πολυσακχαρίτη συμπεριλαμβανομένων των *wzy* (γονίδιο πολυμεράσης) και *wzx* (γονίδιο φλιπάσης). Στο 5' άκρο της ομάδας γονιδίων *cps* υπάρχουν 4 σχετικά συντηρημένες περιοχές, οι *cpsA* (*wzg*) – *cpsB* (*wzh*) – *cpsC* (*wzd*) – *cpsD* (*wze*) (Jiang *et al.*, 2001).

Ο καθορισμός της πλήρους αλληλουχίας του επίτοπου *cps* για περισσότερους από 90 γνωστούς ορότυπους επέτρεψε την ανάπτυξη μεθόδων PCR για την οροτυπία του μικροβίου (Bentley *et al.*, 2006, Pai *et al.*, 2006).

- **Πολυπλεκτικές αντιδράσεις πολυμεράσης – Multiplex PCR (mPCR).**

Πολύαριθμες πολυπλεκτικές (multiplex) μέθοδοι έχουν περιγραφεί, οι οποίες περιλαμβάνουν διάφορους συνδυασμούς για την αναγνώριση των συχνότερα παρατηρούμενων ορότυπων. Το 2006, οι Pai και συνεργάτες (Pai R. *et al.*, 2006) σχεδίασαν ειδικούς εκκινητές που στόχευαν στους 29 ορότυπους που τυποποιούνταν πιο συχνά στα προγράμματα επιτήρησης του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) των ΗΠΑ.

Επτά mPCR, καθεμία αποτελούμενη από τέσσερα ζεύγη εκκινητών ειδικά για ορότυπο/οροομάδα πραγματοποιούνται διαδοχικά. Οι συνδυασμοί των εκκινητών και η σειρά με την οποία πραγματοποιούνται οι μεμονωμένες mPCR προσδιορίστηκαν από τη συχνότητα κατανομής οροτύπων που προκαλούσαν διεισδυτική νόσο στις Ηνωμένες Πολιτείες. Εάν η πρώτη αντίδραση αποτύχει να αναγνωρίσει τον ορότυπο πραγματοποιείται η επόμενη και ούτω καθεξής.

Έκτοτε, οι συνδυασμοί και η σειρά αυτών των συμβατικών mPCR έχουν τροποποιηθεί σύμφωνα με τις συχνότητες εμφάνισης των οροτύπων σε Ευρώπη (Azzari C. *et al.*, 2008), Λατινική Αμερική (Dias C.A. *et al.*, 2007), Αφρική (Morais L. *et al.*, 2007, NjanpopLafourcade B.M. *et al.*, 2010) και Ασία (Saha

S.K. *et al.*, 2008), και ο αριθμός των ορότυπων που μπορούν να ταυτοποιηθούν έχει αυξηθεί (<http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html>). Τόσο αυτές όσο και παρόμοιες μέθοδοι mPCR έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση ορότυπων απευθείας σε φυσιολογικά στείρα και συχνά αρνητικά σε καλλιέργεια κλινικά δείγματα (Azzari C. *et al.*, 2008, NjanpopLafourcade B.M. *et al.*, 2010, Saha S.K. *et al.*, 2008) και σε μελέτες ρινοφαρυγγικής φορέας (daGloria Carvalho M. *et al.*, 2010, Pimenta F.C. *et al.*, 2011).

- **Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real-time quantitative PCR):** Πιο πρόσφατα, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες αντιδράσεις ποσοτικής PCR (qPCR) πραγματικού χρόνου. Οι αντιδράσεις αυτές είναι ταχύτερες και η ευαισθησία και η ειδικότητά τους βελτιώνονται με τη χρήση ανιχνευτών με σήμανση. Έχουν όμως μεγαλύτερο κόστος από τη συμβατική mPCR και ο συνδυασμός οροτύπων που μπορεί να ανιχνευθεί σε κάθε μια, είναι περιορισμένος, (Azzari, C. *et al.*, 2010, Marchese, A. *et al.*, 2011).

8.2.3.3. Μέθοδοι βασισμένες στην αλληλούχηση γενετικού υλικού

α) Multilocus Sequence Typing (MLST)

Η τεχνική του MLST για τον πνευμονιόκοκκο βασίζεται στην αλληλούχηση του DNA τμημάτων 7 γενετικών επίτοπων κυτταρικής οικονομίας (house keeping genes) (Enright&Spratt, 1998). Για κάθε γονίδιο, οι διαφορετικές αλληλουχίες που υπάρχουν σε ένα βακτηριακό είδος καταχωρούνται ως διακριτά αλληλόμορφα και, για κάθε μικροβιακό στέλεχος, τα αλληλόμορφα σε κάθε έναν από τους επτά επιτόπους ορίζουν το αλληλικό προφίλ ή τον τύπο αλληλουχίας (ST). Τα αποτελέσματα καταχωρούνται σε βάσεις δεδομένων (spneumoniae. mlst. net).

Η μέθοδος έχει επίσης χρησιμοποιηθεί απ' ευθείας σε κλινικά δείγματα σε περιπτώσεις που οι καλλιέργειες ήταν αρνητικές (πχ. ENY, πλευριτικό υγρό) (Enright *et al.*, 2000, Obando *et al.*, 2008).

Ένα από τα πιο εντυπωσιακά ευρήματα κατά τη χρήση της μεθόδου για την τυποποίηση του μικροβίου είναι ότι υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ των τύπων ST και των ορότυπων πράγμα που σημαίνει ότι σε γενικές γραμμές ένας ορότυπος είναι κυρίαρχος σε ένα ST με σχετικά λίγες καλά αναγνωρίσιμες εξαιρέσεις. (Beall *et al.*, 2006, Brueggemann *et al.*, 2003, Enright & Spratt, 1998).

β) Capsular Sequence Typing (CST)

Η μέθοδος CST είναι μια μοριακή μέθοδος γονοτύπησης του επίτοπου του καψιδίου με σκοπό να αναγνωρισθεί ο ορότυπος. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλούχιση ενός τμήματος του γονιδίου *wzh*. Αυτό το γονίδιο επιλέχθηκε επειδή ποικίλλει αρκετά μεταξύ των διαφόρων ορότυπων.

Η μέθοδος αναπτύχθηκε στο Εθνικό Ινστιτούτο Δημόσιας Υγείας και Περιβάλλοντος της Ολλανδίας (National Institute for Public Health and the Environment – RIVM) για τη μελέτη των οροτύπων των στελεχών *Streptococcus pneumoniae* που προκαλούν διεισδυτικές λοιμώξεις (Elberse *et al.*, 2011).

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση CST βασίστηκαν στις διαθέσιμες αλληλουχίες των γονιδίων *wzh* των πνευμονιοκοκκικών καψιδικών επιτόπων όπως περιγράφονται από τους Bentley και συνεργάτες (Bentley *et al.*, 2006).

Ο Bentley και οι συνεργάτες του, προσδιόρισαν το 2006 την αλληλουχία του DNA των γονιδίων βιοσύνθεσης της κάψας (που βρίσκονται μεταξύ των γονιδίων *dexB* και *aliA*) και για τους 90 τότε γνωστούς ορότυπους του *S. pneumoniae* και συσχέτισαν τη σύσταση των γονιδίων με τα ορολογικά προφίλ και με τις δομές των πολυσακχαριτών της κάψας, παρέχοντας μια λεπτομερή και πλήρη κατανόηση του τρόπου βιοσύνθεσης της κάψας και της εξελικτικής πορείας των αντίστοιχων γονιδίων.

Εφάρμοσαν αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για κάθε έναν από τους διαφορετικούς ορότυπους, χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για τα γονίδια *dexB* και *aliA*. Τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων περιείχαν τα γονίδια των καψιδικών επιτόπων (cps). Στη συνέχεια έγινε αλληλούχιση των προϊόντων της PCR.

Η ανάλυση των αλληλουχιών cps επιβεβαίωσε την ύπαρξη πολλών χαρακτηριστικών που είχαν παρατηρηθεί προηγουμένως. Βρέθηκε ότι γονίδια για τη δημιουργία του καψιδικού πολυσακχαρίτη - CPS προσανατολίζονται πάντα προς την ίδια κατεύθυνση μεταξύ των γονιδίων *dexB* και *aliA*. Τα γονίδια ρύθμισης και επεξεργασίας *wzg*, *wzh*, *wzd* και *wze* (επίσης γνωστά ως cpsA, B, C, D) είναι υψηλά συντηρημένα σε όλες τις περιπτώσεις και βρίσκονται σχεδόν πάντα με αυτή τη σειρά στο 5' άκρο του επιτόπου cps. Στις περισσότερες ομάδες γονιδίων cps, το πέμπτο γονίδιο κωδικοποιεί την αρχική τρανσφεράση της φωσφορικής γλυκόζης (γονίδιο *WchA/CpsE*) (Bentley *et al.*, 2006).

Η περαιτέρω ανάλυση των επιτόπων cps έδειξε ότι ένας αριθμός διαφορετικών μηχανισμών έχουν δημιουργήσει αντιγονική ποικιλομορφία στα CPS. Ορισμένοι από αυτούς περιλαμβάνουν την μετατροπή ενός μεμονωμένου ορότυπου σε δύο συναφείς ορότυπους με τη συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων (π.χ. οροομάδα 6) ή την

εισαγωγή ή διαγραφή ενός μόνο γονιδίου, με αποτέλεσμα ελαφρά διαφορετικές δομές CPS (π.χ. οροομάδα 18). Σε άλλες περιπτώσεις, οι επίτοποι cps ορισμένων ορότυπων σε μια οροομάδα φαίνεται να είναι ουσιαστικά άσχετοι μεταξύ τους και πιθανώς αντικατοπτρίζουν την κοινή ύπαρξη ενός κυρίαρχου επιτόπου που οδήγησε στην τοποθέτησή τους στην ίδια οροομάδα (π.χ. οροομάδες 7, 17, 33 και 35). Ομοίως, ορισμένοι ορότυποι που τοποθετούνται σε διαφορετικές οροομάδες εμφανίζουν μεγαλύτερη συνάφεια μεταξύ τους από εκείνους εντός της ίδιας οροομάδας (π.χ. οι τύποι 7B και 7C σχετίζονται στενότερα με τον τύπο 40 παρά με τους 7A και 7F).

Καθώς οι οροομάδες ορίστηκαν χωρίς να υπάρχει γνώση της δομής του CPS ή των αλληλουχιών cps που κωδικοποιούν τη σύνθεσή του, η ύπαρξη κοινών ανοσοκυρίαρχων επίτοπων οδήγησε σε συμπερίληψη στην ίδια οροομάδα, ακόμη και αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές σε άλλα μέρη της δομής και επομένως και στο cps (Bentley *et al.*, 2006).

Βασιζόμενοι στις πιο πάνω παρατηρήσεις οι ερευνητές από το Ινστιτούτο Δημόσιας Υγείας της Ολλανδίας (RIVM) προχώρησαν στην ανάπτυξη της μεθόδου Capsular Sequence Typing–CST και την εφαρμογή της για το χαρακτηρισμό του ορότυπου σε βακτηριακά στελέχη πνευμονιοκόκκου (Elberse *et al.*, 2011).

- **Αρχή της μεθόδου CST**

Η μέθοδος CST αναπτύχθηκε στο Εθνικό Ινστιτούτο Δημόσιας Υγείας και Περιβάλλοντος της Ολλανδίας (National Institute for Public Health and the Environment – RIVM) για τη μελέτη των οροτύπων των στελεχών *Streptococcus pneumoniae* που προκαλούν διεισδυτικές λοιμώξεις.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του CST (Elberse *et al.*, 2011) για να υπάρχει η δυνατότητα ενίσχυσης του γονιδίου *wzh* όλων των οροτύπων του πνευμονιόκοκκου σε μια PCR σχεδιάστηκαν 3 forward και 4 reverse εκκινητές (primers) οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως μείγμα στην αντίδραση PCR (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Αλληλουχίες εκκινητών αντίδρασης CST.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
CST_01-M13F	<u>GTAAAACGACGGCCAG</u> CATTTCGCATATCGTTTTTG
CST_02-M13F	<u>GTAAAACGACGGCCAG</u> CATTCTCACATTATTTTTGATGT
CST_03-M13F	<u>GTAAAACGACGGCCAG</u> CATTTCGCACATCGTCTTTG
CST_01-M13R	<u>CAGGAAACAGCTATGAC</u> CTGAGCTCTTTTTTTCATGA
CST_02-M13R	<u>CAGGAAACAGCTATGAC</u> GTGAACTCGTTTCTTTCATGA
CST_03-M13R	<u>CAGGAAACAGCTATGAC</u> CCGAGCTCTCTTTTTTCATAA
CST_04-M13R	<u>CAGGAAACAGCTATGAC</u> CCGAGCTCTCTTTTTTCATGA
M13F	<u>GTAAAACGACGGCCAG</u>
M13R	<u>CAGGAAACAGCTATGAC</u>

Οι εκκινητές (primers), πέρα από την αλληλουχία τους φέρουν M-tails, δηλαδή κοινές αλληλουχίες που προστίθενται τεχνικά στα 5' άκρα των primers, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια (οι αλληλουχίες αυτές –MF και –MR) σαν εκκινητές (primers) στο πρωτόκολλο της αλληλούχισης που θα ακολουθήσει την PCR (στον πίνακα το τμήμα της αλληλουχίας των M-tails φαίνεται υπογραμμισμένο και με κόκκινο χρώμα).

➤ Πηγή DNA

Η αντίδραση CST μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας 10 ng καθαρού γονιδιωματικού DNA. Ωστόσο, η διαδικασία έχει βελτιστοποιηθεί για χρήση με διάλυμα που προέρχεται από λύση βακτηριακών κυττάρων.

Με μικροβιολογικό κρίκο λαμβάνονται αποικίες από 24ωρες καλλιέργειες μικροβίων σε τρυβλία Columbia άγαρ με 5% αίμα προβάτου επωασμένα στους 37°C και εναιωρούνται σε 500 μl TE (Tris-EDTA buffer). Το διάλυμα θερμαίνεται για 10 λεπτά στους 95°C. Μετά την αδρανοποίηση το προϊόν λύσης χρησιμοποιείται είτε απευθείας είτε αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί σε PCR.

➤ Αντίδραση PCR

Η PCR πραγματοποιείται σε όγκους 20 μl. Σε κάθε αντίδραση PCR, 5 μl DNA (10 ng) ή 5 μl διαλύματος λύσης *S. pneumoniae* (αραιωμένο 1:10 σε νερό MilliQ - Νερό που καθαρίζεται από το σύστημα milliQ, Millipore, Billerica, ΗΠΑ) προστίθενται σε ένα μείγμα που περιέχει Qiagen HotStar Taq Mastermix (Qiagen, Hilden, Germany) και το μείγμα εκκινητών όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Η σύνθεση του μείγματος της PCR.

Συστατικό	Ποσότητα (μL)
Primermix*	1
Hot Star Mastermix	10
MilliQ water	4
Lysate or DNA	5
Σύνολο	20

* Όλοι οι εκκινητές αναμειγνύονται σε ένα primermix και έχουν συγκέντρωση 10 μM εντός του μείγματος. Για παράδειγμα, προστίθεται 1 μl από όλους τους εκκινητές (7 μl συνολικά) και 3 μl νερού MilliQ.

Το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR είναι το ακόλουθο (Πίνακας 5):

Πίνακας 5: Πρόγραμμα αντίδρασης PCR.

Χρόνος	Θερμοκρασία	Κύκλοι
15 min.	95°C	1
20 sec.	95°C	
30 sec.	51°C	35
30 sec.	72°C	
7 min.	72°C	1
∞	4°C	1

➤ **Ηλεκτροφόρηση προϊόντων**

Το προϊόν της PCR ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης. 5 μl του προϊόντος της αντίδρασης χρωματίζονται με διάλυμα χρωστικής GelRed (6X Gel loading dye, Biotium, USA) και τοποθετούνται σε τζέλ αγαρόζης 2,0% (w/v). Το προϊόν ηλεκτροφορείται για 30 λεπτά και το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης γίνεται ορατό με υπεριώδη φθορισμό

➤ **Καθαρισμός του προϊόντος της PCR**

Ακολουθεί ο καθαρισμός των προϊόντων.

5 μl προϊόντος PCR υποβάλλονται σε επεξεργασία με 2 μl αντιδραστηρίου ExoSAP-IT (GE Healthcare Life Sciences).

Σε ένα θερμοκυκλοποιητή, εκτελείται το ακόλουθο πρόγραμμα:

- 15 λεπτά 37°C
- 15 λεπτά 80°C

➤ **Αντίδραση αλληλούχισης**

Στη συνέχεια ακολουθεί η αντίδραση αλληλούχισης η οποία πραγματοποιείται σε αναλυτή AB 3730. Για μια αντίδραση αλληλούχισης όγκου 20 μl, προστίθενται 5-10 ng προϊόντος PCR (≈ 1 μl) σε ένα μείγμα που περιέχει Big Dye (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) ρυθμιστικό διάλυμα και εκκινητές. Η σύνθεση του μείγματος καθώς και το πρόγραμμα της αντίδρασης αλληλούχισης παρατίθενται στους πίνακες 6 και 7.

Πίνακας 6: Σύνθεση του μείγματος αλληλούχισης.

Συστατικό	Ποσότητα (μl)
Primer F or R*	1
Big Dye Terminator	1
Sequence buffer	7
MilliQ water	10
DNA	1
Total	20
* Η συγκέντρωση των εκκινητών είναι 5 μM	

Πίνακας 7: Πρόγραμμα αντίδρασης αλληλούχισης.

Χρόνος	Θερμοκρασία	Κύκλοι
1 min.	96°C	1
10 sec.	96°C	
5 sec.	50°C	25
4 min.	60°C	
7 min.	72°C	1
∞	4°C	1

➤ **Καθαρισμός προϊόντων αλληλούχισης**

Το προϊόν της αντίδρασης αλληλούχισης καθαρίζεται χρησιμοποιώντας το κιτ Big DYE X Terminator (Applied Biosystems, FosterCity, CS, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

➤ **Ανάλυση των αποτελεσμάτων**

Τα αρχεία με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης μπορούν να εισαχθούν, να αποθηκευτούν και να αναλυθούν στο λογισμικό BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

➤ **Απόδοση ορότυπου**

Στη συνέχεια, η νουκλεοτιδική αλληλουχία που προκύπτει, εισάγεται στη βάση δεδομένων *Streptococcus pneumoniae* CST Typing Tool Version 0.0 του RIVM – διαθέσιμη στο <https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/spn> (online ελεύθερη πρόσβαση). Η βάση δεδομένων «επιστρέφει» ως αποτέλεσμα τον προσδιορισμό του τύπου (ορότυπου) του καψιδίου.

Έτσι από την αλληλούχιση περίπου 506 ζευγών βάσεων του γονιδίου *wzh* μπορεί να προσδιοριστεί ο τύπος του καψιδίου.

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, η μέθοδος ήδη χρησιμοποιείται σε απομονωθέντα στελέχη πνευμονιοκόκκου στο National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) της Ολλανδίας, όπου και σχεδιάστηκε (Elberse *et al.*, 2011).

Η αντίδραση CST αποδίδει αρκετά καλά και είναι σε θέση να επιβεβαιώσει τον ορότυπο όπως προσδιορίζεται από την αντίδραση Quellung στις περισσότερες περιπτώσεις. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις η CST δίνει διαφορετικά αποτελέσματα, «επιστρέφοντας» ως αποτέλεσμα δύο ή τρεις ορότυπους, συνεπώς χρειάζεται περαιτέρω ανάλυση προκειμένου να χαρακτηριστεί ο ορότυπος.

γ) Next Generation Sequencing (NGS) και Whole Genome Sequencing (WGS)

Οι πρόσφατες πρόοδοι στη μεθοδολογία της αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) και συγκεκριμένα, η δραματική και συνεχής μείωση του κόστους και η υψηλότερη ταχύτητα και απόδοση, έχουν κάνει τις μεθόδους που βασίζονται στην αλληλούχιση ένα προφανές επόμενο βήμα στην ανάπτυξη της μοριακής τυποποίησης των πνευμονιοκόκκων. Έχουν περιγραφεί διάφορες εφαρμογές της μεθόδου στην οροτυπία του μικροβίου (Geno K. A *et al.*, 2015).

Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) έχει χρησιμοποιηθεί για επιδημιολογική έρευνα (Croucher N.J. *et al.*, 2013). Εκτός από τις πληροφορίες για τον ορότυπο, το WGS θα μπορούσε να παρέχει πρόσθετες πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένου του τύπου MLST και της αντοχής στα αντιβιοτικά ή της αντικατάστασης οροτύπου. Ωστόσο, η χρήση του WGS είναι πιθανό να παραμείνει περιορισμένη σε εργαστήρια αναφοράς τουλάχιστον έως ότου αρχίσουν να διατίθενται αυτοματοποιημένα εργαλεία βιοπληροφορικής για ανάλυση δεδομένων, βελτιστοποιηθούν περαιτέρω οι τεχνολογίες ανάλυσης και μειωθεί το κόστος (Geno K.A. *et al.*, 2015).

8.2.3.4. Άλλες Μέθοδοι

Μεθοδος RFLP – Πολυμορφισμός στο μήκος των θραυσμάτων περιορισμού

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην φυσική μεταβλητότητα των μορίων του DNA. Η διάσπαση του DNA με ενδονουκλεάση περιορισμού οδηγεί στο σχηματισμό θραυσμάτων διαφορετικού μήκους, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης (AGE) και να οπτικοποιηθούν άμεσα μετά από χρώση.

Οι Lawrence και συνεργάτες (Lawrence ER *et al.*, 2000) ενίσχυσαν ένα τμήμα της περιοχής μεταξύ των γονιδίων *cpsA-cpsB* και χρησιμοποίησαν 3 περιοριστικά ένζυμα για να δημιουργήσουν πρότυπα πέψης περιορισμού που διαφοροποίησαν 11 κοινούς εμβολιακούς ορότυπους, αν και με κάποια επικάλυψη. Σε μια άλλη ανάλυση RFLP, οι Batt και συνεργάτες (Batt S.L. *et al.*, 2005) ενίσχυσαν όλο τον γενετικό τόπο μεταξύ των γονιδίων *dexB* και *aliA* και χρησιμοποίησαν ένζυμο περιορισμού για να παράγουν μοναδικά μοτίβα για καθέναν από τους 46 ορότυπους ή οροομάδες που δοκιμάστηκαν. Παρά τον αρχικό ενθουσιασμό, καμία από αυτές τις δοκιμασίες δεν έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη συνέχεια, πιθανώς επειδή η ερμηνεία των προτύπων πέψης είναι υποκειμενική.

9. ΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Ο πνευμονιόκοκκος με την εισαγωγή των αντιβιοτικών στη θεραπεία των λοιμώξεων αποτελούσε ευαίσθητο μικρόβιο για τις περισσότερες κατηγορίες των αντιβιοτικών. Για πολλά χρόνια, η θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλούνται από *S. pneumoniae* ήταν σχετικά απλή. Η θεραπεία εκλογής ήταν η χορήγηση πενικιλίνης. Με την πάροδο του χρόνου και την ευρεία χρήση των αντιβιοτικών, το 1977 στο Durban και το 1978 στο Γιοχάνεσμπουργκ στη Νότια Αφρική εμφανίστηκαν τα πρώτα στελέχη ανθεκτικών πνευμονιοκόκκων στην πενικιλίνη (Appelbaum P.C. *et al.*, 1977, Jacobs M.R. *et al.*, 1978). Τα ανθεκτικά αυτά στελέχη προέρχονταν από νοσοκομεία που συνήθιζαν την «προφυλακτική» χορήγηση αντιβιοτικών για τη θεραπεία των ιογενών λοιμώξεων. Στη συνέχεια κατά τη δεκαετία του 1990 άρχισαν να κάνουν την εμφάνισή τους στελέχη πνευμονιοκόκκου ανθεκτικά στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς (Appelbaum P.C. 1995, Figueiredo A.M. *et al.*, 1992).

Έτσι με την πάροδο των ετών η επιλογή της θεραπείας έχει γίνει πιο περίπλοκη. Ένα συνεχώς αυξανόμενο ποσοστό πνευμονιοκοκκικών στελεχών παράγει τροποποιημένες πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται μικροβιακή αντοχή. Ωστόσο, αυτή η αντοχή μπορεί να ξεπεραστεί σε ένα βαθμό, με τη χορήγηση υψηλότερων δόσεων πενικιλίνης, γεγονός που οδηγεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου σε ορισμένους ιστούς και, ως αποτέλεσμα, επαρκή δέσμευση με τις PBPs για να προκαλέσει βακτηριακή θανάτωση (Hauser A.R., 2013). Αυτή η κατάσταση γίνεται πιο περίπλοκη αν σκεφτεί κανείς ότι πολλά β-λακταμικά αντιβιοτικά, όπως οι πενικιλίνες, επιτυγχάνουν περίπου 100 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα και τους πνεύμονες από ότι στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Έτσι, ένα ανθεκτικό στην πενικιλίνη ή στις κεφαλοσπορίνες στέλεχος του *S. pneumoniae* μπορεί να καταστραφεί από τις υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου που υπάρχουν στον πνεύμονα αλλά επιμένει στις σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις που υπάρχουν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Hauser A.R., 2013).

Οι δυσκολίες στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από πνευμονιόκοκκους ανθεκτικούς στην πενικιλίνη και γενικά στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, επιδεινώνονται από το γεγονός ότι αυτά τα βακτήρια είναι επίσης συχνά ανθεκτικά σε πολλά άλλα αντιβιοτικά. Το επίκτητο γενετικό υλικό που κωδικοποιεί την αντοχή στην πενικιλίνη συνοδεύεται επίσης συχνά από γονίδια που οδηγούν σε απώλεια ευαισθησίας σε πολλά άλλα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις,

όπως μακρολίδες (αζιθρομυκίνη), τετρακυκλίνες (δοξυκυκλίνη), κλινδαμυκίνη και σουλφοναμίδες (τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη) (Hauser A.R., 2013).

Οι μηχανισμοί αντοχής των πνευμονιοκόκκων στα αντιβιοτικά περιλαμβάνουν την τροποποίηση χρωμοσωμικών γονιδίων, μέσω οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού που κωδικοποιεί τροποποιημένες πρωτεΐνες (π.χ. Penicillin Binding Proteins, PBPs) ή μέσω απόκτησης τμημάτων γενετικού υλικού που κωδικοποιούν παράγοντες αντοχής (π.χ. για αντοχή σε τετρακυκλίνη, καναμυκίνη, ερυθρομυκίνη ή χλωραμφενικόλη) (Klugman, 1990). Παρά τα αυξανόμενα ποσοστά αντοχής οι δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες κατηγορίες αντιβιοτικών για θεραπεία πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων είναι τα β-λακταμικά και οι μακρολίδες.

9.1. Αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

Στη δομή του πνευμονιοκόκκου συμμετέχουν πέντε υψηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες (1a, 1b, 2a, 2b, 2x) οι λεγόμενες πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs) και μία πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους η PBP3. Η PBP3 φαίνεται ότι δε σχετίζεται με την ανάπτυξη αντοχής. Οι PBPs είναι ένζυμα (τρανσπεπτιδάσες) απαραίτητα για τα τελικά στάδια της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος του πνευμονιοκόκκου. Τα βήτα-λακταμικά αντιβιοτικά αναστέλλουν την ανάπτυξη του πνευμονιοκόκκου με τον εξής μηχανισμό: παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια με τις PBPs και δεσμεύονται με αυτές μη αναστρέψιμα οδηγώντας σε αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος και επομένως αναστολή της ανάπτυξης ή λύση του μικροβιακού κυττάρου (Arason V.A. *et al.*, 1996).

Δομικές αλλαγές στη δομή των PBPs (Hakenbeck R. *et al.*, 1980) οδηγούν σε ελαττωμένη συγγένεια (affinity) της πενικιλίνης αλλά και των υπόλοιπων β-λακταμικών αντιβιοτικών με τις PBPs (Munoz R. *et al.*, 1991) οδηγώντας σε αντοχή του μικροβίου. Ο βαθμός της αντοχής εξαρτάται σε γενικές γραμμές, από το ποιες PBPs μεταβάλλονται και ποιος είναι ο βαθμός συγγένειας (affinity) του β-λακταμικού παράγοντα με το νέο μόριο PBP (Lynch J.P., Zhanel G.G., 2009).

Η σύνθεση των PBPs κωδικοποιείται από τα αντίστοιχα *pbp* γονίδια. Τα γονίδια αυτά παρουσιάζουν ετερογένεια στη νουκλεοτιδική αλληλουχία και προκύπτουν από οριζόντια μεταφορά DNA αλλά και από ανασυνδυασμούς. Στην ουσία τμήματα *pbp* γονιδίων σε στελέχη που είναι ευαίσθητα αντικαθίστανται από τμήματα *pbp* γονιδίων

ανθεκτικών στελεχών πνευμονιοκόκκου ή άλλων ειδών στρεπτόκοκκων (Maiden M.C., 1998)

9.2. Αντοχή στις μακρολίδες

Οι μακρολίδες δεσμεύονται στην 23S υποομάδα του βακτηριακού ριβοσώματος και παρεμποδίζουν τη μεταφορά αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα εμποδίζοντας την πρωτεϊνική σύνθεση του μικροβιακού κυττάρου (Berry V. *et al.*, 1998)

Η αντοχή σ' αυτή τη κατηγορία αντιβιοτικών οφείλεται σε 2 κυρίως μηχανισμούς (Corso A. *et al.*, 1998, Shortridge V.D. *et al.*, 1999, Van Eldere J. *et al.*, 2005):

α) Στην μεθυλίωση του βακτηριακού ριβοσώματος, στη θέση πρόσδεσης του αντιβιοτικού, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση πρόσδεσης του αντιβιοτικού (κωδικοποιείται από το γονίδιο *ermB*). Η αλλαγή αυτή οδηγεί σε διασταυρούμενη αντοχή σε μακρολίδες και λινκοσαμίδες (κλινδαμυκίνη), οδηγώντας στη δημιουργία του φαινότυπου MLSb. Ο φαινότυπος αυτός δεν επηρεάζει τις κετολίδες (τελιθρομυκίνη) και οδηγεί σε υψηλού βαθμού αντοχή με αποτέλεσμα η αύξηση της δόσης του φαρμάκου να μην επιφέρει καμία αλλαγή στο αντιμικροβιακό αποτέλεσμα.

β) και στην ενεργοποίηση αντλιών που εκκρίνουν το αντιβιοτικό έξω από το βακτηριακό κύτταρο (αντλίες εκροής), που κωδικοποιούνται από το γονίδιο *mefA* (Farrell *et al.*, 2005, Klugman 1990, 2002) με αποτέλεσμα να περιορίζεται η στάθμη του φαρμάκου στο εσωτερικό του μικροβίου. Ο μηχανισμός αυτός εκφράζει το φαινότυπο M και μπορεί εν μέρει να αναχαιτιστεί με την αύξηση της δόσης του φαρμάκου. Ο φαινότυπος M χαρακτηρίζεται από μέτρια αντοχή στις μακρολίδες (ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη και αζίθρομυκίνη) και δεν επηρεάζει τις λινκοσαμίδες (κλινδαμυκίνη).

10. ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ (ΦΟΡΕΙΑ)

10.1. Μηχανισμοί αποικισμού

Η μετάδοση του *S. pneumoniae* μεταξύ ατόμων συμβαίνει μέσω σταγονιδίων αερολυμάτων που εισπνέονται καθώς και μέσω μολυσμένων με το μικρόβιο επιφανειών που εισάγουν τα βακτήρια στον στοματοφάρυγγα (π.χ. παιχνίδια με επικάλυψη σάλιου σε παιδικούς σταθμούς).

Ως εκ τούτου, οι κυρίαρχοι μηχανισμοί άμυνας κατά του πνευμονιόκοκκου περιλαμβάνουν το φυσικό φραγμό που σχηματίζεται από την επιφάνεια του βλεννογόνου της αναπνευστικής οδού, τα διαλυτά αντιβακτηριακά συστατικά που υπάρχουν στη βλέννα και τα ανοσοκύτταρα τόσο του συστήματος φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας που βρίσκονται στην επιφάνεια των βλεννογόνων (Shenoy A.T., Orihuela C.J., 2016).

Η πρώτη γραμμή άμυνας για την αντιμετώπιση της βακτηριακής προσκόλλησης και αποικισμού του ρινοφαρυγγικού επιθηλίου, είναι το αρνητικά φορτισμένο στρώμα βλέννας της επιθηλιακής επιφάνειας. Στην επιφάνεια του αναπνευστικού επιθηλίου εκκρίνονται επίσης διάφορες ουσίες με αντιμικροβιακή δράση, όπως λακτοφερρίνη, λυσοζύμη και άλλα πεπτίδια. Η λακτοφερρίνη δεσμεύει το σίδηρο που είναι απαραίτητος για τον μεταβολισμό του μικροβίου ενώ η λυσοζύμη διασπά τους γλυκοσιδικούς δεσμούς μεταξύ N-ακετυλογλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος της πεπτιδογλυκάνης (Shenoy A.T., Orihuela C.J., 2016).

Για να αποφύγουν τον εγκλωβισμό από τη βλέννα και την επακόλουθη κάθαρση οι πνευμονιόκοκκοι έχουν εξελίξει σε διαφορετικό βαθμό αρνητικά φορτισμένες καψιδικές επιφάνειες (Nelson A.L. *et al.*, 2007). Με εξαίρεση τους ορότυπους 7A, 7F, 14, 33F και 37, η κάψα των υπολοίπων οροτύπων - με γνωστή τη βιοχημική δομή- παρουσιάζει αρνητικό φορτίο (Kamerling J.P., 2000). Το αρνητικό φορτίο της κάψας απωθεί ηλεκτροστατικά τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα που είναι επίσης αρνητικά φορτισμένα και αναστέλλει τις αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων τους με τους συνδέτες της πνευμονιοκοκκικής επιφάνειας (Li Y. *et al.*, 2013, Magnusson K.E., 1989). Οι ορότυποι που έχουν το μεγαλύτερο αρνητικό φορτίο είναι αυτοί που παρουσιάζουν τον υψηλότερο επιπολασμό φορέας στον ανθρώπινο πληθυσμό (Li Y *et al.*, 2013).

Για την αντιμετώπιση των μικροβιοκτόνων ουσιών που υπάρχουν στο στρώμα της βλέννης οι πνευμονιόκοκκοι εκφράζουν ένζυμα που αδρανοποιούν τα βακτηριοκτόνα

πεπτίδια ή τροποποιούν τους στόχους δράσης τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τροποποίησης στόχου είναι η αντίσταση στην πενικιλίνη η οποία προκαλείται από μείωση της συγγένειας με την πενικιλίνη, των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs- Penicillin Binding Proteins) – πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης - λόγω αλλαγών στη δομή τους.

Οι ρινοφαρυγγικές εκκρίσεις είναι επίσης πλούσιες σε εκκριτική ανοσοσφαιρίνη Α (sIgA), η οποία συνδέεται και προκαλεί συσσωμάτωση των μικροβιακών κυττάρων (Fasching C.E. *et al.*, 2007). Αυτό διευκολύνει την οψωνοποίηση τους και προάγει τη φαγοκυττάρωση. Οι πνευμονιόκοκκοι έχουν αναπτύξει ένα ένζυμο με δράση πρωτεάσης IgA1, το οποίο διασπά την sIgA εμποδίζοντας τη συσσωμάτωση και τον εγκλωβισμό τους μέσα στη βλέννη αποκτώντας έτσι πρόσβαση στο να αποικίσουν τον υποκείμενο ρινοφαρυγγικό βλεννογόνο (Weiser J.N. *et al.*, 2003).

Εξ' αιτίας της δράσης της IgA1 πρωτεάσης η μεσολαβούμενη από αντισώματα κάθαρση μπορεί να επιτευχθεί μόνο αφού παραχθούν σημαντικά ποσά ειδικών αντισωμάτων από άλλες τάξεις και υποτάξεις. Πράγματι, η ελάττωση στον αποικισμό από πνευμονιόκοκκο που ακολούθησε τη χρήση των συζευγμένων εμβολίων μπορεί να αποδοθεί και στην επαγωγή υψηλών επιπέδων IgG που δεν είναι στόχος της εν λόγω πρωτεάσης (Shenoy A.T., Orihuela C.J., 2016).

Η CRP είναι ακόμα ένας σημαντικός παράγοντας της φυσικής ανοσίας έναντι του πνευμονιόκοκκου η οποία προσδενόμενη ειδικά στη ChoP (φωσφορυλοχολίνη) αλληλοεπιδρά με τον παράγοντα C1q του συμπληρώματος για να ενεργοποιηθεί η κλασσική οδός του συμπληρώματος.

Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα προϋποθέτει την προσκόλληση του μικροβίου στο αναπνευστικό επιθήλιο.

Μέσα σε λίγα λεπτά από την είσοδο του μικροοργανισμού στη ρινική κοιλότητα, τα μικροβιακά κύτταρα έρχονται σε επαφή με τις βλεννώδεις εκκρίσεις. Η κάψα ελαττώνει τη παγίδευση στη βλέννη και έτσι επιτρέπει στο μικρόβιο να πλησιάσει τις επιφάνειες των επιθηλίων (Nelson A. *et al.*, 2007).

Αρχικά τα βακτήρια εντοπίζονται στη στοιβάδα του γλυκοκάλυκα που επικαλύπτει το αναπνευστικό και οσφρητικό επιθήλιο (Nelson A. *et al.*, 2007). Η κάψα έχει ισχυρή αρνητική φόρτιση και απωθεί τα πλούσια σε σιαλικό οξύ βλεννοπολυσακχαρίδια που υπάρχουν στη βλέννη (Kamerling J., 2000). Αυτό επιτρέπει στο βακτήριο να αποκτήσει πρόσβαση σε υποδοχείς της επιφάνειας των επιθηλιακών κυττάρων. Μόλις φτάσει

στην επιφάνεια του επιθηλίου η έκφραση παχιάς κάψας φαίνεται να είναι μειονέκτημα για το μικρόβιο εξαιτίας της ανασταλτικής δράσης στην προσκόλληση.

Τα περισσότερα στελέχη που έχουν μελετηθεί παρουσιάζουν μεταβολές φάσης, μεταξύ 2 μορφών, που ξεχωρίζουν από τη μορφολογία των αποικιών τους σε διαφανείς και αδιαφανείς (Weiser J.N. *et al.*, 1994). Στα αρχικά στάδια του αποικισμού επικρατούν οι διαφανείς παραλλαγές που εκφράζουν λεπτότερη κάψα και έχουν χαρακτηριστικά που προωθούν τη πρόσδεση στους ιστούς του ξενιστή (Weiser J.N. *et al.*, 1994).

Οι δεσμευτικές πρωτεΐνες της χολίνης στο κυτταρικό τοίχωμα συμβάλλουν στη δυνατότητα προσκόλλησης στα κύτταρα του ξενιστή (Cundell D.R. *et al.*, 1995, McCullers J.A., Rehg J.E., 2002). Η προσκόλληση γίνεται μέσω των επιφανειακών πρωτεϊνών όπως για παράδειγμα της προσκολλητίνης A της επιφανείας του πνευμονιόκοκκου (pneumococcal surface adhesin A, PsaA). Μια άλλη προσκολλησίνη είναι η χολινο-δεσμευτική πρωτεΐνη A (CbpA που επίσης αναφέρεται ως PspC ή SpsA) η οποία προσδένεται στον ανθρώπινο εκκριτικό παράγοντα της IgA και στην ανοσοσφαιρίνη IgA (Hammerschmidt S. *et al.*, 1997). Επιπλέον μία από τις επιφανειακές πρωτεΐνες, η δεσμευτική της χολίνης πρωτεΐνη A (choline binding protein A, CbpA), έχει υψηλή συγγένεια για το σιαλικό οξύ που υπάρχει στα επιθηλιακά κύτταρα (Rosenow C. *et al.*, 1997).

Ο *S. pneumoniae* παράγει και γλυκοσιδάσες (King S. *et al.*, 2006) οι οποίες δρουν διαδοχικά και αφαιρούν τελικά σάκχαρα που βρίσκονται σε πολλές δομικές ουσίες του ανθρώπινου οργανισμού, αποκαλύπτοντας έτσι υποδοχείς για προσκόλληση και επηρεάζουν τους μηχανισμούς κάθαρσης του ξενιστή (που χρησιμοποιούν αυτές τις ουσίες) είτε και παρέχουν πηγή θρεπτικών ουσιών.

Τόσο σε μοντέλα ποντικών όσο και σε ανθρώπους, οι αδιαφανείς παραλλαγές που εκφράζουν αυξημένα ποσά CPS και είναι περισσότερο ανθεκτικά στη φαγοκυττάρωση μέσω οψωνοποίησης, κυριαρχούν κατά τη μετάβαση από τις επιφάνειες των βλεννογόνων στην αιματική ροή (Kim J.O. *et al.*, 1999, Weiser J. *et al.*, 2001).

Μεταξύ 1ης και 3ης ημέρας από την έναρξη του αποικισμού σε πειραματικά μοντέλα ποντικών παρατηρείται συρροή ουδετερόφιλων και φαγοκυττάρωση μικροβίων στους αυλούς της ρινικής κοιλότητας. Ωστόσο, αυτή η οξεία φλεγμονώδης απάντηση (ήπια πυώδης ρινίτις) είναι αναποτελεσματική να αντιμετωπίσει επιτυχώς το μικρόβιο και οι πνευμονιόκοκκοι επιμένουν στην επιθηλιακή επιφάνεια ακόμα και μετά την ουδετεροφιλική διήθηση. Μεταλλαγμένα στελέχη με ελαττωματική έκφραση της πνευμολυσίνης προκαλούν μειωμένη εισροή ουδετερόφιλων και επιμένουν για

μεγαλύτερη χρονική περίοδο σε μοντέλα αποικισμού του ρινοφάρυγγα (VanRossum A. *et al.*, 2005).

Τα επιθηλιακά κύτταρα αντιδρούν στο ωσμωτικό stress που προκαλεί η δημιουργία πόρων από την πνευμονολυσίνη με την παραγωγή χημειοκινών που προσελκύουν τα ουδετερόφιλα (Ratner A. *et al.*, 2006).

Η καταστροφή του μικροβίου από τον ξενιστή απαιτεί οψωνοποίηση από αντισώματα ειδικά του ορότυπου μαζί με συμπλήρωμα που ακολουθείται από φαγοκυττάρωση.

Γενικά ο αποικισμός δε συνοδεύεται από συμπτωματική νόσο. Η μετάβαση της ασυμπτωματικής φορείας σε διεισδυτική νόσο προϋποθέτει την τοπική ανάπτυξη φλεγμονωδών παραγόντων, ιντερλευκίνης 1 (interleukin-1, IL-1) και του παράγοντα νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor, TNF), όπως συμβαίνει και σε ιογενείς λοιμώξεις (Tuomanen E.I., 1997). Μέσω αυτής της διαδικασίας μεταβάλλεται ο τύπος και ο αριθμός των υποδοχέων στα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα-στόχους.

10.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τη φορεία

Παράγοντες που επηρεάζουν τη φορεία του πνευμονιοκόκκου αποτελούν η ηλικία του ξενιστή, η εποχή, ο συγχρωτισμός στην κοινότητα (παρακολούθηση σχολείου/ παιδικού σταθμού) ή το οικιακό περιβάλλον (αριθμός αδερφών), η οξεία λοίμωξη του αναπνευστικού, ειδικές διατροφικές συνθήκες (θηλασμός), η προηγούμενη χρήση αντιβιοτικής αγωγής, το κάπνισμα (ενεργητικό και παθητικό) και ο εμβολιασμός (Bogaert D. *et al.*, 2004, Principi N. *et al.*, 1999, Ghaffar F. *et al.*, 1999).

Ο ρινοφάρυγγας αποικίζεται κατά τη διάρκεια του 1ου έτους ζωής, με τη μέγιστη συχνότητα αποικισμού να παρατηρείται σε παιδιά ηλικίας 3 ετών (Bogaert D. *et al.*, 2004).

Σημαντικό παράγοντα που ευνοεί την φορεία και τη διασπορά στελεχών πνευμονιοκόκκου στην κοινότητα αποτελεί ο συγχρωτισμός. Σε παιδιά παιδικών σταθμών διαπιστώνονται υψηλά ποσοστά φορείας (Bogaert D. *et al.*, 2004, Bogaert D. *et al.*, 2001). Σε μελέτη που έγινε στην Ολλανδία ο σχετικός κίνδυνος αποικισμού με πνευμονιοκόκκο στα παιδιά που παρακολούθησαν παιδικούς σταθμούς ήταν έξι φορές μεγαλύτερος σε σχέση με αυτά που παρέμεναν στο σπίτι (Bogaert D. *et al.*, 2001).

10.3. Η επίδραση του ανταγωνισμού

Έχει υπολογιστεί ότι περισσότερα από 700 είδη μικροβίων κατοικούν στον ανθρώπινο φάρυγγα (Aas J.A. *et al.*, 2005). Ο επιτυχημένος αποικισμός πιθανότατα απαιτεί μηχανισμούς που εξουδετερώνουν τη παρουσία ανταγωνιστικών ειδών. Σε μοντέλα ποντικών έχει καταδειχθεί ότι ο συναποικισμός με άλλα βακτηριακά είδη που κατοικούν στις ίδιες περιοχές μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την κάθαρση του *S. pneumoniae* μέσω της επαγωγής της μεσολαβούμενης από το συμπλήρωμα θανάτωσης από τα ουδετερόφιλα (Lysenko E.S. *et al.*, 2005). Με τον τρόπο αυτό φαίνεται ότι ένα μικροβιακό είδος μπορεί να χρησιμοποιήσει τη φυσική ανοσιακή απάντηση του ξενιστή για να υπερισχύσει έναντι του ανταγωνισμού.

Ένα επιπλέον συμπέρασμα είναι ότι ο πνευμονιόκοκκος είναι ανθεκτικός στη φυσική ανοσιακή απάντηση που προκαλεί αλλά δεν είναι απαραίτητα ανθεκτικός στην απάντηση που επάγεται από τους ανταγωνιστές του.

Επιπλέον τα διάφορα στελέχη ανταγωνίζονται το ένα το άλλο. Η αύξηση στην επίπτωση ασυνήθων ορότυπων σε πληθυσμούς όπου έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς τα πολυσακχαριδικά συνδεδεμένα εμβόλια (φαινόμενο γνωστό ως αντικατάσταση οροτύπου) υποδηλώνει ότι τα στελέχη που δεν υπάρχουν στο εμβόλιο είχαν διαγκωνιστεί από τους ορότυπους του εμβολίου.

Ένας μηχανισμός που εξηγεί αυτό τον ανταγωνισμό εντός του ίδιου είδους είναι η παραγωγή πνευμονιοκοκκικών βακτηριοσινών που είναι γνωστές ως πνευμοσίνες (Dawid S. *et al.*, 2007). Αυτά τα πεπτίδια έχουν αντιμικροβιακή δράση και στοχεύουν μέλη του ίδιου είδους.

Μια άλλη συνέπεια του “πυκνοκατοικημένου” μικροβιακού περιβάλλοντος στον ανθρώπινο φάρυγγα είναι η διαθεσιμότητα εξωγενούς DNA από συγγενικά είδη στρεπτοκόκκων και άλλα στελέχη πνευμονιόκοκκου. Αυτά τα νουκλεϊκά οξέα μπορεί να προσληφθούν από τον *S. pneumoniae* εξ αιτίας της φυσικής ικανότητας που διαθέτει και στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για να εμπλουτίσουν το γενετικό του υλικό. Η απόκτηση γονιδίων που κωδικοποιούν τροποποιημένες πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες για παράδειγμα, προσέδωσε αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά με αποτέλεσμα την προβληματική αντιμετώπιση των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων (Dowson C. *et al.*, 1994).

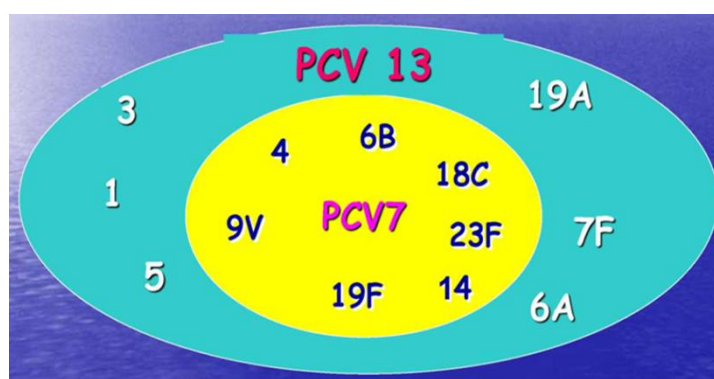
11. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ – ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ

Η πρώτη προσπάθεια για την πρόληψη της πνευμονιοκοκκικής νόσου έγινε από τον Wright το 1911 που υποστήριξε ότι ο ενοφθαλμισμός με ολόκληρους νεκρούς πνευμονιόκοκκους προστατεύει από πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις (Hefron R., 1939, Musher D.M. *et al.*, 1990). Δυστυχώς η προσπάθεια παρασκευής εμβολίου απέτυχε γιατί περιλάμβανε μόνο έναν από τους δύο ορότυπους που είχαν ανακαλυφθεί την εποχή εκείνη και η δόση του εμβολίου δεν επαρκούσε γιατί χρειαζόταν μεγάλη ποσότητα για να είναι αποτελεσματική.

Το 1926 οι Felton και Bailey (Felton L.D., 1934) κατάφεραν να απομονώσουν τους πολυσακχαρίτες του ελύτρου του πνευμονιόκοκκου, γεγονός που οδήγησε στην ανάπτυξη του πρώτου πολυσακχαριδικού εμβολίου. Τελικά, αποσύρθηκε από την αγορά λόγω της παράλληλης παραγωγής και χρήσης των αντιβιοτικών για την άμεση και επιτυχή αντιμετώπιση του πνευμονιόκοκκου. Το πρόβλημα ωστόσο που προέκυψε λίγο αργότερα ήταν η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών στην πενικιλίνη. Αυτό οδήγησε στην αναζήτηση νέων στρατηγικών ανοσοποίησης και την παραγωγή τελικά το 1977 του 14-δύναμου πολυσακχαριδικού εμβολίου από τον Austrian. Το εμβόλιο αυτό εξελίχθηκε το 1983 σε 23-δύναμο (καλύπτοντας 23 ορότυπους) το οποίο κυκλοφορεί έως σήμερα (Fedson D. *et al.*, 1988).

Τα μειονεκτήματα του εμβολίου αυτού, όπως η πτωχή ανοσογονικότητα σε παιδιά <2 ετών και σε ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς, οδήγησαν στην ανάπτυξη συζευγμένων πολυσακχαριδικών εμβολίων, αρχικά του 7-δύναμου που κυκλοφορεί από το 2000 και στη συνέχεια του 10-δύναμου και 13-δύναμου που κυκλοφόρησαν το 2010. (Εικόνα 12).

Εικόνα 12: Ορότυποι που περιέχονται στα συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια που κυκλοφορούν στη χώρα μας.



11.1. Πολυσακχαριδικό εμβόλιο

Το 23-δύναμο πολυσακχαριδικό εμβόλιο περιέχει 25 µg κεκαθαρμένου πολυσακχαρίτη του ελύτρου από τους παρακάτω ορότυπους: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F και 33F. Οι 23 αυτοί ορότυποι ευθύνονταν για το 85-90% των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων (Bogaert D. *et al.*, 2004). Το εμβόλιο αυτό είναι δραστικό σε ενήλικες και παιδιά >2 ετών. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι προσφέρει προστασία σε ορισμένες ομάδες υψηλού κινδύνου όπως ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία ή ασπληνία και σε ηλικιωμένους με παθήσεις όπως χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (Bruyn G.A. *et al.*, 1992, ACIP, 1997, Rubins J.B. *et al.*, 1999).

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

Δυστυχώς, στα παιδιά <2 ετών που έχουν τη μεγαλύτερη συχνότητα τόσο πνευμονιοκοκκικής φορέας όσο και νόσου, καθώς και στους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, υπάρχει πτωχή ανοσιακή απάντηση στο συγκεκριμένο εμβόλιο (Koskela M. *et al.*, 1986, O'Brien K.L. *et al.*, 1996). Η αποτελεσματικότητα των πολυσακχαριδικών εμβολίων στα παιδιά >2 ετών και στους ενήλικες είναι 61-75% και μπορούν να χορηγηθούν σε συγκεκριμένες περιπτώσεις (Butler J.C. *et al.*, 1999, Fedson D.S., 1998).

Το 23-δύναμο εμβόλιο δεν προάγει την T-εξαρτώμενη ανοσιακή απάντηση (Wadwa R.P., Feigin R.D., 1999). Αυτό σημαίνει ότι απουσιάζουν τα B κύτταρα μνήμης και περιορίζεται η περίοδος προστατευτικής κάλυψης με το εμβόλιο. Τέλος, κάποιοι πολυσακχαρίτες του ελύτρου έχουν χαμηλή ανοσογονικότητα και σε αυτούς περιλαμβάνονται διάφοροι ορότυποι που σχετίζονται με αντοχή στην πενικιλίνη (Poland G.A., 1999).

Τα παραπάνω οδήγησαν στην παρασκευή νέων πνευμονιοκοκκικών εμβολίων, χωρίς αυτό βέβαια να σημαίνει ότι μπορούν να αντικατασταθούν πλήρως τα πολυσακχαριδικά εμβόλια.

Κάποιες μελέτες έχουν αναδείξει και μια πρόσθετη δράση του πολυσακχαριδικού εμβολίου όταν χρησιμοποιείται ως αναμνηστική δόση μετά από εμβολιασμό με το συζευγμένο (Obaro S.K. *et al.*, 1997). Έχει προταθεί ότι ο εμβολιασμός με συζευγμένα

εμβόλια κατά τη βρεφική ηλικία που ακολουθείται από αναμνηστική δόση του πολυσακχαριδικού εμβολίου μετά την ηλικία των 10 ετών μπορεί να μειώσει συνολικά τα ποσοστά θνησιμότητας και θνητότητας από πνευμονιόκοκκο καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής (Austrian R., 1999).

11.2. Συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια

Ο Avery με τους συνεργάτες του από το 1929 είχε δείξει ότι η σύζευξη ενός πολυσακχαρίτη με μία πρωτεΐνη αυξάνει την ανοσογονικότητα του πολυσακχαρίτη (Poland G.A., 1999, Klein J.O., 2000). Με τον τρόπο αυτό τα πολυσακχαριδικά αντιγόνα αποκτούν τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης-φορέα και αναγνωρίζονται ως θυμοεξαρτώμενα. Οι πρωτεΐνες διασπώνται σε πεπτίδια που συνδέονται με τάξης MHC-II μόρια της κυτταρικής μεμβράνης και παρουσιάζονται στα T-κύτταρα. Αυτό οδηγεί στη διέγερση της παραγωγής B-κυττάρων μνήμης προκαλώντας ισχυρότερη αναμνηστική απάντηση σε νέα διέγερση. Επιπλέον υπάρχει καλύτερη ανοσολογική απάντηση σε μικρές ηλικίες εξ' αιτίας της προωριότερης ωρίμανσης της θυμοεξαρτώμενης ανοσιακής απάντησης.

Κάθε πολυσακχαρίτης συνδέεται ξεχωριστά με μία πρωτεΐνη-φορέα. Ο αριθμός ωστόσο των πρωτεϊνών-φορέων πρέπει να είναι περιορισμένος καθώς μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών-φορέων μπορεί να ελαττώσει την αντισωματική απάντηση στα πολυσακχαριδικά αντιγόνα λόγω αντιγονικού ανταγωνισμού (Sorensen R.U. *et al.*, 1998). Οι πρωτεΐνες-φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι ίδιες με αυτές που υπάρχουν στο συζευγμένο εμβόλιο του αιμοφίλου της ινφλουέντζας τύπου b και είναι το τοξοειδές του τετάνου, το τοξοειδές της διφθερίτιδας, μία μη τοξική μεταλλαγμένη διφθεριτική τοξίνη (CRM197) και ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα της εξωτερικής μεμβράνης του μηνιγγιτιδόκοκκου της ομάδας B (Poland G.A., 1999).

Τα συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια περιέχουν 7-13 ορότυπους (Εικόνα 12).

Το 7-δύναμο εμβόλιο (PCV7) περιέχει 7 από τους πιο συχνούς ορότυπους που ευθύνονται για διεισδυτικές λοιμώξεις και εμφανίζουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα, περιέχει 2 μg για κάθε πολυσακχαρίτη των οροτύπων 4, 9V, 14, 18C, 19F, 23F και 4 μg του ορότυπου 6B (συνολικά 16 μg πολυσακχαρίτη). Οι πολυσακχαρίτες είναι συζευγμένοι με την πρωτεΐνη-φορέα CRM197 (20 μg) και προσροφημένοι σε φωσφορικό αργίλιο (0,125 μg).

Το 10-δύναμο πολυσακχαριδικό εμβόλιο καλύπτει επιπλέον τους ορότυπους 1, 5 και 7F ενώ το 13-δύναμο που κυκλοφόρησε το 2010, παρέχει προστασία επιπλέον έναντι των οροτύπων 3, 6A και 19A (Nuorti J.P., Whitney C.G., 2010).

Σε μία συστηματική ανάλυση (Lucero M.G. *et al.*, 2009) που περιλάμβανε αποτελέσματα από 5 κλινικές μελέτες σε διάφορες χώρες για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα των συζευγμένων πολυσακχαριδικών εμβολίων (7-δύναμο, 10-δύναμο, 13-δύναμο) έναντι των διεισδυτικών λοιμώξεων και της πνευμονίας φάνηκε ότι σε υγιή παιδιά <2 ετών η αποτελεσματικότητα του εμβολίου ήταν 80% για διεισδυτικές λοιμώξεις από ορότυπο του εμβολίου και 58% για λοιμώξεις από όλους τους ορότυπους.

11.3. Συστάσεις για εμβολιασμό στη χώρα μας

Ο εμβολιασμός σύμφωνα με τις συστάσεις της Εθνικής Επιτροπής Εμβολιασμών (Υπουργείο υγείας – Εθνικό πρόγραμμα εμβολιασμών) περιλαμβάνει:

– Εμβόλιο πνευμονιόκοκκου, συζευγμένο (PCV)

Η μικρότερη ηλικία χορήγησης είναι οι 6 εβδομάδες. Το PCV συνιστάται για όλα τα υγιή παιδιά 2-59 μηνών, ενώ το σχήμα εμβολιασμού με PCV διαφοροποιείται ανάλογα με την ηλικία έναρξης του εμβολιασμού.

Τα παιδιά με αυξημένο κίνδυνο νόσησης από πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις συνιστάται να εμβολιάζονται με PCV13

– Εμβόλιο πνευμονιόκοκκου, πολυσακχαριδικό (PPSV23)

Η μικρότερη ηλικία χορήγησης είναι τα 2 έτη

- Το 23-δύναμο πολυσακχαριδικό εμβόλιο (PPSV) συνιστάται να γίνεται επιπλέον του συζευγμένου PCV13 τουλάχιστον 2 μήνες μετά την τελευταία δόση του PCV13, σε άτομα >2 ετών με αυξημένο κίνδυνο νόσησης από πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις
- Μία αναμνηστική δόση PPSV23 συνιστάται να γίνεται 5 χρόνια μετά την 1^η δόση.
- Ενήλικες ≥ 65 ετών ή άτομα που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου για τα οποία υπάρχει ένδειξη εμβολιασμού με πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο πρέπει να λαμβάνουν και τα δύο είδη εμβολίων. Συστήνεται να προηγείται το εμβόλιο

PCV13 και μετά ένα έτος να ακολουθεί το PPSV23. Σε άτομα ηλικίας ≥ 65 ετών που έχει προηγηθεί το PPSV23, ακολουθεί το PCV13 ένα έτος αργότερα.

- Για παιδιά, εφήβους και ενήλικες που παρουσιάζουν έναν ή περισσότερους από τους παρακάτω επιβαρυντικούς παράγοντες ή χρόνια νοσήματα, συνιστάται εμβολιασμός και σε ηλικίες >5 ετών έως ≤ 64 ετών:
 - Άτομα με ανατομική ή λειτουργική ασπληνία, όπως, ομόζυγη - θαλασσαιμία, δρεπανοκυτταρική και μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία, σπληνεκτομή.
 - Συγγενής ανοσοανεπάρκεια (κυρίως έλλειψη της IgG2).
 - Ανοσοκαταστολή κληρονομική ή επίκτητη εξαιτίας νοσήματος ή θεραπείας.
 - Νεφρωσικό σύνδρομο ή χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.
 - Σακχαρώδη διαβήτη ή άλλο χρόνια μεταβολικό νόσημα.
 - Καρδιακή νόσο με σοβαρή αιμοδυναμική διαταραχή.
 - Χρόνια πνευμονοπάθεια, συμπεριλαμβανομένου του άσθματος στο οποίο χορηγούνται υψηλές δόσεις κορτικοειδών p.o. και της κυστικής ίνωσης.
 - Συστηματικοί καπνιστές ανεξαρτήτως ηλικίας.
 - Διαφυγή εγκεφαλονωτιαίου υγρού από συγγενείς ή επίκτητες αιτίες.
 - Κοχλιακά εμφυτεύματα
 - Λοίμωξη HIV.

11.4. Στρατηγικές για την ανάπτυξη νέων εμβολίων κατά του *S. pneumoniae*

Όλα τα μέχρι τώρα διαθέσιμα εμβόλια κατά του πνευμονιόκοκκου έχουν περιορισμούς. Τόσο το PPV όσο και τα PCV είναι εμβόλια που προκαλούν μόνο ειδική για τον ορότυπο ανοσία. Έχει επανειλημμένα εμφανιστεί ανάδυση οροτύπων αντικατάστασης μετά την εισαγωγή τους (Weinberger, D.M. *et al.*, 2011, Kaur, R. *et al.*, 2016) καθώς επίσης και αποτυχίες του εμβολίου μετά τον εμβολιασμό με PCV-13 (Moraga-Llor, F. *et al.*, 2016, Antachopoulos C. *et al.*, 2014).

Η τάση του *S. pneumoniae* να αποκτά νέο γενετικό υλικό μέσω του φαινομένου της βακτηριακής μεταμόρφωσης καθώς και η ικανότητα γενετικού ανασυνδυασμού, του επιτρέπει να εξελιχθεί προσαρμοζόμενος στο περιβάλλον του ξενιστή. Η αλλαγή της κάψας αναφέρθηκε ότι συμβαίνει συχνότερα μετά την εισαγωγή των εμβολίων για τον

πνευμονιόκοκκο. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στους επίτοπους οι οποίοι κωδικοποιούν τη βιοσύνθεση πολυσακχαριτών της κάψας, θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην εμφάνιση μη τυποποιησίμων στελεχών πνευμονιόκοκκου χωρίς κάψα (Masomian, M. *et al.*, 2020). Η πρωτεΐνη K της επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου σε αυτές τις βακτηριακές παραλλαγές έχει προταθεί ότι βοηθά στην προσκόλληση, συμβάλλοντας στο 3-19% των πνευμονιοκοκκικών ασθενειών (Keller, L.E. *et al.*, 2013).

Σοβαρές ασθένειες που προκαλούνται από πνευμονιόκοκκο εξακολουθούν να εμφανίζονται παρά τη διαθεσιμότητα του πολυσακχαριδικού (PPV23) και των συζευγμένων εμβολίων (PCV) στην αγορά. Η ταχεία εξάπλωση των πολυανθεκτικών στελεχών έχει επιδεινώσει το παγκόσμιο πρόβλημα των πνευμονιοκοκκικών ασθενειών. Οι περιορισμοί που τίθενται από τα τρέχοντα εμβόλια PCV περιλαμβάνουν το υψηλό κόστος και τη προστασία έναντι συγκεκριμένων ορότυπων (O'Brien K.L., 2009, Gladstone, R.A. *et al.*, 2011). Αν και η εισαγωγή των PPV και των PCV μείωσε εντυπωσιακά την επίπτωση της νόσου, τα αναδυόμενα νέα κλινικά στελέχη απαιτούν την προσθήκη νεότερων ορότυπων στα σκευάσματα εμβολίων (Hsu, H.E. *et al.*, 2009, Croucher N.J. *et al.*, 2011). Λαμβάνοντας υπόψη ότι υπάρχουν περίπου 100 ορότυποι πνευμονιόκοκκου, πιθανώς θα ήταν πολύ περίπλοκο και ακριβό να αυξηθεί ο αριθμός των ορότυπων στα σκευάσματα εμβολίου PCV. Ως εκ τούτου, υπάρχει ανάγκη να αναπτυχθούν νέα εμβόλια για τον πνευμονιόκοκκο. Ιδανικό θα ήταν ένα εμβόλιο για τον πνευμονιόκοκκο που παρουσιάζει τη δυνατότητα να παρέχει ευρεία κάλυψη ορότυπων, να προκαλεί βλεννογονική και συστηματική ανοσία και να εμποδίζει τον πρωτογενή ενδορινικό αποικισμό, καθώς και την διεισδυτική νόσο. Πολλές πνευμονιοκοκκικές πρωτεΐνες έχουν μελετηθεί ως υποψήφιος για εμβόλια, όπως η πνευμονιοκοκκική επιφανειακή πρωτεΐνη A (PspA), η πνευμονολυσίνη (Ply), η πνευμονιοκοκκική επιφανειακή πρωτεΐνη C (PspC) και η πνευμονιοκοκκική επιφανειακή προσκολλησίνη A (PsaA) (Masomian, M. *et al.*, 2020).

Υπάρχουν πολλές και διαφορετικές προσεγγίσεις για την παράκαμψη των περιορισμών και των προβλημάτων που περιγράφονται παραπάνω στην ανάπτυξη εναλλακτικών προφυλακτικών εμβολίων. Η χρήση ολοκυτταρικού πνευμονιοκοκκικού εμβολίου, είτε με βάση ζωντανά εξασθενημένα κύτταρα (Ramos-Sevillano, E. *et al.*, 2020), αδρανοποιημένα ολόκληρα κύτταρα, εκχυλίσματα κυττάρων (Moffitt K.L. *et al.*, 2012, Malley R. *et al.*, 2012, Xu X. *et*

al., 2014) ή ακυτταρικά εμβόλια πολλαπλών αντιγόνων (Zhang F., 2013) αποτελούν δυνατότητες υπό έρευνα. Μια διαφορετική προσέγγιση, μπορεί να είναι η σύζευξη των πολυσακχαριτών σε μια πνευμονιοκοκκική πρωτεΐνη φορέα (Odutola A. *et al.*, 2016, Odutola A. *et al.*, 2017, Prymula R. *et al.*, 2017) για τη βελτίωση της ανοσολογικής απόκρισης έναντι του παθογόνου ή εναλλακτικά, να ενσωματώσει άλλα στοιχεία στη σύνθεση που αυξάνουν αυτή την απόκριση (Dullforce P. *et al.*, 1998, Buchanan R.M. *et al.*, 2001).

Μια πιθανή εξέλιξη που θα μπορούσε να είναι εναλλακτική των σημερινών PPV23 ή PCV είναι η ανάπτυξη εμβολίων βασισμένων σε αντιγόνα πνευμονιοκοκκικών πρωτεϊνών. Ανάλογο παράδειγμα είναι η περίπτωση του μικροβίου *Neisseria meningitidis* της οροομάδας B, για το οποίο υπάρχουν δύο εμβόλια βασισμένα σε μηνιγγιτιδοκοκκικές πρωτεΐνες που παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά αποτελεσματικότητας έναντι της μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου που προκαλείται από στελέχη της οροομάδας B (Flacco M.E. *et al.*, 2018, Parikh S.R. *et al.*, 2016, Ostergaard L. *et al.*, 2017)

Τα αντισώματα που δημιουργούνται εναντίον αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να επάγουν την κυτταρική ανοσολογική απόκριση μέσω της διαδικασίας οψονοποίησης και φαγοκυττάρωσης, αλλά μπορεί επίσης να επηρεάσουν τη λειτουργία των βακτηριακών πρωτεϊνών στις οποίες συνδέονται. Ως αποτέλεσμα, τα ανθρώπινα αντισώματα κατά των πνευμονιοκοκκικών πρωτεϊνών, για παράδειγμα, θα μπορούσαν να μειώσουν την προσκόλληση του πνευμονιόκοκκου στα επιθηλιακά κύτταρα και να αποτρέψουν τον ρινοφαρυγγικό αποικισμό, ή ακόμη και να μειώσουν την αλληλεπίδραση με το επιθήλιο του πνεύμονα, αποφεύγοντας επομένως την ανάπτυξη πνευμονίας και συστηματικής διασποράς (Sempere J. *et al.*, 2021).

11.4.1. Νέα συζευγμένα εμβόλια

Μια αρχική προσπάθεια υπέρβασης του φαινομένου της αντικατάστασης και της μεγάλης γεωγραφικής διαφοροποίησης στους κυκλοφορούντες ορότυπους ήταν η προσθήκη νέων πνευμονιοκοκκικών ορότυπων στα ήδη αδειοδοτημένα συζευγμένα εμβόλια PCV.

Η εταιρεία Merck Sharp & Dohme Corp. (Kenilworth, ΗΠΑ) έκανε μελέτες για ένα νέο συζευγμένο εμβόλιο, το PCV-15 (Masomian, M. *et al.*, 2020). Το PCV-15

περιλαμβάνει τους 13 ορότυπους του PCV-13 και επιπλέον τους ορότυπους 22F και 33F (Greenberg, D. *et al.*, 2018). Τον Ιούλιο του 2021 η εταιρεία Merck ανακοίνωσε ότι ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) ενέκρινε το VAXNEUVANCE™ (Πνευμονιοκοκκικό 15-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο) για την πρόληψη της διεισδυτικής νόσου που προκαλείται από 15 ορότυπους *Streptococcus pneumoniae* σε ενήλικες ηλικίας 18 ετών και άνω (Merck, 2021).

Η εταιρεία Pfizer Inc. (Νέα Υόρκη, ΗΠΑ) ανέπτυξε ένα 20-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο πνευμονιόκοκκου (20vPnC). Το εμβόλιο 20vPnC περιλαμβάνει τους 13 ορότυπους από το Prevenar 13 συν επτά επιπλέον ορότυπους (8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F και 33F) που είναι γνωστό ότι προκαλούν διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσο (IPD) (Balsells, E. *et al.*, 2017, Hausdorff, W.P. *et al.*, 2016, Cohen, R. *et al.*, 2017, Moore, M.R. *et al.*, 2015, Metcalf B.J. *et al.*, 2016) και μηνιγγίτιδα (Olarie, L. *et al.*, 2015, Thigpen M.C. *et al.*, 2011).

Οι επτά νέοι ορότυποι συνδέονται με αντοχή στα αντιβιοτικά (Metcalf B.J. *et al.*, 2016, Tomczyk S. *et al.*, 2016, Mendes R.E. *et al.*, 2015) καθώς και υψηλή θνησιμότητα (Oligbu G. *et al.*, 2017, VanHoek A.J. *et al.*, 2012, Stanek R.J. *et al.*, 2016, Harboe Z.B. *et al.*, 2009).

Τον Ιούνιο του 2021 η εταιρεία Pfizer Inc. ανακοίνωσε ότι ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) ενέκρινε το PREVNAR 20™ (Πνευμονιοκοκκικό 20-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο) για την πρόληψη της διεισδυτικής νόσου και της πνευμονίας που προκαλείται από 20 ορότυπους *Streptococcus pneumoniae* σε ενήλικες ηλικίας 18 ετών και άνω (Pfizer, 2021).

11.4.2. Πρωτεϊνικά εμβόλια

Μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση στα εμβόλια που βασίζονται σε πολυσακχαρίτες της κάψας είναι η χρήση των πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για τη λοιμογόνο δράση του βακτηρίου, για την κατασκευή νέων εμβολίων. Ο πνευμονιόκοκκος έχει πολλές πρωτεΐνες που είναι καλά διατηρημένες μεταξύ των διαφορετικών οροτύπων, οι περισσότερες από τις οποίες εμφανίζονται στην επιφάνεια του και επομένως είναι προσβάσιμες σε αντισώματα (Lagousi T. *et al.*, 2019). Παρόμοια με τα καψιδικά αντιγόνα των πολυσακχαριτών, τα μη καψιδικά πρωτεϊνικά αντιγόνα μπορεί να επάγουν την παραγωγή οψονοφαγοκυτταρικών αντισωμάτων, με τη δυνατότητα να προσφέρουν προστασία ανεξάρτητη από τον

ορότυπο έναντι της πνευμονιοκοκκικής νόσου (Lagousi T. *et al.*, 2019). Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι οι πνευμονιοκοκκικές πρωτεΐνες συμβάλλουν στη βακτηριακή μολυσματικότητα, καθώς εμπλέκονται σε πολλά διαφορετικά στάδια παθογένεσης της νόσου, τα αντί-πρωτεϊνικά αντισώματα, σε αντίθεση με τα αντισώματα κατά της κάψας, μπορεί να εμφανίζουν πρόσθετους προστατευτικούς μηχανισμούς εκτός από την μεσολαβούμενη από οψονοποίηση φαγοκυττάρωση. Για παράδειγμα, ανθρώπινα αντισώματα έναντι πολλών πνευμονιοκοκκικών πρωτεϊνών έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν την πνευμονιοκοκκική προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπινου πνεύμονα και το ρινοφαρυγγικό αποικισμό σε ζωικά μοντέλα (Lagousi T. *et al.*, 2019).

Αρκετά επιδημιολογικά και πειραματικά ευρήματα έδειξαν ότι όχι μόνο η χυμική αλλά και η κυτταρική ανοσία που επάγεται από τις πνευμονιοκοκκικές πρωτεΐνες εμπλέκεται στον φυσικό μηχανισμό επίκτητης ανοσίας στην πνευμονιοκοκκική νόσο (Lagousi T. *et al.*, 2019).

Τα εμβόλια πνευμονιόκοκκου με βάση τις πρωτεΐνες αντιμετωπίζουν αρκετές προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν.

Η αλληλουχία αμινοξέων μεταξύ των πνευμονιοκοκκικών πρωτεϊνών παρουσιάζει πολύ μικρότερη ποικιλομορφία σε σύγκριση με τη βιοχημική δομή μεταξύ των πνευμονιοκοκκικών πολυσακχαριτών. Ωστόσο, ορισμένες πρωτεΐνες περιέχουν περιοχές με υψηλή μεταβλητότητα αλληλουχίας μεταξύ διαφορετικών ορότυπων, γεγονός που τις καθιστά ακατάλληλες για την ανάπτυξη ενός ανεξάρτητου από τον ορότυπο εμβολίου. Για να είναι υποψήφια για εμβόλιο, μια πρωτεΐνη πρέπει να περιέχει καλά διατηρημένες αντιγονικές περιοχές χωρίς μεταβλητότητα της αλληλουχίας μεταξύ των διαφορετικών ορότυπων και να είναι ικανή να επάγει ανοσοαπόκριση αναγνωριζόμενη τόσο από τους υποδοχείς των T-κυττάρων όσο και των B-κυττάρων.

Το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης μεταξύ των διαφορετικών στελεχών/οροτύπων εμφανίζει επίσης σημαντική ετερογένεια και μεταβλητότητα (Lagousi T. *et al.*, 2019). Μερικά από τα πιθανά μειονεκτήματα της χρήσης μιας μοναδικής πρωτεΐνης είναι η χαμηλή ανοσοαπόκριση και ότι τα βακτήρια θα μπορούσαν να αποφύγουν την αναγνώρισή της από το ανοσιακό σύστημα του ξενιστή με μικρές αλλαγές στη δομή της. Εναλλακτικά, πολλές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ίδια σύνθεση, επιτυγχάνοντας

συμπληρωματική επίδραση στην ανοσολογική απόκριση (Sempere J. *et al.*, 2021). Ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να αυξήσει την ανοσογονικότητα της πρωτεΐνης είναι η θέση της στο βακτηριακό περίβλημα και η δυνατότητα αλληλεπίδρασης με βασικά συστατικά της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Οι πρωτεΐνες που εκτίθενται στην επιφάνεια μπορεί να έχουν αυξημένο ανοσογονικό δυναμικό, προκαλώντας χυμικές και κυτταρικές αποκρίσεις που μπορούν να μπλοκάρουν ή να επηρεάσουν τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης ως παράγοντα λοιμογόνου δράσης. Για να επιτευχθεί βέλτιστη προστασία, η εναλλακτική λύση θα μπορούσε να είναι ένα εμβόλιο βασισμένο σε μια χιμαιρική κατασκευή, με πολλαπλά αντιγόνα που παρέχουν μεγαλύτερο βαθμό προστασίας έναντι της φορέας, της πνευμονίας, της βακτηριαιμίας και της μηνιγγίτιδας (Sempere J. *et al.*, 2021). Οι καλά συντηρημένες πρωτεΐνες με ευρεία κάλυψη οροτύπων που έχουν ερευνηθεί εκτεταμένα ως υποψήφια εμβόλια παρατίθενται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8: Εντοπισμός και λειτουργία των πρωτεϊνών – παραγόντων λοιμογόνου δράσης του *Streptococcus pneumoniae* που είναι καλά συντηρημένες μεταξύ διαφορετικών ορότυπων.

Πρωτεΐνη	Εντόπιση	Λειτουργία	Βιβλιογραφική αναφορά
Πνευμονιοκοκκική πρωτεΐνη επιφανείας A (PspA)	Επιφανειακή πρωτεΐνη	Αναστέλλει την μεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα κάθαρση του πνευμονιοκοκκού	Hollingshead, S.K., et al., 2000, Biles, D.E., et al., 2000, Nagano, H., et al., 2018
Πνευμονιοκοκκική πρωτεΐνη επιφανείας C (PspC)	Επιφανειακή πρωτεΐνη	Προσκολλησίνη (adhesin), αλληλεπιδρά με τον εκκριτικό παράγοντα της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης A (IgA) και με τον υποδοχέα ανοσοσφαιρινών rIgR, αναστέλλει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος αλληλεπιδρώντας με τα συστατικά C3 και παράγοντα H (FH)	Dave, S., et al., 2001, Dieudonné-Vatran, A., et al., 2009
Πνευμολυσίνη (Ply)	Κυτταρόπλασμα/Κυτταρικό τοίχωμα	Ικανότητα εισαγωγής σε μεμβράνες ευκαρυωτικών κυττάρων όπου ολιγομερίζονται για να σχηματίσουν μεγάλους διαμεμβρανικούς πόρους που οδηγούν σε κυτταρική λύση	Miyaji, E.N., et al., 2013, Price, K.E., et al., 2009
Πνευμονιοκοκκική τριαδική πρωτεΐνη ιστιδίνης D (PhdD)	Επιφανειακή πρωτεΐνη	Προσκολλησίνη, υψηλή ικανότητα δέσμευσης ιόντων ψευδαργύρου	Loisel, E., et al., 2011
Παράγοντας επιμήκυνσης Tu (EF-Tu)	Επιφανειακή πρωτεΐνη	Καταλύει τη σύνδεση ενός αμινοακυλο-tRNA (aa-tRNA) στο ριβόσωμα. Αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών	Nagai, K., et al., 2018
Πνευμονιοκοκκικό πεπτίδιο 27 (Pep27)	Κυτταρική μεμβράνη	Επιτρέπει στα βακτήρια να προσκολληθούν και να αποικίσουν πνεύμονες, αίμα και εγκέφαλο	Kim, E.-H., et al., 2012

Πηγή: Masomian M. *et al.*, 2020

Η πρόοδος στη γνώση των μηχανισμών δράσης αυτών των πρωτεϊνών, μαζί με τις τεχνικές μοριακού DNA, μας επιτρέπουν την επιλογή εξαιρετικά συντηρημένων αντιγονικών περιοχών εντός των πρωτεϊνών λοιμογόνου δράσης του πνευμονιόκοκκου και τον συνδυασμό διαφορετικών αντιγονικών επιτόπων από περισσότερες από μία πρωτεΐνες. Καθώς κάθε μία από αυτές τις πρωτεΐνες συμμετέχει σε συγκεκριμένες διεργασίες, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη εάν το εμβόλιο επιδιώκει να αποτρέψει την πνευμονία και την IPD ή/και να παρεμβαίνει στον αποικισμό, και αυτό θα εξαρτηθεί από τη συμμετοχή της εν λόγω πρωτεΐνης σε καθεμία από αυτές τις διεργασίες. Το όφελος από πιθανή εξάλειψη της κατάστασης φορείας στους ανθρώπινους πληθυσμούς είναι υπό συζήτηση καθώς, λόγω της πιθανής αλλοίωσης στη μικροβιακή χλωρίδα, θα μπορούσε να μείνει ελεύθερος οικολογικός χώρος και να καταληφθεί από άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς (McDaniel L.S. *et al.*, 2016).

11.4.3. Ολοκυτταρικά εμβόλια

Τα ολοκυτταρικά εμβόλια είναι σε θέση να εκφράζουν όλα τα πρωτεϊνικά αντιγόνα χωρίς να απαιτείται καθαρισμός μεμονωμένων πρωτεϊνών. Έτσι, θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως οικονομική εναλλακτική λύση στα σημερινά εμβόλια που βασίζονται σε πολυσακχαρίτες, στις αναπτυσσόμενες χώρες. Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι τα εμβόλια από αδρανοποιημένα μικρόβια ή από ζωντανά εξασθενημένα στελέχη χωρίς κάψα ήταν σε θέση να προσφέρουν προστασία ανεξάρτητη από τον ορότυπο και να προκαλέσουν τόσο χυμικές όσο και κυτταρικές απαντήσεις έναντι πολλαπλών αντιγόνων σε ζωικά μοντέλα (Lieberman C. *et al.*, 2008, Lu Y.J. *et al.*, 2010, Goncalves V.M. *et al.*, 2014, Kim S.J. *et al.*, 2019, Malley R. *et al.*, 2001).

Η άποψη ότι ένα ζωντανό εξασθενημένο εμβόλιο πνευμονιόκοκκου ενέχει μεγαλύτερους κινδύνους οφείλεται στην τάση του *S. pneumoniae* να μπορεί να λύσει τα κύτταρα χρησιμοποιώντας τον εξαρτώμενο από την πρωτεΐνη lytA μηχανισμό και να απελευθερώσει την τοξίνη πνευμονολυσίνη μαζί με γενετικό υλικό που θα μπορούσε να προσληφθεί από γειτονικά κύτταρα πνευμονιόκοκκου (VanderPoll T., Opal S.M., 2009).

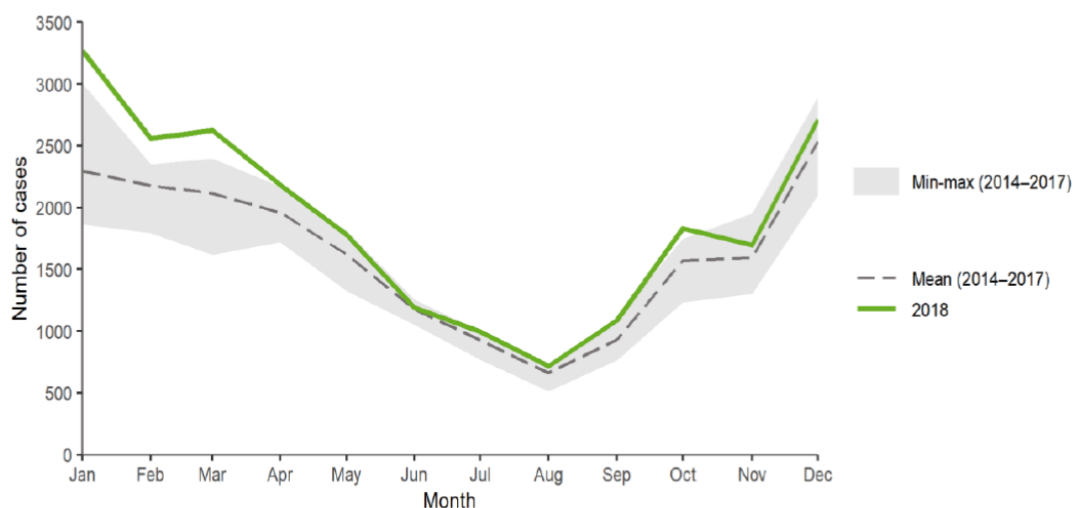
Επομένως, θεωρητικά, ένα αδρανοποιημένο εμβόλιο θα μπορούσε να είναι πολύ πιο ασφαλές από ένα ζωντανό εξασθενημένο εμβόλιο.

12. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο *Streptococcus pneumoniae* είναι ένα παθογόνο μικρόβιο αποκλειστικά για τον άνθρωπο. Δε ζει στο περιβάλλον. Αποικίζει τον ρινοφάρυγγα του ανθρώπου, που αποτελεί τη δεξαμενή του μικροβίου. Πριν από κάθε λοίμωξη προηγείται αποικισμός του ρινοφάρυγγα από το συγκεκριμένο στέλεχος. Το ποσοστό του αποικισμού για τους ενήλικες είναι 5-10%, ενώ στα παιδιά κυμαίνεται από 20-40% και μπορεί να φθάσει το 60% σε παιδιά που πηγαίνουν σε βρεφονηπιακούς σταθμούς (Christenson B. *et al.*, 1997, Henderson F.W. *et al.*, 1988). Τα ποσοστά φορείας είναι αυξημένα κατά την διάρκεια του χειμώνα (Marchisio P. *et al.*, 2001). Συνθήκες συγχρωτισμού ευνοούν την πιθανότητα και τη συχνότητα του αποικισμού. Η διάρκεια της μικροβιοφορείας εξαρτάται από την ηλικία και τον ορότυπο. Σε μελέτη που έγινε σε παιδιά, βρέθηκαν αποικισμένα από τον 6ο μήνα και η φορεία διήρκεσε 4 μήνες. Αντίθετα σε ενήλικες ο αποικισμός διαρκεί λιγότερο (2-4 βδομάδες) (Gray B.M., Dillon H.C. Jr, 1988, Ekdahl K. *et al.*, 1997).

Η εποχή παίζει ρόλο στην εμφάνιση των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, οι οποίες είναι συχνότερες από τον Νοέμβριο έως τον Απρίλιο (ECDC, AER 2018, Εικόνα 13).

Εικόνα 13: Κατανομή επιβεβαιωμένων κρουσμάτων IPD ανά μήνα, EU/EEA, 2018 και 2014-2017.



Πηγή: ECDC, 2020 https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_IPD.pdf

Οι ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού ευνοούν τις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις (Kim P. *et al.*, 1996). Στα παιδιά αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων από *Streptococcus pneumoniae* παρατηρήθηκε κατά την σχολική περίοδο.

Οι πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις είναι συχνότερες σε νεογνά και βρέφη έως 2 ετών, στη συνέχεια το ποσοστό μειώνεται, ενώ αυξάνεται πάλι σε ενήλικες >65 ετών (Burman L.A. *et al.*, 1985, ECDC, 2020).

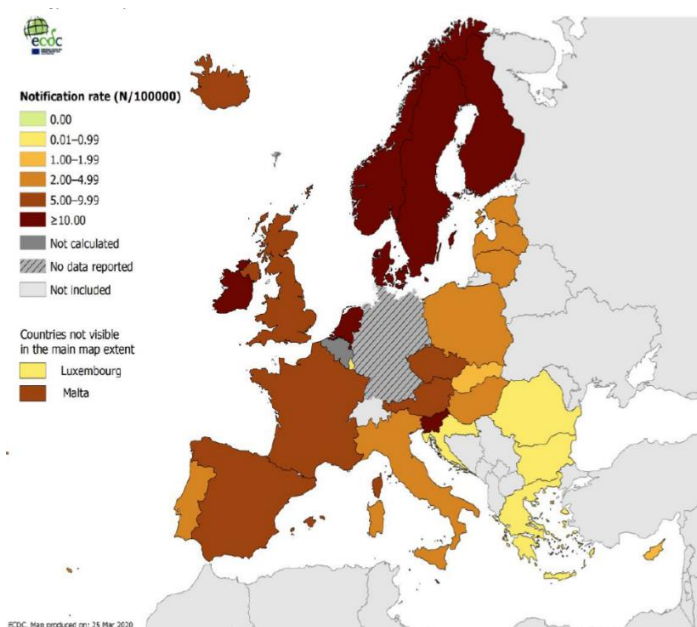
Ορισμένες φορές υπάρχει παρατεταμένη φορεία ενός συγκεκριμένου στελέχους, αλλά σπάνια αυτό προκαλεί λοίμωξη. Συνήθως λοίμωξη προκαλούν τα στελέχη που έχουν αποκτηθεί πρόσφατα. Παιδιά που δεν έχουν αδέρφια έχουν την τάση να αποικίζονται αργότερα και από λιγότερα στελέχη (Yagupsky P. *et al.*, 1998).

Υπάρχει η τάση ορότυποι που είναι λιγότερο ανοσογονικοί να αποικίζουν το ρινοφάρυγγα μικρών παιδιών για μεγαλύτερο διάστημα σε σχέση με ορότυπους που χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο βαθμό ανοσογονικότητα. Επίσης η τοπική παραγωγή αντισωμάτων μπορεί να είναι σημαντικός παράγοντας περιορισμού της διάρκειας φορείας. Ο αποικισμός στους ενήλικες και στα μεγαλύτερα παιδιά έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ειδικού για τον συγκεκριμένο ορότυπο IgG αντισώματος και αυτό στις περισσότερες περιπτώσεις, συμβαίνει χωρίς να υπάρχει εμφανής νόσος.

Οι περισσότεροι ορότυποι του πνευμονιοκόκκου μπορούν να προκαλέσουν νόσο.

Στην Ευρώπη το 2018 αναφέρθηκαν 24.663 επιβεβαιωμένα κρούσματα διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου από 29 χώρες. Η μέση επίπτωση ήταν 6,2 ανά 100.000 πληθυσμού (ECDC, 2020). Η κατανομή των περιστατικών παρουσιάζεται στην εικόνα 14.

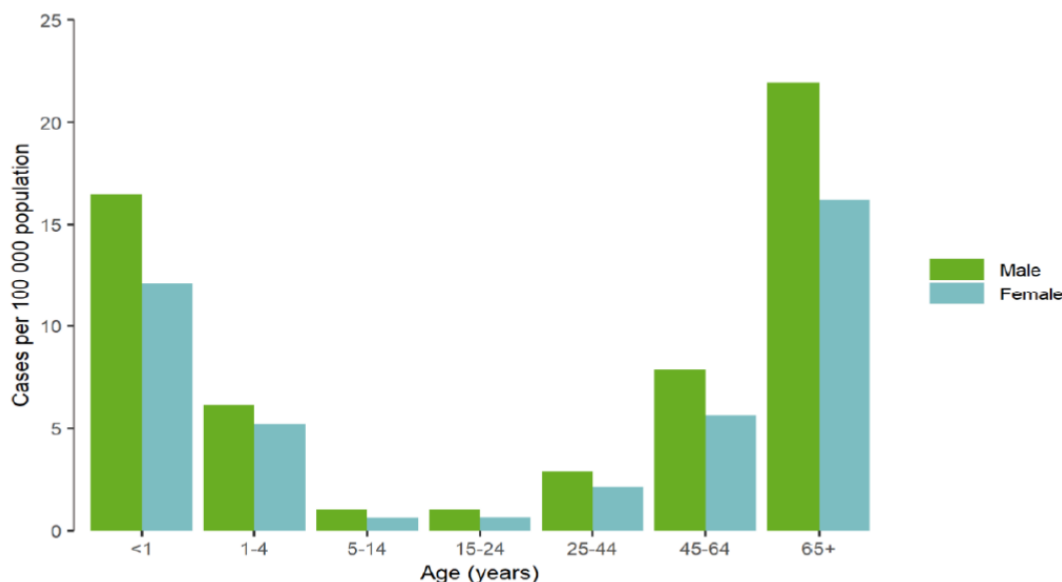
Εικόνα 14: Κατανομή επιβεβαιωμένων περιστατικών IPD ανά 100.000 πληθυσμού ανά χώρα, EU/EEA, 2018.



Πηγή: ECDC, 2020 https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_IPD.pdf

Οι περισσότερες περιπτώσεις IPD αφορούσαν κυρίως σε ηλικιωμένους και σε βρέφη, με 18,7 επιβεβαιωμένα κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού σε ενήλικες ηλικίας 65 ετών και άνω και 14,4 επιβεβαιωμένα κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού σε βρέφη κάτω του ενός έτους (Εικόνα 15).

Εικόνα 15: Κατανομή επιβεβαιωμένων περιστατικών διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου ανά 100.000 πληθυσμού, ανά ηλικία και φύλο, EU/ΕΕΑ, 2018.

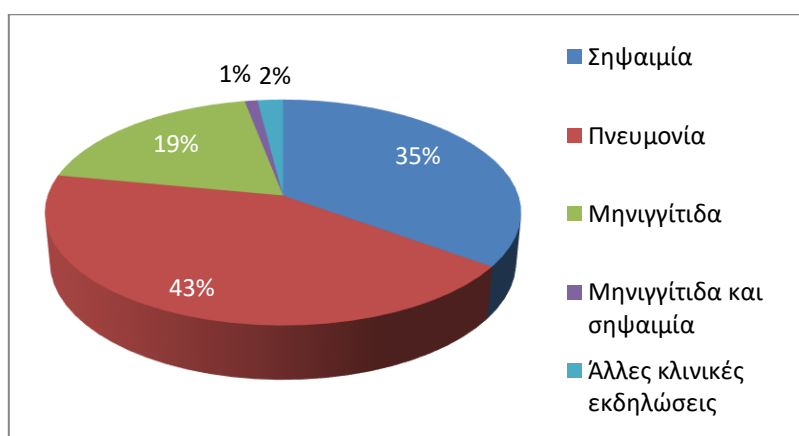


Πηγή: ECDC, 2020 https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_IPD.pdf

Τα ποσοστά της νόσου ήταν χαμηλότερα σε άτομα ηλικίας 5-24 ετών (0,8 επιβεβαιωμένα κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού). Το ποσοστά ήταν υψηλότερα στους άνδρες σε όλες τις ηλικιακές ομάδες (ECDC, 2020).

Οι κλινικές εκδηλώσεις φαίνονται στο διάγραμμα 1.

Διάγραμμα 1: Κλινικές εκδηλώσεις IPD στην Ευρώπη το 2018.

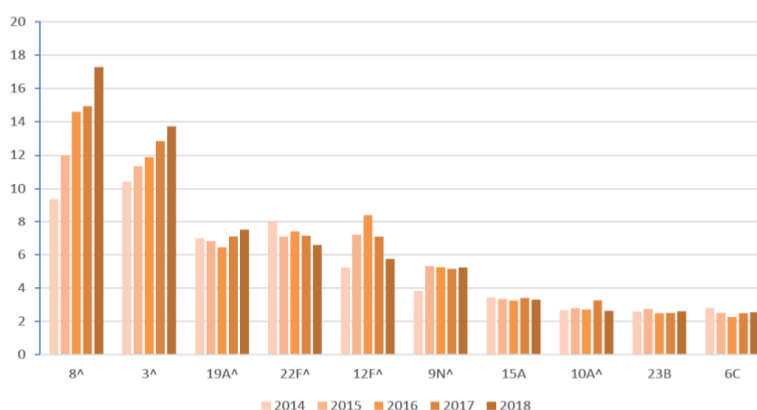


Πηγή: ECDC, 2020 https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_IPD.pdf

Η κλινική εικόνα ήταν γνωστή για το 34% όλων των περιπτώσεων. Από αυτές, σηψαιμία αναφέρθηκε στο 35%, πνευμονία στο 43%, μηνιγγίτιδα στο 19%, μηνιγγίτιδα και σηψαιμία στο 1%, ενώ σε 2% είχε άλλες κλινικές εκδηλώσεις (ECDC, 2020).

Οι δέκα πιο συχνοί ορότυποι (για τα περιστατικά στα οποία ήταν γνωστός ο ορότυπος) ήταν οι: 8, 3, 19A, 22F, 12F, 9N, 15A, 10A, 23B, 6C (κατά σειρά μειούμενης συχνότητας), αντιπροσωπεύοντας το 70% όλων των περιπτώσεων με γνωστό ορότυπο το 2018. Η κατανομή αυτών των οροτύπων κατά την περίοδο 2014-2018 παρουσιάζεται στο διάγραμμα 2.

Διάγραμμα 2: Κατανομή οροτύπων επιβεβαιωμένων περιπτώσεων διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου κατά τα έτη 2014-2018: οι πιο κοινοί ορότυποι *S. Pneumoniae* για το 2018.



Πηγή: ECDC, 2020 https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_IPD.pdf

Η κατανομή των οροτύπων διέφερε ανάλογα με την ηλικιακή ομάδα. Οι πέντε πιο συνηθισμένοι ορότυποι σε κάθε ηλικιακή ομάδα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

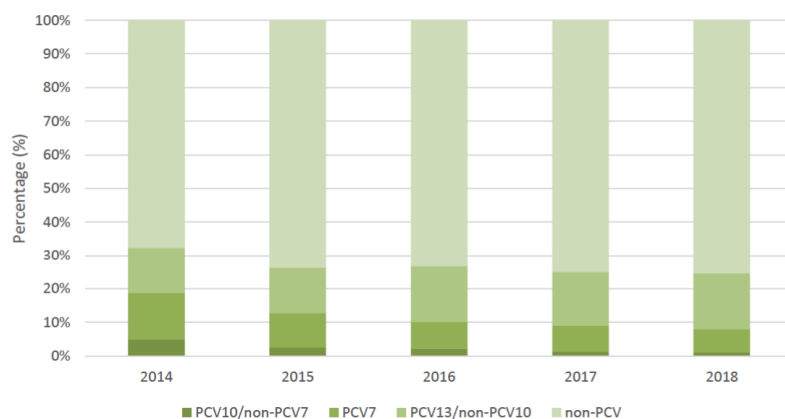
Πίνακας 9: Ποσοστά των πέντε πιο συχνών οροτύπων *S. pneumoniae* από επιβεβαιωμένα κρούσματα διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου, ανά ηλικιακή ομάδα, 2018.

<1 έτους	1-4 ετών	5-14 ετών	15-24 ετών	25-44 ετών	45-64 ετών	≥65 ετών
8 (11%)	24F (12.2%)	8 (10%)	8 (32.5%)	8 (28%)	8 (21.5%)	3 (14.7%)
10A (8.4%)	3 (9.2%)	19A (8.3%)	12F (10%)	3 (11.3%)	3 (14.6%)	8 (14%)
3 (7.6%)	19A (8.4%)	12F (7.5%)	19A (8.7%)	12F (9.5%)	19A (7.2%)	19A (7.6%)
19A (7.0%)	12F (7.3%)	23B (7.1%)	3 (7.3%)	19A (7.6%)	12F (7.1%)	22F (7.4%)
24F (6,5%)	23B (7.3%)	3 (5%)	33F (4.7%)	9N (4.5%)	22F (6.4%)	9N (5.4%)

Πηγή: ECDC, 2020 https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_IPD.pdf

Στα παιδιά κάτω των πέντε ετών, υπήρξε μείωση στο ποσοστό των ορότυπων PCV7 από 14% σε 6%, και στο ποσοστό των ορότυπων PCV10/μη-PCV7 από 5 % σε 1% (Διάγραμμα 3). Υπήρξε μια ελαφρά αύξηση στην αναλογία των ορότυπων PCV13/non-PCV10 μεταξύ 2013 και 2017 (από 13% σε 16% αντίστοιχα) και μια αύξηση στους non-PCV ορότυπους από 68% σε 75% (ECDC, 2020).

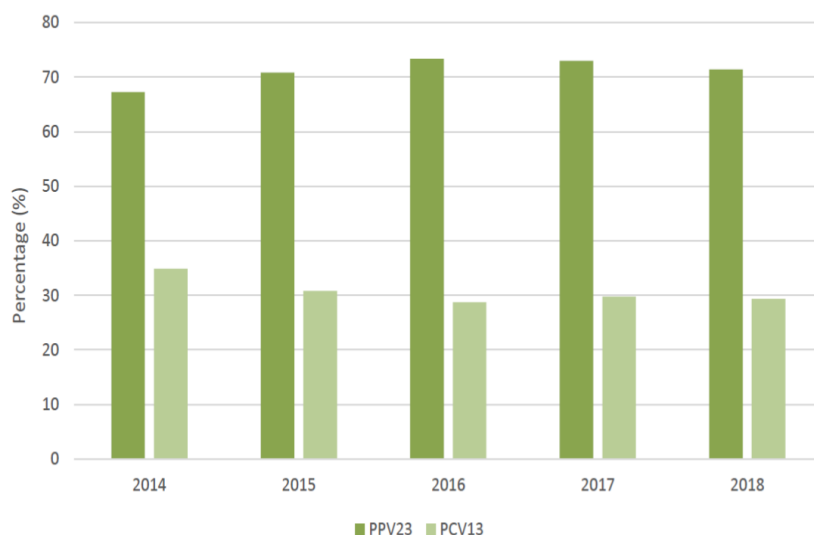
Διάγραμμα 3: Επιβεβαιωμένες περιπτώσεις διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου σε παιδιά ηλικίας < 5 ετών: κατανομή ανά ορότυπο PCV και έτος, 2014-2018.



Πηγή: ECDC, 2020 https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_IPD.pdf

Σε άτομα ηλικίας 65 ετών και άνω, υπήρξε μείωση στο ποσοστό των ορότυπων PCV13 από 35% σε 29% (Διάγραμμα 4). Το ποσοστό διεισδυτικής νόσου που προκλήθηκε από τους ορότυπους PPV23 κυμάνθηκε μεταξύ 67% και 73%. (ECDC, 2020).

Διάγραμμα 4: Επιβεβαιωμένες περιπτώσεις διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου σε ηλικίες >65 ετών: κατανομή ανά τύπο εμβολίου και έτος, 2014-2018.



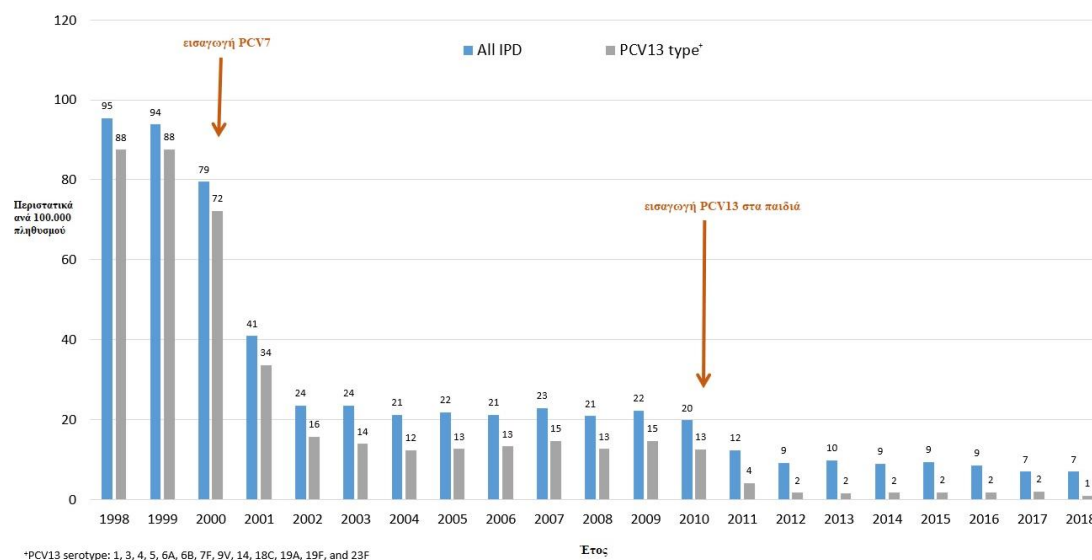
Πηγή: ECDC, 2020 https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_IPD.pdf

Στις Ηνωμένες Πολιτείες η διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσος μειώθηκε δραματικά τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες μετά την εισαγωγή των συζευγμένων εμβολίων για τον πνευμονιόκοκκο (βλ. σχήματα παρακάτω). Το κέντρο ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων των ΗΠΑ (CDC) συνέστησε για πρώτη φορά το PCV7 το 2000 και το PCV13 το 2010.

Από το 1998 έως το 2018, τα ποσοστά διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου στα παιδιά κάτω των 5 ετών μειώθηκαν κατά 93%. Η διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσος που προκαλείται από τους 13 ορότυπους που καλύπτονται από το PCV13 μειώθηκε κατά 98% σε παιδιά κάτω των 5 ετών κατά την ίδια χρονική περίοδο (CDC, 2020).

Στα παιδιά <5 ετών η συνολική επίπτωση IPD μειώθηκε από 95 περιπτώσεις ανά 100.000 το 1998 σε 7 περιπτώσεις ανά 100.000 το 2018. Η IPD που προκαλείται από ορότυπους PCV13 μειώθηκε από 88 περιπτώσεις ανά 100.000 το 1998 σε 1 περίπτωση ανά 100.000 το 2018 (Διάγραμμα 5).

Διάγραμμα 5: Μεταβολές στην επίπτωση της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου (IPD) σε παιδιά <5 ετών από το 1998 έως το 2018 στις Ηνωμένες Πολιτείες.

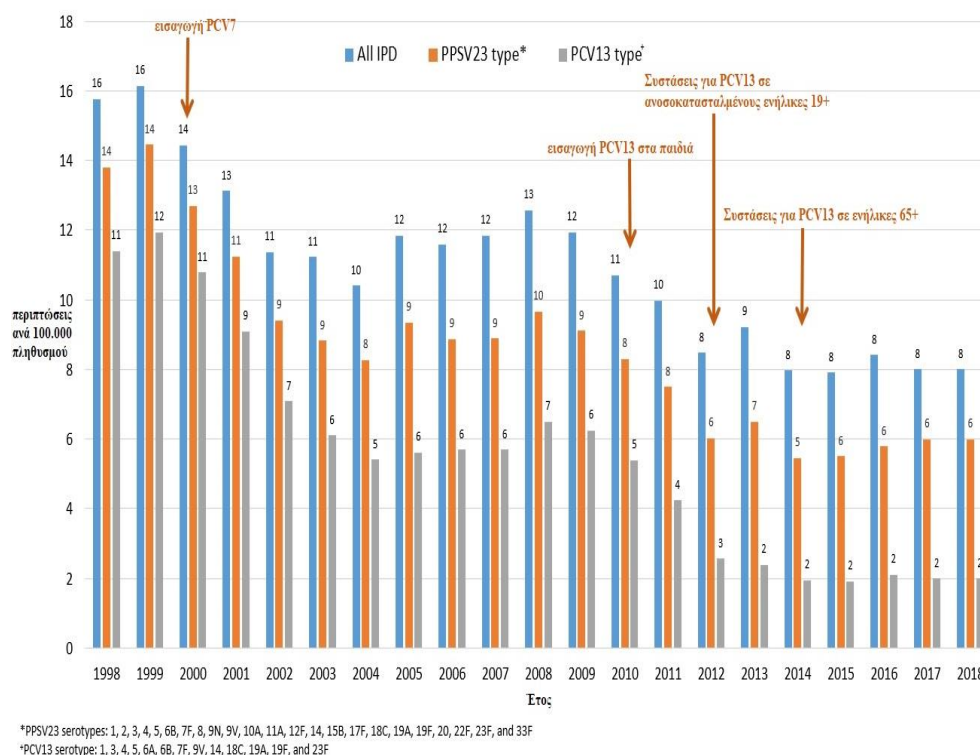


Πηγή: CDC, 2020

Κατά την ίδια χρονική περίοδο στις ηλικίες μεταξύ 19 και 64 ετών η συνολική επίπτωση IPD μειώθηκε από 16 περιπτώσεις ανά 100.000 το 1998 σε 8 περιπτώσεις ανά 100.000 το 2018. Η IPD που προκλήθηκε από ορότυπους PCV13 μειώθηκε από 11 περιπτώσεις ανά 100.000 το 1998 σε 2 περιπτώσεις ανά 100.000 το 2018. Η IPD που προκλήθηκε από ορότυπους PPSV23 μειώθηκε επίσης από 14 περιπτώσεις ανά

100.000 το 1998 σε 6 περιπτώσεις ανά 100.000 το 2018 αλλά αυτό οφείλονταν σε μειώσεις της IPD που προκλήθηκαν από κοινούς ορότυπους με το PCV13 (Διάγραμμα 6).

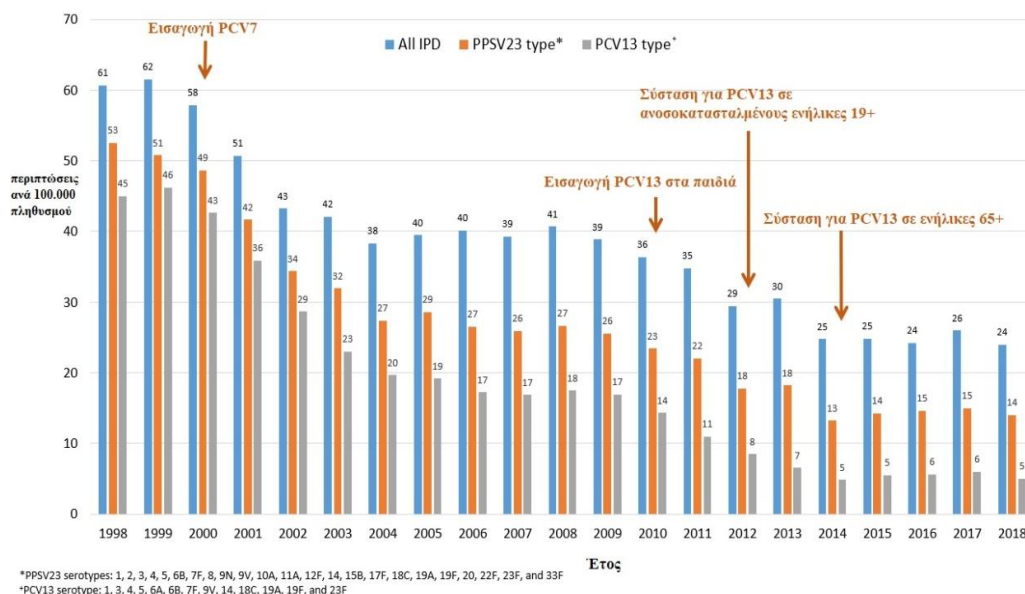
Διάγραμμα 6: Μεταβολές στην επίπτωση της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου (IPD) σε ενήλικες 19-64 ετών από το 1998 έως το 2018 στις Ηνωμένες Πολιτείες.



Πηγή: CDC, 2020

Μεταξύ των ενηλίκων 65 ετών και άνω από το 1998 έως το 2018 στις Ηνωμένες Πολιτείες η συνολική επίπτωση IPD μειώθηκε από 61 περιπτώσεις ανά 100.000 το 1998 σε 24 περιπτώσεις ανά 100.000 το 2018. Η IPD που προκλήθηκε από ορότυπους PCV13 μειώθηκε από 45 περιπτώσεις ανά 100.000 το 1998 σε 5 περιπτώσεις ανά 100.000 το 2018. Η IPD που προκλήθηκε από ορότυπους PPSV23 μειώθηκε επίσης από 53 περιπτώσεις ανά 100.000 το 1998 σε 15 περιπτώσεις ανά 100.000 το 2016, αλλά αυτό πιθανώς οφείλονταν σε μειώσεις της IPD που προκλήθηκαν από κοινούς ορότυπους με τον PCV13 (Διάγραμμα 7).

Διάγραμμα 7: Μεταβολές στην επίπτωση της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου (IPD) σε ενήλικες ≥65 ετών από το 1998 έως το 2018 στις Ηνωμένες Πολιτείες.



Πηγή: CDC, 2020

Στην Ελλάδα σε μελέτες που είχαν γίνει πριν τη κυκλοφορία του 7-δύναμου εμβολίου, είχε βρεθεί ότι οι ορότυποι 14, 19F, 6B, 23F και 18C ήταν υπεύθυνοι για το 96,7% των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών νόσων (IPD) ενώ οι ορότυποι 19F, 9V, 14, 23F και 6B ήταν υπεύθυνοι για το 51% των περιστατικών οξείας ωτίτιδας (AOM) (Levidiotou S. et al., 2006) (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Κατανομή οροτύπων από 338 στελέχη *S. pneumoniae* πριν την εισαγωγή του επταδύναμου συζευγμένου εμβολίου.

Patient group	No. of patients	Serotypes included in the 7valent vaccine					Serotypes not included in the 7valent vaccine								
		19F	23F	6B	14	9V	18C	19A	23A/B	6A	3	33F	11A	15B	NT
IPD															
< 2 years	39	7		7	23		2								
2-5 years	7	1		1	1		4								
> 5 years	14	2	8		2				2						
Total (%)	60	10 (16.6)	8 (13.4)	8 (13.4)	26 (43.4)		6 (10)		2 (3.4)						
AOM															
< 2 years	45	15	4	2	6	10	4			2	1	1			
2-5 years	33	3	1		2	2	1			6	7	7	4		
> 5 years	28	2	1		2	4	1			16				2	
Total (%)	106	20 (18.9)	6 (5.7)	2 (1.9)	10 (9.4)	16 (15.1)	6 (5.7)			24 (22.7)	8 (7.5)	8 (7.5)	4 (3.8)	2 (1.9)	
NC (%)	172	8 (4.6)	40 (23.3)	36 (21)	8 (4.6)	16 (9.4)				8 (4.6)	8 (4.6)		24 (13.9)	16 (9.4)	8 (4.6)

IPD, invasive pneumococcal disease; AOM, acute otitis media; NC, nasopharyngeal carriage.

Πηγή: Levidiotou S. et al., 2006

Σε άλλη μελέτη φάνηκε ότι οι ορότυποι 19F, 9V, 14, 23F και 6B αποτελούσαν το 70,6% του συνολικού αριθμού των στελεχών που παρουσίαζαν αντοχή σε κάποια κατηγορία αντιβιοτικών (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Κατανομή οροτύπων σε στελέχη πνευμονιόκοκκου που παρουσιάζουν αντοχή σε τουλάχιστον 1 κατηγορία αντιβιοτικών.

	Athens (n, %)	Halkida (n, %)	Thessaloniki (n, %)	Ioannina (n, %)	Alexandroupolis (n, %)	Heraклеion (n, %)	Peloponnese (n, %)	Total (n, %)
PCV7* serotypes	80 (70.17)	42 (73.68)	33 (58.92)	10 (76.92)	6 (54.55)	25 (75.76)	30 (90.91)	226 (71.29)
19F	32 (28.07)	20 (35.09)	9 (16.07)	2 (15.38)	3 (27.27)	11 (33.33)	10 (30.3)	87 (27.44)
14	10 (8.77)	6 (10.53)	10 (17.86)			11 (33.33)	3 (9.09)	40 (12.62)
9V	20 (17.54)		2 (3.57)	2 (15.38)			10 (30.3)	34 (10.73)
23F	10 (8.77)	6 (10.53)	6 (10.71)	5 (38.46)	1 (9.09)	1 (3.04)	4 (12.13)	33 (10.41)
6B	8 (7.02)	10 (17.54)	5 (8.93)	1 (7.69)	2 (18.18)	2 (6.06)	2 (6.06)	30 (9.46)
18C			1 (1.79)				1 (3.03)	2 (0.63)
PCV7-related serotypes	17 (14.92)	10 (17.55)	11 (19.66)	0	2 (18.18)	4 (12.12)	0	43 (13.56)
6A	7 (6.14)	3 (5.26)	5 (8.93)		0	2 (6.06)		17 (5.36)
Other related	10 (8.78)	7 (12.29)	6 (10.73)		2 (18.18)	2 (6.06)		26 (8.20)
Non PCV7 serogroups	10 (8.77)	3 (5.26)	8 (14.28)	3 (23.08)	1 (9.09)	2 (6.06)	3 (9.09)	32 (10.1)
Nontypeable strains	7 (6.14)	2 (3.51)	4 (7.14)	0	2 (18.18)	2 (6.06)	0	16 (5.05)
Total	114 (100)	57 (100)	56 (100)	13 (100)	11 (100)	33 (100)	33 (100)	317 (100)

Πηγή: Katsarolis *et al.*, 2009

Σε πιο πρόσφατη αναδρομική μελέτη (Tzanakaki *et al.*, 2014) μελετήθηκαν οι ορότυποι του πνευμονιόκοκκου που προκάλεσαν μηνιγγίτιδα σε τρεις χρονικές περιόδους:

- Περίοδος Α (πριν την εισαγωγή των εμβολίων, 2000-2005)
- Περίοδος Β (μετά την εισαγωγή του 7-δύναμου συζευγμένου εμβολίου, 2006-2010)
- Περίοδος C (μετά την εισαγωγή του 13-δύναμου συζευγμένου εμβολίου, 2011-2012)

Στην περίοδο Α οι πιο συχνοί ορότυποι που προκαλούσαν μηνιγγίτιδα ήταν οι **14** (50%), **23F** (13,4%), και **6** (12,3%). Στην περίοδο Β οι πιο συχνοί ορότυποι που προκαλούσαν τη συγκεκριμένη νόσο ήταν ο **3** (31,3%), ο **19F** (26,8%), ο **6** (21,9%) και ο **19A** (12,5%). Τέλος κατά την περίοδο C παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στη μηνιγγίτιδα, στα ποσοστά όλων των οροτύπων *S. pneumoniae* ιδιαίτερα του **3** (6,5%) και του **19A** (2,6%).

Τέλος σε μελέτη που έγινε στην περιοχή της Κρήτης, μελετήθηκαν στελέχη *Streptococcus pneumoniae* που απομονώθηκαν από ενήλικες κατά τη διάρκεια μιας χρονικής περιόδου 8 ετών από το 2009 έως το 2016. Συνολικά 135 στελέχη *S. pneumoniae* απομονώθηκαν από ενήλικες κατά τη διάρκεια της περιόδου μελέτης

(Πίνακας 12). Είκοσι ένας διαφορετικοί ορότυποι ταυτοποιήθηκαν με τους 17F, 15A, 3, 19A και 11A, να είναι οι περισσότεροι συχνοί (Maraki S. *et al.*, 2018).

Πίνακας 12: Κατανομή οροτύπων όλων των στελεχών του *Streptococcus pneumoniae* που απομονώθηκαν κατά τις 2 περιόδους μελέτης.

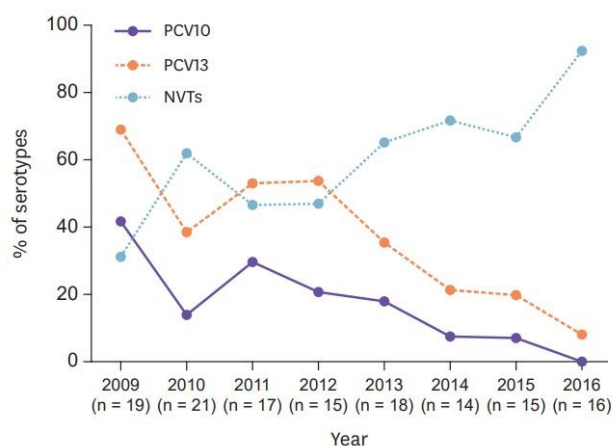
Ορότυποι	Αριθμός στελεχών	
	2009–2013	2014–2016
3 ^a	8	5
4 ^a	1	0
6A ^a	1	0
6B ^a	1	2
7F ^a	8	0
8	2	6
9V ^a	2	1
9N	2	1
10A	2	1
11A	8	4
12F	1	1
14 ^a	4	0
15A	8	6
17F	15	0
19A ^a	13	0
19F ^a	5	0
20	1	2
22F	0	3
23B	6	1
35B	1	6
35F	0	2

^a Ορότυποι που περιλαμβάνονται στο 13-όνομο συζευγμένο εμβόλιο

Πηγή: Maraki S. *et al.*, 2018

Επίσης στη συγκεκριμένη μελέτη γίνεται εμφανής η σταδιακή μείωση των ποσοστών των οροτύπων που περιλαμβάνονται στα συζευγμένα εμβόλια και η ανάδυση νέων μη εμβολιακών οροτύπων (Διάγραμμα 8). Οι περισσότερο συχνοί μη εμβολιακοί αναδυόμενοι ορότυποι ήταν οι 17F, 15A και 11A, με τον 15A να σχετίζεται ισχυρά με μικροβιακή αντοχή (Maraki S *et al.*, 2018).

Διάγραμμα 8: Η ετήσια κατανομή του επιπολασμού των οροτύπων *Streptococcus pneumoniae* (PCV10, PCV13 και NVTs) κατά τη περίοδο μελέτης.



Πηγή: Maraki S. *et al.*, 2018

Ένας αριθμός μελετών έχει καταδείξει την επίδραση των συζευγμένων πνευμονιοκοκκικών εμβολίων (PCV) στη μείωση της επίπτωσης της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου (IPD). Παρείχαν επίσης στοιχεία για αύξηση των μη εμβολιακών ορότυπων ως αποτέλεσμα της εισαγωγής των συζευγμένων πολυσακχαριδικών εμβολίων, PCV10 και PCV13 (Flasche S. *et al.*, 2011, D'Ancona F. *et al.*, 2015, Waight P.A. *et al.*, 2015).

Επιπλέον, ο εμβολιασμός βρεφών και μικρών παιδιών είχε ως αποτέλεσμα την έμμεση προστασία των μεγαλύτερων ενηλίκων μειώνοντας τη ρινοφαρυγγική μεταφορά και μετάδοση του βακτηρίου στα παιδιά και συμβάλλοντας στη μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας στις μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες (Flasche S. *et al.*, 2011, D'Ancona F. *et al.*, 2015, Waight P.A. *et al.*, 2015, Tocheva A.S *et al.*, 2011).

Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να συνεχιστεί η παρακολούθηση των κυκλοφορούντων ορότυπων προκειμένου να αξιολογηθούν τα τρέχοντα προγράμματα εμβολιασμού και να επικαιροποιηθεί η ανάπτυξη νέων εμβολίων.

B. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

ΣΚΟΠΟΣ

Ο μικροοργανισμός *Streptococcus pneumoniae* (πνευμονιόκοκκος) είναι ένα από τα πιο συχνά και κοινά παθογόνα μικρόβια. Συνολικά, κάθε χρόνο 1,6 εκατ. άνθρωποι στον κόσμο πεθαίνουν από ασθένειες που προκαλούνται από τον πνευμονιόκοκκο, από τους οποίους περίπου 700.000-1.000.000 είναι παιδιά κάτω των 5 ετών (WHO, 2007). Εκτός από τα παιδιά, υψηλού κινδύνου για πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις θεωρούνται τα άτομα τρίτης ηλικίας καθώς και αυτά με ανοσιακό έλλειμμα (π.χ. HIV λοίμωξη, κακοήθεια ή σακχαρώδη διαβήτη) ή χρόνια πνευμονοπάθεια (άσθμα, χρόνια βρογχίτιδα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια) (ECDC, 2010).

Η έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση και τυποποίηση του πνευμονιοκόκκου ως προς τους ορότυπους του, είναι κριτικής σημασίας. Η αυξημένη συχνότητα και η ιδιαίτερη βαρύτητα των διεισδυτικών και μη πνευμονιοκοκκικών νόσων αποτελούν τους κυριότερους λόγους για τους οποίους η επιδημιολογική επιτήρηση των παθογόνων οροτύπων κρίνεται επιβεβλημένη (CDC, 2000). Ο εμβολιασμός είναι σημαντικός όχι μόνο για λόγους πρόληψης, αλλά και λόγω της συνεχούς αυξανόμενης αντοχής στην πενικιλίνη.

Ο προσδιορισμός του ορότυπου βασίζεται στη δομική ποικιλομορφία του πολυσακχαρίτη της κάψας.

Η κύρια μέθοδος οροτυπίας του πνευμονιόκοκκου είναι η αντίδραση Quellung. Ωστόσο το υψηλό κόστος των αντιορών, συνδυαζόμενο με διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ των οροτύπων καθώς επίσης και το γεγονός ότι κάποια στελέχη είναι μη τυποποιήσιμα, είναι τα κύρια αρνητικά στοιχεία της μεθόδου. Επιπλέον, η τεχνική αυτή εξαρτάται από την απομόνωση και ανάπτυξη του μικροοργανισμού η οποία σε αρκετές περιπτώσεις (π.χ. προηγούμενη λήψη αντιβιοτικών) είναι αδύνατη.

Τα τελευταία χρόνια, οι μοριακές τεχνικές έφεραν μια πραγματική επανάσταση καθότι γίνεται δυνατή η άμεση ταυτοποίηση του μικροοργανισμού (Dias, 2007). Η εφαρμογή μοριακών μεθόδων και συγκεκριμένα η χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι ζωτικής σημασίας, στον επιτυχή εντοπισμό των μικροοργανισμών που προκαλούν λοιμώξεις, σε ένα σημαντικό ποσοστό των κλινικών δειγμάτων με αρνητική καλλιέργεια, ιδιαίτερα εκείνων που προέρχονται από φυσιολογικά άσηπτο σημείο, όπως το πλευριτικό υγρό ή υγρό από το μέσο ούς, για να τεθεί η οριστική διάγνωση. Η ακριβής διάγνωση και η αναγνώριση του παθογόνου είναι σημαντική για την αντιμετώπιση του ασθενή και τη στοχευμένη αντιμικροβιακή θεραπεία. (Xirogianni *et*

al., 2013). Προηγούμενη θεραπεία με αντιβιοτικά μπορεί, εν μέρει, να ευθύνεται για την παρατηρούμενη χαμηλή αποτελεσματικότητα των βακτηριακών καλλιέργειών (Tzanakaki *et al.*, 2003), ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι σε ποσοστό έως 60% των θετικών για τον μικροοργανισμό δειγμάτων με χρήση PCR δεν αναπτύσσεται βακτήριο στην καλλιέργεια (Ξηρογιάννη 2010, Xirogianni *et al.*, 2013).

Με την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών απευθείας στα βιολογικά υλικά, ο αιτιολογικός παράγοντας αναγνωρίζεται σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τις συμβατικές καλλιέργειες.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η βελτιστοποίηση μιας νεότερης μεθόδου μοριακής τυποποίησης, βασισμένης στην αλληλούχιση του γονιδίου *wzh* του επιτόπου της κάψας – Capsular Sequencing Typing (CST), με στόχο την εφαρμογή, απ' ευθείας σε κλινικά δείγματα ασθενών με πνευμονιοκοκκική λοίμωξη (αίμα, ΕΝΥ, πλευριτικό υγρό κτλ.). Η εν λόγω μεθοδολογία θα αναπτυχθεί σε μια σχετικά εύκολη, ταχεία και οικονομική μέθοδο, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιείται στην ρουτίνα ενός εργαστηρίου.

Η μέθοδος ήδη χρησιμοποιείται μόνο σε απομονωθέντα βακτηριακά στελέχη στο National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) της Ολλανδίας – όπου και έγινε η αρχική ανάπτυξή της – για τον έλεγχο των στελεχών πνευμονιόκοκκου από θετικές καλλιέργειες (Elberse *et al.*, 2011), ενώ δεν έχει εφαρμοστεί απ' ευθείας σε βιολογικά υλικά.

Η συγκεκριμένη τεχνική θα εφαρμοστεί τόσο σε πρότυπα στελέχη όσο και σε κλινικά δείγματα (αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πλευριτικό υγρό, ωτικό υγρό, βρογχικά εκπλύματα, αιμοκαλλιέργειες, οφθαλμικό υγρό) τα οποία ήταν θετικά ως προς την ταυτοποίηση του *S. pneumoniae* με την υπάρχουσα μοριακή μεθοδολογία multiplex PCR που εφαρμόζεται στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (ΕΚΑΜ) και αρνητικά ως προς την ταυτοποίηση οροτύπου με τις αντίστοιχες multiplex PCR που εφαρμόζονται στο ΕΚΑΜ (αγνώστου οροτύπου).

ΣΤΟΧΟΙ

Πρώτος στόχος της παρούσας μελέτης είναι η ταυτοποίηση του οροτύπου στις περιπτώσεις πνευμονοκοκκικών λοιμώξεων με την χρήση μιας νέας μεθόδου που εφαρμόζεται απευθείας σε κλινικά δείγματα χωρίς να είναι απαραίτητη η απομόνωση του μικροοργανισμού σε καλλιέργεια.

Δεύτερος στόχος της μελέτης είναι επίσης η συλλογή επιδημιολογικών δεδομένων ως προς τους ορότυπους που προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις, όπως η μηνιγγίτιδα, η σηψαιμία και η πνευμονία.

Στην εποχή που διατρέχουμε τα δεδομένα που θα συλλεγούν, αναμένεται να αποτυπώσουν μια καλύτερη απεικόνιση της αποτελεσματικότητας του εμβολιασμού ανά ομάδες πληθυσμού και ανά λοίμωξη.

Γ. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΟ

Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν:

- α) Ταυτοποιημένα και τυποποιημένα στελέχη αναφοράς πνευμονιοκόκκου που αποκτήθηκαν από εργαστήρια της Ευρώπης: National Institute for Health and Welfare (Φινλανδία), National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Centre for Infectious Disease Control (Bilthoven, Ολλανδία), National Reference Centre for Bacterial Meningitis, Dept. of Epidemiology and Clinical Microbiology (National Medicines Institute, Warsaw, Πολωνία).
- β) Στελέχη πνευμονιοκόκκου που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα τα οποία στάλθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (ΕΚΑΜ) κατά τη διάρκεια των ετών 2010-2020 από όλα τα νοσοκομεία της χώρας.
- γ) Κλινικά δείγματα (ολικό αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πλευριτικό υγρό, αρθρικό υγρό, υγρό μέσου ωτός, αιμοκαλλιέργειες, πύον) από ασθενείς με πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις τα οποία εξετάστηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας, κατά τη διάρκεια των ετών 2010-2020 από όλα τα νοσοκομεία της χώρας.

Όλα τα παραπάνω στελέχη και κλινικά δείγματα που εστάλησαν στο ΕΚΑΜ είχαν **ταυτοποιηθεί με multiplex PCR ως θετικά για πνευμονιόκοκκο** (Tzanakaki *et al.*, 2005). Επιπλέον, όλα τα δείγματα ήταν **αρνητικά για τους ορότυπους που ανιχνεύονται στις ήδη εφαρμοζόμενες multiplex PCR** που διενεργούνται στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας για την ανίχνευση 17 οροτύπων πνευμονιόκοκκου:

- i) Πρωτόκολλο multiplexPCR για την ανίχνευση των οροτύπων 1, 3, 14, 19A
- ii) Πρωτόκολλο multiplexPCR για την ανίχνευση των οροτύπων 4, 6, 18, 19F, 23F (Σιουμάλα Μ., και συν 2007)
- iii) Πρωτόκολλο multiplexPCR για την ανίχνευση των οροτύπων 5, 10A, 23B
- iv) Πρωτόκολλο multiplexPCR για την ανίχνευση των οροτύπων 7A/F, 17F, 9N/L
- v) Πρωτόκολλο multiplexPCR για την ανίχνευση των οροτύπων 9A/V, 7C/B/40 (Μαρμαράς Ν. και συν., 2015).

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Καλλιέργεια και επώαση

Όλα τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε αιματούχο άγαρ και επώαστηκαν στους 37°C παρουσία 5% v/v CO₂ για 24 ώρες.

2.1.1. Παρασκευή αιματούχου άγαρ (5% v/v αίμα αλόγου)

1. 39 gr θρεπτικού υλικού (Columbia blood agar base, OXOID CM0331, Hampshire, England) διαλύονται σε 1L απιονισμένο νερό και αναδεύονται υπό θέρμανση μέχρι βρασμού.
2. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15min.
3. Στη συνέχεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο και αφήνεται έως ότου φτάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία (περίπου 55°C).
4. Για την παρασκευή αιματούχου άγαρ, μετά την αποστείρωση και σε θερμοκρασία περίπου 55°C, προστίθενται 50mL απινιδωμένου αίματος αλόγου, ώστε η τελική περιεκτικότητα να είναι 5% κατ' όγκο.
5. Το υλικό αναδεύεται και μοιράζεται στα τρυβλία.
6. Τα τρυβλία αφήνονται να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου, και στη συνέχεια φυλάσσονται στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.2. Συντήρηση βακτηριακών στελεχών

Όλα τα βακτηριακά στελέχη συντηρήθηκαν στους -70°C σε θρεπτικό ζωμό (Heart Infusion Broth, OXOID CM0225, Hampshire, England). Για τη συντήρηση κάθε στελέχους χρησιμοποιήθηκε υλικό από 24ωρο καλλιέργημα. Το υλικό συλλέχθηκε με μικροβιολογικό κρίκο σε στείρες συνθήκες και τοποθετήθηκε σε σωληνάριο που περιείχε 1ml θρεπτικού ζωμού.

2.2.1. Παρασκευή θρεπτικού ζωμού συντήρησης

1. 18,5 gr Brain Heart Infusion Broth (OXOID CM0225, Hampshire, England) διαλύονται σε 500 mL απιονισμένου νερού και αναδεύονται υπό θέρμανση μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.

2. Προστίθενται 125 mL γλυκερόλης και αποστειρώνονται στους 121°C για 15 min.
3. Το υλικό μοιράζεται σε cryovials, σε όγκο ίσο με 1ml.
4. Για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων, τα cryovials τοποθετούνται σε θερμοκρασία 37°C για 24h.
5. Το υλικό συντηρείται στους 4°C.

2.3. Απομόνωση γενετικού υλικού

2.3.1. Απομόνωση γενετικού υλικού από βακτηριακό στέλεχος

Για την απομόνωση DNA από στέλεχος παρασκευάζεται εναιώρημα από 24ωρο καλλιέργημα σε κωνικό σωληνάριο τύπου erpendorf που περιέχει 200 μ L διαλύματος Tris* (10mM Trisbase, 10 mMTris-HCl, pH 7.3).

Αναδεύεται ισχυρά (vortex) και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 100°C για 10min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 12min.

Το υπερκείμενο (που περιέχει το γενετικό υλικό) μεταγγίζεται σε νέο κωνικό σωληνάριο τύπου erpendorf και το ίζημα απορρίπτεται.

Το DNA διατηρείται στους -20°C.

* Παρασκευή διαλύματος Tris

Σε 500 ml απιονισμένο νερό διαλύονται 0.635 gr tris-hcl (tr04251000, scharlau, sentmenat, spain) και 0.118 gr trisbase (tr04251000, scharlau, sentmenat, spain) και αναδεύονται συνεχώς για 20 λεπτά, μέχρι να διαυγάσει πλήρως. Ελέγχεται το pH και αν χρειαστεί ρυθμίζεται ώστε να είναι 7.3 στους 25°C. Τέλος, το διάλυμα φιλτράρεται υπό στείρες συνθήκες και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

2.3.2. Απομόνωση γενετικού υλικού από βιολογικά υλικά

Η απομόνωση DNA από τα κλινικά δείγματα (αίμα, ENY, πλευριτικό υγρό, ωτικό υγρό, βρογχικά εκπλύματα, αιμοκαλλιέργειες) πραγματοποιήθηκε με το MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit στο αυτοματοποιημένο σύστημα απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων MagCore (MagCore HF 16, nucleic acid extraction system, RBC Bioscience, Taiwan).

Σε αυτή τη μέθοδο, μαγνητικά σφαιρίδια προστίθενται στο δείγμα. Σε σωστές συγκεντρώσεις άλατος τα νουκλεϊκά οξέα συνδέονται με τα μαγνητικά σφαιρίδια και ακολουθούν στάδια πλυσίματος. Με αυτό το τρόπο απομακρύνονται τα ανεπιθύμητα συστατικά (π.χ. πρωτεΐνες).

Μετά τα στάδια πλύσης, το DNA ή το RNA απελευθερώνεται από τα μαγνητικά σφαιρίδια με ένα ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης, λαμβάνοντας καθαρό δείγμα έτοιμο για παραπέρα χρήση.

2.4. Πρωτόλλο CST – Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα

2.4.1. PCR

– Επιλογή εκκινητικών μορίων

Στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 13) παρατίθενται οι αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν στο τελικό πρωτόκολλο, όπως αναπτύχθηκε.

Πίνακας 13: Αλληλουχίες εκκινητών.

	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή	Δημοσίευση
Εκκινητές που χρησιμοποιούνται στο πρώτο στάδιο PCR	CST_1F	CATTCGCATATCGTTTTTG	Elberse <i>et al.</i> , 2011 Τροποποιημένο, (χωρίς M-tails)
	CST_2F	CATTCTCACATTATTTTTGATGT	
	CST_3F	CATTCGCACATCGTCTTTG	
	CST_1R	CTGAGCTCTTTTTTCATGA	
	CST_2R	GTGAACTCGTTTCTTCATGA	
	CST_3R	CCGAGCTCTCTTTTTCATAA	
	CST_4R	CCGAGCTCTCTTTTTCATGA	
Εκκινητές που χρησιμοποιούνται στο δεύτερο στάδιο PCR	CST_01-M13F	<u>GTAAAACGACGGCCAG</u> CATTCGCATATCGTTTTTG	Elberse <i>et al.</i> , 2011
	CST_02-M13F	<u>GTAAAACGACGGCCAG</u> CATTCTCACATTATTTTTGATGT	
	CST_03-M13F	<u>GTAAAACGACGGCCAG</u> CATTCGCACATCGTCTTTG	
	CST_01-M13R	<u>CAGGAAACAGCTATGAC</u> CTGAGCTCTTTTTTCATGA	
	CST_02-M13R	<u>CAGGAAACAGCTATGAC</u> GTGAACTCGTTTCTTCATGA	
	CST_03-M13R	<u>CAGGAAACAGCTATGAC</u> CCGAGCTCTCTTTTTCATAA	
	CST_04-M13R	<u>CAGGAAACAGCTATGAC</u> CCGAGCTCTCTTTTTCATGA	
Εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αλληλούχιση	M13F (-20)	<u>GTAAAACGACGGCCAG</u>	
	M13R	<u>CAGGAAACAGCTATGAC</u>	

– Ένζυμο (Πολυμεράση)

Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs, Massachusetts USA) το οποίο ανήκει στην ομάδα των πολυμερασών υψηλής πιστότητας.

Οι πολυμεράσες DNA υψηλής πιστότητας είναι σημαντικές για εφαρμογές στις οποίες η αλληλουχία DNA δεν πρέπει να έχει λάθη μετά την ενίσχυση. Η μοναδική τους δομή, αυξάνει την πιστότητα και την ταχύτητα.

Η πολυμεράση *Phusion DNA* παρέχεται με τυπικό ρυθμιστικό διάλυμα 5X *Phusion HF*, το οποίο περιέχει $MgCl_2$ (1,5 mM στην τελική συγκέντρωση αντίδρασης 1X).

Με ποσοστό σφάλματος >50 φορές χαμηλότερο από αυτό της DNA πολυμεράσης *Taq* και 6 φορές χαμηλότερο από αυτό της DNA πολυμεράσης που προέρχεται από το βακτήριο *Pyrococcus furiosus*, η *Phusion* είναι μία από τις πιο ακριβείς θερμοσταθερές πολυμεράσες που είναι διαθέσιμες.

– Μίγμα δεοξυνουκλεοτιδίων

Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το Deoxynucleotide (dNTP) Solution Set (New England Biolabs, Massachusetts USA). Περιέχει 0,25 ml καθαρού νουκλεοτιδίου από κάθε ένα από τα dATP, dCTP, dGTP και dTTP, σε συγκέντρωση 10 mM.

– Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR, ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται όγκος νερού ίσος με τον όγκο του προστιθέμενου δείγματος (2 μ L). Η χρήση του νερού γίνεται για να ελεγχθούν τυχόν επιμολύνσεις κατά την διενέργεια της PCR.

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται -αντίστοιχος με τον αρνητικό- όγκος δείγματος που περιέχει γενετικό υλικό από στελέχη γνωστών οροτύπων για την PCR-1, ενώ το προϊόν της πρώτης αντίδρασης χρησιμοποιείται σαν δείγμα DNA (template) για τη PCR-2. Ο θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της σωστής λειτουργίας της τεχνικής της PCR.

Για την παρασκευή του θετικού μάρτυρα απομονώνεται γενετικό υλικό από στέλεχος γνωστού οροτύπου και αραιώνεται μέχρι να επιτευχθεί συγκέντρωση 1ng/ μ L. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης γίνεται με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου.

– Πρωτόκολλο PCR-1

Για το πρώτο στάδιο (PCR-1) αναμειγνύονται ανά αντίδραση 0,8mM dNTPs, 0,48U Phusion Taq, 1,1X ρυθμιστικό διάλυμα HF, 0,7 μl μείγμα εκκινητών (VBC, Austria) (10μM/εκκινητή) και 2 μl από το προς τυποποίηση DNA, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 20μl.

Στο πρώτο στάδιο, χρησιμοποιούνται οι primers χωρίς M-tails (Πίνακας 13).

Η αντίδραση πραγματοποιείται στον θερμοκυκλοποιητή Robo Cyclor (Stratagene, USA). Το τελικό πρόγραμμα της αντίδρασης, όπως διαμορφώθηκε για την εκτέλεση του πρώτου σταδίου (PCR-1) παρουσιάζεται στον πίνακα 14.

12 μL από το προϊόν της PCR-1 αναμειγνύονται με 3 μL χρωστικής Gel Red (6X Gel loading dye, Biotium, USA) και ηλεκτροφορούνται, προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη θετικού προϊόντος.

Πίνακας 14: Συνθήκες πρώτου σταδίου (PCR-1).

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
98°C	1min	1
98°C	14sec	
58°C	35sec	14
72°C	38sec	
98°C	13sec	
57°C	34sec	14
72°C	37sec	
98°C	12sec	
56°C	32sec	14
72°C	35sec	
72°C	5min	1
4°C	∞	

– Πρωτόκολλο PCR-2

Όσα δείγματα δώσουν θετικό προϊόν στο πρώτο στάδιο, υποβάλλονται σε δεύτερο στάδιο PCR (PCR-2). Για το δεύτερο στάδιο (PCR-2) αναμειγνύονται ανά αντίδραση 0,6 mM dNTPs, 0,5U PhusionTaq, 0,9X ρυθμιστικό διάλυμα HF, 0,6 μl μείγμα εκκινητών (10μM/εκκινητή) και 2 μl από το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR σε συνολικό όγκο αντίδρασης 20 μl.

Στο δεύτερο στάδιο, χρησιμοποιούνται οι primers με M-tails (Πίνακας 13), οι οποίοι ενισχύουν επιπλέον τα προϊόντα του πρώτου σταδίου, ενώ ταυτόχρονα ενσωματώνουν στο προϊόν τις M-ουρές, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την αντίδραση αλληλούχισης που θα ακολουθήσει.

Η αντίδραση πραγματοποιείται στο θερμοκυκλοποιητή Piko Thermal Cycler (Finnzymes/Thermo Scientific, Waltham, MA USA). Το τελικό πρόγραμμα της αντίδρασης, όπως διαμορφώθηκε για την εκτέλεση του δεύτερου σταδίου (PCR-2) παρουσιάζεται στον πίνακα 15.

Πίνακας 15: Τελικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR-2.

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
98°C	1min	
98°C	10sec	
55°C	30sec	20
72°C	20sec	+0,5°C/κύκλο
98°C	10sec	
66°C	30sec	22
72°C	20sec	
72°C	5min	
4°C	∞	

5 μL από το προϊόν της PCR-2 αναμειγνύονται με 1μL χρωστικής Gel Red (6X Gel loading dye, Biotium, USA) και ηλεκτροφορούνται, προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη θετικού προϊόντος.

2.4.2. Ηλεκτροφόρηση

- Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων της PCR γίνεται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (w/v)*, με μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp (Gene Ruler 100bp, Fermentas USA).

Τα προϊόντα της PCR αναμιγνύονται με χρωστική GelRed (6X Gel loading dye, Biotium, USA) σε αναλογία 1:6 και ηλεκτροφορούνται σε τάση 110V.

Τα αποτελέσματα γίνονται ορατά σε τράπεζα UV ακτινοβολίας.

* Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

1. Ζυγίζεται ποσότητα αγαρόζης (HT Biotechnology Ltd.) για την παρασκευή πηκτώματος περιεκτικότητας 2% σε αγαρόζη. Η ποσότητα της αγαρόζης που ζυγίζεται εξαρτάται από το μέγεθος του πηκτώματος που χρειάζεται να παρασκευαστεί, ανάλογα με τις θέσεις φορτώματος που χρειάζονται.
2. Προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος TEB 1X (Tris-EDTA-Boric Acid, AppliChem, Barcelona, Spain) (100 ml). Το διάλυμα αναδεύεται και βράζει μέχρι να διαλυθεί.
3. Ρίχνουμε το πήκτωμα στο ειδικό καλούπι με τις θέσεις φορτώματος και περιμένουμε να πήξει.

2.4.3. Καθαρισμός και αλληλούχιση προϊόντων

Το υπόλοιπο από το τελικό προϊόν της PCR-2 (15μL), καθαρίζεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντων PCR, του κιτ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Γερμανία), σε τελικό όγκο έκλουσης 30μL.

Για να ελεγχθεί η απόδοση του καθαρισμού, 5μL του καθαρισμένου προϊόντος αναμιγνύονται με 1μL διάλυμα χρωστικής GelRed (6X Gel loading dye, Biotium, USA) και απεικονίζεται υπό υπεριώδη φθορισμό μετά από ηλεκτροφόρηση σε 2,0% (w/v) τζελ αγαρόζης. Τα καθαρισμένα προϊόντα στέλνονται για αλληλούχιση σε εξωτερικό εργαστήριο που παρέχει υπηρεσίες αλληλούχισης (Cemia, Λάρισα).

2.4.4. Ανάλυση αλληλουχιών

Τα χρωματογραφήματα αναλύονται με τη χρήση του λογισμικού ChromasPro της εταιρείας Technelysium (Technelysium Pty Ltd Brisbane, Australia).

Οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που προέρχονται από τις δύο αλυσίδες DNA συγκρίνονται μεταξύ τους με το δωρεάν διαδικτυακό λογισμικό Nucleotide Blast του Εθνικού Ινστιτούτου Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας (National Center for Biotechno-

logy Information) των ΗΠΑ – ελεύθερη πρόσβαση στο: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Μετά την ανάλυση και τις απαιτούμενες διορθώσεις οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων εισάγονται στο *S. pneumoniae* CST TypingTool (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/spn>) και αποδίδεται ο ορότυπος (δωρεάν διαδικτυακή βάση δεδομένων του Εθνικού Ινστιτούτου Δημόσιας Υγείας και Περιβάλλοντος, RIVM, Ολλανδία).

2.4.5. Πρόσθετα πρωτόκολλα PCR

Για τις περιπτώσεις στις οποίες δεν αποδίδεται ένας μοναδικός ορότυπος με το CST, αλλά ομάδα οροτύπων (δύο ή τρεις) εφαρμόζονται πρόσθετα πρωτόκολλα μεμονωμένων PCR έτσι ώστε να γίνει, εάν αυτό είναι δυνατό, η ταυτοποίηση ενός οροτύπου.

Όλα τα πρόσθετα πρωτόκολλα διενεργούνται στο ίδιο πρόγραμμα όπου και αναμειγνύονται: 1X Kara 2G Fast Multiplex (Kara biosystems, Νότια Αφρική) και 0,3 μM από κάθε εκκινητή (Πίνακας 17), ενώ προστίθενται 2 μl δείγματος DNA σε συνολικό όγκο αντίδρασης 20 μl.

Η αντίδραση πραγματοποιείται στο θερμοκυκλοποιητή Piko Thermal Cycler (Finnzymes/Thermo Scientific).

Το πρόγραμμα όπως χρησιμοποιείται για την εκτέλεση των πρόσθετων αντιδράσεων PCR παρουσιάζεται στον πίνακα 16.

Πίνακας 16: Τελικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται για τα πρόσθετα πρωτόκολλα PCR.

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
98 °C	30sec	1
98 °C	5sec	
65 °C	12sec	11
72 °C	15sec	(-0,2 °C/κύκλος)
98 °C	5sec	
63 °C	12sec	27
72 °C	15sec	
72 °C	1 λεπτό	1
4°C	∞	

Τα προϊόντα της αντίδρασης αναμειγνύονται με 3μl διαλύματος χρωστικής GelRed (6X Gel loading dye, Biotium, USA) και ηλεκτροφορούνται σε αгарόζη 2,0% (w/v).

Πίνακας 17: PCR-εκκινητές που χρησιμοποιούνται στις πρόσθετες αντιδράσεις PCR για την ταυτοποίηση ενός μεμονωμένου ορότυπου μεταξύ της συγκεκριμένης ομάδας ορότυπων που αποδίδονται από το CST.

Αποδιδόμενος ορότυπος με CST	Επιπρόσθετες αντιδράσεις PCR			
	Ορότυπος	Εκκινητές	Προϊόν (bp)	Δημοσίευση
11A/D, 18F	11A/D	11A-F- GGACATGTT CAGGTGATTCCCAATATAGTG	463bp	Pai et al.
		11A-R-GATTATGAGTGTAATTTATCCAACTTCTCCC		
	18	18-F-GCATCTGTACAGTGTGCTAATTGGATTGAAG	354bp	Brito et al.
		18-R-CITTAACATCTGACTTTTTCTGTCCCAAC		
22A/F, 15B/C	22A/F	22A/F-F-GAGTAT AGC CAG ATTATGGCAGTT TTATTGTC	643bp	Pai et al.
		22A/F-R-CTCCAGCACTTGCCTGGAAACAACAGACAAC		
	22F	22F-F- CTGTCAAGTATGCTGAGGATTTG	82bp	Velusamy et al.
		22F-R- AGATTTCTCCTGGATATAATGCGAT		
	22A	22A-F-CCCAGGACAATCACAAGAATA	84bp	
		22A-R-TGATGCTTGGCCAAATTGGAG		
15B/C	15B/C-F-TTGGAAATTTTTAATTAGTGGCTTACCTA	496bp	Pai et al.	
15B/C, 23F	15B/C-R-CATCCGCTTATTAATTGAAGTAATCTGAACC			
23F	23F-F-TGGTAGTGACAGCAACGA	177bp	Lawrence et al.	
	23F-R-CAAAGGCTAATTCAGCATC			
12F/B	12F/44	12F/44-F- TTCGGAGGGTCCGATTATATTT	149bp	Velusamy et al.
		12F/44-R- CTTTGGTAATCCACTGTTCTGG		
20,13	20	20-F- GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G	514bp	Pai et al.
		20-R- CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTTATC		
	13	13-F-TACTAA GGTAAT CTCTGG AAATCGAAAGG	655bp	Da Gloria Carvalho
		13-R-CTCATGCATTTTAT AACCGCTTT ITG TTC		

Πηγή: Marmaras N. *et al.*, 2021

2.5. Ειδικότητα της μεθόδου

Η ειδικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με τον έλεγχο των ήδη τυποποιημένων μικροβιακών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν. Η τυποποίηση είχε γίνει είτε με αντίδραση Quellung είτε με μοριακές τεχνικές.

2.6. Πειραματικά στάδια για την ανάπτυξη της μεθόδου

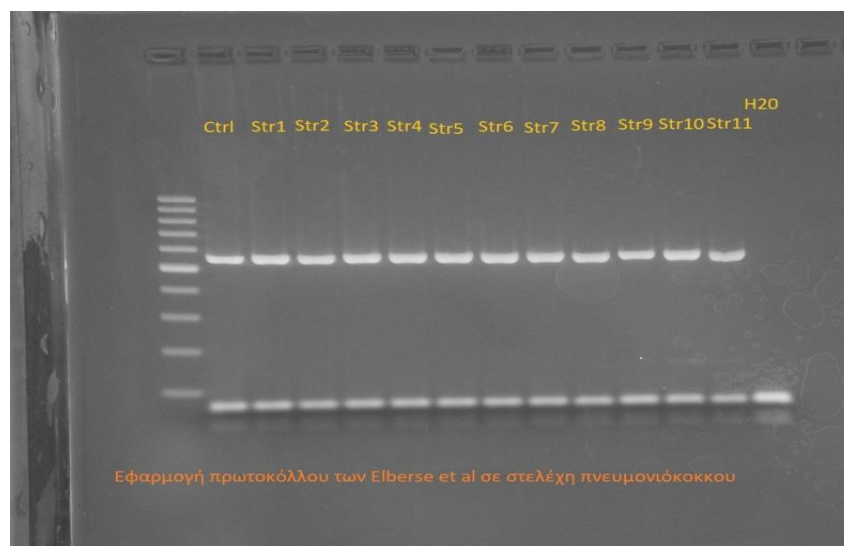
1) Εφαρμογή της μεθόδου CST σε στελέχη

Αρχικά, η μέθοδος CST εφαρμόστηκε σε DNA βακτηριακών στελεχών (10 ng ανά αντίδραση) που υπήρχαν στο ΕΚΑΜ, με τις συνθήκες και συγκεντρώσεις προσαρμοσμένες, σύμφωνα με αυτές που περιγράφονται από τους Elberse και συν. Εν συντομία, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μL, προστέθηκαν 0,3μL (2U/μL) Phusion Taq Polymerase, 4,8μL HF buffer 5X, 0,4μL dNTPs (40 mM), 1μL primermix (10μM από κάθε έναν από τους primers με M-tails του πίνακα 13).

Το πρόγραμμα της αντίδρασης αποτελούνταν από: αρχικό χρόνο αποδιάταξης, 15 min στους 95°C, ακολουθούμενο από 20 sec στους 95°C, 30 sec στους 51 °C, και 30 sec στους 72 °C για 35 κύκλους. Ο τελικός χρόνος επέκτασης ήταν 7 min στους 72 °C και στη συνέχεια τα προϊόντα παρέμεναν στους 4 °C μέχρι την ηλεκτροφόρηση τους.

Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά, ως προς την απόδοση της PCR και το χαρακτηρισμό του οροτύπου (Εικόνα 16).

Εικόνα 16: Εφαρμογή αρχικού πρωτοκόλλου των Elberse *et al.*, σε 11 στελέχη πνευμονιόκοκκου.



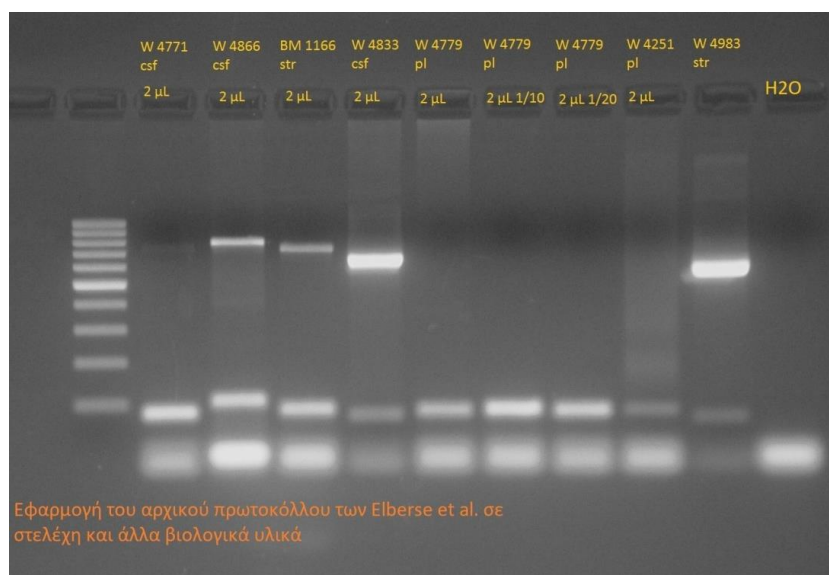
Str: βακτηριακό στέλεχος

2) Εφαρμογή της μεθόδου CST σε κλινικά δείγματα

Ακολούθως, έγινε εφαρμογή της μεθόδου απευθείας σε κλινικά δείγματα (ΕΝΥ, πλευριτικό, αίμα κτλ.) τα οποία είχαν αποσταλεί στο ΕΚΑΜ από διάφορα νοσοκομεία της Ελλάδας.

Τα κλινικά δείγματα περιέχουν ποσότητα γενετικού υλικού που ποικίλει ανάλογα με το μικροβιακό φορτίο, καθώς και μεγάλη ποσότητα ανθρώπινου γενετικού υλικού, με αποτέλεσμα, η απόδοση της αντίδρασης PCR να μην είναι το ίδιο ικανοποιητική με τα στελέχη. Όπως φαίνεται ενδεικτικά στην εικόνα 17, τα δείγματα με κωδικούς W4771csf, W4779pl και W4251pl (κλινικά δείγματα ENY και πλευριτικού υγρού αντίστοιχα) δεν έδωσαν θετικό προϊόν.

Εικόνα 17: Εφαρμογή αρχικού πρωτοκόλλου των Elberse *et al.*, σε στελέχη πνευμονιόκοκκου και άλλα βιολογικά υλικά.



Str: βακτηριακό στέλεχος, Csf: εγκεφαλονωτιαίο υγρό, Pl: πλευριτικό υγρό

3) Βελτιστοποίηση παραμέτρων της αντίδρασης με σκοπό την εφαρμογή της τεχνικής σε κλινικά δείγματα

Στη συνέχεια, έγινε εκτεταμένη προσπάθεια βελτιστοποίησης της αντίδρασης (βελτιστοποίηση συνθηκών προγράμματος και συγκεντρώσεων αντιδραστηρίων) έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση (παραγωγή θετικών προϊόντων) απευθείας στα κλινικά δείγματα. Οι αλλαγές-τροποποιήσεις εφαρμόστηκαν διαδοχικά. Κάθε τροποποίηση αξιολογούνταν ως προς την απόδοση της αντίδρασης.

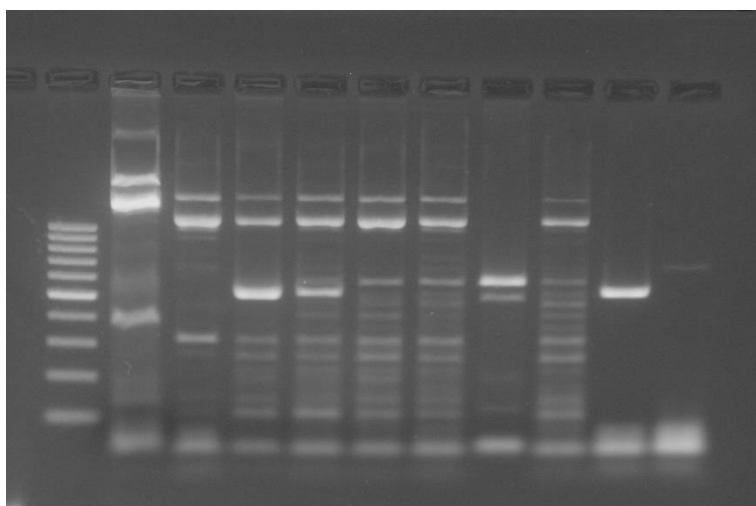
Ενδεικτικά, ακολουθούν τα αποτελέσματα για ορισμένες δοκιμές-τροποποιήσεις που έγιναν στις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων:

– **Μεταβολές στη συγκέντρωση του ενζύμου:** Αρχικά, έγινε δοκιμή αύξησης της συγκέντρωσης του ενζύμου που προστίθεται στην αντίδραση από 0,6U σε 0,7U.

Στην εικόνα 18 φαίνεται η εφαρμογή της PCR σε κλινικά δείγματα με την αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου. Στην πρώτη διαδρομή φαίνεται ο μάρτυρας μοριακού

βάρους (M), στις διαδρομές 2 έως 9 έχουν φαινόνται τα αποτελέσματα από διάφορα κλινικά δείγματα, στη διαδρομή 10 το αποτέλεσμα δείγματος στελέχους (control) και στη τελευταία διαδρομή (11) είναι ο αρνητικός μάρτυρας (H₂O). Όπως γίνεται αντιληπτό, η αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου, επέφερε την παραγωγή πολλαπλών μη ειδικών προϊόντων στην αντίδραση (διαδρομές 2-9) καθιστώντας αδύνατο τον προσδιορισμό του ζητούμενου (ειδικού προϊόντος) προϊόντος.

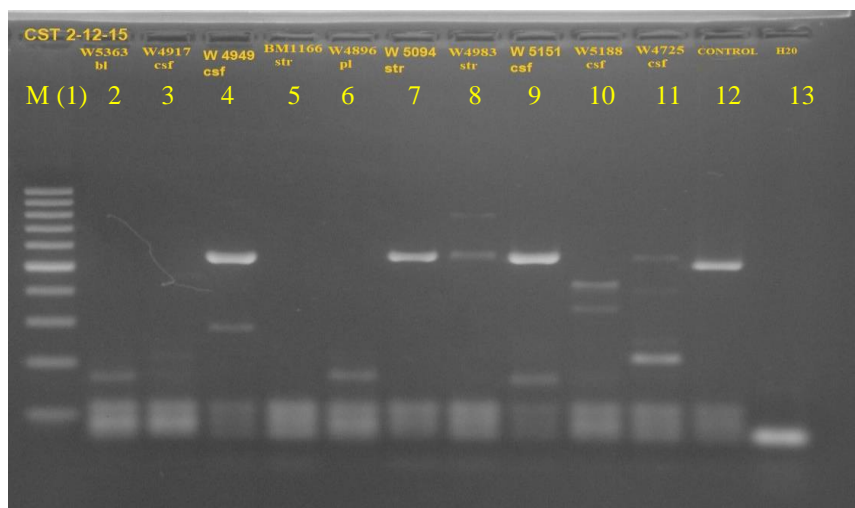
Εικόνα 18: Εφαρμογή κλινικών δειγμάτων στο αρχικό πρωτόκολλο αντίδρασης με χρήση διαφορετικής συγκέντρωσης ενζύμου.



– **Μεταβολές στη συγκέντρωση των εκκινητών:** Εναλλακτικά, έγινε προσπάθεια διαδοχικής αύξησης της συγκέντρωσης των εκκινητών, για υψηλότερη απόδοση της αντίδρασης. Εφόσον οι primers προστίθεντο σαν mix, αυξήθηκε ο συνολικός προστιθέμενος όγκος του primermix από 1μL σε 1,2 μL (12μM από κάθε έναν από τους primers με M-tails του πίνακα 13).

Στην εικόνα 19 φαίνεται η εφαρμογή της PCR σε κλινικά δείγματα με αυξημένη συγκέντρωση εκκινητών (1,2μL, 12μM/primer). Στην πρώτη διαδρομή είναι ο μάρτυρας μοριακού βάρους (M), στις διαδρομές 2 έως 11 έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα κλινικά δείγματα, στη διαδρομή 12 DNA στελέχους (control) και στη τελευταία διαδρομή (13) είναι ο αρνητικός μάρτυρας (H₂O). Όπως γίνεται αντιληπτό, παρά την αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών, η απόδοση της αντίδρασης δεν αυξήθηκε για όλα τα κλινικά δείγματα (μη παραγωγή θετικού προϊόντος στις διαδρομές 2, 3, 5, 6, 10, 11).

Εικόνα 19: Εφαρμογή κλινικών δειγμάτων στο αρχικό πρωτόκολλο αντίδρασης με χρήση διαφορετικής συγκέντρωσης εκκινητών.

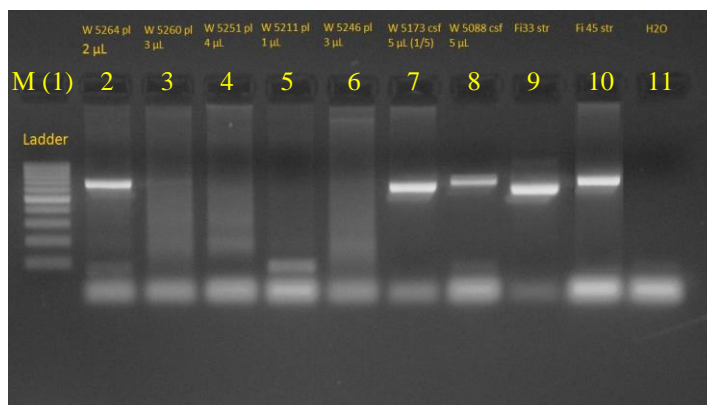


Str: βακτηριακό στέλεχος, Csf: εγκεφαλονωτιαίο υγρό, Pl: πλευριτικό υγρό, Bl: ολικό αίμα

– Μεταβολή του όγκου του δείγματος (template) που προστίθεται στην αντίδραση:

Στη συνέχεια, έγιναν δοκιμές με διαδοχική αύξηση της ποσότητας του προστιθέμενου δείγματος (template-DNA στόχος) από 1μL έως και 5 μL (Εικόνα 20). Εδώ, τα προβλήματα που προέκυψαν ήταν συνδυαστικά, καθώς σε κάποια από τα δείγματα η ποσότητα του δείγματος που προστίθετο δεν ήταν επαρκής για την παραγωγή θετικού προϊόντος (Εικόνα 20, διαδρομή 5), ενώ σε κάποια άλλα η αυξημένη ποσότητα έκανε αναστολή της αντίδρασης (Εικόνα 20, διαδρομές 3, 4 & 6). Αυτό οφείλεται στη διαφορετική αναλογία μικροβιακού φορτίου/ανθρώπινου γενετικού υλικού που περιέχεται ανά δείγμα και επηρεάζει συνολικά την απόδοση της αντίδρασης. Μεγάλη ποσότητα ανθρώπινου γενετικού υλικού στα δείγματα μπορεί να λειτουργήσει ανασταλτικά στην παραγωγή θετικού προϊόντος από το DNA-στόχο.

Εικόνα 20: Δοκιμή αρχικού πρωτοκόλλου αντίδρασης CST με χρήση διαφορετικών ποσοτήτων γενετικού υλικού σε διάφορα κλινικά δείγματα.



Μεταβολές που ακολούθησαν στη συγκέντρωση των dNTPs, καθώς και τροποποιήσεις στο πρόγραμμα της PCR, όπως μεταβολές της θερμοκρασίας υβριδισμού των primers, του χρόνου επέκτασης και αποδιάταξης αλλά και αύξηση του αριθμού των κύκλων σε όλα τα στάδια της αντίδρασης, δεν επέφεραν ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την απόδοση της αντίδρασης. Επιπλέον, έγινε προσθήκη σταδίων υβριδισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες σύμφωνα με τις αρχές της touchdown PCR, όπως αναφέρθηκαν παραπάνω.

Στο επόμενο στάδιο βελτιστοποίησης, έγινε προσπάθεια διάσπασης του αρχικού πρωτοκόλλου CST σε δύο στάδια, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στο πρώτο στάδιο οι primers χωρίς την επέκταση των M-tails (Πίνακας 13) και το προϊόν του πρώτου σταδίου, να χρησιμοποιηθεί σαν DNA-στόχος για το δεύτερο στάδιο. Με αυτό τον τρόπο, αναμένεται να αυξηθεί η συνολική απόδοση της αντίδρασης και η παραγωγή ειδικών προϊόντων.

4) Διαχωρισμός του αρχικού πρωτοκόλλου CST σε δύο στάδια (διαδοχικές PCR-1 και PCR-2)

Καθώς οι αλλαγές των παραμέτρων που περιγράφηκαν παραπάνω δεν επέφεραν ικανοποιητικά αποτελέσματα, αποφασίστηκε να χωριστεί η αντίδραση PCR σε δύο στάδια (δύο διαδοχικές PCR-1 και PCR-2).

Οι εκκινητές που θα χρησιμοποιούνταν για την πρώτη αντίδραση (PCR-1) θα ήταν όμοιοι με τους εκκινητές που περιγράφονται στο αρχικό πρωτόκολλο, με την απουσία των M13 tails (Πίνακας 13). Το μικρότερο μέγεθος εκκινητών στη πρώτη αντίδραση θα διευκόλυνε την πρόσδεση στο DNA-στόχο αυξάνοντας την ευαισθησία της αντίδρασης (υψηλή απόδοση προϊόντος).

Το προϊόν της πρώτης αντίδρασης θα χρησιμοποιούνταν ως template (δείγμα) για την δεύτερη αντίδραση (PCR-2). Οι εκκινητές (primers) της δεύτερης αντίδρασης θα ήταν εκτεταμένοι με ενσωματωμένες τις M13 «ουρές» (tails). Το δεύτερο στάδιο θα ενίσχυε επιπλέον τα προϊόντα (όπως συμβαίνει και στα πρωτόκολλα nested PCR) και παράλληλα θα έδινε προϊόντα εκτεταμένα, με τις αλληλουχίες των M13-tails που θα χρησιμοποιούνταν ως στόχοι των εκκινητών (MF, MR, Πίνακας 13) στην αντίδραση αλληλούχισης.

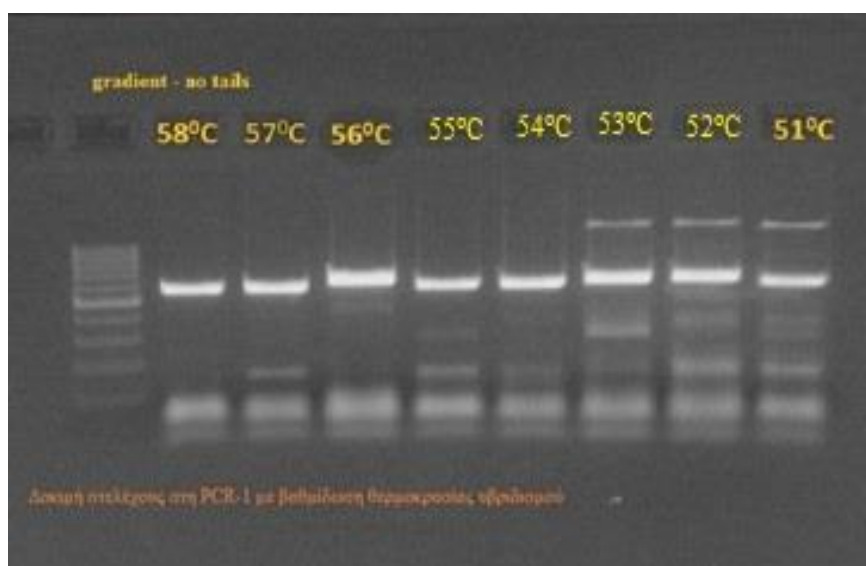
α) Πειραματικά στάδια ανάπτυξης αντίδρασης PCR –1

Όλες οι δοκιμές για την αντίδραση PCR-1 πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή Robo Cyclor (Stratagene, USA).

– **Εφαρμογή βαθμίδωσης (gradient) θερμοκρασίας υβριδισμού:** Για να βρεθεί η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών έγινε δοκιμή με βαθμίδωση (gradient) θερμοκρασίας υβριδισμού στο πρόγραμμα της PCR (μεταξύ 58°C και 51°C) και χρήση DNA μικροβιακού στελέχους σαν δείγμα (10ng).

Σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μL, προστέθηκε 1μL primermix (10μM/primer), 0.8mM dNTPs, 0,5U Phusion Taq Polymerase και 1.2X buffer HF, ενώ οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 98°C για 1min, αρχική αποδιάταξη, 98°C για 15sec, 51°C-58°C για 35sec, 72°C για 40sec, για 40 κύκλους και 72°C για 1min, τελικός χρόνος επιμήκυνσης. Στην εικόνα 21 φαίνεται ότι η καλύτερη απόδοση της αντίδρασης (υψηλή απόδοση ειδικού προϊόντος, μη-παραγωγή μη ειδικών προϊόντων) είναι σε θερμοκρασίες υβριδισμού (58-54°C).

Εικόνα 21: Δοκιμή στελέχους στη αντίδραση 1 με χρήση βαθμίδωσης θερμοκρασίας υβριδισμού με χρήση DNA απομονωθέντος στελέχους.

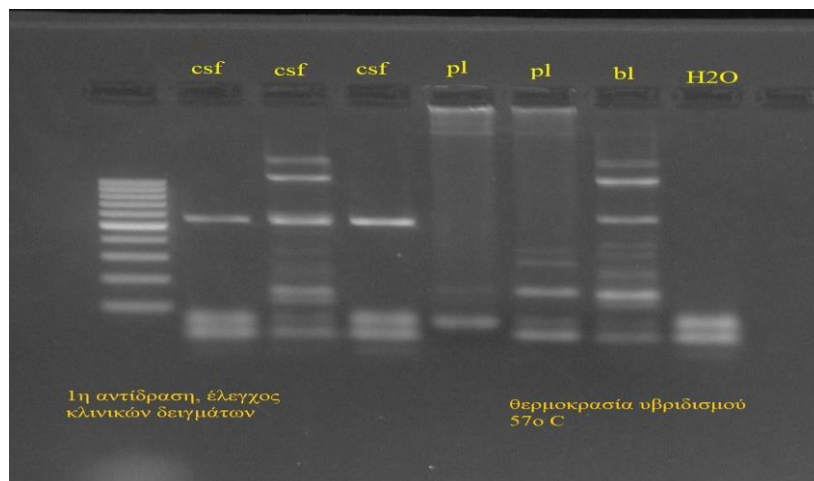


– **Έλεγχος κλινικών δειγμάτων σε θερμοκρασίες υβριδισμού 54-58°C:** Στη συνέχεια έγιναν δοκιμές με κλινικά δείγματα στις εν λόγω θερμοκρασίες υβριδισμού. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορα κλινικά δείγματα μεταξύ των οποίων ENY, πλευριτικό υγρό και αίμα. Ενδεικτικά, στην εικόνα 22 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ελέγχου κλινικών δειγμάτων σε θερμοκρασία υβριδισμού 57°C. Παρατηρείται ότι υπάρχουν μη

ειδικά προϊόντα σε δείγματα αίματος (bl) και ENY (csf), ενώ τα δείγματα πλευριτικών υγρών (pl) εμφάνισαν αναστολή.

Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν με την εφαρμογή του προγράμματος στις υπόλοιπες θερμοκρασίες υβριδισμού (58°C και 56-54°C).

Εικόνα 22: Έλεγχος κλινικών δειγμάτων σε θερμοκρασία υβριδισμού 57°C.



– **Αλλαγές άλλων παραμέτρων του προγράμματος και των συγκεντρώσεων αντιδραστηρίων της αντίδρασης:** Για την ελάττωση των μη ειδικών προϊόντων του προηγούμενου σταδίου, αποφασίστηκε να μειωθούν οι χρόνοι υβριδισμού και επέκτασης, ενώ παράλληλα δοκιμάστηκε αυξομείωση του συνολικού αριθμού των κύκλων της αντίδρασης. Στη συνέχεια, ταυτόχρονα με τις αλλαγές στις συνθήκες του προγράμματος έγιναν διαδοχικές δοκιμές με αλλαγές στις συγκεντρώσεις των εκκινητικών μορίων.

Παρόλες τις αλλαγές και τις δοκιμές που έγιναν, δεν κατέστη δυνατό να ληφθεί μια αποδοτική αντίδραση, είτε διότι δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός του ζητούμενου προϊόντος για όλα τα δείγματα, είτε γιατί παράγονταν μη ειδικά τμήματα καθιστώντας αδύνατο τον προσδιορισμό του ζητούμενου προϊόντος.

– **Προσθήκη σταδίων υβριδισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες (touchdown PCR):** Σε αυτό το στάδιο αποφασίστηκε να γίνει προσθήκη σταδίων υβριδισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Χρησιμοποιήθηκαν οι θερμοκρασίες υβριδισμού που είχαν δώσει τα καλύτερα αποτελέσματα στο πρώτο στάδιο.

Ο στόχος ήταν εκκινώντας από σχετικά υψηλή θερμοκρασία υβριδισμού, να αποφευχθεί η μη ειδική προσκόλληση των εκκινητών και να μειωθεί η παραγωγή μη

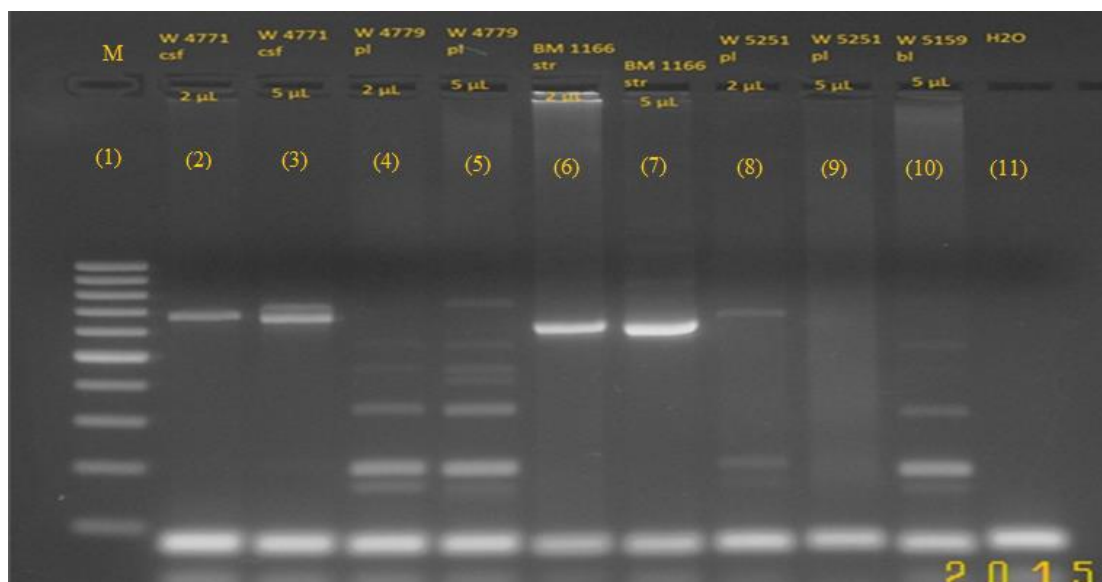
ειδικών προϊόντων, ενώ η μείωση της θερμοκρασίας στη συνέχεια να διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό του ειδικού προϊόντος (πίνακας 18).

Πίνακας 18: Το πρόγραμμα δοκιμής touchdown PCR που εφαρμόστηκε:

Θερμοκρασία		Χρόνος	Κύκλοι
98°C		1min	
98°C		14sec	
58°C		35sec	12
72°C		38sec	
98°C		14sec	
57°C		35sec	14
72°C		38sec	
98°C		14sec	
56°C		35sec	14
72°C		38sec	
72°C		5min	
4°C		∞	

Τα αρχικά αποτελέσματα της εφαρμογής σταδίων υβριδισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες φαίνονται στην εικόνα 23.

Εικόνα 23: Εφαρμογή σταδίων υβριδισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες στην PCR-1.



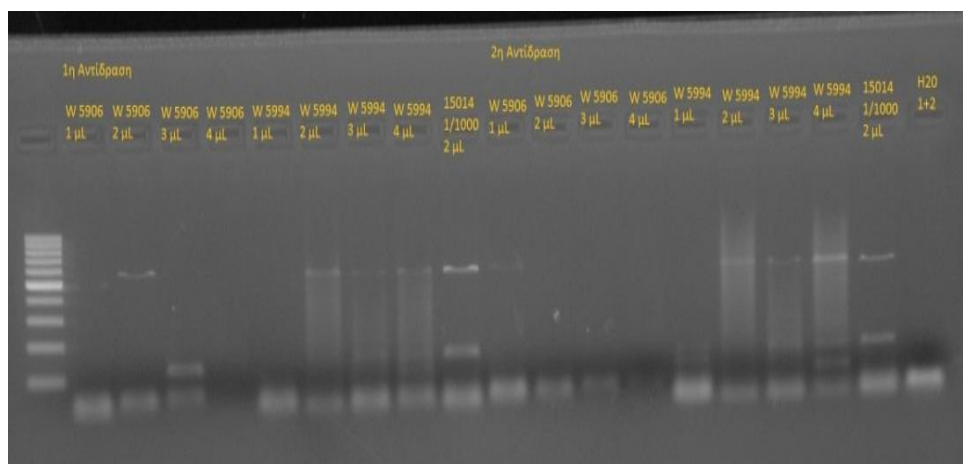
Στην πρώτη διαδρομή είναι ο μάρτυρας μοριακού βάρους (M), στις διαδρομές 2 και 3 δείγμα ENY σε διαφορετικές ποσότητες template (2 & 5 μ L αντίστοιχα), στις διαδρομές 4, 5, 8, και 9 δείγματα πλευριτικών υγρών σε διαφορετικές ποσότητες template (2 & 5 μ L αντίστοιχα), στις διαδρομές 6 και 7 βακτηριακό στέλεχος, ενώ στη διαδρομή 10 δείγμα αίματος. Στην τελευταία διαδρομή (11) είναι ο αρνητικός μάρτυρας (H₂O).

Ενώ η αντίδραση είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα κατά την εφαρμογή σε βακτηριακά στελέχη και δείγματα ENY, τα αποτελέσματα δεν ήταν εξίσου ικανοποιητικά για δείγματα που περιείχαν μεγαλύτερη ποσότητα ανθρώπινου γενετικού υλικού, όπως τα δείγματα αίματος και πλευριτικών υγρών.

– **Αλλαγές άλλων παραμέτρων του προγράμματος και των συγκεντρώσεων αντιδραστηρίων της αντίδρασης:** Στη συνέχεια έγιναν διαδοχικές δοκιμές με αλλαγές στις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων, π.χ. αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου από 0,4U σε έως και 0,8U και ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσης των εκκινητών, δοκιμές με αύξηση και μείωση της συγκέντρωσης του buffer (0,8X έως και 1.4X) προκειμένου να ελαττωθεί η παραγωγή των μη ειδικών προϊόντων και να ενισχυθούν τα ειδικά προϊόντα, μεταβολές στην ποσότητα του DNA-στόχου που προστίθεται ανά αντίδραση (1 μ L έως 5 μ L). Οι δοκιμές αυτές συνδυάστηκαν με τροποποιήσεις του προγράμματος της αντίδρασης στους χρόνους αποδιάταξης, υβριδισμού και επέκτασης

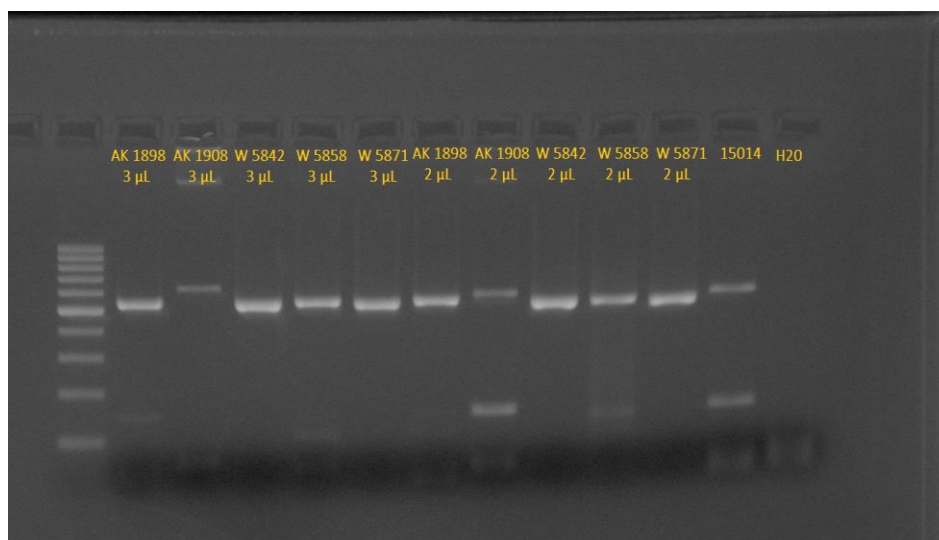
Στην εικόνα 26, η μείωση των χρόνων αποδιάταξης και υβριδισμού στο πρόγραμμα της αντίδρασης, σχεδόν εξαφανίζουν τα μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι δοκιμές διαφορετικής ποσότητας από κάθε κλινικό δείγμα, φαίνεται να αποδίδουν καλύτερα όταν προστίθενται 2μL από το δείγμα στην αντίδραση.

Εικόνα 26: Εφαρμογή της PCR-1 σε κλινικά δείγματα με μείωση των χρόνων αποδιάταξης και υβριδισμού.



Τελικά, το πρόγραμμα διαμορφώθηκε όπως αναφέρεται παραπάνω (παράγραφος 2.4.1. και πίνακας 14), όπου επετεύχθη η βέλτιστη ισορροπία στοιχειομετρίας της αντίδρασης και προγράμματος. Ενδεικτικά, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 27, όπου διάφορα κλινικά δείγματα φαίνεται να δίνουν ικανοποιητικής απόδοσης προϊόντα, ενώ τα μη ειδικά προϊόντα της αντίδρασης έχουν σχεδόν εξαφανιστεί.

Εικόνα 27: Εφαρμογή της PCR-1 σε κλινικά δείγματα μετά από αλλαγές σε διάφορες παραμέτρους της αντίδρασης.



– **Δοκιμή επιπλέον κλινικών δειγμάτων και βελτιστοποίηση:** Σε αυτό το στάδιο δοκιμάστηκαν περαιτέρω κλινικά δείγματα (αίμα, ΕΝΥ, πλευριτικό υγρό.) ούτως ώστε να πιστοποιηθεί ότι η αντίδραση δίνει αποτελέσματα στα διάφορα είδη δειγμάτων που αποστέλλονται στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας.

β) Πειραματικά στάδια ανάπτυξης αντίδρασης PCR –2

Όλες οι δοκιμές για το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης (PCR-2) πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή Piko Thermal Cycler (Finnzymes/Thermo Scientific).

– **Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα:**

Οι δοκιμές για τη δεύτερη αντίδραση ξεκίνησαν ενώ είχαν προχωρήσει σε κάποιο βαθμό οι δοκιμές για τη PCR –1 και προχώρησαν παράλληλα στη συνέχεια.

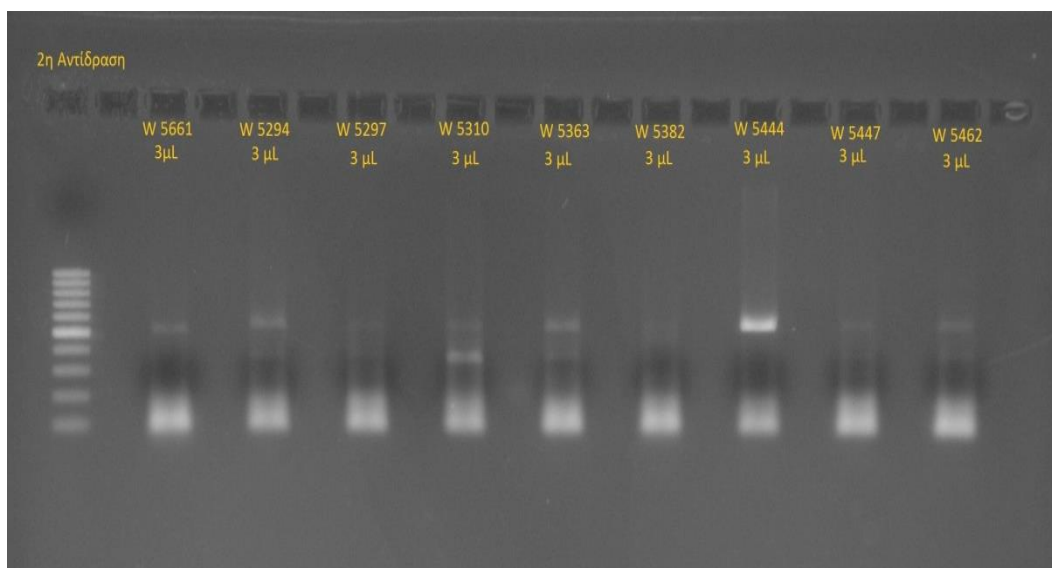
Το αρχικό πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε και η στοιχειομετρία της αντίδρασης φαίνονται παρακάτω:

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
98°C	1min	
98°C	20sec	
64°C	30sec	40
72°C	35sec	
72°C	8min	
4°C	∞	

ReactionVolume	20	μl
BufferFinal	1.2	x
dNTPsFinal	0.8	mM
Primermix: 10μM/prim	1	μl
Taq per reaction	0.5	U

Τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης φαίνονται στην εικόνα που ακολουθεί (εικόνα 28).

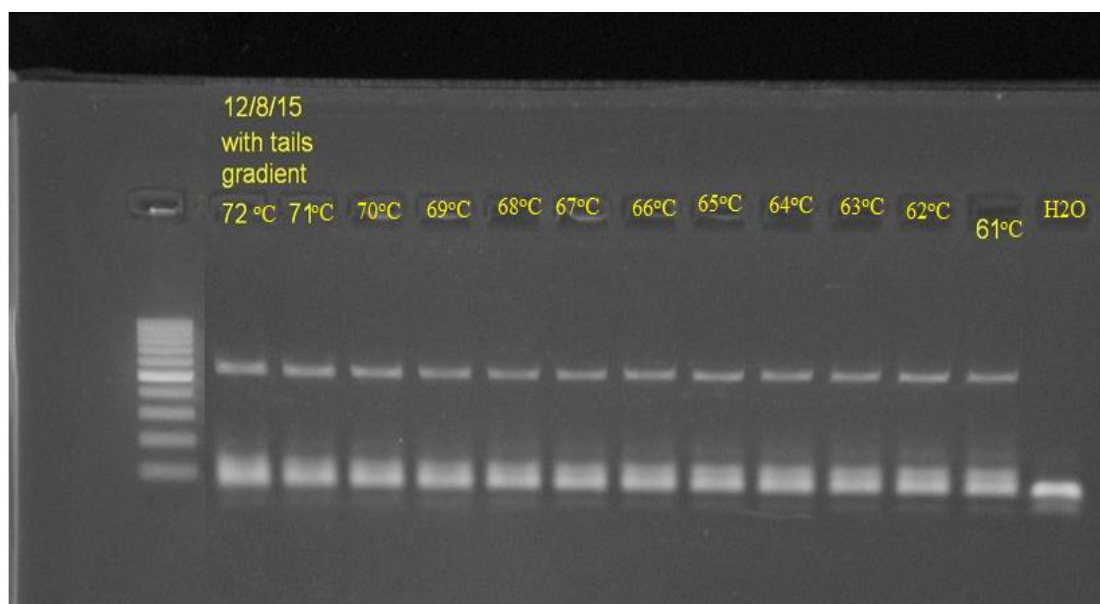
Εικόνα 28: Εφαρμογή της PCR-2 σε κλινικά δείγματα.



Τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά για όλα τα είδη δειγμάτων που δοκιμάστηκαν.

– **Εφαρμογή βαθμίδωσης θερμοκρασίας υβριδισμού:** Στη συνέχεια για να βρεθεί η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών έγινε δοκιμή με βαθμίδωση θερμοκρασίας υβριδισμού (μεταξύ 61 και 72 βαθμών Κελσίου). Η δοκιμή έγινε χρησιμοποιώντας σαν δείγμα στέλεχος μικροβίου που είχε δώσει προϊόν κατά την εφαρμογή του στην αντίδρασης PCR-1 (εικόνα 29).

Εικόνα 29: Δοκιμή αντίδρασης PCR-2 με χρήση βαθμίδωσης θερμοκρασίας υβριδισμού.



Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα, κατά την εφαρμογή βαθμίδωσης θερμοκρασίας υβριδισμού, διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές, ως προς την απόδοση προϊόντος, που να εξαρτώνται από τη διαφορετική θερμοκρασία. Φάνηκε έτσι ότι έπρεπε να δοθεί προσοχή στην αλλαγή των υπόλοιπων παραμέτρων της αντίδρασης για να επιτύχουμε μέγιστη απόδοση προϊόντος όταν εφαρμόζεται σε κλινικά δείγματα.

– **Αλλαγές παραμέτρων της αντίδρασης:** Με βάση την προηγούμενη παρατήρηση έγιναν διαδοχικές δοκιμές με αλλαγές:

- στις συγκεντρώσεις των εκκινητικών μορίων και του ενζύμου
- του συνολικού αριθμού των κύκλων της αντίδρασης.
- στους χρόνους αποδιάταξης, υβριδισμού και επιμήκυνσης.
- Συνδυασμοί των παραπάνω

Παρόλες τις δοκιμές δεν ήταν εφικτό να υπάρχει ικανοποιητικό αποτέλεσμα κατά τη χρήση κλινικών δειγμάτων.

– **Αναζήτηση αιτίων μη αποδοτικής αντίδρασης:** Κατά το στάδιο αυτό έγινε ενδελεχής ανάλυση των μέχρι εκείνη τη στιγμή αποτελεσμάτων. Επίσης έγινε ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και αναζήτηση των πιθανών λόγων που δεν επέτρεπαν να υπάρχει λήψη προϊόντος κατά την εφαρμογή κλινικών δειγμάτων στη PCR-2. Μια πιθανή εξήγηση ήταν ότι λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους των εκκινητών με τις ενσωματωμένες M-tails ήταν δυσκολότερος ο επιτυχής υβριδισμός τους κατά το αρχικό στάδιο της αντίδρασης.

– **Χρήση μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας υβριδισμού:** Σε αυτό το στάδιο αποφασίστηκε να γίνει χρήση ενός προγράμματος PCR με μεταβαλλόμενη θερμοκρασία υβριδισμού στους αρχικούς κύκλους (Η θερμοκρασία υβριδισμού σε κάθε κύκλο αυξάνεται κατά ένα συγκεκριμένο ποσό σε σχέση με τον προηγούμενο κύκλο), ενώ η θερμοκρασία υβριδισμού από κει και μετά παραμένει σταθερή. Με αυτό τον τρόπο ξεκινώντας από μια σχετικά χαμηλή θερμοκρασία υβριδισμού επιτρέπεται στους εκκινητές να υβριδιστούν με μεγαλύτερη ευκολία στο δείγμα. Στη συνέχεια η σταδιακή αύξηση θερμοκρασίας υβριδισμού ευνοεί την απόδοση του ειδικού προϊόντος και περιορίζει την ενίσχυση των μη ειδικών (Η ίδια λογική είχε ήδη εφαρμοστεί, κατά

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: ΜΕΘΟΔΟΙ

την ανάπτυξη της μεθόδου που χρησιμοποιείται στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας για την ταυτοποίηση παθογόνων σε στελέχη και κλινικά δείγματα).

Έγινε επίσης τροποποίηση στη συγκέντρωση του Buffer, των dNTPs και του ενζύμου.

Το πρόγραμμα και η στοιχειομετρία που εφαρμόστηκε φαίνεται παρακάτω:

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
98°C	3min	
98°C	20sec	
55°C	35sec	20
72°C	40sec	+0,5°C/κύκλο
98°C	20sec	
66°C	35sec	22
72°C	40sec	
72°C	5min	
4°C	∞	

ReactionVolume	20	μl
BufferFinal	0.9	x
dNTPsFinal	0.7	mM
Primermix:10μM/prim	0.8	μl
Taq per reaction	0.4	U

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή των παραπάνω φαίνονται στην εικόνα 30.

Εικόνα 30: Αντίδραση PCR-2 με εφαρμογή μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας υβριδισμού.

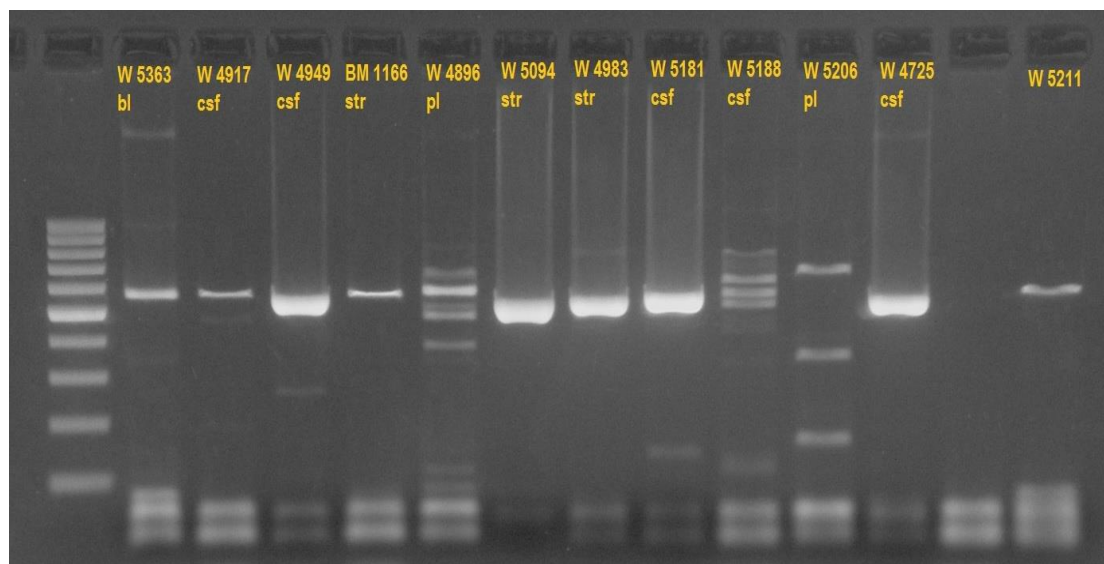


Από τη παραπάνω εικόνα γίνεται εμφανές ότι δεν υπήρχε παραγωγή προϊόντος για όλα τα δείγματα ενώ ταυτόχρονα για κάποια από τα δείγματα υπήρχε παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.

– **Αλλαγές παραμέτρων της αντίδρασης:** Στη συνέχεια έγιναν διάφορες δοκιμές με αλλαγές που περιλάμβαναν μεταξύ άλλων:

- Μεταβολές στις συγκεντρώσεις των εκκινητικών μορίων
- Αυξομείωση του συνολικού αριθμού των κύκλων της αντίδρασης
- Μεταβολές στους χρόνους αποδιάταξης, υβριδισμού και επέκτασης.
- Μεταβολές στη συγκέντρωση του Buffer
- Μεταβολές στη συγκέντρωση των dNTPs
- Μεταβολές στη συγκέντρωση του ενζύμου.
- Μεταβολές στη ποσότητα του δείγματος που προστίθεται στην αντίδραση.
- Διάφοροι συνδυασμοί των παραπάνω.

Εικόνα 31: Αντίδραση PCR-2. Αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου και μείωση χρόνων αποδιάταξης και επιμήκυνσης.



Στην εικόνα 31 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR-2 χρησιμοποιώντας αυξημένη συγκέντρωση πολυμεράσης και μειώνοντας τους χρόνους αποδιάταξης και επιμήκυνσης. Όπως φαίνεται, η απόδοση προϊόντος είναι αισθητά βελτιωμένη για τα περισσότερα δείγματα αλλά εξακολουθούν να υπάρχουν μη ειδικά προϊόντα.

Ακολούθως συνεχίστηκαν οι επαναλαμβανόμενες δοκιμές με μεταβολές διαφόρων παραμέτρων.

Από τις μεταβολές αυτές, εκείνες που είχαν καθοριστική επίδραση στο αποτέλεσμα της αντίδρασης, εκτός από τις μεταβολές που αναφέρθηκαν πιο πάνω, ήταν:

- i. Η μείωση της συγκέντρωσης των dNTPs και
- ii. Η μείωση της συγκέντρωσης των εκκινητών.

Μετά από επανειλημμένες δοκιμές η κατάληξη ήταν μια αντίδραση η οποία έδινε ικανοποιητικά αποτελέσματα χρησιμοποιώντας ως template (δείγμα) ποσότητα υλικού από το προϊόν της PCR-1.

– **Δοκιμή επιπλέον κλινικών δειγμάτων και βελτιστοποίηση:** Σε αυτό το στάδιο δοκιμάστηκαν τα κλινικά δείγματα που είχαν δώσει ικανοποιητικό αποτέλεσμα στη PCR-1 (αίμα, ENY, πλευριτικό υγρό κτλ.) ούτως ώστε να διαπιστωθεί αν η αντίδραση δίνει αποτελέσματα στα διάφορα είδη δειγμάτων που αποστέλλονται στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας.

Εφ' όσον τα αποτελέσματα κρίθηκαν ικανοποιητικά αποφασίστηκε χρησιμοποιηθεί και να εφαρμοστεί η αντίδραση ως αντίδραση PCR-2

2.7. Έλεγχος ευαισθησίας, ειδικότητας και κατώτερου ορίου ανίχνευσης για τις 2 αντιδράσεις

Η ευαισθησία των τεχνικών PCR αξιολογήθηκε με την εφαρμογή της σε 67 ταυτοποιημένα και τυποποιημένα στελέχη πνευμονιόκοκκου που ανήκουν σε γνωστούς ορότυπους. Τα αποτελέσματα ανάμεσα στις δύο μεθόδους είχαν 100% συμφωνία (ευαισθησία 100%).

Η ειδικότητα των μεθόδων αξιολογήθηκε με τη χρήση στελεχών διαφορετικών μικροβίων. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 40 στελέχη *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus sp.* και *Listeria sp.*

Δεν υπήρξε ανάπτυξη προϊόντος για κανένα από τα παραπάνω στελέχη που ελέγχθηκαν με τις νέες αντιδράσεις. (ειδικότητα 100%).

Το κατώτερο όριο ανίχνευσης (η μικρότερη συγκέντρωση γενετικού υλικού που ανιχνεύεται με την αντίδραση) βρέθηκε με κλιμακούμενη μείωση της συγκέντρωσης του DNA. Το κατώτερο όριο ανίχνευσης είναι τα 5 pg/μL

2.8. Εφαρμογή των δύο νέων αντιδράσεων σε κλινικά δείγματα

Οι δύο νέες αντιδράσεις εφαρμόστηκαν σε 306 δείγματα (βιολογικά υλικά και βακτηριακά στελέχη) που απομονώθηκαν από 283 ασθενείς με πνευμονιοκοκκική λοίμωξη και στάλθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (ΕΚΑΜ), από όλα τα Νοσοκομεία της χώρας, κατά την χρονική περίοδο 2010-2020, στο πλαίσιο των υπηρεσιών ταυτοποίησης και τυποποίησης που παρέχονται.

Αυτά αποτελούνταν από: 239 βιολογικά υλικά (ολικό αίμα n = 36, εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) n = 118, πλευριτικό υγρό n = 65, αρθρικό υγρό n = 1, υγρό μέσου ωτός n = 15, αιμοκαλλιέργεια n = 2, πύον n = 2) που είχαν αρνητική καλλιέργεια και ταυτοποιήθηκαν θετικά για τον πνευμονιόκοκκο μόνο με τη μέθοδο της PCR (Tzanakaki *et al.*, 2005) και 67 βακτηριακά στελέχη.

Όλα τα βακτηριακά στελέχη είχαν ταυτοποιηθεί με συμβατικές (α-αιμόλυση, δοκιμασία οπτοχίνης κτλ) και μοριακές μεθόδους ενώ για τα κλινικά δείγματα, που δεν

υπήρχαν θετικές καλλιέργειες η ταυτοποίηση του πνευμονιοκόκκου είχε γίνει με μοριακή τεχνική (Tzanakaki *et al.*, 2005).

Η βελτιστοποίηση της μεθόδου ολοκληρώθηκε το 2018, συνεπώς η επεξεργασία των δειγμάτων της περιόδου 2010-2018 έγινε αναδρομικά. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1γ), τα δείγματα ήταν αρνητικά για τους ορότυπους 1, 3, 14, 19A, 4, 6, 18, 19F, 23F, 5, 10A, 23B, 7A/F, 17F, 9N/L, 9A/V, 7C/B/40 που ταυτοποιούνται στο ΕΚΑΜ με multiplex PCR (Σιουμάλα Μ., και συν 2007, Μαρμαράς Ν. και συν. 2015). Από το 2019, η νέα μέθοδος αντικατέστησε τις multiplex PCR και αποτελεί την κύρια μέθοδο που χρησιμοποιείται για την οροτυποποίηση του πνευμονιοκόκκου στην καθημερινή πράξη του εργαστηρίου.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΤΕΛΕΧΗ

Η εφαρμογή της μεθόδου CST, όπως διαμορφώθηκε σε δύο στάδια αντιδράσεων, φάνηκε ότι έχει καλή απόδοση σε μια πληθώρα βιολογικών υλικών που εφαρμόστηκε (ολικό αίμα, ENY, πλευριτικό/ωτικό/αρθρικό υγρό, πύον, αιμοκαλλιέργειες), καθώς ανιχνεύθηκε επιτυχώς και ταυτοποιήθηκε ο ορότυπος σε όλα τα κλινικά δείγματα (n = 239) και βακτηριακά στελέχη (n = 67) που είχαν προηγουμένως ταυτοποιηθεί ως θετικά για *S. pneumoniae*.

Με τη νέα μέθοδο, χαρακτηρίστηκαν ως προς τον ορότυπο συνολικά 283 περιπτώσεις ασθενών με πνευμονιοκοκκική λοίμωξη. Για τις 216/283 (76,3%) δεν είχε απομονωθεί πνευμονιοκοκκικό στέλεχος στην καλλιέργεια. Για τις περιπτώσεις αυτές, η τυποποίηση του πνευμονιοκόκκου έγινε απευθείας στα κλινικά δείγματα (n = 239), δυνατότητα την οποία έδωσε η νέα μεθοδολογία.

Καθώς ο ίδιος ορότυπος ταυτοποιήθηκε σε δύο ή περισσότερα δείγματα που ελήφθησαν από τον ίδιο ασθενή, λήφθηκε υπόψη ένας ορότυπος ανά ασθενή στην παρούσα μελέτη.

2. ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

(ΘΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ)

Από τα αποτελέσματα της εφαρμογής της τεχνικής στα 67 βακτηριακά στελέχη, στα οποία ο ορότυπος είχε προηγουμένως ταυτοποιηθεί με τη μέθοδο του Quellung, αξιολογήθηκε η ειδικότητα της τεχνικής στο 100%, με 100% θετική και αρνητική προγνωστική αξία (Positive Predictive Value, (PPV) & Negative Predictive Value, (NPV)), καθώς τα αποτελέσματα των δύο τεχνικών Quellung και CST συμφωνούσαν απόλυτα ως προς τον προσδιορισμό των οροτύπων.

3. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΟΡΟΤΥΠΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΤΕΛΕΧΗ

Στον πίνακα 19 παρατίθενται αναλυτικά οι ορότυποι που ταυτοποιήθηκαν και η συχνότητα ανεύρεσής τους στις 283 περιπτώσεις λοιμώξεων που εξετάστηκαν.

Πίνακας 19: Ορότυποι που ταυτοποιήθηκαν κατά την εφαρμογή της νέας τεχνικής σε κλινικά δείγματα από 283 περιπτώσεις ασθενών με πνευμονιοκοκκική λοίμωξη και συχνότητα αυτών.

	ΟΡΟΤΥΠΟΣ ΠΟΥ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ CST	ΟΡΟΤΥΠΟΣ ΠΟΥ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΜΕ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΗ PCR	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ (n)
Απ' ευθείας ταυτοποίηση ενός ορότυπου με την εφαρμογή της νέας μεθόδου	3	-	45
	8	-	18
	10A	-	2
	10B	-	1
	14	-	3
	15A	-	11
	16F	-	2
	18A	-	1
	19A	-	15
	21	-	8
	23A	-	15
	23B	-	5
	31	-	2
	37	-	2
	42	-	2
	7A/F	-	2
	9N/L	-	4
10F/C	-	1	
Επισπρόσθετη εφαρμογή single PCRs	11A/D, 18F	11A/D	18
	12F/B	12F	14
	15B/C, 23F	15B/C	28
	20,13	20	7
	22A/F, 15B/C	22F	22
Ορότυποι που δεν είναι δυνατό να διαχωριστούν	17A, 35B/C	-	15
	24F, 40	-	18
	25A/F, 38	-	7
	33A/F, 35A	-	3
	34,17A	-	5
	35F, 47F	-	7
ΣΥΝΟΛΟ			283

3.1. Ορότυποι που ταυτοποιήθηκαν απευθείας από την εφαρμογή του CST

Σε ποσοστό, 49,12% των περιπτώσεων (139/283) αναγνωρίστηκε αμέσως ένας μόνο ορότυπος (ή ένα ζεύγος ορότυπων μέσα στην ίδια ομάδα). Συγκεκριμένα, οι ορότυποι που αναγνωρίστηκαν άμεσα ήταν οι: 3, 7A/F, 8, 9N/L, 10A, 10B, 10F/C, 14, 15A, 16F, 18A, 19A, 21, 23A, 23B, 31, 37 και 42.

Για τις υπόλοιπες περιπτώσεις, η μέθοδος απέδωσε δύο ή τρεις ορότυπους, ως άμεσο αποτέλεσμα από τη βάση δεδομένων του RIVM.

3.2. Ορότυποι που ταυτοποιήθηκαν από την εφαρμογή επιπρόσθετων μεμονωμένων PCR

Σε ποσοστό 31,44% (89/283) των περιπτώσεων χρειάστηκε εφαρμογή επιπρόσθετων μεμονωμένων αντιδράσεων PCR προκειμένου να ταυτοποιηθεί ένας μόνο ορότυπος.

Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι ορότυποι που έδωσε άμεσα το αποτέλεσμα του CST, ήταν τουλάχιστον δύο, ενώ και κάποιιοι από αυτούς ανήκαν σε διαφορετικές οροομάδες:

- 11A/D, 18F
- 12F/B
- 22A/F, 15B/C
- 15B/C, 23F
- 20,13

Χρησιμοποιώντας εκκινητικά μόρια από τη βιβλιογραφία (Πίνακας 17), πραγματοποιήθηκαν επιπλέον μεμονωμένες PCR, που στόχευαν στον αποκλεισμό και στην ταυτοποίηση αποκλειστικά κάποιων από αυτούς τους οροτύπους.

3.3. Ορότυποι για τους οποίους δεν υπάρχει δυνατότητα επιπλέον ταυτοποίησης

Στις υπόλοιπες περιπτώσεις, 55/283 (19,4%) το άμεσο αποτέλεσμα του CST έδωσε δύο ή τρεις οροτύπους της ίδιας ή διαφορετικής οροομάδας, οι οποίοι όμως δεν είναι δυνατό να διαχωριστούν, καθώς δεν υπάρχουν PCR που να τους ταυτοποιούν στη βιβλιογραφία:

- 17A, 35B/C,
- 24F, 40,
- 25A/F, 38,

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 33A/F, 35A,

- 34,17A,

- 35F, 47F.

4. ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ CST ΣΤΗΝ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΟΥ *Streptococcus pneumoniae* ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Σε όλα τα δείγματα που αποστέλλονται στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας, γίνεται έλεγχος με 2 αρχικές Multiplex PCR με τις οποίες ανιχνεύονται οι παρακάτω μικροοργανισμοί:

- *Neisseria meningitidis*,
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus spp*,
- *Haemophilus influenzae*,
- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Staphylococcus aureus* και
- *Listeria monocytogenes*

Στη συνέχεια τα δείγματα που ταυτοποιούνται θετικά για *Streptococcus pneumoniae* ελέγχονται με επιπλέον μοριακές μεθόδους:

- Multiplex PCR έως το 2018 και
- CST από το 2019 και μετά καθώς και αναδρομικά από το 2010 για τα δείγματα NT για την απόδοση οροτύπου.

4.1. Επιδημιολογική εικόνα *Streptococcus pneumoniae*

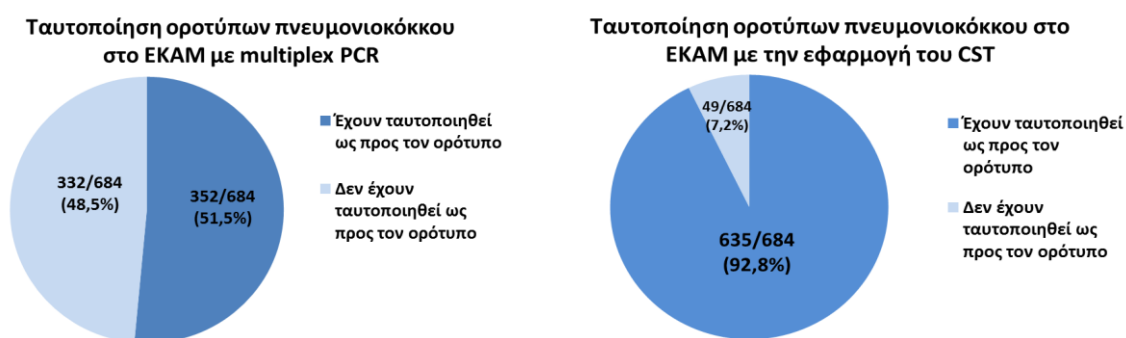
Από το 2019 και μετά η νέα τροποποιημένη μέθοδος CST είναι η κύρια μέθοδος που εφαρμόζεται στο ΕΚΑΜ για τον καθορισμό των οροτύπων του μικροοργανισμού.

Συνολικά, κατά την περίοδο 2010-2020, στο ΕΚΑΜ ταυτοποιήθηκαν 684 περιπτώσεις ασθενών με πνευμονιοκοκκική λοίμωξη (διεισδυτικές και μη διεισδυτικές λοιμώξεις), από τις οποίες τουλάχιστον ένα κλινικό δείγμα ή/και στέλεχος εστάλη στο ΕΚΑΜ και ταυτοποιήθηκε θετικό με multiplex PCR για *S. pneumoniae*. Με την εφαρμογή των multiplex PCR που προαναφέρθηκαν (Σιουμάλα Μ. και συν. 2007, Μαρμαράς Ν. και συν. 2015), έως και το 2018, χαρακτηρίστηκαν ως προς τον ορότυπο 352/684 (51,5%) από αυτές. Με τις multiplex PCR είναι δυνατή η ταυτοποίηση 17 οροτύπων (η ομάδων οροτύπων, 1, 3, 4, 5, 6, 7A/F, 7C/B/40, 9A/V, 9N/L, 10A, 14, 17F, 19A, 19F, 23F). Συνεπώς, υπήρχαν αρκετά δείγματα στα οποία δεν είχε αποδοθεί κανένας από τους

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

παραπάνω ορότυπους με αποτέλεσμα τα δείγματα αυτά να χαρακτηρίζονται ως μη τυποίσιμα με τις προϋπάρχουσες τεχνικές (non-tyrable, NT).

Με την ανάπτυξη της νέας μεθόδου έγινε δυνατή η τυποποίηση αυτών των δειγμάτων (NT) και η απόδοση ορότυπου. Με την εφαρμογή της μεθόδου του CST σε κλινικά δείγματα και στελέχη, αναδρομικά για την περίοδο 2010-2018 (δείγματα που είχαν χαρακτηρηστεί ως – NT) και σε όλα τα θετικά δείγματα για *S. pneumoniae* από το 2019 και μετά, το σύνολο των περιπτώσεων που ταυτοποιήθηκαν ανέρχεται σε 635/684 (92,8%).



Με την εφαρμογή της μεθόδου, αναδείχθηκαν νέοι ορότυποι του πνευμονιοκόκκου, χωρίς την ανάγκη διενέργειας καλλιέργειας και Quellung test.

Ένα δείγμα των πλεονεκτημάτων που προσέφερε η νέα μέθοδος, είναι ότι με την ολοκλήρωση της τυποποίησης των μη-τυποποιημένων δειγμάτων κατέστη δυνατή η αναδρομική μελέτη των οροτύπων *Streptococcus pneumoniae* στην Ελλάδα για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα, από το 2010, μετά την εισαγωγή του εμβολίου PCV-13, έως το 2020.

4.2. Αποτελέσματα της τεχνικής από την εφαρμογή σε δείγματα για την επιδημιολογική επιτήρηση της μηνιγγίτιδας στην Ελλάδα

Η μηνιγγίτιδα είναι νόσος υποχρεωτικής δήλωσης. Όλα τα περιστατικά δηλώνονται στον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας από τους κλινικούς γιατρούς χρησιμοποιώντας την αντίστοιχη φόρμα υποχρεωτικής δήλωσης.

Κατά τη περίοδο Ιανουαρίου 2010 - Δεκεμβρίου 2020 συνολικά δηλώθηκαν 427 περιπτώσεις μηνιγγίτιδας λόγω *S. pneumoniae* στον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας. Εξ' αυτών, 405 (94,8%) επιβεβαιώθηκαν εργαστηριακά, είτε με καλλιέργεια

και άλλες μεθόδους (συγκόλληση λατέξ, χρώση Gram, FilmArray), στα κατά τόπους Νοσηλευτικά ιδρύματα, είτε με τη χρήση μοριακών μεθόδων στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας.

Οι υπόλοιπες 22 από τις 427 περιπτώσεις που δηλώθηκαν στον ΕΟΔΥ θεωρούνται ύποπτα περιστατικά με βάση μόνο την κλινική εικόνα στις οποίες δεν πιστοποιήθηκε η παρουσία του μικροοργανισμού

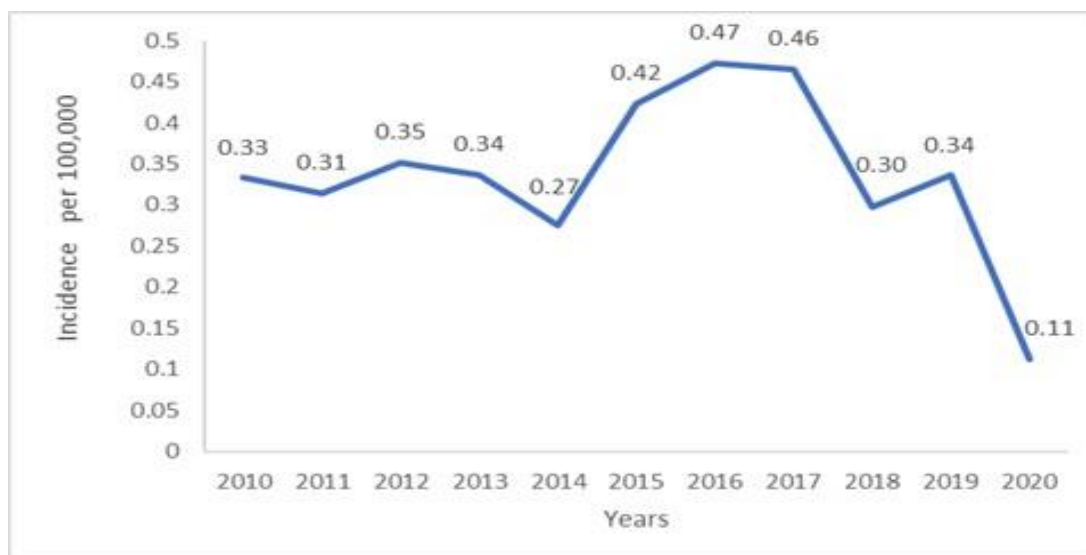
Δείγματα (ολικό αίμα/ΕΝΥ/βακτηριακά στελέχη) από 273 ασθενείς με κλινική εικόνα μηνιγγίτιδας που αποδόθηκε σε πνευμονιόκοκκο από τον έλεγχο που πραγματοποιήθηκε, στάλθηκαν στο ΕΚΑΜ από νοσοκομεία όλης της χώρας για ταυτοποίηση και οροτυποποίηση. Μεταξύ αυτών των δειγμάτων, στο 71,1% (194/273) ο *S. pneumoniae* ταυτοποιήθηκε αποκλειστικά με PCR, ενώ στο 28,9% (79/273) επιβεβαιώθηκε επίσης με καλλιέργεια. Ορότυπος αποδόθηκε στο 95,2% (260/273) των περιπτώσεων για τις οποίες στάλθηκε δείγμα στο ΕΚΑΜ. Για τις υπόλοιπες 13 περιπτώσεις και καθώς η μελέτη ήταν αναδρομική, η ποσότητα του δείγματος δεν ήταν επαρκής για την ανάλυση και έτσι δεν κατέστη δυνατό να αποδοθεί ορότυπος.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση με χρήση του Microsoft Excel για απλούς υπολογισμούς και δημιουργία γραφημάτων. Οι πνευμονιοκοκκικοί ορότυποι κατηγοριοποιήθηκαν ως εξής: PCV13 ορότυποι (ορότυποι που συμπεριλαμβάνονται στο PCV13): 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F και non- PCV13 ορότυποι (ορότυποι που δεν περιλαμβάνονται στο PCV13). Χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία X^2 για έλεγχο των τάσεων με την πάροδο του χρόνου στην επίπτωση των ορότυπων PCV13 και non-PCV13. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο 0,05.

Ετήσια επίπτωση μηνιγγίτιδας λόγω *S. pneumoniae*

Η ετήσια επίπτωση μεταξύ των ετών 2010 και 2014, είχε μια μέση τιμή 0,32/100.000 πληθυσμού, κορυφώθηκε μεταξύ των ετών 2015-2017 φτάνοντας στο 0,47/100.000 πληθυσμού το 2016 και μειώθηκε τα επόμενα χρόνια, φτάνοντας στο 0,34/100.000 πληθυσμού το 2019 (διάγραμμα 9). Η πολύ χαμηλή επίπτωση που παρατηρήθηκε κατά το 2020 δεν μπορεί να αξιολογηθεί, καθώς εκτιμάται ότι είναι αποτέλεσμα της εφαρμογής πολιτικών περιορισμού για τον COVID-19.

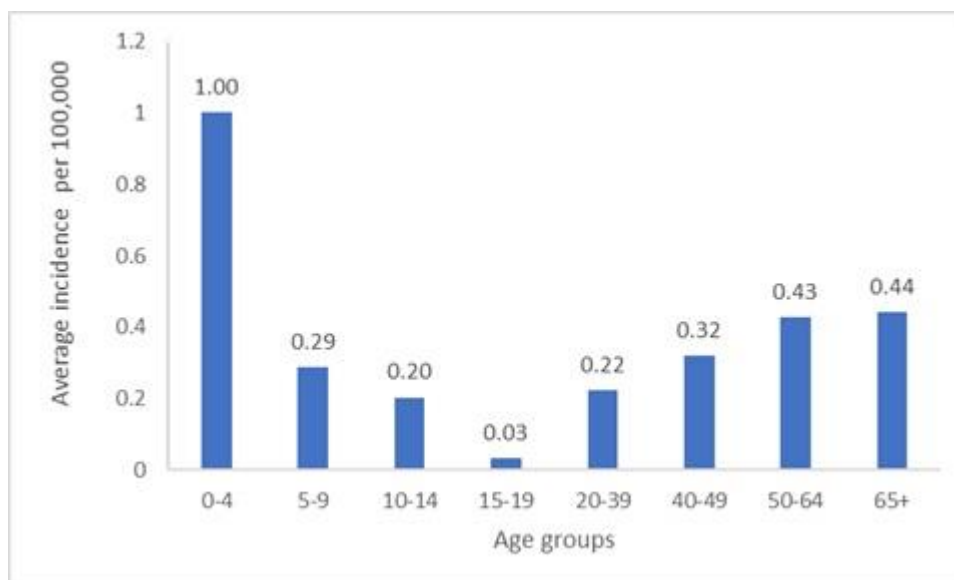
Διάγραμμα 9: Ετήσια επίπτωση πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας.



Κατανομή ανά ηλικιακή ομάδα

Η πλειονότητα των περιπτώσεων πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας καταγράφηκε σε ηλικιωμένους ενήλικες, που αντιπροσωπεύουν το 27,2% (110/405) και το 22,2% (90/405) των περιπτώσεων σε ενήλικες ηλικίας ≥ 60 ετών και 50-64 ετών, αντίστοιχα, ακολουθούμενες από τις ηλικιακές ομάδες: 20-39 ετών (15,1%; 61/405), 40-49 ετών (14,1%; 57/405) και 0-4 ετών (13,8%; 56/405). Η μειοψηφία των περιπτώσεων εμφανίστηκαν σε παιδιά 5-9 ετών και 10-14 ετών (4,2%; 17/405 και 3%; 12/405, αντίστοιχα) και εφήβους 15-19 ετών (0,5%; 2/405).

Περαιτέρω ανάλυση για την συχνότητα της πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας σε σχέση με την ηλικιακή ομάδα αποκάλυψε ότι η υψηλότερη μέση επίπτωση παρατηρήθηκε στα παιδιά 0-4 ετών (1/100.000), ακολουθούμενη από ενήλικες ηλικίας ≥ 65 ετών και ενήλικες ηλικίας 50-64 ετών (0,44/100.000 και 0,43/100.000, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 10).

Διάγραμμα 10: Επίπτωση μηνιγγίτιδας από *S. pneumoniae*, ανά ηλικιακή ομάδα.

Κατανομή οροτύπων

Ορότυποι αποδόθηκαν σε 260/273 (95,2%) των περιπτώσεων που αναλύθηκαν (και για τις οποίες είχαν σταλεί δείγματα στο ΕΚΑΜ. Για τις υπόλοιπες 13/273 περιπτώσεις η ποσότητα του εναπομείναντος δείγματος δεν ήταν επαρκής για να εφαρμοστεί η διαδικασία της οροτυποποίησης.

Ο ορότυπος 3 ήταν ο πιο διαδεδομένος και εντοπίστηκε στο 11,5% (30/260) των οροτυποποιημένων περιπτώσεων, ενώ οι ορότυποι 19Α και 23Β ήταν επόμενοι σε σειρά συχνότητας 7,7%; 20/260). Ακολουθούν οι ορότυποι 15Β/С, 23Α, 11Α/Д, 22F, 17Α/35В/С, 7Α/F, 24F/40, 12F, 15Α, 14, 10Α, 6D, 8 και 19F.

Η κατανομή οροτύπων σε σχέση με την ηλικιακή ομάδα φαίνεται στον πίνακα 20.

Πίνακας 20: Κατανομή οροτύπων σε σχέση με την ηλικιακή ομάδα.

Ορότυπος	Ηλικία (years)		0-4y	5-9y	10-14y [#]	20-39y	40-49y	50-64y	≥ 65y
	Αριθμός περιπτώσεων (n = 260)		44	13	8	36	29	57	73
Ορότυποι που περιλαμβάνονται στο PCV13	3	30 (11.5%)	1	1	0	4	2	7	15
19A	20 (7.7%)	1	0	0	1	2	7	9	
7A/F	10 (3.8%)	4	0	1	2	2	0	1	
14	9 (3.5%)	2	0	0	0	3	2	2	
19F	6 (2.3%)	3	0	1	0	1	0	1	
1	3 (1.2%)	0	1	0	0	1	0	1	
Άλλοι Ορότυποι *	5 (1.9%)	1	0	1	0	1	1	1	
Σύνολο	83 (31.9%)	12 (27.2%)	2 (15.4%)	3(37.5%)	7 (19.4%)	12 (41.4%)	17 (29.8%)	30 (41.1%)	
Ορότυποι που δεν περιλαμβάνονται στο PCV13	23B	20 (7.7%)	1	2	1	5	3	1	7
15B/C or 15B ^b	15 (5.8%)	5	1	0	3	2	3	1	
11A/D ^b	14 (5.4%)	0	1	0	1	2	5	5	
23A	14 (5.4%)	3	2	0	2	2	2	3	
22F ^b	13 (5%)	0	0	0	1	2	2	8	
17A, 35B/C ^a	10 (3.8%)	1	0	0	2	0	2	5	
12F ^b	9 (3.5%)	2	1	0	2	0	3	1	
24F, 40 ^a	9 (3.5%)	7	0	0	0	1	1	0	
15A	9 (3.5%)	0	0	0	3	1	2	3	
10A	8 (3.1%)	1	1	0	2	0	3	1	
6D ^b	8 (3.1%)	2	0	1	0	0	3	2	
8	6 (2.3%)	1	0	0	1	2	1	1	
20 ^b	5 (1.9%)	1	0	0	0	0	2	2	
35F/47F ^a	5 (1.9%)	3	1	1	0	0	0	0	
21	4 (1.5%)	1	1	0	0	0	1	1	
34/17A ^a	4 (1.5%)	0	0	0	3	0	1	0	
7C ^b	4 (1.5%)	0	0	0	1	1	1	1	
9 N/L	3 (1.2%)	0	0	0	0	1	1	1	
Άλλοι Ορότυποι **	17 (6.5%)	4	1	2	3	0	6	1	
Σύνολο	177(68.0%)	32 (72.7%)	11 (84.6%)	5 (62.5%)	29 (80.5%)	17 (58.6%)	40 (70.1%)	43 (58.9%)	

* 5, 6B, 23F

** 6, 17F, 18, 18A, 31, 37, 42, 25A/F/38, 33A/F/35A

^a Το CST απέδωσε μια ομάδα οροτύπων, χωρίς να υπάρχει δυνατότητα αναγνώρισης ενός μοναδικού ορότυπου εξ αιτίας της μη ύπαρξης διαθέσιμων single PCRs

^b το CST απέδωσε μια ομάδα οροτύπων. Η επιπλέον εφαρμογή single PCRs απέδωσε ένα μοναδικό ορότυπο

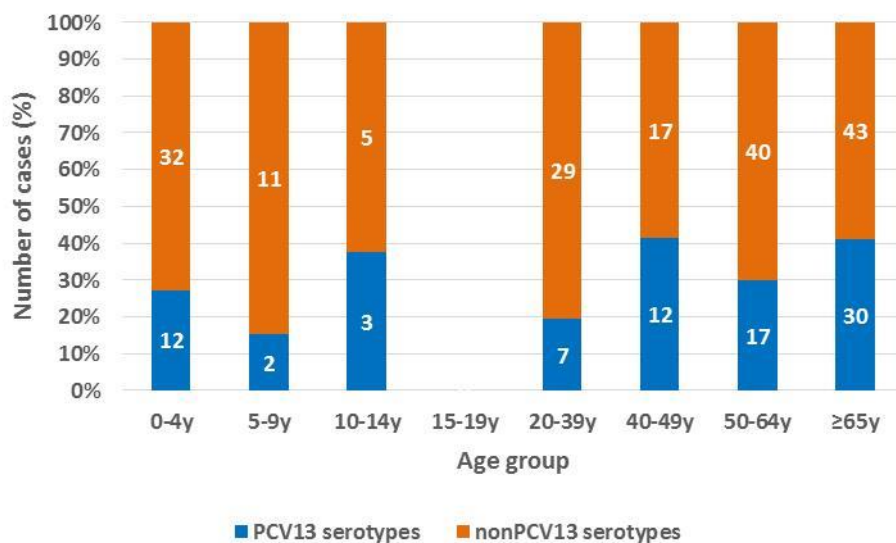
[#] Καμία οροτυποποιημένη περίπτωση στην ηλικιακή ομάδα 15-19 έτη.

Συγκεκριμένα, στην ηλικιακή ομάδα 0-4 ετών ο ορότυπος 24F/40 ήταν ο πιο διαδεδομένος (15,9%; 7/44), ακολουθούμενος από τον ορότυπο 15B/C (11,4%; 5/44). Όσον αφορά τις μεγαλύτερες ηλικίες, ο ορότυπος 3 ήταν ο πιο διαδεδομένος σε ενήλικες, ηλικίας ≥65 ετών (20,5%; 15/73), ακολουθούμενος από τους 19A (12,3%; 9/73), 22F (11%; 8/73) και 23B (9,6%; 7/73). Στην ηλικιακή ομάδα 50-64 ετών, οι ορότυποι 3 και 19A ήταν οι πιο διαδεδομένοι (12,3%; 7/57 έκαστος), ακολουθούμενοι από τον 11A/D (8,8%; 5/57). Αντίθετα, ο ορότυπος 23B κυριαρχούσε (13,9%; 5/36) σε ενήλικες 20-39 ετών, ακολουθούμενος από τον ορότυπο 3 (11,5%; 4/36).

Σε όλες σχεδόν τις ηλικιακές ομάδες (και για τις περιπτώσεις που έγινε οροτυποποίηση) η νόσος προκλήθηκε κυρίως από non-PCV13 ορότυπους, (68,1%; 177/260) ενώ σε

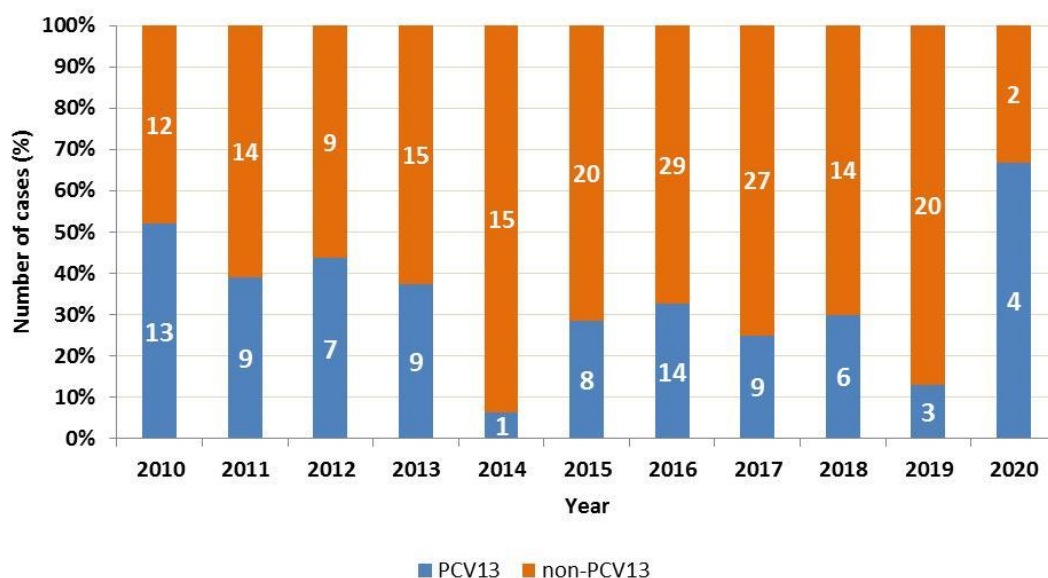
ορότυπους PCV13 οφείλεται το 31,9% (83/260) των οροτυποποιημένων περιπτώσεων (διάγραμμα 11).

Διάγραμμα 11: Κατανομή PCV13 και non-PCV13 οροτύπων ανά ηλικιακή ομάδα.



Μεταξύ των ετών 2010-2012 ο αριθμός των ορότυπων PCV13 και non-PCV13 ήταν παρόμοιος. Ωστόσο, μια αύξηση των non-PCV13 οροτύπων παρατηρήθηκε από το 2013, με περαιτέρω σταδιακή αύξηση κατά τα επόμενα έτη και ταυτόχρονη σταδιακή μείωση της συχνότητας των PCV13 οροτύπων (διάγραμμα 12).

Διάγραμμα 12: Κατανομή PCV13 και non-PCV13 οροτύπων ανά έτος.



Κατά τη περίοδο 2010-2012 το 54,7% των περιστατικών οφειλόταν σε non-PCV13 ορότυπους, αυξανόμενο σε 71,1% τη χρονική περίοδο 2013-2016 και φτάνοντας το 77,2% μεταξύ 2017-2019.

Η αυξητική τάση που παρατηρήθηκε βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική (τεστ $X^2 = 8.0583$, $p = 0.0045$). Σημειωτέον, ότι τα δεδομένα που καταγράφηκαν για το έτος 2020 δεν μπορούν να αναλυθούν, διότι λόγω των προστατευτικών μέτρων κατά της πανδημίας COVID-19, υπήρξαν μόνο ελάχιστα κρούσματα.

Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι από το 2014 παρατηρήθηκε μια μεγαλύτερη ποικιλομορφία στους ορότυπους που προκαλούν νόσο (νέοι αναδυόμενοι ορότυποι, αύξηση σχετικής συχνότητας αρκετών ορότυπων)

Θνητότητα

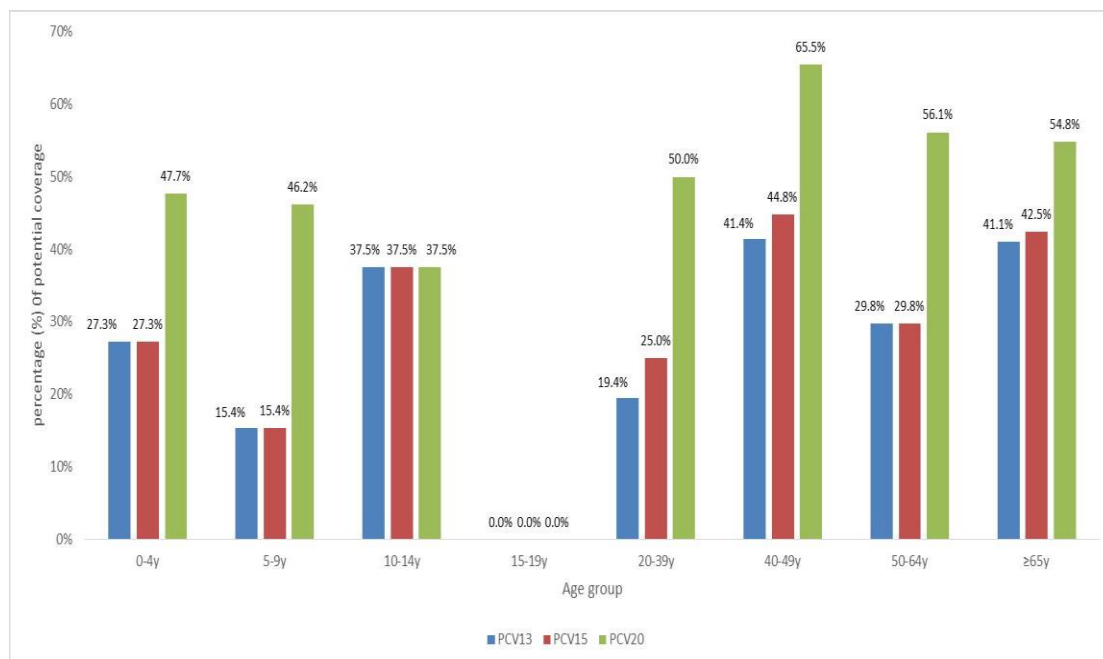
Από τις συνολικά 18 θανατηφόρες περιπτώσεις νόσου, οι 5 (27,8%) οφειλόταν σε PCV13 ορότυπους: 2 οφειλόταν σε ορότυπο 19A, και από 1 περίπτωση σε ορότυπο 1, 14 και 7A/F. Όσο αφορά την ηλικία, 4 θανατηφόρες περιπτώσεις αφορούσαν ενήλικες (εκ των οποίων οι 2 σε άτομα άνω των 80 ετών) ενώ μία θανατηφόρος περίπτωση αφορούσε παιδί 4 ετών με κλινική εκδήλωση μηνιγγίτιδας και βακτηριαιμίας από ορότυπο 14.

Από τις 13 (72,2%) περιπτώσεις που οφειλόταν σε non-PCV13 ορότυπους, ο ορότυπος 6D αναγνωρίστηκε σε 3 (16,7%) κατά τα πρώτα χρόνια του μελετώμενου διαστήματος (2010-2013). Ο ορότυπος 10A βρέθηκε σε 2 περιπτώσεις (11,1%), ενώ υπήρχε από 1 (5,6%) περίπτωση που αποδόθηκε στους ορότυπους 8, 22F, 17A/35B/C. Για τις υπόλοιπες 5 περιπτώσεις δεν είχε σταλεί κλινικό δείγμα στο ΕΚΑΜ για αναγνώριση του ορότυπου.

Εκτίμηση κάλυψης οροτύπων από τα επερχόμενα εμβόλια PCV

Με βάση το γεγονός ότι επίκειται και στη χώρα μας η κυκλοφορία των νέων πολυδύναμων συζευγμένων εμβολίων (PCV15 και PCV20), η πιθανή κάλυψη εμβολίου για την πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα εκτιμήθηκε σύμφωνα με τα τρέχοντα αποτελέσματα. Συνολικά, το PCV15 εκτιμάται ότι καλύπτει το 33,5%, ενώ το PCV20 εκτιμάται ότι καλύπτει 53,5% των περιπτώσεων, με διακυμάνσεις ανάλογα με την ηλικιακή ομάδα (διάγραμμα 13).

Διάγραμμα 13: Πιθανή κάλυψη (%) από 13-δύναμο (PCV13), 15-δύναμο (PCV15) και 20-δύναμο (PCV20) συζευγμένο εμβόλιο πνευμονιόκοκκου σε σχέση με τις ηλικιακές ομάδες.



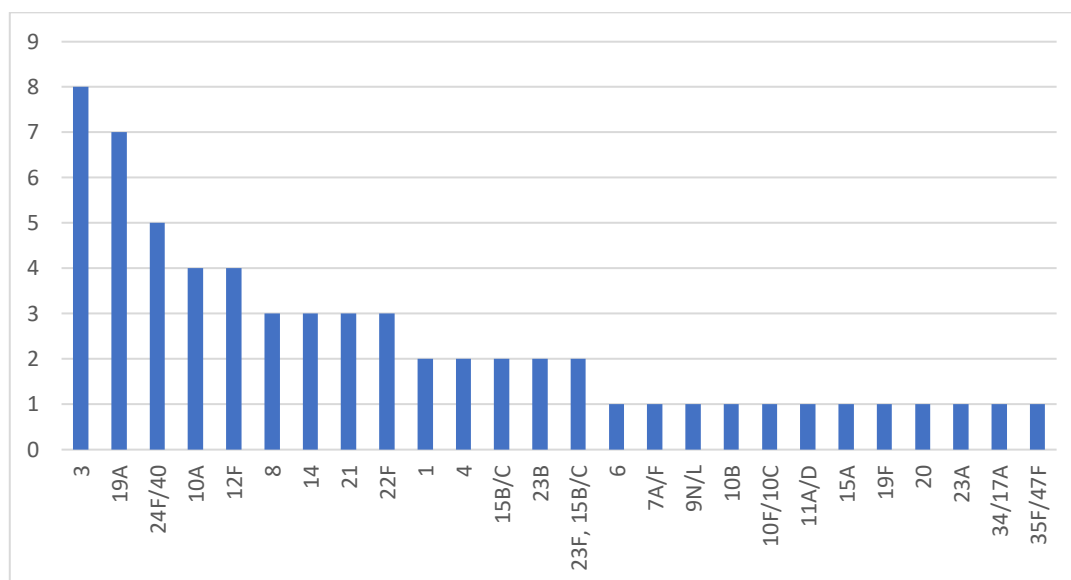
Όσον αναφορά τις υπόλοιπες περιπτώσεις λοιμώξεων από πνευμονιόκοκκο, να σημειωθεί ότι δε γίνεται υποχρεωτικά καταγραφή των περιστατικών σε εθνικό επίπεδο. Παρόλα αυτά, αποστέλλονται στο ΕΚΑΜ-δείγματα για υπηρεσίες ταυτοποίησης και τυποποίησης και σε περιπτώσεις που η κλινική διάγνωση δεν είναι μηνιγγίτιδα. Έτσι, κατά τη διάρκεια της χρονικής περιόδου 2010-2020 απεστάλη ένας ικανός αριθμός κλινικών δειγμάτων (από άλλες κλινικές οντότητες π.χ. σηψαιμία, πνευμονία, ωτίτιδα κτλ.) που ταυτοποιήθηκαν θετικά για *Streptococcus pneumoniae*.

4.3. Αποτελέσματα τεχνικής στην εφαρμογή δειγμάτων ασθενών με σηψαιμία

Κατά το αναφερόμενο χρονικό διάστημα της μελέτης (2010-2020), στάλθηκαν στο ΕΚΑΜ 68 δείγματα από ασθενείς με κλινική διάγνωση σηψαιμία. Από αυτά, για λόγους που έχουν αναφερθεί και πιο πάνω, ορότυπος αποδόθηκε σε 62 δείγματα.

Οι απομονωθέντες ορότυποι κατά σειρά συχνότητας παρουσιάζονται στο διάγραμμα 14.

Διάγραμμα 14: Απομονωθέντες ορότυποι κατά σειρά συχνότητας – Σηψαιμίες.



Ο πιο συχνά ταυτοποιημένος ορότυπος, ήταν ο ορότυπος 3 (8 περιπτώσεις) ακολουθούμενος από τον ορότυπο 19A (7 περιπτώσεις). Επόμενοι σε συχνότητα απομόνωσης ήταν ο ορότυπος 24F/40 (5 περιπτώσεις) και οι ορότυποι 10A και 12F (από 4 περιπτώσεις). Ακολουθούσαν διάφοροι άλλοι ορότυποι με μειούμενη συχνότητα.

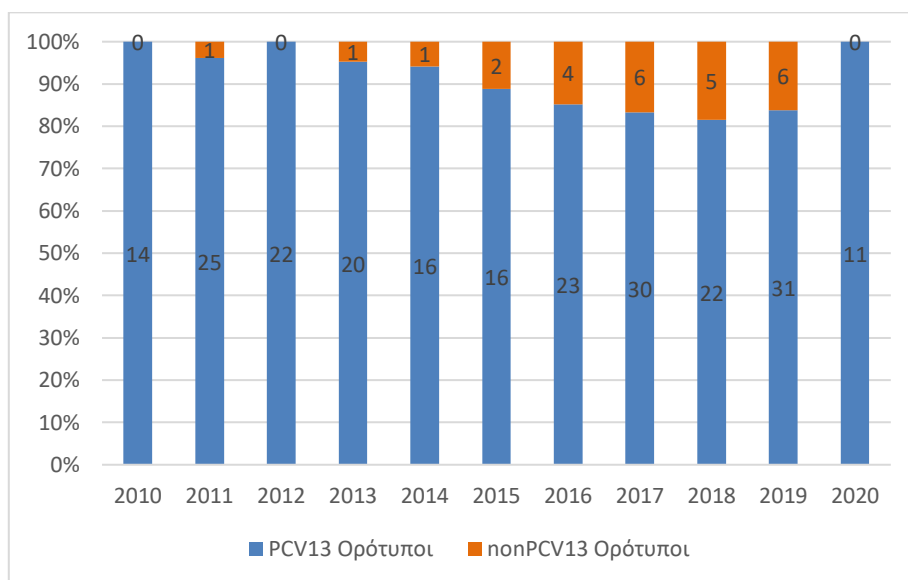
Από το σύνολο των 62 οροτυποποιημένων δειγμάτων, στα 27 (43,5%) βρέθηκαν ορότυποι για τους οποίους υπάρχει δυνατότητα ταυτοποίησης με τις ήδη εφαρμοζόμενες τεχνικές στο ΕΚΑΜ. Για τις υπόλοιπες 35 (56,5%) περιπτώσεις, η τυποποίηση έγινε δυνατή με την εφαρμογή της νέας μεθόδου – CST.

4.4. Αποτελέσματα τεχνικής στην εφαρμογή σε δείγματα ασθενών με πνευμονία ή/και εμπύημα

Κατά το χρονικό διάστημα 2010-2020, στάλθηκαν στο ΕΚΑΜ δείγματα από 283 περιπτώσεις ασθενών με κλινική διάγνωση πνευμονία και/ή εμπύημα. Από αυτά, ορότυπος ταυτοποιήθηκε στα 256/283 δείγματα. Για τα 27 δείγματα στα οποία δεν κατέστη δυνατή η απόδοση οροτύπου και επειδή η μελέτη έγινε αναδρομικά, δεν υπήρχε ικανοποιητική ποσότητα δείγματος ώστε να μπορέσει να εφαρμοστεί η νέα τεχνική.

Η κατανομή των οροτύπων που περιλαμβάνονται (PCV13) και των άλλων (nonPCV13) οροτύπων κατ' έτος παρατίθεται στο παρακάτω διάγραμμα (διάγραμμα 15).

Διάγραμμα 15: Κατανομή PCV13 και non-PCV13 οροτύπων ανά έτος.

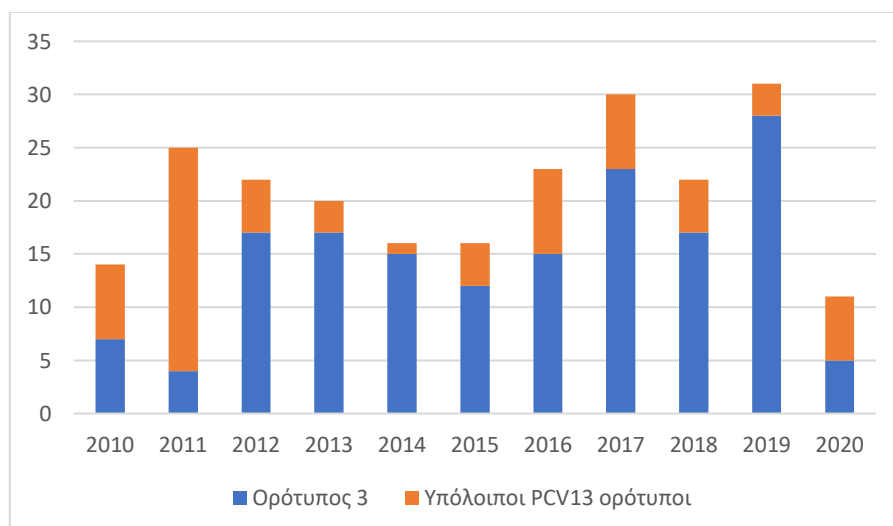


Από το παραπάνω διάγραμμα εύκολα γίνονται αντιληπτά δύο δεδομένα:

- Σε όλα τα έτη κυριαρχούν οι ορότυποι οι οποίοι θεωρητικά καλύπτονται από τα ήδη κυκλοφορούντα εμβόλια
- Ενώ στα πρώτα χρόνια της μελέτης οι ορότυποι οι οποίοι δεν καλύπτονται από τα κυκλοφορούντα εμβόλια είναι εξαιρετικά σπάνιοι, στη συνέχεια φαίνεται να αυξάνουν σε συχνότητα.

Είναι αξιοσημείωτο ότι ο πιο συχνός ορότυπος, που απομονώθηκε και ο οποίος καλύπτεται από τα εμβόλια ήταν ο ορότυπος 3. Αυτό παρατηρήθηκε σχεδόν σε όλα τα μελετώμενα έτη όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 16.

Διάγραμμα 16: Κατανομή ορότυπου 3 και λοιπών εμβολιακών οροτύπων κατ' έτος

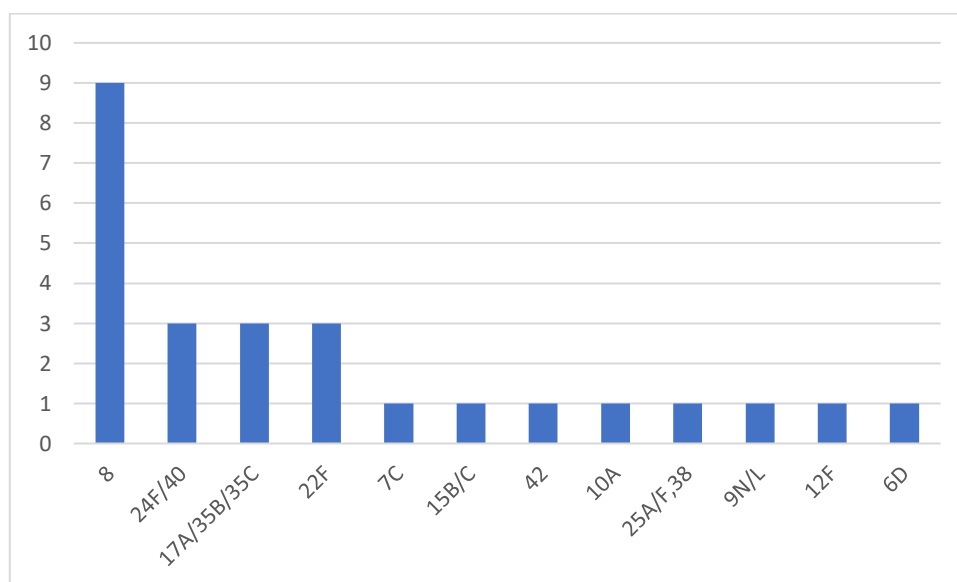


ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έτσι από τις 256 συνολικά περιπτώσεις πνευμονίας από *Streptococcus pneumoniae* που αποδόθηκε ορότυπος, οι 160 οφειλόταν σε ορότυπο 3. Επόμενος σε συχνότητα ήταν ο ορότυπος 19A με 38 απομονώσεις, ο ορότυπος 1 με 11, ο ορότυπος 14 με 7 ενώ ακολουθούσαν διάφοροι άλλοι ορότυποι με μικρή συχνότητα απομόνωσης.

Όσο αφορά τους ορότυπους οι οποίοι δεν καλύπτονται από τα κυκλοφορούντα εμβόλια, αυτοί παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (διάγραμμα 17) μαζί με τη συχνότητα απομόνωσης τους.

Διάγραμμα 17: Είδος και συχνότητα απομόνωσης μη εμβολιακών οροτύπων σε πνευμονίες.



Ο πιο συχνά ανευρισκόμενος ορότυπος ήταν ο 8 (9 περιπτώσεις) ακολουθούμενος από τους 24F/40, 17A/35B/C και 22F (από 3 περιπτώσεις αντίστοιχα).

4.5. Αποτελέσματα τεχνικής στην εφαρμογή δειγμάτων ασθενών με ωτίτιδα

Κατά τη διάρκεια του μελετώμενου χρονικού διαστήματος, στάλθηκαν στο ΕΚΑΜ, 41 ωτικά δείγματα τα οποία βρέθηκαν θετικά για *Streptococcus pneumoniae*, από ασθενείς με κλινική ένδειξη ωτίτιδα ή/και μαστοειδίτιδα. Οι ορότυποι που βρέθηκαν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 21).

Πίνακας 21: Ορότυποι που απομονώθηκαν από ωτικά δείγματα.

Ορότυπος	Αριθμός περιστατικών (n)
3*	13
7C*	1
14*	3
19A*	5
19F*	1
23B*	3
11A/D**	1
15A**	1
15B/C**	1
16F**	2
17A/35B/35C**	1
22F**	2
23A**	1
23F, 15B/C**	1
24F/40**	1
25A/F,38**	2
33F/33A/35A**	1
35F/47F**	1
Σύνολο	41

* ορότυποι για τους οποίους ήταν δυνατή η ταυτοποίηση με τις προϋπάρχουσες τεχνικές στο EKAM

** ορότυποι που ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση του CST

Όπως μπορεί να γίνει αντιληπτό από τον παραπάνω πίνακα, χωρίς την εφαρμογή του CST υπήρχε η δυνατότητα να ταυτοποιηθούν 26 από τα 41 δείγματα (63,4%). Με την εφαρμογή της νέας μεθόδου δόθηκε η δυνατότητα να ταυτοποιηθούν και τα υπόλοιπα δείγματα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επιβεβαίωση του παθογόνου και ο προσδιορισμός του ορότυπου των κλινικά ύποπτων περιπτώσεων διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου (IPD) είναι σημαντικά για τη επιδημιολογική επιτήρηση των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων.

Όπως έχει αποδειχθεί, η συχνότητα εμφάνισης των οροτύπων που ευθύνονται για IPD μπορεί να αλλάξει με το πέρασμα του χρόνου (Amin-Chowdhury Z. *et al.*, 2020).

Λαμβάνοντας υπόψη την πίεση που ασκείται στο μικροοργανισμό από τα εμβόλια και την μελλοντική εξέλιξη των συζευγμένων εμβολίων, η συνεχής παρακολούθηση των οροτύπων είναι εξαιρετικά σημαντική.

Η αναγκαιότητα κατανόησης της ειδικής επιδημιολογίας των οροτύπων, η συσχέτιση τους με τους τύπους της νόσου, οι δυσκολίες που αντιμετωπίζονται σήμερα στη διαχείριση της πνευμονιοκοκκικής νόσου και η υιοθέτηση προληπτικών μέτρων οδήγησαν σε περαιτέρω έρευνα για τεχνικές τυποποίησης της κάψας ανεξάρτητα από την ύπαρξη θετικής καλλιέργειας. Καθώς πλέον, περισσότερο από το 60% των περιπτώσεων νόσου από *S. pneumoniae* αναγνωρίζονται με μοριακές μεθόδους, η ανάγκη για μοριακή ταυτοποίηση και άμεση τυποποίηση απ' ευθείας από τα κλινικά δείγματα έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια.

Όπως είναι γνωστό, η μέθοδος αναφοράς για την οροτυποποίηση του πνευμονιοκόκκου είναι η αντίδραση Quellung ή δοκιμή Neufeld. Ωστόσο, η μέθοδος είναι χρονοβόρα και δαπανηρή, καθώς οι αντιοροί που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ομάδας και του ορότυπου έχουν υψηλό κόστος ενώ είναι απαραίτητη η απομόνωση βακτηριακού στελέχους.

Από την άλλη, λαμβάνοντας υπόψη ότι επί του παρόντος έχουν αναγνωριστεί περίπου 100 διαφορετικοί τύποι πνευμονιοκοκκικής κάψας, η μοριακή προσέγγιση με τη χρήση διαδοχικών μεθόδων multiplex PCR (Brito, D.A. *et al.*, 2003, Azzari, C. *et al.*, 2008) καθώς και μεθόδων PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) (Azzari, C. *et al.*, 2010, Magomani, V. *et al.*, 2014), παρόλο που επιτρέπει την ταυτοποίηση, σε υψηλό ποσοστό (75-90%), δειγμάτων που είναι αρνητικά στην καλλιέργεια αλλά θετικά σε μοριακές μεθόδους για ανίχνευση πνευμονιοκόκκου παραμένει επίσης χρονοβόρα και δαπανηρή. Ως εκ τούτου, για να μπορέσουμε να αναγνωρίσουμε τους επικρατέστερους ορότυπους, υπάρχει ανάγκη για λιγότερο χρονοβόρες, και πιο οικονομικές μεθόδους, ειδικά στην εποχή μετά το PCV-13, κατά την οποία η ποικιλομορφία των ορότυπων έχει γενικά αυξηθεί, και με διαφορετικούς ορότυπους όπως οι 24F, 22F, 8, 15A και 33F να γίνονται

επιδημιολογικά σημαντικοί σε χώρες που χρησιμοποιούν το PCV-13 (Tin Tin Htar *et al.*, 2015, Amin-Chowdhury, Z. *et al.*, 2021).

Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει ότι με την άμεση εφαρμογή της νέας μεθόδου CST στα κλινικά δείγματα, ταυτοποιήθηκε ο πνευμονιόκοκκος και στα 239 κλινικά δείγματα στα οποία δεν υπήρχε θετική καλλιέργεια. Στη πλειονότητα (80,56%) των περιπτώσεων αποδόθηκε ένας ορότυπος, είτε εφαρμόζοντας μόνο το CST είτε σε συνδυασμό με single PCR που στοχεύει σε μια συγκεκριμένη ομάδα οροτύπων.

Η εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου PCR δύο σταδίων βελτίωσε την απόδοση του προϊόντος PCR, δημιουργώντας ένα ευαίσθητο εργαλείο που εφαρμόζεται απευθείας σε κλινικά δείγματα. Ως αποτέλεσμα, ένας μεμονωμένος ορότυπος αναγνωρίστηκε απευθείας με το CST, σχεδόν στο 50% των περιπτώσεων, ενώ η περαιτέρω εφαρμογή μιας single PCR που στοχεύει σε μια ομάδα 2-3 οροτύπων απέδωσε ένα επιπλέον 31,4% μεμονωμένων οροτύπων.

Υπήρχε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη χρήση παραδοσιακών μεθόδων οροτυπίας για τις 67 περιπτώσεις που επιβεβαιώθηκαν με καλλιέργεια και στις οποίες αναγνωρίστηκε ο ορότυπος.

Σε σύγκριση με την ταυτοποίηση οροτύπων που πραγματοποιείται είτε με συμβατική μέθοδο (Quellung) είτε με την εφαρμογή διαδοχικών πολυπλεκτικών αναλύσεων PCR, η προτεινόμενη μεθοδολογία παρέχει τη δυνατότητα τυποποίησης δειγμάτων χωρίς θετική καλλιέργεια με σχετικά φθινό, γρήγορο (αποτελέσματα μπορεί να ληφθούν εντός 24 ωρών) και αξιόπιστο τρόπο και με την άμεση αναγνώριση ενός μόνο ορότυπου ή ταυτοποίηση μιας ομάδας δύο ή τριών οροτύπων, οι οποίοι μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω με δοκιμασία single PCR. Επιπλέον, η προτεινόμενη μεθοδολογία μπορεί εύκολα να εγκατασταθεί σε εργαστήρια που είναι εξοπλισμένα για εκτέλεση μοριακών ελέγχων DNA με PCR. Αναλυτές αλληλούχισης δεν είναι απαραίτητοι καθώς αυτό το τμήμα της τεχνικής, μπορεί να πραγματοποιηθεί από εξωτερικό εργαστήριο.

Η εφαρμογή του νέου πρωτοκόλλου CST σε συνδυασμό με αντιδράσεις PCR επέτρεψε την πραγματοποίηση της πρώτης μελέτης στην Ελλάδα με δεδομένα για τους ορότυπους του πνευμονιόκοκκου στη μηνιγγίτιδα και –σε κάποιο βαθμό– στη σηψαιμία, σε όλες τις ηλικίες και για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, το γεγονός ότι οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν απευθείας σε PCR-θετικά, καλλιέργεια-αρνητικά βιολογικά δείγματα (όπως ENY και αίμα), βελτίωσε σημαντικά την αναγνώριση των πνευμονιοκοκκικών οροτύπων και επέτρεψε την ταυτοποίηση συγκεκριμένων οροτύπων εντός μιας ομάδας (Marmaras N. *et al.*, 2021).

Με το τρόπο αυτό, αποκτήθηκαν σημαντικές γνώσεις για την κατανομή των οροτύπων της πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας στην Ελλάδα.

Όπως ήταν αναμενόμενο, η συχνότητα εμφάνισης πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας ήταν υψηλότερη σε βρέφη, νεαρά παιδιά και ηλικιωμένους (WHO 2012, ECDC 2020). Όσον αφορά την κατανομή των οροτύπων, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην αναλογία των ορότυπων PCV13 που προκαλούν πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα με την πάροδο του χρόνου. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και σε άλλες χώρες όπου εφαρμόζονται προγράμματα εμβολιασμού με PCV13 (Ladhani S.N. *et al.*, 2018, Ben-Shimol S. *et al.*, 2021, Ouldali N. *et al.*, 2021, Baxter R. *et al.*, 2021, Ouldali N. *et al.*, 2018, Weinberger R. *et al.*, 2018).

Ωστόσο, ακόμη και στα πιο πρόσφατα χρόνια (2017-2019), οι ορότυποι PCV13 συνέχισαν να αποτελούν το 15,6% της νόσου, με τους ορότυπους 3, και 19A να αντιπροσωπεύουν το 66,6% της νόσου που προκαλείται από ορότυπους PCV13. Αυτό το εύρημα αναδεικνύει την ανάγκη για υψηλή συμμόρφωση με τις συστάσεις για εμβολιασμό και τα αντίστοιχα προγράμματα.

Η επιμονή των οροτύπων 3 και 19A σε περιπτώσεις IPD έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Ladhani S.N. *et al.*, 2018, Ben-Shimol S. *et al.*, 2021, Ouldali N. *et al.*, 2021, ECDC 2020, Kaplan S.L. *et al.*, 2019) και μπορεί να σχετίζεται με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά αυτών των οροτύπων (Koutouzis E.I. *et al.*, 2018, Groves N. *et al.*, 2019).

Επιπλέον, παρά την άμεση αποτελεσματικότητα του PCV13 έναντι τόσο του ορότυπου 19A όσο και του ορότυπου 3 (αν και για τον ορότυπο 3 χαμηλότερη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με άλλους ορότυπους εμβολίου) (Isturiz R. *et al.*, 2017, Sings H.L. *et al.*, 2019), και οι δύο ορότυποι είναι οι πιο διαδεδομένοι μεταξύ των περιπτώσεων αποτυχίας του εμβολίου (Oligbu G. *et al.*, 2017, Hernández S. *et al.*, 2020).

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα ήταν η ανίχνευση των αναδυόμενων non-PCV13 οροτύπων που προκαλούν μηνιγγίτιδα στην Ελλάδα με τους πιο διαδεδομένους να είναι οι 23B, 15B/C, 11A/D, 23A, 22F, 17A, 35B/C, 12F, 24F/40, 15A, 10A και 6D. Μεταξύ αυτών, οι ορότυποι 10A, 11A, 12F, 15B, 22F είναι στόχος των νέων πολυδύναμων συζευγμένων εμβολίων που αναμένονται και στη χώρα μας (PCV15 και PCV20).

Οι ορότυποι 15A, 23A, 23B, 24F, οι οποίοι δεν περιλαμβάνονται στα νέα PCV, έχουν αναφερθεί ως αναδυόμενες αιτίες IPD επίσης σε άλλες μελέτες (Ladhani S.N. *et al.*, 2018, Ouldali N. *et al.*, 2021, ECDC 2020, Weinberger R. *et al.*, 2018, Kaplan S.L. *et al.*

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

al., 2019) και είναι σημαντικό να συνεχιστεί η παρακολούθηση τους στο μέλλον. Ο ορότυπος 24F αναφέρεται ότι επηρεάζει κυρίως βρέφη και παιδιά ηλικίας έως 4 ετών (Ouldali N. *et al.*, 2021, ECDC 2020), όπως ήταν και το εύρημα της παρούσας μελέτης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εφαρμογή της προτεινόμενης μεθοδολογίας για άμεσο προσδιορισμό του πνευμονιοκοκκικού ορότυπου σε αρνητικά στην καλλιέργεια, θετικά σε PCR κλινικά δείγματα, είναι σχετικά φθηνή, γρήγορη και αξιόπιστη και θα μπορούσε να βελτιώσει την επιδημιολογική επιτήρηση των ορότυπων του πνευμονιόκοκκου. Επιπλέον, μπορεί να διευκολύνει τη στενή παρακολούθηση των εξελισσόμενων οροτύπων και της αποτελεσματικότητας των εμβολίων, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την αξιολόγηση της συνολικής επίδρασης των προγραμμάτων εμβολιασμού κατά του πνευμονιόκοκκου και για σχεδιασμό μελλοντικών στρατηγικών εμβολιασμού.

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aas, J.A., Paster B.J., Stokes L.N., Olsen I., Dewhirst F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5721-5732 (2005).
- Abeyta, M., Hardy, G.G. & Yother, J. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 71, 218-225 (2003).
- ACIP: Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 1997, 46 (RR-8), 1-24.
- Adamkiewicz, T.V., Sarnaik S., Buchanan G.R., Iyer R.V., Miller S.T., Pegelow C.H., Rogers Z.R., Vichinsky E., Elliott J., Facklam R.R., O'Brien K.L., Schwartz B., Van Beneden C.A., Cannon M.J., Eckman J.R., Keyserling H., Sullivan K., Wong W.Y., Wang W.C. Invasive pneumococcal infections in children with sickle cell disease in the era of penicillin prophylaxis, antibiotic resistance, and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccination. *J. Pediatr.* 2003;143: 438-444.
- Alexander, J.E., Berry A.M., Paton J.C., Rubins J.B., Andrew P.W., Mitchell T.J. Amino acid changes affecting the activity of pneumolysin alter the behaviour of pneumococci in pneumonia. *Microb. Pathog.* 24, 167-174 (1998).
- Alpern E., Alessandrini E., McGowan K., Bell L.M., Shaw K.N. Serotype prevalence of occult pneumococcal bacteremia. *Pediatrics* 2001; 108:e23.
- Alter S.J. Pneumococcal infections. *Ped. Rev.* 2009; 30: 155-64.
- Amin-Chowdhury, Z.; Collins, S.; Sheppard, C.; Litt, D.; Fry, N.K.; Andrews, N.; Ladhani, S.N. Characteristics of Invasive Pneumococcal Disease Caused by Emerging Serotypes After the Introduction of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in England: A Prospective Observational Cohort Study, 2014-2018. *Clin. Infect. Dis.* 2020, 71, e235-e243.
- Amin-Chowdhury, Z.; Groves, N.; Sheppard, C.L.; Litt, D.; Fry, N.K.; Andrews, N.; Ladhani, S.N. Invasive pneumococcal disease due to 22F and 33F in England: A tail of two serotypes. *Vaccine* 2021, 39, 1997-2004.
- Anderson D.C., Schmalstieg F.C., Finegold M.J. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency. Their quantitative definition

- and relation to leucocyte dysfunction and clinical features. *J. Infect. Dis.* 1985;152:668-689.
- Antachopoulos C., Tsolia M.N., Tzanakaki G., Xirogianni A., Dedousi O., Markou G., Zografou S.M., Eliades A., Kirvassilis F., Kesanopoulos K., Roilides E. Parapneumonic pleural effusions caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 in children immunized with 13-valent conjugated pneumococcal vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2014; 33:81-83. doi:10.1097/INF.0000000000000041.
 - Appelbaum P.C., Bhamjee A., Scragg J.N., Hallett A.F., Bowen A.J., Cooper R.C. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet.* 1977;2 (8046): 995-7.
 - Appelbaum P.C. New prospects for antibacterial agents against multidrug-resistant pneumococci. *Microb. Drug Resist.* 1995;1 (1): 43-8.183.
 - Arason V.A., Kristinsson K.G., Sigurdsson J.A., Stefansdottir G., Molstad S., Gudmundsson S. Do antimicrobials increase the carriage rate of penicillin resistant pneumococci in children? Cross sectional prevalence study. *BMJ.* 1996;313 (7054): 387-91.
 - Arrecubieta C., García E., López R. 1995. Sequence and transcriptional analysis of a DNA region involved in the production of capsular polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Gene* 167:1-7 [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00657-5](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(95)00657-5).
 - Austrian R., Bernheimer H.P., Smith E.E.B., Mills G.T. 1959. Simultaneous production of two capsular polysaccharides by pneumococcus. II. The genetic and biochemical bases of binary capsulation. *J. Exp. Med.* 110:585-602 <http://dx.doi.org/10.1084/jem.110.4.585>
 - Austrian R. The Pneumococcus at the Millennium: Not Down, Not Out. *The Journal of Infectious Diseases* 1999; 179 (Suppl 2): S338-41
 - Austrian, R. (1976). The quellung reaction, a neglected microbiologic technique. *Mt Sinai J. Med.* 43, 699-709.
 - Austrian, R. Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Rev. Infect. Dis.* 3, S1-S17 (1981).
 - Avery O.T., Macleod C.M., McCarty M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of

- transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* 79:137-158 <http://dx.doi.org/10.1084/jem.79.2.137>
- Avery O.T., Macleod C.M., McCarty M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* 79:137-158 <http://dx.doi.org/10.1084/jem.79.2.137>
 - Azzari A., Cortimiglia M., Nieddu F., Moriondo M., Indolfi G., Mattei R., Zuliani M., Adriani B., Degl'Innocenti R., Consales G., Aquilini D., Bini B., Di Natale M.E., Canessa C., Ricci S., de Vitis E., Mangone G., Bechini A., Bonanni P., Pasinato A. & Resti M. (2016) Pneumococcal serotype distribution in adults with invasive disease and in carrier children in Italy: Should we expect herd protection of adults through infants' vaccination?, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12:2, 344-350, DOI: 10.1080/21645515.2015.1102811
 - Azzari, C.; Moriondo, M.; Indolfi, G.; Cortimiglia, M.; Canessa, C.; Becciolini, L.; Lippi, F.; de Martino, M.; Resti, M. Realtime PCR is more sensitive than multiplex PCR for diagnosis and serotyping in children with culture negative pneumococcal invasive disease. *PLoS ONE*. 2010, 5, e9282
 - Azzari, C.; Moriondo, M.; Indolfi, G.; Massai, C.; Becciolini, L.; de Martino, M.; Resti, M. Molecular detection methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by *Streptococcus pneumoniae* in Italian children. *J. Med. Microbiol.* 2008, 57, 1205-1212
 - Balsells, E.; Guillot, L.; Nair, H.; Kyaw, M.H. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2017, 12, e0177113.
 - Batt S.L., Charalambous B.M., McHugh T.D., Martin S., Gillespie S.H. 2005. Novel PCR-restriction fragment length polymorphism method for determining serotypes or serogroups of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43:2656-2661. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.6.2656-2661.2005>.

- Baxter R., Aukes L., Pelton S.I., Yee A., Klein N.P., Gruber W.C. *et al.*, Impact of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine on Invasive Pneumococcal Disease After Introduction Into Routine Pediatric Use. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2021 Mar 26;10 (2): 141-150. doi: 10.1093/jpids/piaa035.
- Beall, B., McEllistrem, M.C., Gertz, R.E. Jr, Wedel S., Boxrud D.J., Gonzalez A.L., Medina M.J., Pai R., Thompson T.A. & other authors (2006). Pre- and post vaccination clonal compositions of invasive pneumococcal serotypes for isolates collected in the United States in 1999, 2001, and 2002. *J. Clin. Microbiol* 44, 999-1017.
- Ben-Shimol S., Regev-Yochay G., Givon-Lavi N., Van Der Beek B.A., Brosh-Nissimov T., Peretz A. *et al.*; Israeli Pediatric Bacteremia And Meningitis Group (Ipbmg), And The Israeli Adult Invasive Pneumococcal Disease (Iaipd) Group. Dynamics of Invasive Pneumococcal Disease in Israel in Children and Adults in the PCV13 Era: A Nationwide Prospective Surveillance. *Clin Infect Dis.* 2021 Jul 22: ciab645. doi: 10.1093/cid/ciab645.
- Bentley S.D., Aanensen D.M., Mavroidi A., Saunders D., Rabinowitsch E., Collins M., Donohoe K., Harris D., Murphy L., Quail M.A., Samuel G., Skovsted I.C., Kalltoft M.S., Barrell B., Reeves P.R., Parkhill J., Spratt B.G. 2006. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* 2:e31 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0020031>.
- Benton K.A., Everson M.P. & Briles D.E. A pneumolysin negative mutant of *Streptococcus pneumoniae* causes chronic bacteremia rather than acute sepsis in mice. *Infect. Immun.* 63, 448-455 (1995).
- Bergmann S. & Hammerschmidt S. Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* 152, 295-303 (2006).
- Bernheimer H.P., Wermundsen I.E., Austrian R. Qualitative Differences in the Behavior of Pneumococcal Deoxyribonucleic Acids Transforming to the Same Capsular Type. *ASM Journals, Journal of Bacteriology*, Vol. 93, No. 1. DOI:<https://doi.org/10.1128/jb.93.1.320-333.1967>
- Berry A. & Paton J. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect. Immun.* 68, 133-140 (2000).

- Berry A.M. & Paton J.C. Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 64, 5255-5262 (1996).
- Berry A.M., Alexander J.E., Mitchell T.J., Andrew P.W., Hansman D., Paton J.C. Effect of defined point mutations in the pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 63, 1969-1974 (1995).
- Berry A.M., Lock R.A., Hansman D. & Paton J.C. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 57, 2324-2330 (1989).
- Berry A.M., Ogunniyi A.D., Miller D.C. & Paton J.C. Comparative virulence of *Streptococcus pneumoniae* strains with insertion-duplication, point, and deletion mutations in the pneumolysin gene. *Infect. Immun.* 67, 981-985 (1999).
- Berry A.M., Yother J., Briles D.E., Hansman D. & Paton J.C. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 57, 2037-2042 (1989).
- Berry V., Thorburn CE, Knott SJ, Woodnutt G. Bacteriological efficacies of three macrolides compared with those of amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42 (12): 3193-9.
- Bogaert D., de Groot R., Hermans P.W.M. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect. Dis.* 2004;4; 144-54.
- Bogaert D., Hermans P.W.M., Adrian P.V., Rümke H.C., de Groot R. Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. *Vaccine* 2004; 22:2209-20.
- Bogaert D., Engelen M.N., Timmers-Reker A.J., Elzenaar K.P, Peerbooms P.G., Coutinho R.A., de Groot R., Hermans P.W. Pneumococcal carriage in children in the Netherlands: a molecular epidemiological study. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 3316-20.
- Boulnois G.J. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 1992;138:249-259.
- Braun J., Sublett J.E., Freyer D., Mitchell T.J., Cleveland J.L., Tuomanen E.I., and Weber J.R. Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J. Clin. Invest.* 109, 19-27 (2002).

- Briles, D.E. & Mirza, S. PspA inhibits the antibacterial effect of lactoferrin on *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem. Cell Biol.* 84, 401 (2006).
- Briles, D.E., Ades E., Paton J.C., Sampson J.S., Carlone G.M., Huebner R.C., Virolainen A., Swiatlo E., Hollingshead S.K. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 68, 796-800 (2000).
- Brito, D.A.; Ramirez M.; de Lencastre, H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 2378-2384.
- Brueggemann A.B., Griffiths D.T., Meats E., Peto T., Crook D.W. & Spratt B.G. (2003). Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J. Infect. Dis* 187, 1424-1432.
- Brueggemann A.B., Peto T.E., Crook D.W., Butler J.C., Kristinsson K.G., Spratt B.G. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *J. Infect. Dis.* (2004) 190:1203-11. doi: 10.1086/423820
- Bruyn G.A., Zegers B.J., van Futrh R. Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 14:251-62.
- Burman L.A., Norrby R., Trollfors B. Invasive pneumococcal infections: Incidence, predisposing factors, and prognosis. *Rev. Infect. Dis.* 1985;7:133-142.
- Butler J.C., Shapiro E.D., Carlone G.M. Pneumococcal vaccines: history, current status, and future directions. *Am. J. Med.* 1999;107:69S-76S.
- Calix J.J., Porambo R.J., Brady A.M., Larson T.R., Yother J., Abeygunwardana C., Nahm M.H., 2012. Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among *Streptococcus pneumoniae* serotype 20 strains: discovery of a new pneumococcal serotype. *J. Biol. Chem.* 287:27885-27894.
- Canvin J.R., Marvin A.P., Sivakumaran M., Paton J.C., Boulnois G.J., Andrew P.W., Mitchell T.J. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicaemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J. Infect. Dis.* 172, 119-123 (1995).

- CDC, 2020. Surveillance and Reporting, Pneumococcal Disease. Available at: <https://www.cdc.gov/pneumococcal/surveillance.html>. Page last reviewed: September 1, 2021.
- CDC. (2000) Preventing Pneumococcal Disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).
- Cheng Q., Finkel D. & Hostetter M.K. Novel purification scheme and functions for a C3-binding protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochemistry* 39, 5450-5457 (2000).
- Christenson B., Sylvan S.P., Noreen B., Carriage of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* among children attending day-care centres in Stockholm area. *Scand. J. Infect. Dis.* 1997;29:555-558.
- Coffey T.J., Enright M.C., Daniels M. *et al.*: Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 27:73-83 1998
- Cohen, R.; Cohen, J.F.; Chalumeau, M.; Levy, C. Impact of pneumococcal conjugate vaccines for children in high- and non-high-income countries. *Expert Rev. Vaccines* 2017, 16, 625-640.
- Cooper G., Rosenstein C., Walter A., Peizer L. 1932. The further separation of types among the pneumococci hitherto included in group IV and the development of therapeutic antisera for these types. *J. Exp. Med.* 55:531-554.
- Corso A., Severina E.P., Petruk V.F., Mauriz Y.R., Tomasz A. Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing respiratory disease in the United States. *Microb Drug Resist.* 1998; 4 (4): 325-37.
- Croucher N.J. Harris S.R., Fraser C., Quail M.A., Burton J., van der Linden M., McGee L., von Gottberg A., Song J.H., Ko K.S. *et al.*, Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* 2011, 331, 430.
- Croucher N.J., Finkelstein J.A., Pelton S.I., Mitchell P.K., Lee G.M., Parkhill J., Bentley S.D., Hanage W.P., Lipsitch M. 2013. Population genomics of post-

- vaccine changes in pneumococcal epidemiology. *Nat Genet* 45:656-663. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2625>.
- Crum N.F., Barrozo C.P., Chapman F.A., Ryan M.A. & Russell K.L. An outbreak of conjunctivitis due to a novel unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* among military trainees. *Clin. Infect. Dis.* 39, 1148-1154 (2004).
 - Cunningham-Rundles C. Clinical and immunologic analysis of 103 patients with common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* 1989;9:22-23.
 - da Gloria Carvalho M., Pimenta F.C., Jackson D., Roundtree A., Ahmad Y., Millar E.V., O'Brien K.L., Whitney C.G., Cohen A.L., Beall B.W. 2010. Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 48:1611-1618. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02243-09>.
 - D'Ancona F., Caporali M.G., Del Manso M., Giambi C., Camilli R., D'Ambrosio F. *et al.*, Invasive pneumococcal disease in children and adults in seven Italian regions after the introduction of the conjugate vaccine, 2008-2014. *Epidemiol. Prev.* 2015 Jul-Aug;39 (4 Suppl 1): 134-8.
 - Dave S., Carmicle S., Hammerschmidt S., Pangburn M. & McDonald L. Dual roles of PspC, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, in binding human secretory IgA and factor H. *J. Immunol.* 173, 471-477 (2004).
 - Dawid S., Roche A. & Weiser J. The blp bacteriocins of *Streptococcus pneumoniae* mediate intraspecies competition both in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 75, 443-451 (2007).
 - Deibel R.H., Seeley H.W. Jr. Family II: Streptococcaceae. Fam. nov. In: Buchanan R.E., Gibbons N.E., eds. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. Baltimore. Williams & Wilkins, 1974;490-517.
 - Dias C.A., Teixeira L.M., daCarvalho M.G., Beall B. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J. Med. Microbiol.* 56; 1185-8. (2007)
 - Dietl B., Henares D., Boix-Palop L., Muñoz-Almagro C., Garau J. and Calbo E. (2021). Related Factors to *Streptococcus pneumoniae* Invasive Infection and Clinical Manifestations: The Potential Role of Nasopharyngeal Microbiome. *Front. Med.* 8:650271. doi: 10.3389/fmed. 2021.650271.

- Dillard J.P., Yother J. Genetic and molecular characterization of capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Mol Microbiol.* 1994; 12: 959-972
- Dillard J.P., Caimano M., Kelly T., Yother J. Capsules and cassettes: Genetic organization of the capsule locus of *Streptococcus pneumoniae*. *Dev. Bio. I Stand.* 1995; 85:261-5.
- Dillard J.P., Vandersea M.W., Yother J. 1995. Characterization of the cassette containing genes for type 3 capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Exp. Med.* 181:973-983 <http://dx.doi.org/10.1084/jem.181.3.973>.
- Dowson C., Coffey T. & Spratt B. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding protein mediated resistance to β -lactam antibiotics. *Trends Microbiol.* 2, 361-366 (1994).
- Dullforce, P.; Sutton, D.C.; Heath, A.W. Enhancement of T cell-independent immune responses in vivo by CD40 antibodies. *Nat. Med.* 1998, 4, 88-91.
- ECDC 2010. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. Available at: http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/1011_sur_annual_epidemiological_report_on_communicable_diseases_in_europe.pdf
- Eddy B. 1944. Cross reactions between the several pneumococcal types and their significance in the preparation of polyvalent antiserum. *Public Health Rep* 59:485-499. <http://dx.doi.org/10.2307/4584847>.
- Ekdahl K., Ahlinder I., Hansson H., Melander E., Molstad S., Soderstrom M., Persson K. Duration of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistance *Streptococcus pneumoniae*: Experience from the South Swedish intervention project. *Clin. Infect. Dis.* 1997;25:1113-1117.
- Elberse Karin E.M., van de Pol I., Witteveen S., van der Heide H.G.J, Schot C.S., van Dijk A., van der Ende A., Schouls L.M. Population Structure of Invasive *Streptococcus pneumoniae* in the Netherlands in the Pre-Vaccination Era Assessed by MLVA and Capsular Sequence Typing. *PLoS One.* 2011;6 (5): e20390.

- Enright M.C. & Spratt B.G. (1998). A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 144, 3049-3060.
- Enright M.C., Knox K., Griffiths D., Crook D.W. & Spratt B.G. (2000). Molecular typing of bacteria directly from cerebrospinal fluid. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 627-630.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive pneumococcal disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2020
- European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of invasive bacterial diseases in Europe, 2012. Stockholm: ECDC; 2014
- Faden H., Duffy L., Wasielewski R., Wolf J., Krystofik D., Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *J. Infect. Dis.* 1997; 175:1440-5.
- Farrell D.J., Jenkins S.G., Brown S.D., Patel M., Lavin B.S. & Klugman K.P. (2005). Emergence and spread of *Streptococcus pneumoniae* with *erm* (B) and *mef* (A) resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 851-858.
- Fedson D.S. Pneumococcal vaccination in the United States and 20 other developed countries, 1981-1996. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 26:1117-23.
- Fedson D.S., Musher D.M., Eskola J. Pneumococcal vaccine. In: Plotkin SA Orenstein WA, eds. *Vaccines* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1988; 553-608.
- Felton L.D. Studies on the immunizing substances in pneumococci. *J. Immunol.* 1934; 27:379-93.
- Fenoll, A., Jado I., Vicioso D., and Casal J. 1997. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J. Clin. Microbiol.* 35:764-766.
- Fernebro J., Andersson I., Sublett J., Morfeldt E., Novak R., Tuomanen E., Normark S., Normark B.H. Capsular expression in *Streptococcus pneumoniae* negatively affects spontaneous and antibiotic-induced lysis and contributes to antibiotic tolerance. *J. Infect. Dis.* 189, 328-338 (2004).
- Figueiredo A.M., Connor J.D., Severin A., Vaz Pato M.V., Tomasz A. A Pneumococcal clinical isolate with high-level resistance to cefotaxime and ceftriaxone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992;36 (4): 886-9.

- Figueroa J.E., Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991; 4:359-395.
- Fillon S., Soulis K., Rajasekaran S., Benedict-Hamilton H., Radin J.N., Orihuela C.J., El Kasmi K.C, Murti G., Kaushal D., Gaber W.M., Weber J.R., Murray P.J., Tuomanen E.I. Platelet activating factor receptor and innate immunity: uptake of gram-positive bacterial cell wall into host cells and cell-specific pathophysiology. *J. Immunol.* 2006; 177:6182-91.
- Flacco, M.E.; Manzoli, L.; Rosso, A.; Marzuillo, C.; Bergamini, M.; Stefanati, A.; Cultrera, R.; Villari, P.; Ricciardi, W.; Ioannidis, J.P.A.; *et al.*, Immunogenicity and safety of the multicomponent meningococcal B vaccine (4CMenB) in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2018, 18, 461-472.
- Flasche S., Van Hoek A.J., Sheasby E., Waight P., Andrews N., Sheppard C. *et al.*, Effect of Pneumococcal Conjugate Vaccination on Serotype-Specific Carriage and Invasive Disease in England: A Cross-Sectional Study. *PLoS Med.* 2011 Apr;8 (4): e1001017.
- Fraenkel A. Weitere Beitrage zur Lehre von den Mikroccoccen der genuinen fibrinosen Pneumonie [Further contributions to the theory of Micrococci of genuine fibrinous pneumonia]. *Zeitschrift filr Klinische Medicin* 1886b; 11:437-458
- Ganaie F., Saad J.S., McGee L., van Tonder A.J., Bentley D.D., Lo S.W., Gladstone R.I., Turner P., Keenan J.D., Breiman R.F., Nahm M.H. A New Pneumococcal Capsule Type, 10D, is the 100th Serotype and Has a Large cps Fragment from an Oral Streptococcus. *ASM Journals, mBio*, Vol. 11, No. 3. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00937-20>
- García E., García P. & López R. Cloning and sequencing of a gene involved in the synthesis of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Molec. Gen. Genet.* 239, 188-195 (1993). <https://doi.org/10.1007/BF00281617>.
- Garcia E., Llull D., Munoz R., Mollerach M. & Lopez R. (2000). Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Res. Microbiol.* 151, 429-435.

- GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic 426 analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 2018 Nov;18 (11): 1191-1210. doi: 428 10.1016/S1473-3099 (18) 30310-4.
- Geno K.A., Gilbert G.L., Song J.Y., Skovsted I.C., Klugman K.P., Jones C., Konradsen H.B., Nahm M.H. 2015. Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. *Clin. Microbiol. Rev.* 28:871-899 <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00024-15>.
- Geno, K.A., Saad, J.S., & Nahm, M.H. (2017). Discovery of Novel Pneumococcal Serotype 35D, a Natural WciG-Deficient Variant of Serotype 35B. *Journal of clinical microbiology*, 55 (5), 1416-1425. <https://doi.org/10.1128/JCM.00054-17>
- Ghaffar F., Friedland I.R., McCracken G.H. Jr. Dynamics of nasopharyngeal colonization of *Streptococcus pneumoniae*. *Ped. Infect. Dis. J.* 1999; 18: 638-46.
- Gladstone R.A., Jefferies J.M., Faust S.N., Clark S.C. Continued control of pneumococcal disease in the UK – the impact of vaccination. *J. Med. Microbiol.* 2011, 60, 1-8.
- Goncalves, V.M.; Dias, W.O.; Campos, I.B.; Liberman, C.; Sbrogio-Almeida, M.E.; Silva, E.P.; Cardoso, C.P.J; Alderson, M.; Robertson, G.; Maisonneuve, J.F.; *et al.*, Development of a whole cell pneumococcal vaccine: BPL inactivation, cGMP production, and stability. *Vaccine* 2014, 32, 1113-1120.
- Gray B.M., Converse G.M., Dillon H.C.Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: Acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J. Infect. Dis.* 1980; 142:923-33.
- Gray B.M., Dillon H.C.Jr. Epidemiological studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: Antibody to types 3, 6, 14, and 23 in the first two years of life. *J. Infect. Dis.* 1988;158:948-955.
- Greenberg, D.; Hoover, P.A.; Vesikari, T.; Peltier, C.; Hurley, D.C.; McFetridge, R.D.; Dallas, M.; Hartzel, J.; Marchese, R.D.; Collier, B.G.; *etal.* Safety and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15) in healthy infants. *Vaccine* 2018, 36, 6883-6891

- Griffith F. 1928. The significance of pneumococcal types. *J. Hyg. (Lond)* 27:113-159 <http://dx.doi.org/10.1017/S0022172400031879>.
- Groves N., Sheppard C.L., Litt D., Rose S., Silva A., Njoku N. *et al.*, Evolution of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 3 in England and Wales: A Major Vaccine Evader. *Genes (Basel)*. 2019 Oct 25;10 (11): 845. doi: 10.3390/genes10110845
- Guidolin A., Morona J.K., Morona R., Hansman D., Paton J.C. 1994. Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19F. *Infect. Immun.* 62:5384-5396.
- Hakenbeck R., Tarpay M., Tomasz A. Multiple changes of penicillin binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980;17 (3): 364-71.
- Hammerschmidt S., Tillig M., Wolff S. & Chaatwal J. Species specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. *Mol. Microbiol.* 36, 726-736 (2000).
- Harboe, Z.B.; Thomsen, R.W.; Riis, A.; Valentiner-Branth, P.; Christensen, J.J.; Lambertsen, L.; Krogfelt, K.A.; Konradsen, H.B.; Benfield, T.L. Pneumococcal serotypes and mortality following invasive pneumococcal disease: A population-based cohort study. *PLoS Med.* 2009, 6, e1000081.
- Hausdorff, W.P.; Hanage, W.P. Interim results of an ecological experiment - Conjugate vaccination against the pneumococcus and serotype replacement. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016, 12, 358-374.
- Hauser A.R. Antibiotic basics for clinicians: the ABCs of choosing the right antibacterial agent / 2nd ed. Copyright © 2013
- Hefron R. Pneumonia with special reference to *Pneumococcus Lobar Pneumonia*. New York: Common wealth Fund; 1939 (reprinted by Harvard University Press, 1979).
- Henderson F.W., Gilligan P.H., Wait K., Goff D.A. Nasopharyngeal carriage of antibiotic-resistant pneumococci in children in group day care. *J. Infect. t Dis.* 1988;157:256-263.
- Hermans P.W.M., Adrian P.V., Albert C., Estevão S., Hoogenboezem T., Luijendijk I.H.T., Kamphausen T., Hammerschmidt S. The streptococcal

- lipoprotein rotamase A (SlrA) is a functional peptidyl-prolyl isomerase involved in pneumococcal colonisation. *J. Biol. Chem.* 281, 968-976 (2006).
- Hernández S., Moraga-Llop F., Díaz A., de Sevilla M.F., Ciruela P., Muñoz-Almagro C. *et al.*, Failures of 13-Valent Conjugated Pneumococcal Vaccine in Age-Appropriately Vaccinated Children 2-59 Months of Age, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2020 Jun;26 (6): 1147-1155. doi: 10.3201/eid2606.190951.
 - Hirst R., Mohammed B., Mitchell T., Andrew P. & O’Callaghan C. Streptococcus pneumoniae-induced inhibition of rat ependymal cilia is attenuated by antipneumolysin antibody. *Infect. Immun.* 72, 6694-6698 (2004).
 - Hirst R.A., Sikand K.S., Rutman A., Mitchell T.J., Andrew P.W, O’Callaghan C. Relative roles of pneumolysin and hydrogen peroxide from Streptococcus pneumoniae in inhibition of ependymal ciliary beat frequency. *Infect. Immun.* 68, 1557-1562 (2000).
 - Hsu H.E., Shutt K.A., Moore M.R., Beall B.W., Bennett N.M., Craig A.S., Farley M.M., Jorgensen J.H., Lexau C.A., Petit S. *et al.*, Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N. Engl. J. Med.* 2009, 360, 244-256.
 - Huang S.S., Johnson K.M., Ray G.T., Wroe P., Lieu T.A., Moore M.A. *et al.*, Healthcare utilization and cost of pneumococcal disease in the United States. *Vaccine*, 29 (18) (2011), pp. 3398-3412, 10.1016/j.vaccine.2011.02.088.
 - Isturiz R., Sings H.L., Hilton B., Arguedas A., Reinert R.R., Jodar L. Streptococcus pneumoniae serotype 19A: worldwide epidemiology. *Expert Rev Vaccines.* 2017 Oct;16 (10): 1007-1027. doi: 10.1080/14760584.2017.1362339.
 - Jacobs M.R., Dagan R., Appelbaum P.C., Burch D.J. Prevalence of antimicrobial resistant pathogens in middle ear fluid: multinational study of 917 children with acute otitis media. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42: 589-95.
 - Jacobs M.R., Koornhof H.J., Robins-Browne R.M., Stevenson C.M., Vermaak Z.A., Freiman I. *et al.*, Emergence of multiply resistant pneumococci. *N. Engl. J. Med.* 1978;299 (14): 735-40.
 - Janoff E.N, et Musher D.M. Streptococcus pneumoniae. In: Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases Eighth Edition,

Copyright © 2015 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc. Chapter Updated:
March 4, 2016

- Janoff E.N., O' Brien J., Thompson P., Ehret J., Meiklejohn G., Duvall G., Douglas J.M. Jr. Streptococcus pneumoniae colonization, bacteremia, and immune response among persons with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1993;167:49-56.
- Janulczyk R., Iannelli F., Sjöholm A.G., Pozzi G. & Björck L. Hic, a novel surface protein of Streptococcus pneumoniae that interferes with complement function. *J. Biol. Chem.* 275, 37257-37263 (2000).
- Jedrzejak M.J., Lamani E. & Becker, R.S. Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A. *J. Biol. Chem.* 276, 33121-33128 (2001).
- Johnson S.E., Dykes J.K., Jue D.L., Sampson J.S., Carlone G.M., Ades E.W. Inhibition of pneumococcal carriage in mice by subcutaneous immunization with peptides from the common surface protein pneumococcal surface adhesin A. *Infect. Immun.* 185, 489-496 (2002).
- Jones E.E., Alford P.L., Reingold A.L. Predisposition to invasive pneumococcal illness following parainfluenza type 3 virus infections in chimpanzees. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998; 185:1351-1353.
- Jounblat R., Kadioglu A., Mitchell T. & Andrew P. Pneumococcal behavior and host responses during bronchopneumonia are affected differently by the cytolytic and complement-activating activities of pneumolysin. *Infect. Immun.* 71, 1813-1819 (2003).
- Kadioglu A., Gingles N.A., Grattan K., Kerr A., Mitchell T.J., Andrew P.W. Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect. Immun.* 68, 1557-1562 (2000).
- Kadioglu A., Weiser J.N., Paton J.C., Andrew P.W. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008 Apr;6 (4): 288-301
- Kadioglu, A., Taylor S., Iannelli G., Pozzi G., Mitchell T.J., Andrew P.W. Upper and lower respiratory tract infection by Streptococcus pneumoniae is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect. Immun.* 70, 2886-2890 (2002).

- Kamerling J.P. Pneumococcal polysaccharides: a chemical view. In: Alexander T. *Streptococcus pneumoniae*. 2000.
- Kaplan S.L., Barson W.J., Lin P.L., Romero J.R., Bradley J.S., Tan T.Q. *et al.*, Invasive Pneumococcal Disease in Children's Hospitals: 2014-2017. *Pediatrics*. 2019 Sep;144 (3): e20190567. doi: 10.1542/peds.2019-0567.
- Katsarolis I., Poulakou G., Analitis A., Matthaiopoulou I., Roilides E., Antachopoulos C., Kafetzis D.A., Daikos G.L., Vorou R., Koubaniou C., Pneumatikos I., Samonis G., Syriopoulou V., Giamarellou H. & Kanellakopoulou K. Risk factors for nasopharyngeal carriage of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from a nation-wide surveillance study in Greece. *BMC Infectious Diseases* 2009, 9:120
- Kaur, R., Casey, J.R., Pichichero M.E. Emerging *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing the nasopharynx in children after 13-valent pneumococcal conjugate vaccination in comparison to the 7-valent era, 2006-2015. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016, 35, 901-906.
- Keller L.E., Jones C.V., Thornton J.A., Sanders M.E., Swiatlo E., Nahm M.H., Park I.H., McDaniel L.S. PspK of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to epithelial cells and enhances nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* 2013, 81, 173-181.
- Kim J.O., Romero-Steiner S., Sørensen U.B.S, Blom J., Carvalho M., Barnard S., Carlone G., and Weiser J.N. Relationship between cell-surface carbohydrates and intrastain variation on opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 67, 2327-2333 (1999).
- Kim P., Musher D.M., Glezen W.P., Rodriguez-Barradas M.C., Nahm W.K., Wright C.E. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution, and the isolation of respiratory viruses. *Clin. Infect. Dis.* 1996; 22:100-106.
- Kim, S.J.; Seon, S.H.; Luong, T.T.; Ghosh, P.; Pyo, S.; Rhee, D.-K. Immunization with attenuated non-transformable pneumococcal pep27 and comD mutant provides serotype-independent protection against pneumococcal infection. *Vaccine* 2019, 37, 90-98.

- King S., Hippe K. & Weiser J. Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 59, 961-974 (2006).
- King, S.J., Hippe K.R., Gould J.M, Bae D., Peterson S., Cline R.T., Fasching C., Janoff E.N., Weiser J.N. Phase variable desialylation of host proteins that bind to *Streptococcus pneumoniae* in vivo and protect the airway. *Mol. Microbiol.* 54, 159-171 (2004).
- Kirkham L.A.S., Jefferies J.M.C., Kerr A.R., Jing Y., Clarke S.C., Smith A., Mitchell T.J. Identification of invasive serotype 1 pneumococcal isolates that express non hemolytic pneumolysin. *J. Clin. Microbiol.* 44, 151-159 (2006).
- Kjeldsen C., Slott S., Elverdal P.L., Sheppard C.L., Kapatai G., Fry N.K., Skovsted I.C., Duus J.O. Discovery and description of a new serogroup 7 *Streptococcus pneumoniae* serotype, 7D, and structural analysis of 7C and 7D. *Carbohydr. Res.*, 463 (2018), pp. 24-31, 10.1016/j.carres.2018.04.011.
- Klein J.O. The pneumococcal conjugate vaccine arrives: a big win for kids. *Ped. Infect. Dis. J.* 2000; 19:181-2.
- Klein J.O.: Bacterial pneumonias. In: Feigin, Cherry, Denmler-Harrison, Kaplan eds. *Textbook of Pediatric infectious diseases*, 5th ed. Saunders 2004; 299-311.
- Klemperer G., Klemperer F. Versuche über Immunisierung and Heilung bei der Pneumokokken infection. (Experiments on immunization and healing in pneumococcal infection) *Berl. Klin. Wochenschr.* 1891; 28:833-835, 869-875.
- Klugman K.P. (1990). Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin. Microbiol. Rev* 3, 171-196.
- Klugman K.P. Herd protection induced by pneumococcal conjugate vaccine. *The Lancet Global Health.* Volume 2, Issue 7, E365-E366, July 01, 2014. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70241-4](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70241-4).
- Konradsen H.B. 2005. Validation of serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. *Vaccine* 23:1368-1373. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.09.011>.
- Koskela M., Leinonen M., Haiva V.M. First and second dose antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in infants. *Ped. Infect. Dis.* 1986; 5:45-50.

- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L. *et al.*, (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27, 95-125.
- Koutouzis E.I., Daikos G.L., Chatzichristou P., Michos A.G., Koutouzi F.I., Chrousos G.P. *et al.*, Characteristics of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A isolates from children in the pre and post Conjugate Vaccine Era. Single center experience 1986-2015. *Vaccine*. 2018 Aug 23;36 (35): 5245-5250. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.07.055.
- Kuch A., Golebiewska A., Wasko I., Ronkiewicz P., Markowska M., Hryniewicz W., Skoczynska A. 2014. Usefulness of Pneumotest-Latex for direct serotyping of *Streptococcus pneumoniae* isolates in clinical samples. *J Clin Microbiol* 52:2647-2649. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00451-14>.
- Ladhani S.N., Collins S., Djennad A., Sheppard C.L., Borrow R., Fry N.K. *et al.*, Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000-17: a prospective national observational 450 cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2018 Apr;18 (4): 441-451. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30052-5.
- Lafong A., Crothers E. Simple latex agglutination method for typing pneumococci. *Journal of Clinical Pathology*. 1988; 41 (2): 230-231.
- Lagousi, T.; Basdeki, P.; Routsias, J.; Spoulou, V. Novel protein-based pneumococcal vaccines: Assessing the use of distinct protein fragments instead of full-length proteins as vaccine antigens. *Vaccines* 2019, 7, 9.
- Lankinen K.S., Rintamäki S., Syrjänen R., Kilpi T., Ruutu P., Leinonen M. Type-specific enzyme immunoassay for detection of pneumococcal capsular polysaccharide antigens in nasopharyngeal specimens. *Journal of Microbiological Methods* Volume 56, Issue 2, February 2004, Pages 193-199.
- Lawrence M.C., Pilling P.A., Epa V.C., Berry A.M., Ogunniyi A.D., Paton J.C. The crystal structure of pneumococcal surface antigen PsaA reveals a metal binding site and a novel structure for a putative ABC type binding protein. *Structure* 15, 1553-1561 (1998).
- Lee C.J., Banks S.D. & Li J.P. Virulence, immunity and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. *Crit. Rev. Microbiol.* 18, 89-114 (1991).

- Lee G.M., Harper M.B. Risk of bacteremia for febrile young children in the post- Haemophilus influenzae type b era. Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 1998; 152:624-28.
- Levidiotou S., Vrioni G., Tzanakaki G., Pappa C., Gesouli H., Gartzonika C., Papamichail D., Kremastinou J. Serotype distribution of Streptococcus pneumoniae in north-western Greece and implications for a vaccination programme. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2006 Nov;48 (2): 179-82
- Li Y., Weinberger D.M., Thompson C.M., Trzciński K., Lipsitch M. Surface charge of Streptococcus pneumoniae predicts serotype distribution. Infect Immun. 2013; 81:4519-24. PMID:24082068, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00724-13>.
- Liberman, C.; Takagi, M.; Cabrera-Crespo, J.; Sbrogio-Almeida, M.E.; Dias, W.O.; Leite, L.C.; Goncalves, V.M. Pneumococcal whole-cell vaccine: Optimization of cell growth of unencapsulated Streptococcus pneumoniae in bioreactor using animal-free medium. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008, 35, 1441-1445.
- Llull D., García E., López R. 2001. Tts, a processive beta glucosyl-transferase of Streptococcus pneumoniae, directs the synthesis of the branched type 37 capsular polysaccharide in Pneumococcus and other gram-positive species. J Biol Chem 276:21053-21061 <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M010287200>.
- Llull D., Muñoz R., López R., García E. 1999. A single gene (tts) located outside the cap locus directs the formation of Streptococcus pneumoniae type 37 capsular polysaccharide. Type 37 pneumococci are natural, genetically binary strains. J. Exp. Med 190:241-251 <http://dx.doi.org/10.1084/jem.190.2.241>.
- Lock R.A., Zhang Q.Y., Berr, A.M. & Paton, J.C. Sequence variation in the Streptococcus pneumonia pneumolysin gene affecting haemolytic activity and electrophoretic mobility of the toxin. Infect. Immun. 21, 71-83 (1996).
- Lu, Y.J.; Leite, L.; Goncalves, V.M.; Dias Wde, O.; Liberman, C.; Fratelli, F.; Alderson, M.; Tate, A.; Maisonneuve, J.F.; Robertson, G.; *et al.*, GMP-grade pneumococcal whole-cell vaccine injected subcutaneously protects mice from nasopharyngeal colonization and fatal aspiration-sepsis. Vaccine 2010, 28, 7468-7475.

- Lu, Y.J.; Yadav, P.; Clements, J.D.; Forte, S.; Srivastava, A.; Thompson, C.M.; Seid, R.; Look, J.; Alderson, M.; Tate, A.; *et al.*, Options for inactivation, adjuvant, and route of topical administration of a killed, unencapsulated pneumococcal whole-cell vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010, 17, 1005-1012.
- Lucero M.G., Dulalia V.E., Nillos L.T., Williams G., Parreño R.A.N., Nohynek H., Riley I.D., Makela H. Pneumococcal conjugate vaccines for preventing vaccine-type invasive pneumococcal disease and Xray defined pneumonia in children less than two years of age. *Cohrane Database Syst. Rev.* 2009 Oct 7; (4): CD004977.
- Lynch J.P., 3rd, Zhanel G.G.. Streptococcus pneumoniae: does antimicrobial resistance matter? *Semin Respir Crit Care Med.* 2009;30 (2): 210-38.
- Lysenko E.S., Ratner A.J., Nelson A.L. & Weiser J.N. The role of innate immune responses in the outcome of interspecies competition for colonization of mucosal surfaces. *PLoS Pathog.* 1, 1-9 (2005).
- MacLeod C.M., Hodges R.G., Heidelberger M., Bernhard W.G. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization by specific capsular polysaccharides. *J. Exp. Med* 1945; 82:445-465.
- MacLEOD, C.M., & KRAUS, M.R. (1950). Relation of virulence of pneumococcal strains for mice to the quantity of capsular polysaccharide formed in vitro. *The Journal of experimental medicine*, 92 (1), 1-9. <https://doi.org/10.1084/jem.92.1.1>
- Magomani, V.; Wolter, N.; Tempia, S.; du Plessis, M.; de Gouveia, L.; von Gottberg, A. Challenges of using molecular serotyping for surveillance of pneumococcal disease. *J. Clin. Microbiol.* 2014, 52, 3271-3276
- Maiden M.C. Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clin Infect Dis.* 1998;27 Suppl 1:S12-20.
- Malley, R.; Anderson, P.W. Serotype-independent pneumococcal experimental vaccines that induce cellular as well as humoral immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, 3623-3627.
- Malley, R.; Lipsitch, M.; Stack, A.; Saladino, R.; Fleisher, G.; Pelton, S.; Thompson, C.; Briles, D.; Anderson, P. Intranasal immunization with killed

- unencapsulated whole cells prevents colonization and invasive disease by capsulated pneumococci. *Infect. Immun.* 2001, 69, 4870-4873.
- Manco S., Hernon F., Yesilkaya H., Paton J.C., Andrew P.W., Kadioglu A. Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis. *Infect. Immun.* 74, 4014-4020 (2006).
 - Maraki S., Mavromanolaki V.E., Stafylaki D., Hamilos G., Samonis G.. The Evolving Epidemiology of Serotype Distribution and Antimicrobial Resistance of *Streptococcus pneumoniae* Strains Isolated from Adults in Crete, Greece, 2009-2016. *Infect. Chemother.* 2018 Dec;50 (4): 328-339. <https://doi.org/10.3947/ic.2018.50.4.328>.
 - Marchese A., Esposito S., Coppo E., Rossi G.A., Tozzi A., Romano M., Da Dalt L., Schit, G.C. & Principi N. (2011). Detection of *Streptococcus pneumoniae* and identification of pneumococcal serotypes by real-time polymerase chain reaction using blood samples from Italian children ≤ 5 years of age with community-acquired pneumonia. *Microb. Drug Resist.* 2011 Sep;17 (3): 419-24 doi:10.1089/mdr.2011.0031.
 - Marchisio P., Gironi S., Esposito S., Schito G.C., Mannelli S., Principi N. Seasonal variations in nasopharyngeal carriage of respiratory pathogens in healthy Italian children attending day-care centres or schools. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50:1095-1099.
 - Marmaras N., Xirogianni A., Papandreou A., Petinaki E., Papaevangelou V., Tsolia M. *et al.*, Pneumococcal Serotype Identification by Capsular Sequence Typing (CST): A Modified Novel Approach for Serotyping Directly in Clinical Samples. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Dec 14;11 (12): 2353. doi: 10.3390/diagnostics11122353.
 - Marra A., Lawson S., Asundi J.S., Brigham D. & Hromockyj A.E. In vivo characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. *Microbiology* 148, 1483-1491 (2002).
 - Marrie T.J., Tyrrell G.J., Majumdar S.R., Eurich D.T. Effect of Age on the Manifestations and Outcomes of Invasive Pneumococcal Disease in Adults. *The American Journal of Medicine*. Volume 131, Issue 1, January 2018, Pages 100. e1-100. e7

- Martin M., Turco J.H., Zegans M.E., Facklam R.R., Sodha S., Elliott J.A., Pryor J.H., Beall B., Erdman D.D., Baumgartner Y.Y., Sanchez P.A., Schwartzman J.D., Montero J., Schuchat A. and Whitney C.G. An outbreak of conjunctivitis due to atypical *Streptococcus pneumoniae*. *N. Engl. J. Med.* 348, 1112-1121 (2003).
- Masomian M., Ahmad Z., Gew L.T, Poh C.L. Development of Next Generation *Streptococcus pneumoniae* Vaccines Conferring Broad Protection. *Vaccines* 2020, 8, 132.
- McDaniel, L.S.; Swiatlo, E. Should Pneumococcal Vaccines Eliminate Nasopharyngeal Colonization? *mBio* 2016, 7.
- Mendes, R.E.; Hollingsworth, R.C.; Costello, A.; Jones, R.N.; Isturiz, R.E.; Hewlett, D. Jr.; Farrell, D.J. Non invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes recovered from hospitalized adult patients in the United States in 2009 to 2012. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, 59, 5595-5601.
- Merck: U.S. FDA Approval of VAXNEUVANCE™ (Pneumococcal 15-valent Conjugate Vaccine) for the Prevention of Invasive Pneumococcal Disease in Adults 18 Years and Older Caused by 15 Serotypes. Διαθέσιμο στο: <https://www.merck.com/news/merck-announces-u-s-fda-approval-of-vaxneuvance-pneumococcal-15-valent-conjugate-vaccine-for-the-prevention-of-invasive-pneumococcal-disease-in-adults-18-years-and-older-caused-by-15-serot/> (τελευταία πρόσβαση στις 14 Νοεμβρίου 2021).
- Metcalf, B.J.; Gertz, R.E. Jr.; Gladstone, R.A.; Walker, H.; Sherwood, L.K.; Jackson, D.; Li, Z.; Law, C.; Hawkins, P.A.; Chochua, S.; *et al.*, Strain features and distributions in pneumococci from children with invasive disease before and after 13-valent conjugate vaccine implementation in the USA. *Clin. Microbiol. Infect.* 2016, 22, 60. e9-60. e29.
- Michelow I.C., Lozano J., Olsen K., Goto C., Rollins N.K., Ghaffar F., Rodriguez-Cerrato V., Leinonen M., McCracken G.H. Jr. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* lower respiratory infection in hospitalized children by culture, polymerase chain reaction, serological testing and urinary antigen detection. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 34: e1-11.

- Mitchell T.J., Andrew P.W., Saunders F.K., Smith A.N. & Boulnois G.J. Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region homologous to a human acute phase protein. *Mol. Microbiol.* 5, 1883-1888 (1991).
- Moffitt, K.L.; Yadav, P.; Weinberger, D.M.; Anderson, P.W.; Malley, R. Broad antibody and T cell reactivity induced by a pneumococcal whole-cell vaccine. *Vaccine* 2012, 30, 4316-4322.
- Moore C.E., Sengduangphachan, A., Thaojaikong T., Sirisouk J., Foster D., Phetsouvanh R., McGee L., Croo, D.W., Newton P.N. & Peacock S.J. (2010). Enhanced determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes associated with invasive disease in Laos by using a real-time polymerase chain reaction serotyping assay with cerebrospinal fluid. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83, 451-457.
- Moore H.F., Chesney A.M. A further study of ethylhydrocuprein (Optochin) in the treatment of acute lobar pneumonia. *Arch. Intern. Med.* 1918;21:659-81.
- Moore H.F., Chesney A.M. A study of ethylhydrocuprein (Optochin) in the treatment of acute lobar pneumonia. *Arch. Intern. Med.* 1917; 19: 611-82.
- Moore, M.R.; Link-Gelles, R.; Schaffner, W.; Lynfield, R.; Lexau, C.; Bennett, N.M.; Petit, S.; Zansky, S.M.; Harrison, L.H.; Reingold, A.; *et al.*, Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: Analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect. Dis.* 2015, 15, 301-309.
- Moraga-Llop F., Garcia-Garcia J.J., Díaz-Conradi A., Ciruela P., Martínez-Osorio J., González-Peris S., Hernández S., De Sevilla M.F., Uriona S., Izquierdo C. *et al.*, Vaccine failures in patients properly vaccinated with 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in Catalonia, a region with low vaccination coverage. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016, 35, 460-463.
- Morona J.K., Morona R., Paton J.C. 1997. Characterization of the locus encoding the *Streptococcus pneumoniae* type 19F capsular polysaccharide biosynthetic pathway. *Mol Microbiol* 23:751-763 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.2551624.x>.
- Mundy L.S., Janoff E.N., Schwebke K.E., Shanholtzer C.J., Willard K.E. Ambiguity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*: optochin, bile

- solubility, quelling, and the Accu Probe DNA tests. *Am. J. Clin. Pathol.* 1998; 109:55-61.
- Munoz R., Coffey TJ, Daniels M, Dowson CG, Laible G, Casal J *et al.*, Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 1991;164 (2): 302-6.
 - Munoz R., Fenoll A., Vicioso D., Casal J. Optochin resistant variants of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1999; 13:63-6
 - Musher D.M. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity and treatment. *Clin. Infect. Dis.* 14, 801-807 (1992).
 - Musher D.M. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell G.I., Bennett J.E., Dolin R. (eds). *Principles and practice of infectious diseases*. Churchill Livingstone, New York, 2000;2128-2147.
 - Musher D.M., Groover J.E., Rowland J.M., Watson D.A., Struewing J.B., Baughn R.E., Mufson M.A. Antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: Prevalence, persistence and response to revaccination. *Clin. Infect. Dis.* 1993;17:66-73.
 - Musher D.M., Watson D.A., Dominguez E.A. Pneumococcal vaccination: Work to date and future prospects. *Am. J. Med. Sci.* 1990; 300: 45-52.
 - Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun.* 2007; 75:83-90. PMID:17088346, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01475-06>.
 - Njanpop Lafourcade B.M., Sanou O., van der Linden M., Levina N., Karanfil M., Yaro S., Tamekloe T.A., Mueller J.E.. 2010. Serotyping pneumococcal meningitis cases in the African meningitis belt by use of multiplex PCR with cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 48:612-614. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01402-09>.
 - Nuorti J.P., Whitney C.G.; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of pneumococcal disease among infants and children - use of 13 - valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal conjugate vaccine - recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm. Rep.* 2010 Dec 10;59 (RR-11): 1-18.

- O’Brein K.L., Steinhoff M.C., Edwards K., Keyserling H., Thoms M.L., Madore D. Immunologic priming of young children by pneumococcal glycoprotein conjugate, but not polysaccharide, vaccines. *Ped. Infect. Dis. J.* 1996; 15:425-30.
- O’Brien K.L. Pneumococcal conjugate vaccine, polysaccharide vaccine, or both for adults? we’re not there yet. *Clin. Infect. Dis.* 2009, 49, 1326-1328.
- Obando I., Munoz-Almagro C., Arroyo L.A., Tarrago D., Sanchez-Tatay D., Moreno-Perez D., Dhillon S.S., Esteva C., Hernandez-Bou S., Garcia-Garcia J.J., Hausdorff W.P. and Brueggemann A.B (2008). Pediatric parapneumonic empyema, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1390-1397.
- Obaro S.K., Huo Z., Banya W.A., Winston A.S., Henderson D.C., Monteil, M.A., Leach A., Greenwood B.A glycoprotein pneumococcal conjugate vaccine primes for antibody responses to a pneumococcal polysaccharide vaccine in Gambian children. *Ped. Infect. Dis. J.* 1997; 16:1135-40.
- Odotola, A.; Ota, M.O.; Ogundare, E.O.; Antonio, M.; Owiafe, P.; Worwui, A.; Greenwood, B.; Alderson, M.; Traskine, M.; Verlant, V.; *et al.*, Reactogenicity, safety and immunogenicity of a protein-based pneumococcal vaccine in Gambian children aged 2-4 years: A phase II randomized study. *Hum. Vaccines Immunother.* 2016, 12, 393-402.
- Odotola, A.; Ota, M.O.C.; Antonio, M.; Ogundare, E.O.; Saidu, Y.; Foster-Nyarko, E.; Owiafe, P.K.; Ceesay, F.; Worwui, A.; Idoko, O.T.; *et al.*, Efficacy of a novel, protein-based pneumococcal vaccine against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in infants: A phase 2, randomized, controlled, observer-blind study. *Vaccine* 2017, 35, 2531-2542.
- Olarte, L.; Barson, W.J.; Barson, R.M.; Lin, P.L.; Romero, J.R.; Tan, T.Q.; Givner, L.B.; Bradley, J.S.; Hoffman, J.A.; Hulten, K.G.; *et al.*, Impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis in US children. *Clin. Infect. Dis.* 2015, 61, 767-775.
- Oligbu G., Collins S., Andrews N., Sheppard C.L., Fry N.K., Slack M.P.E. *et al.*, Characteristics and Serotype Distribution of Childhood Cases of Invasive Pneumococcal Disease Following Pneumococcal Conjugate Vaccination in England and Wales, 2006-2014. *Clin Infect Dis.* 2017 Oct 1;65 (7): 1191-1198. doi:556 10.1093/cid/cix418.

- Oligbu, G.; Collins, S.; Sheppard, C.L.; Fry, N.K.; Slack, M.; Borrow, R.; Ladhani, S.N. Childhood deaths attributable to invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2006-2014. *Clin. Infect. Dis.* 2017, 65, 308-314.
- Orihuela C.J., Gao G.L., Francis K.P., Yu J. & Tuomanen E.I. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 190, 1661-1669 (2004).
- Ostergaard, L.; Vesikari, T.; Absalon, J.; Beeslaar, J.; Ward, B.J.; Senders, S.; Eiden, J.J.; Jansen, K.U.; Anderson, A.S.; York, L.J.; *et al.*, A Bivalent Meningococcal B Vaccine in Adolescents and Young Adults. *N. Engl. J. Med.* 2017, 377, 2349-2362.
- Ouldali N., Levy C., Varon E., Bonacorsi S., Béchet S., Cohen R. *et al.*; French Pediatric Meningitis Network. Incidence of paediatric pneumococcal meningitis and emergence of new serotypes: a time-series analysis of a 16-year French national survey. *Lancet Infect Dis.* 2018 Sep;18 (9): 983-991. doi:10.1016/S1473-3099(18)30349-9.
- Ouldali N., Varon E., Levy C., Angoulvant F., Georges S., Ploy M.C. *et al.*, Invasive pneumococcal disease incidence in children and adults in France during the pneumococcal conjugate vaccine era: an interrupted time-series analysis of data from a 17-year national prospective surveillance study. *Lancet Infect Dis.* 2021 Jan; 21 (1): 137-147. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30165-1.
- Overweg, K., Kerr A., Sluijter M., Jackson M.H., Mitchell T.J., de Jong A.P., de Groot R., Hermans P.W. The putative proteinase maturation protein A of *Streptococcus pneumoniae* is a conserved surface protein with potential to elicit protective immune responses. *Infect. Immun.* 68, 4180-4188 (2000).
- Pai R., Gertz R.E. & Beall B. (2006). Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 44, 124-131.
- Parikh, S.R.; Andrews, N.J.; Beebeejaun, K.; Campbell, H.; Ribeiro, S.; Ward, C.; White, J.M.; Borrow, R.; Ramsay, M.E.; Ladhani, S.N. Effectiveness and impact of a reduced infant schedule of 4CMenB vaccine against group B meningococcal disease in England: A national observational cohort study. *Lancet* 2016, 388, 2775-2782.

- Park I.H., Pritchard D.G., Cartee R., Brandao A., Brandileone M.C., Nahm M.H. 2007. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 45:1225-1233. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02199-06>.
- Pasteur L. Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. (Note on the new disease caused by the saliva of a child who died of rabies). *Comptes Rendus* 1881; 92:159-65.
- Paton J.C., Trappetti C. 2019. *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharide. *Microbiol. Spectrum* 7 (2): GPP3-0019-2018. doi:10.1128/microbiol.spec.GPP3-0019-2018.
- Peterson S., Cline R.T., Tettelin H. *et al.*: Gene expression analysis of the *Streptococcus pneumoniae* competence regulons by use of DNA microarrays. *J. Bacteriol.* 182:6192-6202: 2000
- Pfizer: U.S. FDA approves PREVNAR 20™, Pfizer's pneumococcal 20-valent conjugate vaccine for adults ages 18 years or older. Διαθέσιμο στο: <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/us-fda-approves-prevnar-20tm-pfizers-pneumococcal-20-valent> (τελευταία πρόσβαση στις 14 Νοεμβρίου 2021).
- Pikis A., Campos J.M., Rodriguez W.J., Keith J.M. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Mechanism, Significance, and Clinical Implications. *J. Infect. Dis.* 2001; 184:582-90.
- Pimenta F.C., Carvalho M.D.G., Gertz R.E., Jr, Bastos-Rocha C.G., Oliveira L.S., Lacerda Pigosso L., Lima J.A., Marquez Franco C., Andrade A.L., Beall B.W. 2011. Serotype and genotype distributions of pneumococcal carriage isolates recovered from Brazilian children attending day-care centres. *J. Med. Microbiol.* 60:1455-1459. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.031450-0>.
- Poland G.A. The burden of pneumococcal disease and the role of conjugate vaccines. *Vaccine* 1999; 17:1674-9.
- Principi N., Marchisio P., Schito G.C., Mannelli S. Risk factors for carriage of respiratory pathogens in the nasopharynx of healthy children. Ascanius Project Collaborative Group. *Ped. Infect. Dis. J.* 1999; 18: 517-23.
- Prymula, R.; Szenborn, L.; Silfverdal, S.A.; Wysocki, J.; Albrecht, P.; Traskine, M.; Gardev, A.; Song, Y.; Borys, D. Safety, reactogenicity and immunogenicity

- of two investigational pneumococcal protein-based vaccines: Results from a randomized phase II study in infants. *Vaccine* 2017, 35, 4603-4611.
- Quagliarello V., Scheld W.M. Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology and progress. *N. Engl. J. Med.* 1992; 327:864-72.
 - Ramos-Sevillano E., Ercoli G., Felgner P. *et al.* Preclinical development of virulence-attenuated *Streptococcus pneumoniae* strains able to enhance protective immunity against pneumococcal infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2021; 203: 1037- 1041.
 - Ratner A., Hippe K.R., Aguilar J.L., Bender M.H., Nelson A.L. and Weiser J.N. Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* 281, 12994-12998 (2006).
 - Revai K., Mamidi D., Chonmaitree T. Association of nasopharyngeal bacterial colonization during upper respiratory tract infection and the development of acute otitis media. *C. Infect. Dis.* 2008; 46: e34-7.
 - Rodgers G.L., Arguedas A., Cohen R., Dagan R. Global serotype distribution among *Str. Pneumoniae* isolates causing otitis media in children: Potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine* 2009;27: 3802-3810.
 - Rodriguez-Barradas M.C., Das T.S., Watson D.A., Musher D.M. Relative contribution of cell wall and capsular polysaccharides in activating alternative and classical complement pathways by *Streptococcus pneumoniae*. *Med. Microbiol. Lett.* 1993; 2:427-435.
 - Romero-Steiner S., Pilishvili T., Sampson J.S., Johnson S.E., Stinson A., Carlone G.M, and Ades E.W. Inhibition of pneumococcal adherence to human nasopharyngeal epithelial cells by anti-PsaA antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 246-251 (2003).
 - Rosenow C., Ryan P., Weiser J.N., Johnson S., Fontan P., Ortqvist A., Masure H.R. Contribution of novel choline – binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol* 1997; 25:819-29.
 - Rubins J.B., Alter M., Loch J., Janoff E.N. Determination of antibody responses of elderly adults to all 23 capsular polysaccharides after pneumococcal vaccination. *Infect. Immun.* 1999; 67:5979-84.

- Rubins, J., Charboneau D., Fasching C., Berry A.M., Paton J.C., Alexander J.E., Andrew P.W., Mitchell T.J., Janoff E.N. Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 1339-1346 (1996).
- Saha S.K, Darmstadt G.L., Baqui A.H, Hossain B., Islam M., Foster D., Al-Emran H., Naheed A., Arifeen S.E., Luby S.P., Santosham M., Crook D. 2008. Identification of serotype in culture negative pneumococcal meningitis using sequential multiplex PCR: implication for surveillance and vaccine design. *PLoS One* 3: e3576. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003576>.
- Said M.A., Johnson H.L., Nonyane B.A.S, Deloria-Knoll M., O'Brien K.L., for the AGEDD Adult Pneumococcal Burden Study Team. Estimating the Burden of Pneumococcal Pneumonia among Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Techniques. *PLOS ONE*, April 2, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060273>.
- Savage D.G., Lindenbaum J., Garrett T.J. Biphasic pattern of bacterial infection in multiple myeloma. *Ann. Intern. Med.* 1982; 96:47-50.
- Schutze G.E., Mason E.O. Jr, Barson W.J., Kim K.S., Wald E.R., Givner L.B., Tan T.Q., Bradley J.S., Yogev R., Kaplan S.L. Invasive pneumococcal infections in children with asplenia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2002; 21:278-282.
- Sempere, J.; Llamosí, M.; del Río Menéndez, I.; López Ruiz, B.; Domenech, M.; González-Camacho, F. Pneumococcal Choline-Binding Proteins Involved in Virulence as Vaccine Candidates. *Vaccines* 2021, 9, 181. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020181>.
- Sethi S., Evans N., Grant B.J., Murphy T.F. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347:465-71.
- Shaper M., Hollingshead S.K., Benjamin, W.H. & Briles, D.E. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. *Infect. Immun.* 72, 5031-5040 (2004).
- Shea K.M., Edelsberg J., Weycker D., Farkouh R.A., Strutton D.R., Pelton S.I. Rates of pneumococcal disease in adults with chronic medical conditions. *Open Forum Infect. Dis.* 2014 May 27;1 (1): ofu024. doi: 10.1093/ofid/ofu024.

- Shenoy A.T., Orihuela C.J. Anatomical site-specific contributions of pneumococcal virulence determinants. *Pneumonia* 8, 7 (2016). <https://doi.org/10.1186/s41479-016-0007-9>
- Shortridge V.D., Doern G.V., Brueggemann A.B., Beyer J.M., Flamm R.K. Prevalence of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from a multicenter antibiotic resistance surveillance study conducted in the United States in 1994-1995. *Clin Infect Dis.* 1999;29 (5): 1186-8.
- Sings H.L., De Wals P., Gessner B.D., Isturiz R., Laferriere C., McLaughlin J.M. *et al.*, Effectiveness of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Against Invasive Disease Caused by Serotype 3 in Children: A Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies. *Clin Infect Dis.* 2019 May 30;68 (12): 2135-2143. doi:550 10.1093/cid/ciy920. Erratum in: *Clin Infect Dis.* 2021 May 4;72 (9): 1684-1685.
- Slotved H.C., Kaltoft M., Skovsted I.C., Kern M.B., Espersen F. Simple, rapid latex agglutination test for serotyping of pneumococci (Pneumotest-Latex) *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42:2518-2225
- Smillie W.G., Wornock G.H., White H.J. A study of a type I pneumococcus epidemic at the State Hospital of Worcester. Mass. *Am. J. Public Health* 1938; 28:293-302.
- Sorensen R.U., Leiva L.E., Giangrosso P.A., Butler B., Javier F.C., Sacerdote D.M., Bradford N., Moore C. Response to a heptavalent conjugate *Streptococcus pneumoniae* vaccine in children with recurrent infections who are unresponsive to the polysaccharide vaccine. *Ped. Infect. Dis. J.* 1998; 17:685-91.
- Sørensen U.B.S. Pneumococcal polysaccharide antigens: capsules and C polysaccharide. An immunochemical study. *Dan. Med. Bull.* 1995; 42:47-52.
- Sørensen U.B.S., Blom J., Birch-Andersen A. & Henrichsen J. Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect. Immun.* 56, 1890-1896 (1988).
- Sørensen, U.B. (1993). Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2097-2100.

- Stanek, R.J.; Norton, N.B.; Mufson, M.A. A 32-year study of the effect of pneumococcal vaccines on invasive *Streptococcus pneumoniae* disease. *Am. J. Med. Sci.* 2016, 352, 563-573.
- Sternberg G.M. A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *Natl. Board of Health Bull* 1881; 2:781-3.
- Syriopoulou V., Daikos G.L., Soulis K., Michos A., Alexandrou H., Pavlopoulou I., Pagali A., Hajichristodoulou C., Theodoridou M. Epidemiology of invasive childhood pneumococcal infections in Greece. *Acta Paediatr.* 2000;89 (Suppl): 30-34.
- Syrogiannopoulos G.A., Katopodis G.D., Grivea I.N., Beratis N.G. Antimicrobial use and serotype distribution of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates recovered from Greek children younger than 2 years old. *Clin. Infect. Dis.* 2002;35:1178-1182.
- Thermo Fisher Scientific Inc. Real-time PCR Handbook 2.0. © 2020/2021. Διαθέσιμο στο https://rise.articulate.com/share/CzJ69zEmF4MgocDs26iDJscAyM-xxAt-#/lessons/etcfjHVmsOoRuAYZ8Tm9ygluZ_q8L44W. Τελευταία πρόσβαση 16/7/2022.
- Thigpen M.C.; Whitney C.G.; Messonnier N.E.; Zell E.R.; Lynfield R.; Hadler J.L.; Harrison L.H.; Farley M.M.; Reingold A.; Bennett N.M.; *et al.*, Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. *N. Engl. J. Med.* 2011, 364, 2016-2025.
- Thomsen R.W., Hundborg H.H., Lervang H.H., Johnsen S.P., Schonheyder H.C., Sorensen H.T. Risk of community-acquired pneumococcal bacteremia in patients with diabetes: a population-based case-control study. *Diabetes Care* 2004;27:1143-1147.
- Tillett W.S., Cambier M.J., McCormack J.E. The treatment of lobar pneumonia and pneumococcal empyema with penicillin. *Bull NY Acad. Med.* 1944;20:142-78.
- Tilley S., Orlova E., Gilbert R., Andrew P. & Saibil H. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* 121, 247-256 (2005).
- Tin Tin Htar, M.; Christopoulou, D.; Schmitt, H.J. Pneumococcal serotype evolution in Western Europe. *BMC Infect. Dis.* 2015, 15, 419.

- Tocheva A.S., Jefferies J.M., Rubery H., Bennett J., Afimeke G., Garland J. *et al.*, Declining serotype coverage of new pneumococcal conjugate vaccines relating to the carriage of *Streptococcus pneumoniae* in young children. *Vaccine*. 2011 Jun 10;29 (26): 4400-4.
- Tomczyk, S.; Lynfield, R.; Schaffner, W.; Reingold, A.; Miller, L.; Petit, S.; Holtzman, C.; Zansky, S.M.; Thomas, A.; Baumbach, J.; *et al.*, Prevention of antibiotic-non susceptible invasive pneumococcal disease with the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin. Infect. Dis.* 2016, 62, 1119-1125.
- Tuomanen E.I. The biology of pneumococcal infection. *Pediatr. Res.* 1997; 42:253-58.
- Tzanakaki G., Tsolia M., Vlachou V., Theodoridou M., Pangalis A., Foustoukou M., Karpathios T., Blackwell C.C, Kremastinou J. Evaluation of non-culture diagnosis of invasive meningococcal disease by polymerase chain reaction (PCR). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003; 39:31-36.
- Tzanakaki G., Xirogianni A., Kesanopoulos K., Tsolia M., Theodoridou M., Rioilides E., Syrogianopoulos G., Georgakopoulou T., Spoulou V., Argyropoulou A., Voyiatzi A., Markou F., Kremastinou J. Pneumococcal meningitis: the impact of the PCV13 vaccine after 2-year implementation in Greece. 9th International Symposium on Pneumococci and pneumococcal Diseases, 2014, Hyderabad, India Poster No P342
- Tzanakaki, G.; Tsopanomichalou, M.; Kesanopoulos, K.; Matzourani, R.; Sioumala, M.; Tabaki, A.; Kremastinou, J. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Microb. Infect.* 2005, 11, 386-390.
- Umetsu D.T., Ambrosino D.M., Quinti I., Siber G.R., Geha R.S. Recurrent sinopulmonary infection and impaired antibody response to bacterial capsular polysaccharide antigen in children with selective IgG subclass deficiency. *N. Engl. J. Med.* 1985; 313:1247-1251.
- van de Beek D., Cabello C., Dzupova O., Esposito S., Klein M., Kloek A.T., Leib L., Mourvillier B., Ostergaard C., Paglian P., Pfister H.W., Read R.C., Resat Sipahi O., Brouwer M.C., for the ESCMID Study Group for Infections of the Brain (ESGIB). ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute

bacterial meningitis, CMI VOLUME 22, SUPPLEMENT 3, S37-S62, MAY 01, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.007>

- Van der Poll, T.; Opal, S.M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 2009, 374, 1543-1556.
- Van Eldere J., Meekers E., Lagrou K., Massonet C., Canu A., Devenyns I., Verhaegen J., Syrogiannopoulos G., and Leclercq R. Macrolide-resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from Belgium. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 11 Number 4, April 2005
- van Hoek A.J., Andrews N., Waight P.A., Stowe J., Gates P., George R. *et al.*, The effect of underlying clinical conditions on the risk of developing invasive pneumococcal disease in England. *J Infect.* 2012 Jul;65 (1): 17-24. doi:436 10.1016/j.jinf.2012.02.017.
- van Rossum A., Lysenko E. & Weiser J. Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonisation by *Streptococcus pneumoniae* in a murine model. *Infect. Immun.* 73, 7718-7726 (2005).
- VanHoek, A.J.; Andrews, N.; Waight, P.A.; George, R.; Miller, E. Effect of serotype on focus and mortality of invasive pneumococcal disease: Coverage of different vaccines and insight into non-vaccine serotypes. *PLoS ONE* 2012, 7, e39150.
- Vierstraete A., 1999. “Principle of PCR”. Εκδόσεις University of Ghent. Διαθέσιμο online: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
- Wadwa R.P., Feigin R.D. Pneumococcal vaccine: an update. *Pediatrics* 1999; 103:1035-7.
- Waight P.A., Andrews N.J., Ladhani S.N., Sheppard C.L., Slack M.P., Miller E. Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its introduction: an observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2015 May;15 (5): 535-43
- Wara D.W. Host defense against *Streptococcus pneumoniae*: The role of the spleen. *Rev. Infect. Dis.* 1981; 3:299-309.
- Wartha F., Beiter K., Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, Henriques-Normark B. Capsule and d-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell. Microbiol.* 9, 1162-1171 (2007).

- Weinberger D.M., Harboe Z.B., Sanders E.A., Ndiritu M., Klugman K.P., Ruckinger S. *et al.*, Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* (2010) 51:692-9. doi:10.1086/655828.
- Weinberger R., von Kries R., van 524 der Linden M., Rieck T., Siedler A., Falkenhorst G. Invasive pneumococcal disease in children under 16 years of age: Incomplete rebound in incidence after the maximum effect of PCV13 in 2012/13 in Germany. *Vaccine.* 2018 Jan 25;36 (4): 572-577. doi:10.1016/j.vaccine.2017.11.085.
- Weinberger, D.M., Malley, R., Lipsitch, M. Serotype replacement in disease following pneumococcal vaccination: A discussion of the evidence. *Lancet* 2011, 378, 1962-1973.
- Weiser J.N., Markiewicz Z., Tuomanen E., Wani J.H. Relationship between phase variation in colony morphology, intrastain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1996; 64:2240-2245.
- Weiser, J., Bae D., Epino H., Gordon S.B., Kapoor M., Zenewicz L.A., Shchepetov M. Changes in availability of oxygen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotypic variants and clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 69, 5430-5439 (2001).
- Wellmer A., Zysk G., Gerber J., Kunst T., Von Mering M., Bunkowski S., Eiffert H., Nau R.. Decreased virulence of a pneumolysin deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis. *Infect. Immun.* 70, 6504-6508 (2002).
- Welte T., Torres A., Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax* 2012;67:71-79.
- WHO (2007). Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. *Wkly Epidemiol. Rec.* 82:93-104.
- Winkelstein J.A., Bocchini J. AJr, Schiffman G. The role of the capsular polysaccharide in the activation of the alternative pathway by the pneumococcus. *J. Immunol.* 1976; 116:367-370.
- Winkelstein J.A. The role of complement in the host's defense against *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Infect. Dis.* 3, 289-298 (1981).

- Winter, A.J. *et al.*, in Proc. 7th Intern. Cong. Infect. Dis. Abstr. 73.004 (International Society for Infectious Diseases, Brookline, 1996).
- World Health Organization (WHO). Pneumococcal vaccines position paper 2012.431 Wkly Epidemiol Rec, 87 (14), pp. 129-144
- Wright A.E., Parry Morgan W., Colebrook L., Dodgson R.W. Prophylactic inoculation against pneumococcal infections, and on the results which have achieved by it. Lancet 1914; 1:1-10, 87-95.
- Xirogianni A., Tsolia M., Voyiatzi A., Sioumala M., Makri A., Argyropoulou A., Paniara O., Markoulatos P., Kourea-Kremastinou J., Tzanakaki G. Diagnosis of Upper and Lower Respiratory Tract Bacterial Infections with the Use of Multiplex PCR Assays. Diagnostics 2013, 3, 222-231
- Xu, X.; Meng, J.; Wang, Y.; Zheng, J.; Wu, K.; Zhang, X.; Yin, Y.; Zhang, Q. Serotype-independent protection against pneumococcal infections elicited by intranasal immunization with ethanol-killed pneumococcal strain, SPY1. J. Microbiol. 2014, 52, 315-323.
- Yagupsky P., Porat N., Fraser D., Prajgrod F., Merires M., McGee L., Klugman K.P., Dagan R. Acquisition, carriage and transmission of pneumococci with decreased antibiotic susceptibility in young children attending a day care facility in southern Israel. J. Infect. Dis. 1998; 177:1003-12.
- Yother J. 2011. Capsules of Streptococcus pneumoniae and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. Annu. Rev. Microbiol. 65:563-581 <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162944>.
- Young C.L., MacGregor R.R. Alcohol and host defences: Infectious consequences. Infect. Med. 1989; 6:163-175.
- Zhang J., Mostov K.E, Lamm M.E, Nanno M., Shimida S., Ohwaki M., Tuomanen E. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. Cell 102, 827-837 (2000).
- Zhang, F.; Lu, Y.J.; Malley, R. Multiple antigen-presenting system (MAPS) to induce comprehensive B- and T-cell immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013, 110, 13564-13569.

- Zissis N.P., Syriopoulou V., Kafetzis D., Daikos G.L, Tsilimingaki A., Galanakis E., Tsangaropoulou I. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive infections and acute otitis media in children. *Eur. J. Pediatr.* 2004; 163:364-368.
- Αρσένη Α. Κλινική Μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων. Αθήνα, 4η έκδοση, εκδόσεις «Ζήτα» 1994. Τόμος Ι, σελ 144-154.
- Μαρμαράς Ν., Ξηρογιάννη Α., Κεσανόπουλος Κ., Τζανακάκη Τ. Ταυτόχρονη ανίχνευση οκτώ οροτύπων *Streptococcus pneumoniae* απευθείας σε βιολογικά υλικά με τη μεθοδο της stepdown multiplex PCR. Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική Περίοδος Β', Τόμος 20, Τεύχος 1, σελ. 7-15 2015
- Ξηρογιάννη Α. Ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη μοριακή ανίχνευση και ταυτοποίηση βακτηρίων και την απευθείας εφαρμογή σε κλινικά δείγματα. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας 2010.
- Σιουμάλα Μ., Τζανακάκη Τ., Κεσανόπουλος Κ., Λεβειδιώτου Σ., Κρεμαστινού Τ. Ταυτόχρονη ανίχνευση εννέα κύριων οροτύπων *Streptococcus pneumoniae* σε βιολογικά υλικά με τη μέθοδο της stepdown multiplex PCR. Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 2007, 52 (3): 173-179.
- Υπουργείο Υγείας. Εθνική Επιτροπή Εμβολιασμών. Εθνικό πρόγραμμα εμβολιασμών. Προσβάσιμο στο: <https://www.moh.gov.gr/articles/health/dieythynsh-dhmosias-ygieinhs/emboliasmoi>.

ΣΤ. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Pneumococcal meningitis in Greece: A retrospective serotype surveillance study in the post-PCV13 era (2010–2020)



Athanasia Xirogianni^a, Nektarios Marmaras^a, Theano Georgakopoulou^b, Anastasia Papandreou^a, Stelmos Simantirakis^a, Ioanna Magaziotou^b, Andreas Eliades^c, Vassiliki Getsi^d, Anastasia Anastasiou-Katsiardani^e, Efi Staikou^f, Fani Markou^g, Athina Argyropoulou^h, Georgia Vlachakiⁱ, Genovefa Chronopoulou^j, Anastasia Pangalis^k, Theodota Liakopoulou^l, Athanasios Michos^m, Vassiliki Spoulou^{mn}, Evaggelia Lagonaⁿ, George Panagiotakopoulos^b, Efthymia Petinaki^o, Elpis Mantadakis^p, Emmanuel Roilides^q, Manolis Galanakis^r, Vana Papaevangelou^s, Maria Tsofia^t, Georgina Tzanakaki^{a,*}

^a National Meningitis Reference Laboratory, Dept. of Public Health Policy, School of Public Health, University of West Attica, Athens, Greece

^b Department of Vaccine Preventable Diseases, National Public Health Organization (NPHO), Athens, Greece

^c Dept. of Paediatric Intensive Care Unit, University Hospital of Patras, Greece

^d Dept. of Paediatrics, "Hatzikosta" General Hospital, Ioannina, Greece

^e Dept. of Paediatrics, General Volos Hospital "Achilloupoleio", Greece

^f Dept. of Microbiology, "Pentelis" Children Hospital, Athens, Greece

^g Dept. of Microbiology, Serres General Hospital, Serres, Greece

^h Dept. of Clinical Microbiology "Evangelismos" General Hospital, Athens, Greece

ⁱ Dept. of Paediatrics, "Venizeleion" General Hospital, Heraklion, Crete, Greece

^j Central Labs, Athens EUROCLINIC Group, Athens, Greece

^k Central Lab, "Iatriko" Medical Center, Athens, Greece

^l First Dept. of Paediatrics, "IASO" Children's Hospital, Athens, Greece

^m First Department of Pediatrics, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, "Aghia Sophia" Children's Hospital, Athens, Greece

^{mn} Dept. of Paediatrics, "MITERA" General Hospital, Athens, Greece

^o Dept. of Microbiology, Dept. of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa, Greece

^p Dept. of Paediatrics, Faculty of Medicine, Democritus University of Thrace, University General Hospital, Alexandroupolis, Greece

^q 3rd Dept. of Paediatrics, School of Medicine, Aristotle University, and Hippokratium General Hospital, Thessaloniki, Greece

^r Paediatric Infectious Diseases Unit, Heraklion University Hospital, University of Crete, Heraklion, Greece

^s Third Department of Pediatrics, National and Kapodistrian University of Athens, University General Hospital "ATTIKON", Athens, Greece

^t Second Dept. of Pediatrics, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, "A&P Kyriakou" Children's Hospital, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2022

Received in revised form 12 July 2022

Accepted 13 July 2022

Available online 22 July 2022

Keywords:

S. pneumoniae
Meningitis
Serotypes
Surveillance
Vaccines
Multiplex PCR
CST

ABSTRACT

Background: As Greece is a country which has introduced the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) both in the infant and in the adult immunization programs, the aim of the study was to investigate age-specific and serotype-specific trends of pneumococcal meningitis over an 11-year period (2010–2020).

Materials and Methods: Data are reported from pneumococcal meningitis cases [notified to the National Public Health Organization (NPHO)], with clinical samples and bacterial isolates sent for pneumococcal identification and serotyping at the National Meningitis Reference Laboratory (NMRL). Pneumococcal identification was performed directly on clinical samples or bacterial isolates by multiplex PCR (mPCR) assay, while serotyping was carried out by application of the Capsular Sequence Typing (CST) method with the combination of single tube PCR assays.

Results: A total of 427 pneumococcal meningitis cases were notified to the NPHO between 2010 and 2020. Among those, 405 (94.8%) were microbiologically confirmed, while samples from 273 patients were sent to the NMRL for identification and/or further typing. The annual notification rate peaked at 0.47/100,000 in 2016 and since then has been decreasing. The incidence was highest in infants and in older adults. Pneumococcal serotypes were identified in 260/273 (95.2%) cases, where clinical samples were sent to the NMRL. The most prevalent serotypes ($\geq 5\%$) were 3, 19A, 23B, 15B/C, 11A/D, 23A, 22F. During the study period there has been a decrease of PCV13 serotypes combined with an increase of non-PCV13 serotypes ($p = 0.0045$).

* Corresponding author at: National Meningitis Reference Laboratory, Dept. of Public Health Policy, School of Public Health, 196, Alexandras Avenue, Athens, Greece.

E-mail address: gtzanakaki@uniwa.gr (G. Tzanakaki).

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.015>

0264-410X/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Conclusions: This is the first study to report serotypes for pneumococcal meningitis across all ages in the post-PCV13 era in Greece. There is a need to enhance surveillance, by close monitoring of the emerging serotypes and the impact of vaccination programs. Higher-valency PCVs may help to improve the coverage of pneumococcal disease.

© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Streptococcus pneumoniae remains a major cause of morbidity and mortality worldwide. In 2016, *Streptococcus pneumoniae* was the leading cause of lower respiratory tract infection morbidity and mortality globally, contributing to more deaths than all other aetiologies studied (respiratory syncytial virus, influenza and *Haemophilus influenzae* type b) combined [1]. Further, as almost 80% of bacterial meningitis is caused by *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* and to lesser extent *H. influenzae* type b (in countries that have been implemented effective vaccination programs for *H. influenzae* type b), the risk of the disease is higher at the extremes of age (children < 2 years of age and adults > 65 years of age) and in individuals who suffer from chronic medical conditions [2–4].

The introduction of pneumococcal conjugate vaccines (PCVs) in routine pediatric vaccination programs has changed the epidemiology of pneumococcal disease, with large declines in overall and vaccine-type disease both in the vaccinated population and through herd effects in the unvaccinated population [5–7]. At the same time, emergence of serotypes not included in PCVs has been observed worldwide and requires close monitoring for future vaccine development and policy decision making [6–9].

Pneumococcal Conjugated Vaccines (PCVs) have been available since 2004 in Greece. Specifically, the 7-valent PCV (PCV7) was introduced into the infant National Immunization Program (NIP) in 2006, PCV10 in 2009 and PCV13 in 2010 (3 + 1 schedule until June 2019 and 2 + 1 schedule thereafter) [10]. For adults, PCV13 was introduced in the adult NIP for all adults ≥ 50 years of age as of December 2011 [11]. Before December 2011, Greece did not have an established adult NIP, but the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23), which has been in the market since 1999, was recommended in persons at increased risk for pneumococcal disease by their treating physicians, albeit with low vaccination rates. In January 2015, the Greek NIP was revised, with PCV13 being recommended together with PPSV23 for all adults ≥ 65 years of age and for adults 19–64 years of age at increased risk for pneumococcal disease [12].

Invasive pneumococcal disease (IPD) is not under mandatory surveillance in Greece, with the exception of meningitis. Pneumococcal meningitis surveillance is mandatory, along with all types of meningitis (bacterial and viral). All cases are notified to the National Public Health Organization (NPHO) by physicians throughout the country's hospitals, mainly clinical samples (cerebrospinal fluid and blood) and -to a lesser extent- bacterial isolates are sent to the National Meningitis Reference Laboratory (NMRL, Department of Public Health Policy, School of Public Health, University of West Attica) for identification and serotyping, while communication between NPHO and NMRL for data exchanging is on a daily basis.

In order to monitor the epidemiology of pneumococcal disease and the impact of vaccination programs, serotyping is crucial especially in the era of PCVs, since it has recently been shown that the incidence of serotypes responsible for IPD can change overtime [8]. Hence, as detailed epidemiological surveillance is needed, taking into consideration vaccine pressure and development of future conjugate vaccines, the aim of the present study was to investigate age-specific and serotype-specific trends of pneumococcal menin-

gitis in children and adults in Greece during an 11-year period (2010–2020).

2. Materials and methods

2.1. Source of specimens and data collection

Surveillance for meningitis is mandatory. All cases -including pneumococcal meningitis - are notified to the National Public Health Organization (NPHO) by physicians nationwide using a standard data collection form. Data collected include demographic (in accordance with the Hellenic Statistics Authority- age of patient, gender, place of residence) and epidemiological characteristics, clinical manifestations, potential antibiotic treatment prior to cerebrospinal fluid (CSF) collection and disease outcome. Laboratory testing is performed in local hospitals, however, clinical samples and/or isolates obtained from patients are also sent to the NMRL for further testing. Isolates and biological fluids (CSF, blood) received by the NMRL are obtained as part of the laboratory's routine activity and analyzed anonymously by molecular methods.

During the period January 2010–December 2020, a total of 427 meningitis cases due to *S. pneumoniae* were notified to the NPHO. Among those, 405 (94.8%) were microbiologically confirmed; either by culture (n = 114) and other methods (latex agglutination, Gram stain, film array) (n = 18 in local hospitals, or by non-culture identification at the NMRL. Samples (whole blood/CSF/bacterial isolates) from 273 patients were sent to NMRL for further identification and serotyping from hospitals throughout the country. Among those, 194 (71.1%) were identified solely by PCR, while 79 (28.9%) were also culture confirmed. Serotype was assigned to 260 (95.2%) cases with samples sent to the NMRL.

The remaining 22 of the 427 cases notified to the NPHO were considered as suspected cases based only on the clinical presentation (Fig. 1).

2.2. *S. Pneumoniae* identification and serotyping

S. pneumoniae identification was performed directly on clinical samples (cerebrospinal fluid, whole blood) or bacterial isolates as previously described [13], while, serotyping was carried out by the application of the Capsular Sequence Typing (CST) method with the combination of single tube PCR assays as described by Marmaras et al. [14]. Briefly, CST was modified on the previously published protocol by Elberse et al. [15] in order to meet the needs of serotyping directly on clinical samples. Specifically, a two-step PCR assay was performed; during the first step, a mix of three forward and three reverse primers were used, while during the second step, universal forward and reverse sequences were added as adapters to the 5' end upstream and downstream from the primers. The two-step PCR protocol was followed by purification of the PCR products and sequencing, where the universal sequences upstream and downstream the primers were used.

Analysis of the Chromatograms using Chromas software (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>, free downloaded) was carried out. Nucleotide sequences derived from the two DNA chains were

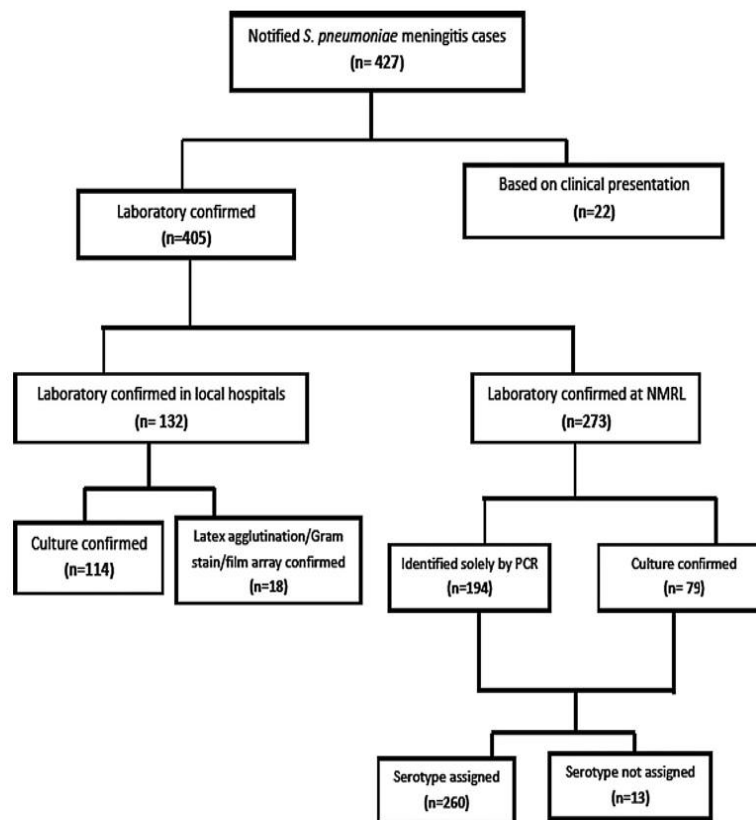


Fig. 1. Cases and sample flow of the study.

compared to each other with ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>, free online software).

The nucleotide sequences were then imported in *S. pneumoniae* CST Typing Tool (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/spn>) (free online database of the National Institute for Public Health and the Environment, RIVM, Netherlands) and the serotype was automatically assigned [15]. For cases where the CST Typing Tool assigned a group of 2–3 serotypes, further identification of a single serotype was carried out by additional single tube PCR assays with specific primers under the same PCR program and reagents' concentration. However, in some cases for which serotypes although assigned in a group of 2–3, a single serotype was not possible to be further identified due to lack of single PCR assays currently available [14].

2.3. Statistical analysis

Descriptive analysis was performed using Microsoft Excel for simple calculations and graphs creation. Pneumococcal serotypes were categorized as follows – PCV13 (PCV13-included) serotypes: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9 V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F; non-PCV13 (not included in PCV13) serotypes. Chi-squared test for trends over time in the prevalence rate of PCV13 and non-PCV13 serotypes was performed using R (prop.test.trend function). Statistical significance was set at 0.05.

Incidence rates were calculated by dividing the total number of cases with the estimated population on the 1st of January for each of the respective years. Age-specific incidence rates were calculated by dividing the number of cases per age-group (numerator) with the estimated population by five-year age group on the 1st of January (denominator) for each of the respective years. Popula-

tion estimates were obtained by the Hellenic Statistics Authority (<https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPO18/->). Incidence rates and confidence intervals were calculated by the use of R.

3. Results

3.1. Burden of disease

3.1.1. Annual incidence of meningitis due to *S. Pneumoniae*

The annual notification rate for pneumococcal meningitis fluctuated between 2010 and 2014, with an average rate of 0.32/100,000 population (95% CI: 0.28–0.37), peaked in 2015–2017, at an average rate of 0.45/100,000 (95% CI: 0.38–0.53), and decreased in 2018–2019, with an average rate of 0.32/100,000 population (95% CI: 0.25–0.40) (Fig. 2). The very low incidence observed during 2020 cannot be evaluated, as it is estimated to be the result of COVID-19 containment policies.

3.1.2. Distribution by age group

The majority of pneumococcal meningitis cases occurred in older adults, accounting for 27.2% (110/405) and 22.2% (90/405) of cases in adults aged ≥ 65 years and 50–64 years, respectively, followed by the age groups of: 20–39 years (15.1%; 61/405), 40–49 years (14.1%; 57/405) and 0–4 years (13.8%; 56/405). A minority of the cases occurred in children 5–9 years and 10–14 years of age (4.2%; 17/405 and 3%; 12/405, respectively) and adolescents 15–19 years of age (0.5%; 2/405).

Further analysis of pneumococcal meningitis incidence by age group revealed that the highest average incidence was observed among children aged 0–4 years (1/100,000), followed by

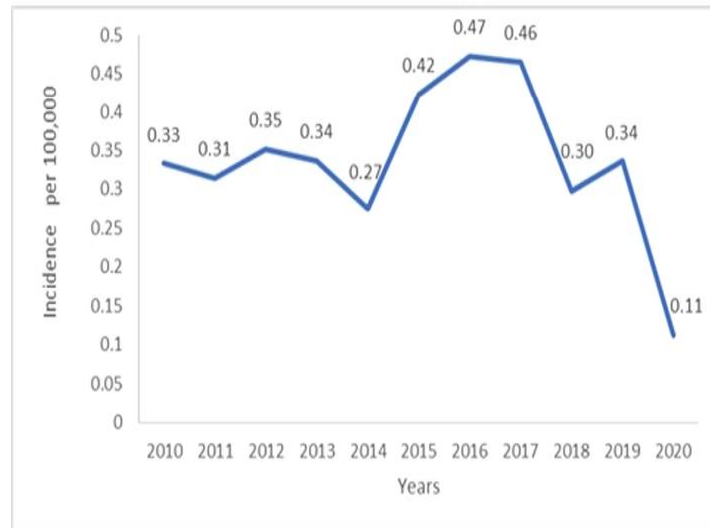


Fig. 2. Annual incidence (per 100,000 population) of *S. pneumoniae* meningitis notified cases (2010–2020).

adults ≥ 65 years and 50–64 years of age (0.44/100,000 and 0.43/100,000, respectively). (Fig. 3).

3.1.3. Case fatality rate

A total of 18/405 (4.4%) fatal cases of pneumococcal meningitis were reported, with the case fatality rate (CFR) ranging from 0% (2017 & 2019) to 8.1% (2010) and 8.3% (2020). The highest CFRs were observed in adults ≥ 65 years (7.3%) and children 0–4 years (7.1%). The CFR ranged from 1.8% to 3.3% among the rest of the adult age groups (3.3%; 20–39 years, 1.8%; 40–49 years, 3.3%; 50–64 years). No fatal cases have been reported among children and adolescents 5–19 years of age.

3.2. Serotype distribution

S. pneumoniae serotypes were identified in 260/273 (95.2%) of the cases, ranging from 75% to 100% of the received at NMRL samples from the above cases (Suppl Table 1) Further, as the study was

a retrospective one, sample quantity from 13 cases (13/273; 4.8%) was not sufficient for further analysis and hence, the serotype was not finally assigned.

Among the serotyped cases, serotype 3 was the most prevalent, identified in 11.5% (30/260) while, serotypes 19A and 23B (7.7%; 20/260) ranked next in order, followed by 15B/C, 23A, 11A/D, 22F, 17A/35B/C, 7A/F, 24F/40, 12F, 15A, 14, 10A, 6D, 8 and 19F.

The serotype distribution in relation to the age group is shown in Table 1. In all age groups the disease was caused mainly by non-PCV13 serotypes (Fig. 4). Specifically, among the age group of 0–4, serotypes 24F/40 were the most prevalent (15.9%; 7/44), followed by serotype 15B/C (11.4%; 5/44). Regarding adults, serotype 3 was the most prevalent in adults ≥ 65 years (20.5%; 15/73), followed by 19A (12.3%; 9/73), 22F (11%; 8/73) and 23B (9.6%; 7/73), while serotypes 3 and 19A were the most prevalent in the age group 50–64 years (12.3%, 7/57 each), followed by 11A/D (8.8%; 5/57). In contrast, serotype 23B predominated (13.9%; 5/36) in adults 20–39 years, followed by serotype 3 (11.1%; 4/36).

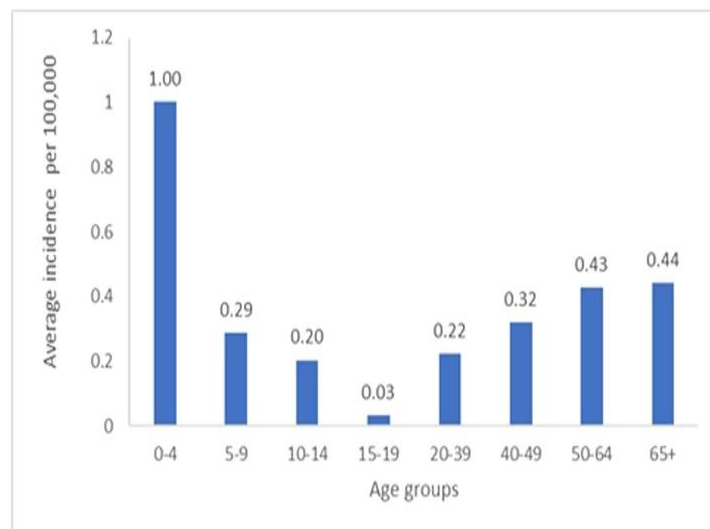


Fig. 3. Average incidence of *S. pneumoniae* meningitis notified cases by age group, 2010–2020.

Table 1
Distribution of serotypes included and not included in the PCV-13 vaccine by age group.

Serotype	AGE (years) Number of cases (n = 260)	0-4y	5-9y	10-14y [#]	20-39y	40-49y	50-64y	≥ 65y
		44	13	8	36	29	57	73
Serotypes included in PCV13(PCV13 serotypes)								
3	30 (11.5%)	1	1	0	4	2	7	15
19A	20 (7.7%)	1	0	0	1	2	7	9
7A/F	10 (3.8%)	4	0	1	2	2	0	1
14	9 (3.5%)	2	0	0	0	3	2	2
19F	6 (2.3%)	3	0	1	0	1	0	1
1	3 (1.2%)	0	1	0	0	1	0	1
Other serotypes*	5 (1.9%)	1	0	1	0	1	1	1
Total	83 (31.9%)	12 (27.2%)	2 (15.4%)	3(37.5%)	7 (19.4%)	12 (41.4%)	17 (29.8%)	30 (41.1%)
Serotypes not included in PCV13 (Non-PCV13 serotypes)								
23B	20 (7.7%)	1	2	1	5	3	1	7
15B/C or 15B ^b	15 (5.8%)	5	1	0	3	2	3	1
11A/D ^b	14 (5.4%)	0	1	0	1	2	5	5
23A	14 (5.4%)	3	2	0	2	2	2	3
22F ^b	13 (5%)	0	0	0	1	2	2	8
17A, 35B/C ^d	10 (3.8%)	1	0	0	2	0	2	5
12F ^b	9 (3.5%)	2	1	0	2	0	3	1
24F, 40 ^a	9 (3.5%)	7	0	0	0	1	1	0
15A	9 (3.5%)	0	0	0	3	1	2	3
10A	8 (3.1%)	1	1	0	2	0	3	1
6D ^b	8 (3.1%)	2	0	1	0	0	3	2
8	6 (2.3%)	1	0	0	1	2	1	1
20 ^b	5 (1.9%)	1	0	0	0	0	2	2
35F/47F ^d	5 (1.9%)	3	1	1	0	0	0	0
21	4 (1.5%)	1	1	0	0	0	1	1
34/17A ^d	4 (1.5%)	0	0	0	3	0	1	0
7C ^b	4 (1.5%)	0	0	0	1	1	1	1
9 N/L	3 (1.2%)	0	0	0	0	1	1	1
Other serotypes**	17 (6.5%)	4	1	2	3	0	6	1
Total	177(68.0%)	32 (72.7%)	11 (84.6%)	5 (62.5%)	29 (80.5%)	17 (58.6%)	40 (70.1%)	43 (58.9%)

* 5, 6B, 23F

** 6, 17F, 18, 18A, 31, 37, 42, 25A/F/38, 33A/F/35A

^a CST assigned a group of serotypes, there was no possibility for a single serotype to be identified due to a lack of PCR assays being currently available in addition to 25A/F/38, 33A/F/35A

^b CST assigned a group of serotypes, the further application of an additional CST-assigned group specific single-tube PCR assay with the use of previously published primers pairs[14]

[#] no serotyped cases for the age group 15–19 years

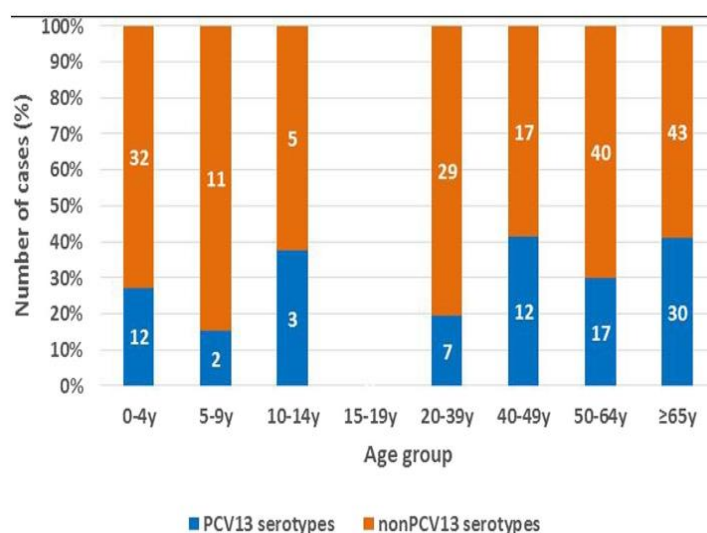


Fig. 4. Distribution (number of cases and %) of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) and non-PCV13 serotypes by age group.

3.3. Distribution of *S. Pneumoniae* vaccine and non-vaccine serotypes over time

Overall, the majority of the serotyped cases were caused by non-PCV13 serotypes (68.1%; 177/260) in contrast to PCV13 serotypes (31.9%; 83/260). Between 2010 and 2012, the serotypes involved in pneumococcal meningitis were similarly split between PCV13 and non-PCV13 serotypes. However, an increase of non-PCV13 serotypes was observed since 2013, with a further gradual increase during the following years, along with the simultaneous decrease of PCV13 serotypes (Fig. 5). During the period 2010–2012, 54.7% of cases were due to non-PCV13 serotypes, increasing to 71.1% in 2013–2016, reaching 77.2% during 2017–2019 (chi-squared test for the increasing trend = 8.0583, p-value = 0.0045). Of note, data obtained for the year 2020 cannot be analysed, as due to the protective measures against the COVID-19 pandemic, there were only few cases notified.

Another interesting finding was that since 2014 a greater diversity in the serotypes implicated in disease was observed (new emerging serotypes, several serotypes increasing in relative frequency).

3.4. Case fatality rate by vaccine and non-vaccine serotypes

Among the total of 18 fatal cases, 5 (27.8%) were due to PCV13 serotypes; 2 (11.1%) were due to serotype 19A and 1 (5.6%) due to each of the serotypes 1, 14 and 7A/F. In relation to age, four fatal cases were presented in adults (42-year-old (n = 1), 32-year-old (n = 1) and > 80 years old (n = 2)), while, one fatal case was presented in a fully vaccinated 4-year-old child presenting with meningitis and bacteremia due to serotype 14 (2013).

Regarding the remaining 13 (72.2%) fatal cases in which non-PCV13 serotypes were identified, serotype 6D was identified in 3 (16.7%) meningitis cases with bacteremia in the early study years

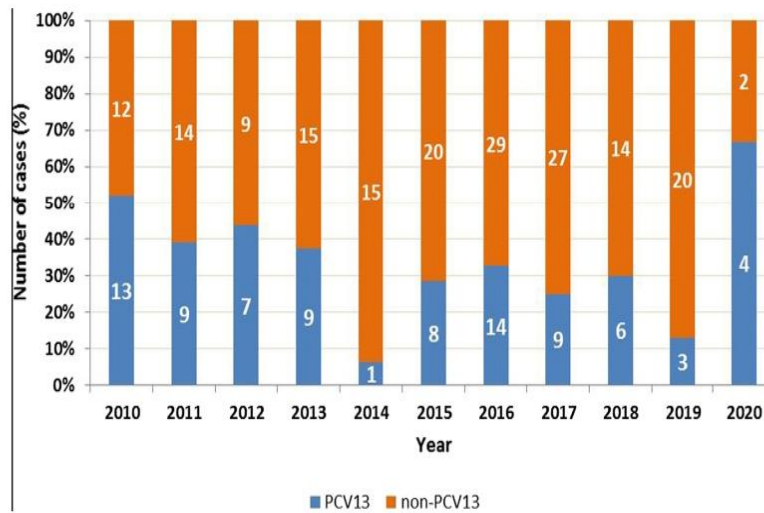


Fig. 5. Distribution (number of cases and %) of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) and non-PCV13 serotypes by year, 2010–2020.

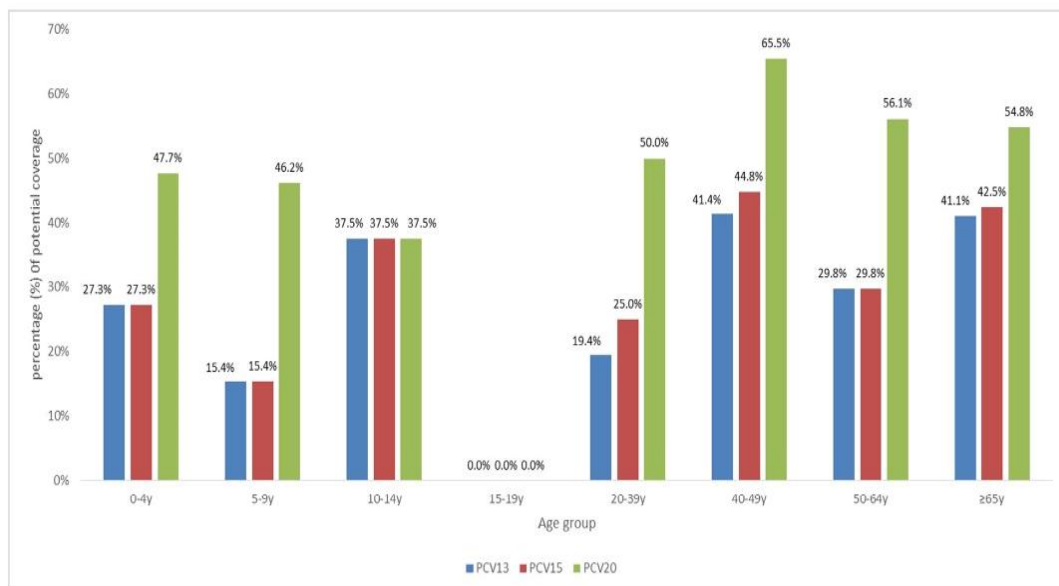


Fig. 6. Potential coverage (%) by 13-valent (PCV13), 15-valent (PCV15)*, 20-valent (PCV20*) pneumococcal conjugate vaccines in relation to age groups. *PCV15 serotypes: PCV13 serotypes plus 22F, 33F. PCV20 serotypes: PCV15 serotypes plus 8, 10A, 11A, 12F, 15B.

(between 2010 and 2013), serotype 10A was identified in 2 cases (11.1%) and there was one fatal case (5.6%) caused by each of the serotypes 8, 22F and 17A/35B/C. For the remaining five fatal cases (27.8%), clinical samples were not sent to the NMRL for serotype identification.

3.5. Estimation of coverage according to the upcoming PCVs

In light of the upcoming higher-valency PCVs (PCV15 and PCV20), the potential vaccine coverage for pneumococcal meningitis was estimated according to the current results. Overall, PCV15 is estimated to cover 33.5%, while PCV20 is estimated to cover 53.5% of cases, varying according to the age group (Fig. 6).

4. Discussion

This is the first study to report data on a large number of pneumococcal meningitis cases across all ages in Greece over the recent years. As expected, the incidence was highest in infants, young children and in the elderly [2,16], while the overall CFR was 4.4%, with the highest rate observed in the elderly, followed by children aged 0–4 years.

Regarding trends over time, the differences in the incidence rate of pneumococcal meningitis were not statistically significant. The incidence rate of pneumococcal meningitis fluctuated during the first years of the study, reaching its lowest level in 2014, which could be correlated with the mature phase of the pediatric vaccination program. An increase in incidence was observed the following years (2015–2017) along with the observed gradual increase in non-PCV13 serotypes. However, a decrease in pneumococcal meningitis incidence was observed during 2018–2019 reaching levels similar to the first years of the study most likely due to strong recommendation and direct vaccine uptake in adults > 65 years of age.

Due to the heterogeneity of surveillance systems for pneumococcal disease across the world, it was not possible to compare our notification rates to other countries. However, the low notification rate of pneumococcal meningitis observed during 2020, is in agreement with previous similar reports [17] and is probably related to the mitigation measures against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), such as the use of masks, social distancing, school closures and travel restrictions. Nonetheless, it will be interesting to see how this may vary in the upcoming years, as COVID-19 containment measures are being loosened and we are gradually returning to normality.

Regarding serotype distribution, a significant decrease was observed in the proportion of PCV13 serotypes causing pneumococcal meningitis over time. A similar pattern has been described in other countries with PCV13 paediatric vaccination programs [6–8,18–20]. However, even in the most recent years (2017–2019), PCV13 serotypes continued to account for 15.6% of disease, with serotypes 3 and 19A accounting for 66.6% of PCV13-type disease. This finding highlights the need for high compliance with the vaccination recommendations and schedules for all the vaccine-eligible groups.

The persistence of serotypes 3 and 19A in IPD has been reported in other settings as well [6–8,16,21] and may be related to specific characteristics of these serotypes [22,23]. According to a previous Greek study on the characteristics of serotype 19A isolates from children with IPD and acute otitis media during the time period 1986–2015, a decrease of 19A prevalence rate was observed after the introduction of PCV13 in the paediatric National Immunization Program. Nonetheless, serotype 19A continued to account for 11.4% of the isolates in 2015 [22]. Moreover, despite the direct effectiveness of PCV13 against both serotypes 19A and 3 (albeit

for serotype 3 lower effectiveness compared to other vaccine serotypes) [24,25], both serotypes are the most prevalent among the vaccine failure cases [26,27]. This comes to an agreement with our dataset, for which, out of 3 vaccine failure cases, one was due to serotype 3 and one due to serotype 19A. Given the hypothesis that different infant vaccination schedules may have a different impact on the circulation of serotypes 19A and 3 in the population [16,25], continued monitoring of the prevalence of serotypes 19A and 3 is very important, especially following the change of the infant vaccination schedule from 3 + 1 to 2 + 1.

Another important finding was the detection of emerging non-PCV13 serotypes in Greece, the most prevalent being 23B, 15B/C, 11A/D, 23A, 22F, 17A,35B/C, 12F, 24F,40, 15A, 10A and 6D. Among those, serotypes 10A, 11A, 12F, 15B, 22F are targeted by higher-valency pneumococcal conjugate vaccines (PCV15 and PCV20). On the other hand, serotypes 15A, 23A, 23B, 24F, which are not included in higher-valency PCVs, have been reported as emerging causes of both IPD [6,8,16,21,28] and pneumococcal meningitis specifically [19,29] also in other settings and are important to continue monitoring in the future. In particular, serotype 24F is reported to affect predominantly infants and children up to 4 years of age, which was the case also in the present study, and is prevalent in Europe and in the Western Pacific region [6,8,16,30]. On the contrary, serotype 24F has been an infrequent cause of IPD in the US [30,31]. Moreover, based on serotype distribution in the present study, it was possible to estimate the potential coverage of pneumococcal meningitis by PCV15 and PCV20, with PCV15 somewhat increasing (mainly due to the addition of serotype 22F) and PCV20 further increasing the coverage of disease.

Another interesting finding was low prevalence of serotype 8, which comes in agreement to the similar low prevalence in the US in contrast to published data from Europe for which serotype 8 is emerging as one of the most prevalent serotypes [16,18]–. It is not known to what extent this may be related, among other factors, to the vaccination policy in Greece. It will be interesting to continue monitoring the local trend of serotype 8 in the future.

Among the non-PCV13 serotypes, 10A and 6D showed the highest CFR. Serotype 10A has long been associated with increased mortality [32], while 6D is a recently recognized serotype which was also associated with increased mortality in South Korea [33,34].

The present study has some limitations. First, although meningitis is a notifiable disease with mandatory reporting in Greece, an average of 64% of the notified cases were sent to the NMRL for either identification and/or serotyping during the whole study period (2010–2020). Analysis per year revealed that since 2016, samples from approximately 80% of the notified cases were sent to the NMRL for further typing. This was observed mainly from the paediatric hospitals and may have to do with paediatricians being more prone for typing, due to higher awareness of the importance of serotyping information. However, the same does not hold true for physicians as 67% of the notified cases were sent from the general hospitals to NMRL for further typing, somehow lying at the discretion of the treating physician.

Hence broadening the network of clinicians and laboratories collaborating with the NMRL for pneumococcal identification and serotyping is important, in order to improve collection of clinical samples and bacterial isolates not only for meningitis but also other clinical presentations of IPD.

Secondly, clinical samples and isolates were not available for serotyping in approximately 32.6% (132/405) of the laboratory confirmed cases as none of those samples were sent to NMRL for further typing. Moreover, 34 cases although assigned to a group of 2–3 serotypes, a specific serotype was not further identified due to lack of PCR assays currently available.

Finally, the scarcity of serotyping data from pneumococcal meningitis cases before the introduction of PCV13 in Greece, precluded any comparisons to the pre-PCV13 era.

Nonetheless, this is the first study to report data on serotypes for pneumococcal meningitis across all ages over a long time period in Greece. Moreover, the recent application of CST protocol in combination with PCR assays directly on culture-negative PCR-positive biological samples (such as CSF and blood) considerably improved the identification of pneumococcal serotypes and allowed the identification of specific serotypes within a serogroup [14].

In conclusion, this study provides important insights into the burden and the serotype distribution of pneumococcal meningitis in Greece. Moreover, it highlights the need for close monitoring of changes in the epidemiology, evolving serotypes and vaccine effectiveness, which are crucial for the evaluation of the overall impact of pneumococcal vaccination programs and for designing future vaccination strategies.

Funding

The study was funded by the National Organization of Public Health (EODY) in the frame of the annual financial support to the National Meningitis Reference Laboratory.

Institutional Review Board Statement

Ethical Review and approval were waived in this study as the procedures being performed were part from the routine laboratory diagnosis and surveillance of bacterial meningitis. The study was conducted in accordance with 1964 Helsinki Declaration and its latter amendments or comparable ethical standards.

Informed Consent Statement

Patient consent was waived as depersonalized data from notifiable disease registry and laboratory findings were used.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.015>.

References

[1] Troeger C, Blacker B, Khalil IA, Rao PC, Cao J, Zimsen SRM, et al. 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(11):1191–210.

[2] World Health Organization (WHO). Pneumococcal vaccines position paper 2012. *Wkly Epidemiol Rec.* 87 (14), pp. 129–144.

[3] van Hoek AJ, Andrews N, Waight PA, Stowe J, Gates P, George R, et al. The effect of underlying clinical conditions on the risk of developing invasive pneumococcal disease in England. *J Infect.* 2012;65(1):17–24.

[4] Shea KM, Edelsberg J, Weycker D, Farkouh RA, Stratton DR, Pelton SI. Rates of pneumococcal disease in adults with chronic medical conditions. *Open Forum Infect Dis.* 2014. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofu024>.

[5] Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W, Lynfield R, Lexau C, Bennett NM, et al. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(3):301–9.

[6] Ladhani SN, Collins S, Djennad A, Sheppard CL, Borrow R, Fry NK, et al. Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000–17: a prospective national observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(4):441–51.

[7] Ben-Shimol S, Regev-Yochay G, Givon-Lavi N, Van Der Beek BA, Brosh-Nissimov T, Peretz A, et al.; Israeli Pediatric Bacteremia And Meningitis Group

(Ipbmg), And The Israeli Adult Invasive Pneumococcal Disease (Iaipd) Group. Dynamics of Invasive Pneumococcal Disease in Israel in Children and Adults in the PCV13 Era: A Nationwide Prospective Surveillance. *Clin Infect Dis.* 2021 Jul 22;ciab645. doi: 10.1093/cid/ciab645.

[8] Ouldali N, Varon E, Levy C, Angoulvant F, Georges S, Ploy M-C, et al. Invasive pneumococcal disease incidence in children and adults in France during the pneumococcal conjugate vaccine era: an interrupted time-series analysis of data from a 17-year national prospective surveillance study. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(1):137–47.

[9] Tin Tin Htar M, Morato Martínez J, Theilacker C, Schmitt HJ, Swerdlow D. Serotype evolution in Western Europe: perspectives on invasive pneumococcal diseases (IPD). *Expert Rev Vaccines.* 2019 Nov;18(11):1145–55. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1688149>.

[10] Grivea IN, Priftis KN, Giotas A, Kotzia D, Tsantouli AG, Douros K, et al. Dynamics of pneumococcal carriage among day-care center attendees during the transition from the 7-valent to the higher-valent pneumococcal conjugate vaccines in Greece. *Vaccine.* 2014;32(48):6513–20.

[11] Greek Ministry of Health. National Immunization Program for Adults 2011. AAA: B4A50E7M-AN8. <https://diageia.gov.gr/doc/%CE%924%CE%9B5%CE%9F%CE%9E7%CE%9C-%CE%9B%CE%9D8> Accessed March 2022.

[12] Greek Ministry of Health. National Immunization Program for Adults 2015. AAA: Ω5Φ6Θ-46Π. <https://www.moh.gov.gr/articles/health/dieythynsh-dhmosias-ygjeinhns/emboliosmoi/ethniko-programma-emboliosmw-n-epe-enhlikwn/6353-palaiotera-epe-enhlikwn> Accessed March 2022.

[13] Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumalas M, Tabaki A, et al. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(5):386–90.

[14] Marmaras N, Xirogianni A, Papandreou A, Petinaki E, Papaevangelou V, Tsolia M, et al. Pneumococcal Serotype Identification by Capsular Sequence Typing (CST): A Modified Novel Approach for Serotyping Directly in Clinical Samples. *Diagnostics (Basel).* 2021 Dec 14;11(12):2353. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11122353>.

[15] Elberse KEM, van de Pol I, Witteveen S, van der Heide HGJ, Schot CS, van Dijk A, et al. Population structure of invasive *Streptococcus pneumoniae* in The Netherlands in the pre-vaccination era assessed by MLVA and capsular sequence typing. *PLoS ONE* 2011;6(5):e20390.

[16] European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive pneumococcal disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2020.

[17] Brueggemann AB, Jansen van Rensburg MJ, Shaw D, McCarthy ND, Jolley KA, Maiden MCJ, et al. Changes in the incidence of invasive disease due to *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* during the COVID-19 pandemic in 26 countries and territories in the Invasive Respiratory Infection Surveillance Initiative: a prospective analysis of surveillance data. *Lancet Digit Health.* 2021;3(6):e360–70.

[18] Baxter R, Aukes L, Pelton SI, Yee A, Klein NP, Gruber WC, et al. Impact of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine on Invasive Pneumococcal Disease After Introduction Into Routine Pediatric Use. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2021;10(2):141–50.

[19] Ouldali N, Levy C, Varon E, Bonacorsi S, Béchet S, Cohen R, et al. French Pediatric Meningitis Network. Incidence of paediatric pneumococcal meningitis and emergence of new serotypes: a time-series analysis of a 16-year French national survey. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(9):983–91.

[20] Weinberger R, von Kries R, van der Linden M, Rieck T, Siedler A, Falkenhorst G. Invasive pneumococcal disease in children under 16 years of age: Incomplete rebound in incidence after the maximum effect of PCV13 in 2012/13 in Germany. *Vaccine.* 2018 Jan 25;36(4):572–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.085>.

[21] Kaplan SL, Barson WJ, Lin PL, Romero JR, Bradley JS, Tan TQ, et al. Invasive Pneumococcal Disease in Children’s Hospitals: 2014–2017. *Pediatrics* 2019;144(3):. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-0567e20190567>.

[22] Koutouzis EI, Daikos GL, Chatzichristou P, Michos AG, Koutouzi FI, Chrousos GP, et al. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A isolates from children in the pre and post Conjugate Vaccine Era. Single center experience 1986–2015. *Vaccine* 2018;36(35):5245–50.

[23] Groves N, Sheppard CL, Litt D, Rose S, Silva A, Njoku N, et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 3 in England and Wales: A Major Vaccine Evader. *Genes (Basel).* 2019 Oct 25;10(11):845. doi: 10.3390/genes10110845.

[24] Isturiz R, Sings HL, Hilton B, Arguedas A, Reinert RR, Jodar L. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A: worldwide epidemiology. *Expert Rev Vaccines.* 2017 Oct;16(10):1007–27. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1362339>.

[25] Sings HL, De Wals P, Gessner BD, Isturiz R, Laferriere C, McLaughlin JM, et al. Effectiveness of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Against Invasive Disease Caused by Serotype 3 in Children: A Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies. *Clin Infect Dis.* 2019 May 30;68(12):2135–43. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy920>. Erratum. In: *Clin Infect Dis.* 2021 May 4;72(9):1684–1685.



[26] Oligbu G, Collins S, Andrews N, Sheppard CL, Fry NK, Slack MPE, et al. Characteristics and Serotype Distribution of Childhood Cases of Invasive Pneumococcal Disease Following Pneumococcal Conjugate Vaccination in England and Wales, 2006–2014. *Clin Infect Dis.* 2017;65(7):1191–8.

[27] Hernández S, Moraga-Llop F, Díaz A, de Sevilla MF, Ciriuela P, Muñoz-Almagro C, et al. Failures of 13-Valent Conjugated Pneumococcal Vaccine in Age-Appropriately Vaccinated Children 2–59 Months of Age. Spain. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(6):1147–55.

- [28] de Miguel S, Domenech M, González-Camacho F, Sempere J, Vicioso D, Sanz JC, et al. Nationwide Trends of Invasive Pneumococcal Disease in Spain From 2009 Through 2019 in Children and Adults During the Pneumococcal Conjugate Vaccine Era. *Clin Infect Dis*. 2021;73(11):e3778–87.
- [29] Oligbu G, Collins S, Djennad A, Sheppard CI, Fry NK, Andrews NJ, et al. Effect of Pneumococcal Conjugate Vaccines on Pneumococcal Meningitis, England and Wales, July 1, 2000–June 30, 2016. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(9):1708–18.
- [30] Balsells E, Guillot L, Nair H, Kyaw MH, Borrow R. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2017 May 9;12(5): e0177113.
- [31] Beall B, Chochua S, Gertz RE Jr, Li Y, Li Z, McGee L, et al. A Population-Based Descriptive Atlas of Invasive Pneumococcal Strains Recovered Within the U.S. During 2015–2016. *Front Microbiol*. 2018 Nov 19;9:2670. doi: 10.3389/fmicb.2018.02670.
- [32] Harboe ZB, Thomsen RW, Riis A, Valentiner-Branth P, Christensen JJ, Lambertsen L, et al. Pneumococcal serotypes and mortality following invasive pneumococcal disease: a population-based cohort study. *PLoS Med*. 2009 May 26;6(5):e1000081.
- [33] Choi EH, Lee HJ, Cho EY, Oh CE, Eun BW, Lee J, et al. Prevalence and genetic structures of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D. South Korea. *Emerg Infect Dis*. 2010 Nov;16(11):1751–3. <https://doi.org/10.3201/eid1611.100941>.
- [34] Cheong HJ, Song JY, Choi MJ, Jeon JH, Kang SH, Jeong EJ, et al. Clinical and microbiological characterization of serotype 6D pneumococcal infections in South Korea. *J Infect Chemother*. 2016;22(8):515–20.

Article

Pneumococcal Serotype Identification by Capsular Sequence Typing (CST): A Modified Novel Approach for Serotyping Directly in Clinical Samples

Nektarios Marmaras ¹, Athanasia Xirogianni ¹, Anastasia Papandreou ¹, Efthymia Petinaki ², Vana Papaevangelou ³, Maria Tsolia ⁴  and Georgina Tzanakaki ^{1,*} 

¹ National Meningitis Reference Laboratory, Department of Public Health Policy, School of Public Health, University of West Attica, 115 21 Athens, Greece; marmarasn@hotmail.com (N.M.); axirogianni@uniwa.gr (A.X.); npapandreou@uniwa.gr (A.P.)

² Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, 411 10 Larissa, Greece; petinaki@med.uth.gr

³ Third Department of Pediatrics, National and Kapodistrian University of Athens, University General Hospital "ATTIKON", 124 62 Athens, Greece; vpapaev@gmail.com

⁴ Second Department of Pediatrics, National and Kapodistrian University of Athens, "A&P Kyriakou" Children's Hospital, 115 27 Athens, Greece; mtsolia@med.uoa.gr

* Correspondence: gtzanakaki@uniwa.gr



Citation: Marmaras, N.; Xirogianni, A.; Papandreou, A.; Petinaki, E.; Papaevangelou, V.; Tsolia, M.; Tzanakaki, G. Pneumococcal Serotype Identification by Capsular Sequence Typing (CST): A Modified Novel Approach for Serotyping Directly in Clinical Samples.

Diagnostics **2021**, *11*, 2353. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11122353>

Academic Editor: Iraklis Tsangaris

Received: 3 November 2021

Accepted: 10 December 2021

Published: 14 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: As almost 60–70% of Invasive Pneumococcal Disease (IPD) is identified by nonculture methods in Greece, serotyping is of high importance for the better monitoring of pneumococcal serotypes due to the availability of conjugate vaccines. The aim of the study was the modification and direct application of the Capsular Sequence Typing (CST) assay in clinical samples in order to serotype *Streptococcus pneumoniae* culture-negative, Polymerase Chain Reaction (PCR)-positive samples, followed by CST group specific single-tube PCR assays. A two-step PCR modified assay was applied on a total of 306 samples (such as CSF, blood, pleural and middle ear fluids, isolates) obtained from 283 patients with IPD. The overall performance permits a rapid, accurate and cost-effective method for nonculture pneumococcal serotyping. As the management of IPD is closely related to the continuous monitoring of pneumococcal serotypes, the proposed approach proved to be a valuable tool for the typing and epidemiological monitoring of *S. pneumoniae*, for the evaluation of the overall impact of vaccination programs in the era of pneumococcal conjugate vaccines, in order to initiate the appropriate vaccination strategy.

Keywords: *S. pneumoniae*; non-culture serotyping; capsular sequence typing (CST)

1. Introduction

Streptococcus pneumoniae is a major cause of serious bacterial infections including meningitis, septicemia and pneumonia and is associated with significant morbidity and mortality worldwide. Young children and elderly people are at the highest risk, with a high incidence observed in those ages [1].

The ability of *S. pneumoniae* to cause disease is directly related to the capsule production, a polysaccharide structure external to the cell wall that provides resistance to phagocytosis and promotes the invasion of the host immune system by the bacteria [2]. To date, approximately 100 different pneumococcal serotypes have been identified, based on the unique antigen structure of the capsular polysaccharide, each with their own characteristics, adaptability for nasopharyngeal carriage and potential for invasive disease [3].

Over the years, in order to reduce the burden of Invasive Pneumococcal Disease (IPD), universal infant vaccination schemes have been initiated by initially introducing the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV-7) in the early 2000s. An increase of non-PCV-7 serotypes observed in the following years [4,5] led to the replacement of

PCV-7 in the routine infant immunization schedule. In the early 2010s, two vaccines, the 10-valent pneumococcal conjugate (PCV-10) and the 13-valent pneumococcal conjugate vaccines (PCV-13), offered a wider serotype coverage range [6]. The implementation of PCV universal vaccination has led to a significant decrease of IPD incidence among vaccinated children.

However, as the vaccination is based on the pneumococcal capsular polysaccharides, immunization is expected to put further selective pressure on the pneumococcal population. Important vaccine effects following immunization are serotype replacement and capsule switch. As shown recently, serotypes that are not included in the aforementioned vaccines seem to emerge [7–9].

Consequently, when evaluating the potential impact of current or new vaccines, there is a need to predict the overall benefits, which are influenced by both declines in the disease incidence due to vaccine-targeted serotypes (VTs) and by an increase in the disease incidence due to non-vaccine targeted serotypes (NVTs). Hence, the management of IPD is closely related to the continuous monitoring of pneumococcal serotypes.

S. pneumoniae serotyping is usually monitored by the serological determination of the capsular type by standard capsular tests after culture. The gold standard for serotyping is the Quellung or Neufeld test [10,11]. However, the method is time-consuming and expensive. On the other hand, several molecular serotyping methods are described by the use of sequential multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) assays [12–16]. However, due to the large number of pneumococcal serotypes used in order to assess the serotype, several multiplex PCRs are involved. Furthermore, many of the PCR-based serotyping assays, including Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Multi Locus Sequence Typing (MLST), DNA microarrays, Next Generation Sequencing (NGS) and Whole Genome Sequencing (WGS), require isolates in order to proceed [17].

On the other hand, Elberse et al. [18], in order to monitor the pneumococcal serotypes in the Netherlands, developed a molecular method, the Capsular Sequence Typing (CST) assay, for serotype identification on pneumococcal isolates. The aforementioned assay was based on the genotyping analysis of the capsular locus *wzh* gene and was achieved by the use of a mix of primers based on publicly available sequences of the capsular genes of known serotypes [19].

As almost 60–70% of *S. pneumoniae* cases are confirmed solely by PCR in Greece—mainly due to the early antibiotic treatment—there is a need for a diagnostic tool for direct serotype identification in culture-negative/PCR-positive biological fluids.

The present study describes a modification of the CST assay in a two-step PCR protocol and its direct application on *S. pneumoniae* culture-negative/PCR-positive clinical samples (CSF, whole blood, pleural fluid, middle ear fluid), which were obtained from patients with IPD clinical manifestations such as meningitis and/or septicaemia, pneumonia, as well as otitis media and arthritis (synovial fluids), aiming for a nonculture pneumococcal serotype identification. Further, as the CST method occasionally identifies a group of 2–3 specific serotypes, individual PCR assays were developed and applied in order to define a single serotype.

2. Materials and Methods

2.1. Source of Specimens

A total of 306 samples identified as *S. pneumoniae* were obtained from 283 patients; these included 239 culture-negative PCR-positive clinical samples (whole blood ($n = 36$), cerebrospinal fluid (CSF) ($n = 118$), pleural fluid ($n = 65$), synovial fluid ($n = 1$), middle ear fluid ($n = 15$), blood culture ($n = 2$), pus ($n = 2$)) and 67 pneumococcal isolates. The samples were sent during 2010–2020 from hospitals throughout the country as the routine identification service provided by to the National Meningitis Reference Laboratory (NMRL).

All bacterial isolates received had previously been identified and serotyped with compatible culture methods (α haemolysis, optochin test, Quellung reaction), while the

clinical samples were identified as *S. pneumoniae* by the use of a multiplex PCR assay described previously [20].

2.2. DNA Isolation

DNA isolation from clinical samples was carried out by the use of the MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit (MagCore HF 16 nucleic acid extraction system, RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan).

For pneumococcal isolates, DNA extraction was carried out from a 24 h blood agar culture, as described previously [20].

2.3. Capsular Sequence Typing (CST)

CST was based on the previously published protocol by Elberse et al. [18]. In order to meet the needs of serotyping directly for clinical samples, the method was modified in a two-step PCR assay. Specifically, during the first step, primers without M-tails were used, while during the second step, the PCR products obtained from the first PCR assay were submitted to the second PCR assay with primers extended with M-tails (i.e., universal forward and reverse sequences added as adapters to the 5' end upstream and downstream from the oligonucleotides) (Table 1).

Table 1. Primers' sequences used for the CST protocol.

	Primer	Primer Sequence	Publication
Primers used for the first PCR	CST_1F	CATTCGCATATCGITTTTG	Modified from Elberse et al. [18] (without M-tails)
	CST_2F	CATTCTCACATTATTTT GATGT	
	CST_3F	CATTCGCACATCGTCTTTG	
	CST_1R	CTGAGCTCTTTTTTCATGA	
	CST_2R	GTGAACTCGTTTCTTCATGA	
	CST_3R	CCGAGCTCTTTTTTCATAA	
	CST_4R	CCGAGCTCTTTTTTCATGA	
Primers used for the second PCR	CST_01-M13F	GTAAAACGACGGCCAG CATTCGCATATCGITTTTG	Elberse et al. [18]
	CST_02-M13F	GTAAAACGACGGCCAG CATTCTCACATTATTTT GATGT	
	CST_03-M13F	GTAAAACGACGGCCAG CATTCGCACATCGTCTTTG	
	CST_01-M13R	CAGGAAACAGCTATGAC CTGAGCTCTTTTTTCATGA	
	CST_02-M13R	CAGGAAACAGCTATGAC GTGAACTCGTTTCTTCATGA	
	CST_03-M13R	CAGGAAACAGC TATGACCCGAGCTCTTTTT CATAA	
	CST_04-M13R	CAGGAAACAGC TATGACCCGAGCTCTTTTT CATGA	
CST sequencing	M13F(-20)	GTAAAACGACGGCCAG	
	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	

During the first step PCR assay, 0.8 mM dNTPs (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 0.48 U/reaction Phusion®-High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs,

Ipswich, MA, USA) and $1.1 \times$ HF buffer (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), $0.8 \mu\text{L}$ primer mix ($10 \mu\text{M}$ /each primer) (VBC, Vienna, Austria) and $2 \mu\text{L}$ DNA template were mixed in a $20 \mu\text{L}$ total reaction volume, under the following conditions: 98°C for 1 min as initial denaturation, 98°C for 14 s, 58°C for 35 s and 72°C for 38 s for 14 cycles, 98°C for 13 s, 57°C for 34 s and 72°C for 37 s for 14 cycles, 98°C for 12 s, 56°C for 32 s and 72°C for 35 s for 14 cycles, and 72°C for 5 min as a final extension step, in a RoboCycler (Stratagene, San Diego, CA, USA). Further, $12 \mu\text{L}$ of the PCR product were stained with $3 \mu\text{L}$ GelRed loading buffer ($6 \times$ Gel loading dye, Biotium, Fremont, CA, USA) subjected to electrophoresis in 2.0% (*w/v*) agarose gel (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) and visualized under ultraviolet fluorescence light.

During the second step PCR protocol, 0.6 mM dNTPs (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 0.5 U /reaction Phusion[®]-High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and $0.9 \times$ HF buffer (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), $0.6 \mu\text{L}$ primer mix ($10 \mu\text{M}$ /each primer) (VBC, Vienna, Austria) and $2 \mu\text{L}$ DNA template (first PCR product) were added in a $20 \mu\text{L}$ total reaction volume under the following conditions: 98°C for 1 min as initial denaturation, 98°C for 10 sec, 55°C for 30 s and 72°C for 20 s for 20 cycles ($+0.5^\circ\text{C}$ /cycle), 98°C for 10 sec, 66°C for 30 s and 72°C for 20 s for 22 cycles, and 72°C for 5 min as a final extension step, in a PikoThermalCycler (Finnzymes/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Further, gel electrophoresis was carried out in $5 \mu\text{L}$ of the PCR product stained with $1 \mu\text{L}$ GelRed loading buffer ($6 \times$ Gel loading dye, Biotium, Fremont, California, USA) in 2.0% (*w/v*) agarose gel (Nippon Genetics, Tokyo, Japan). PCR products were visualized under ultraviolet fluorescence light.

2.4. PCR Product Purification and Sequencing

PCR products were purified according to the PCR-clean-up protocol, NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany) in a $30 \mu\text{L}$ final elution volume. Further, in order to test the purification yield, $5 \mu\text{L}$ of the purified product was stained with $1 \mu\text{L}$ GelRed loading buffer ($6 \times$ Gel loading dye, Biotium, Fremont, CA, USA). Purified products were subjected to electrophoresis in 2.0% (*w/v*) agarose gel (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) and visualized under ultraviolet fluorescence light. The purified products were sent for sequencing.

2.5. Sequencing Analysis

Chromatograms were analyzed by the use of Chromas software (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>, version 2.6.6, Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia, free downloaded (accessed on 10 September 2021)). Nucleotide sequences derived from the two DNA chains were compared to each other with ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>, Bioinformatics tools provided by GenomeNet, Kyoto University Bioinformatics Center, Kyoto, Japan, free online software (accessed on 10 September 2021)).

The nucleotide sequences were imported in the *S. pneumoniae* CST Typing Tool (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/spn>, version 0.0, National Institute for Public Health and the Environment, Ministry of Health, Welfare and Sport, Catharijnesingel, Utrecht, The Netherlands (accessed on 10 September 2021)) (free online database of the National Institute for Public Health and the Environment, RIVM, Netherlands), and the *S. pneumoniae* serotype was automatically assigned [18].

2.6. Additional PCR Protocols

For cases in which the CST Typing Tool assigned a group of 2–3 serotypes, for further identification of a single serotype, additional single tube-PCR assays that are currently available were deployed.

The specific primers used are presented in Table 2. All PCR assays were carried out under the same PCR program and reagents' concentration: $1 \times$ Kapa 2G Fast Multiplex mix (Kapa Biosystems, Cape Town, South Africa), $0.3 \mu\text{M}$ of each respected primer (Table 2) and $2 \mu\text{L}$ DNA template were mixed in a $20 \mu\text{L}$ total reaction volume, under the

following conditions: 98 °C for 30 s as initial denaturation, 98 °C for 5 sec, 65 °C for 12 s (−0.2 °C/cycle) and 72 °C for 15 s for 11 cycles, 98 °C for 5 sec, 63 °C for 12 s and 72 °C for 15 s for 27 cycles, and 72 °C for 1 min as a final extension step, in a Piko Thermal Cycler (Finnzymes/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). PCR products were stained with 3 µL GelRed loading buffer (6× Gel loading dye, Biotium, Fremont, CA, USA), subjected to electrophoresis in 2.0% (w/v) agarose gel (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) and visualized under ultraviolet fluorescence light.

Table 2. PCR primers used for the additional single tube PCR assays for the identification of a single serotype among the specific group of serotypes assigned by CST.

CST-Assigned Serotype	Additional PCR Assays			
	Serotype	Primer	Product (bp)	Publication
11A/D, 18F	11A/D	11A-F- GGACATGTTTCAGGTGATTTCCCAA TATAGTG	463 bp	Pai et al. [21]
		11A-R- GATTATGAGTG TAATTTATTCCAACCTCTCCC		
	18	18-F- GCACTGTACAGTGTGCTAATT GGATTGAAG	354 bp	Brito et al. [12]
		18-R- CTTAACATCTGACTTTTCTGTCCCAAC		
22A/F, 15B/C	22A/F	22A/F-F- GAGTAT AGC CAG ATTATGGCAGTT TTATTGTC	643 bp	Pai et al. [21]
		22A/F-R- CTCCAGCACTTGCCTG GAAACAACAGACAAC		
	22F	22F-F- CTTGTCAAGTATGCTGAGGATTG 22F-R- AGATTTCTCCTGGATATAATGCGAT	82 bp	Velusamy et al. [22]
	22A	22A-F- CCCAGGACAATCACAAGAACTA 22A-R- TGATGCTTGGCCAAATTGGAG	84 bp	
15B/C, 23F	15B/C	15B/C-F-TTGGAAATTTTTTAATTAGTGGCTTAC CTA	496 bp	Pai et al. [21]
		15B/C-R-CATCCGCTTATTAATT GAAGTAATCTGAACC		
	23F	23F-F- TGGTAGTGACAGCAACGA 23F-R- CAAAGGCTAATTCAGCATC	177 bp	Lawrence et al. [23]
12F/B	12F/44	12F/44-F- TTCGGAGGGTCCGATTATATTT 12F/44-R- CTTTGTAATCCACTGTCTGG	149 bp	Velusamy et al. [22]
20,13	20	20-F- GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G	514 bp	Pai et al. [21]
		20-R- CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTTATC		
	13	13-F- TACTAA GGTAAT CTCTGG AAATCGAAAGG	655 bp	Da Gloria Carvalho [24]
		13-R- CTCATGCATTTTAT AACCGCTTT TTG TTC		

2.7. Specificity

The specificity of the CST method was assessed from the 67 pneumococcal isolates of the known serotype by the Quellung reaction sent by the hospitals.

3. Results

Capsular Sequence Typing (CST)

The CST was shown to be well-performed in all clinical samples ($n = 239$) (whole blood samples, CSF pleural/middle ear/synovial fluids, blood cultures) and bacterial isolates ($n = 67$) identified previously by PCR as *S. pneumoniae*. As the same serotype was identified in two or more samples obtained from the same patient, one serotype was considered per patient/case in the present study.

The specificity was estimated at 100% and evaluated from the 67 *S. pneumoniae* isolates for which the serotype was identified by the Quellung reaction (PPV 100% and NPV 100%).

The CST successfully directly identified a single serotype (or a pair of serotypes within the same group) in 49.12% of the cases (139/283); namely, serotypes 3, 7A/F, 8, 9N/L, 10A, 10B, 10F/C, 14, 15A, 16F, 18A, 19A, 21, 23A, 23B, 31, 37 and 42 (Table 3).

Table 3. Pneumococcal single serotype identification by the application of CST.

CST-Assigned Serotype	Final Serotype Identified	Number of Cases
3	3	45
8	8	18
10A	10A	2
10B	10B	1
14	14	3
15A	15A	11
16F	16F	2
18A	18A	1
19A	19A	15
21	21	8
23A	23A	15
23B	23B	5
31	31	2
37	37	2
42	42	2
7A/F	7A/F	2
9N/L	9N/L	4
10F/C	10F/C	1
TOTAL		139 (49.12%)

For the remaining cases, for which CST assigned a group of two or three serotypes, the further application of an additional CST-assigned group specific single-tube PCR assay with the use of previously published primers pairs was deployed. According to the results, the CST-assigned group specific single-tube PCR assay successfully further identified a single serotype in 31.44% (89/283) of cases as follows: serotype 11A/D (previously CST-assigned as a group of serotypes 11A/D, 18F); serotype 12F (previously CST-assigned as 12F/B); serotype 22F (previously CST-assigned as 22A/F,15B/C); serotype 15B/C (previously CST-assigned as 15B/C,23F) and serotype 20 (previously CST-assigned as 20,13) (Table 4).

Table 4. Pneumococcal serotype identification by the application of CST in combination with specific single-tube PCR assays.

CST-Assigned Serotype	Single PCR Assays	Final Serotype Identified	Number of Cases
11A/D, 18F	11A/D 18	11A/D	18
12F/B	12F/44	12F	14
15B/C, 23F	15B/C 23F	15B/C	28
20,13	20 13	20	7
22A/F, 15B/C	22A/F	22F	22
	22A		
	22F		
	15B/C		
	23F		
TOTAL		89 (31.44%)	

Finally, for 55/283 (19.4%) of the remaining cases for which the serotypes were CST-assigned in the following specific groups, 17A/35B/C, 24F/40, 25A/F/38, 33A/F/35A, 34/17A, 35F/47F, there was no possibility for a single serotype to be identified due to a lack of PCR assays being currently available (Table 5).

Table 5. Pneumococcal serotype identification by the application of CST assigning two or two serotypes.

CST-Assigned Serotype	Single PCR Assays	Final Serotype Identified	Number of Cases
24F/40	NA *	24F/40	18
25A/F, 38	NA	25A/F, 38	7
33A/F, 35A	NA	33A/F, 35A	3
34/17A	NA	34, 17A	5
35F/47F	NA	35F/47F	7
TOTAL			55 (19.4%)

* NA: Not Assigned; single-tube specific PCR assays not currently available.

4. Discussion

The bacteriological confirmation and serotype determination of clinically suspected IPD is important for a detailed epidemiological surveillance of pneumococcal infections. As has been recently shown, the incidence of serotypes responsible for IPD can change overtime [8]. Taking into consideration vaccine pressure and the development of future conjugate vaccines, the continuous monitoring of serotypes is important in the era of pneumococcal conjugate vaccines.

The necessity to understand serotypes' specific epidemiology and their association with the disease types, the difficulties which are currently faced in the management of pneumococcal disease and the adoption of preventive measures has led to further research on nonculture pneumococcal capsular typing techniques. As more than 60% of the *S. pneumoniae* cases are currently identified by molecular methods, the need for molecular identification and typing into clinical samples directly has been increasing in recent years.

It is well known that the gold standard for serotyping is the Quellung or Neufeld test; however, the method is time-consuming and not cost-effective as the type, group and factor sera are expensive and require bacterial isolates. On the other hand, taking into account that approximately 100 different pneumococcal capsular types currently exist, the molecular approach by the use of sequential multiplex PCR assays [12,25] and real-time PCR methods [26–29], although it allows the serotype identification of culture-negative PCR-positive clinical samples at a high percentage (75–90%), still remains time-consuming and expensive.

Hence, in order to be able to identify the prevalent serotypes, there is a need for less time-consuming, more cost-effective assays, especially during the post-PCV-13 era, during which serotype diversity has generally increased, with diverse serotypes such as 24F, 22F, 8, 15A and 33F becoming important in countries that use PCV-13 [30,31].

The present study demonstrates that the direct application of the CST in clinical samples identified all 239 nonculture clinical samples. The majority (80.56%) of cases assigned a single serotype, either solely by CST or in combination with single-tube PCR assays targeting for a specific CST group. The application of a two-step PCR protocol improved the yield of the PCR product, creating a sensitive tool when applied directly to clinical samples. As a result, a single serotype was identified directly by CST, without discrepancies in almost 50% of the cases, while the further application of the CST group specific single-tube PCR assay targeting a group of 2–3 serotypes yielded an additional 31.4% single serotypes.

There was a 100% correlation with the results obtained by the use of traditional serotyping methods for the 67 culture-confirmed cases in which the serotype was identified.

In comparison to serotype identification performed by either conventional methods (Quellung) or by the application of sequential multiplex PCR assays, the proposed methodology provides the typing of nonculture samples in a relatively inexpensive, rapid (results can be obtained within 24 h) and reliable way by the direct identification of a single serotype or identification of a group of two or three serotypes, which can be further identified by single-tube PCR assay. Further, the proposed methodology is rather conventional and can be easily established in laboratories that are equipped for DNA template preparation and PCR. Sequencing apparatus is not essential as it can be carried out by an external laboratory.

5. Conclusions

The application of the proposed methodology for direct pneumococcal serotyping to culture-negative, PCR-positive clinical samples is relatively inexpensive, rapid and reliable and could ameliorate pneumococcal serotype surveillance. Furthermore, it may facilitate the close monitoring of evolving serotypes and vaccine effectiveness, which is crucial for the evaluation of the overall impact of pneumococcal vaccination programs and for designing future vaccination strategies.

Author Contributions: Conceptualization: N.M., A.X. and G.T.; formal analysis: N.M., A.X. and G.T.; funding acquisition: G.T.; investigation: N.M., A.X., A.P. and G.T.; methodology: N.M., A.X., A.P. and G.T.; project administration: A.X. and G.T.; resources: A.X. and G.T.; software: N.M. and A.X.; supervision: A.X. and G.T.; validation: N.M., A.X., A.P. and G.T.; visualization: N.M., A.X., A.P., E.P., V.P., M.T. and G.T.; writing original draft: A.X. and N.M.; writing review and editing: A.X., G.T., E.P., V.P. and M.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by the National Organization of Public Health (EODY) in the framework of the annual financial support to the National Meningitis Reference Laboratory.

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived in this study as the procedures being performed were part of the routine laboratory diagnosis and surveillance of bacterial meningitis. The study was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration and its latter amendments or comparable ethical standards.

Informed Consent Statement: Patient consent was waived due to depersonalized data from a notifiable disease registry, and laboratory findings were used.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to all collaborative clinicians and microbiologists from hospitals throughout the country for sending samples.

Conflicts of Interest: No financial or other conflict of interest is to be reported.

References

1. Advisory Committee on Immunization Practices. Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm. Rep.* **2000**, *49*, 1–35.
2. De Velasco, E.A.; Verheul, A.F.; Verhoef, J.; Snippe, H. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 591–603.
3. Greenberg, D.; Hoover, P.A.; Vesikari, T.; Peltier, C.; Hurley, D.C.; McFetridge, R.D.; Dallas, M.; Hartzel, J.; Marchese, R.D.; Collier, B.-A.G.; et al. Safety and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15) in healthy infants. *Vaccine* **2018**, *36*, 6883–6891. [[CrossRef](#)]
4. Richter, S.S.; Heilmann, K.P.; Dohm, C.L.; Riahi, F.; Diekema, D.; Doern, G.V. Pneumococcal serotypes before and after introduction of conjugate vaccines, United States, 1999–2011. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 1074–1083. [[CrossRef](#)]
5. Maraki, S.; Samonis, G.; Galanakis, E. Serotypes and susceptibilities of paediatric clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Crete, Greece, before and after the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2010**, *29*, 1449–1451.
6. Johnson, H.L.; Deloria-Knoll, M.; Levine, O.S.; Stoszek, S.K.; Freimanis Hance, L.; Reithinger, R.; Muenz, L.R.; O'Brien, K.L. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: The pneumococcal globalserotype project. *PLoS Med.* **2010**, *7*, e1000348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Van der Linden, M.; Perniciaro, S.; Imöhl, M. Increase of serotypes 15A and 23B in IPD in Germany in the PCV13 vaccination era. *BMC Infect. Dis.* **2015**, *15*, 207. [[CrossRef](#)]
8. Amin-Chowdhury, Z.; Collins, S.; Sheppard, C.; Litt, D.; Fry, N.K.; Andrews, N.; Ladhani, S.N. Characteristics of Invasive Pneumococcal Disease Caused by Emerging Serotypes After the Introduction of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in England: A Prospective Observational Cohort Study, 2014–2018. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, e235–e243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Garcia Quesada, M.; Yang, Y.; Bennett, J.C.; Hayford, K.; Zeger, S.L.; Feikin, D.R.; Peterson, M.E.; Cohen, A.L.; Almeida, S.C.G.; Ampofo, K.; et al. Serotype Distribution of Remaining Pneumococcal Meningitis in the Mature PCV10/13 Period: Findings from the PSERENADE Project. *Microorganisms* **2021**, *9*, 738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Austrian, R. The quellung reaction, a neglected microbiologic technique. *Mt. Sinai J. Med.* **1976**, *43*, 699–709. [[PubMed](#)]
11. Lund, E. Laboratory diagnosis of Pneumococcus infections. *Bull. World Health Organ.* **1960**, *23*, 5–13. [[PubMed](#)]
12. Brito, D.A.; Ramirez, M.; de Lencastre, H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 2378–2384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kong, F.; Gilbert, G.L. Using cpsA–cpsB sequence polymorphisms and serotype-/group-specific PCR to predict 51 *Streptococcus pneumoniae* capsular serotypes. *J. Med. Microbiol.* **2003**, *52*, 1047–1058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kong, F.; Wang, W.; Tao, J.; Wang, L.; Wang, Q.; Sabananthan, A.; Gilbert, G.L. A molecular-capsular-type prediction system for 90 *Streptococcus pneumoniae* serotypes using partial cpsA–cpsB sequencing and wzy- or wxz-specific PCR. *J. Med. Microbiol.* **2005**, *54*, 351–356. [[CrossRef](#)]
15. Dias, C.; Teixeira, L.M.; Carvalho, M.D.G.; Beall, B. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J. Med. Microbiol.* **2007**, *56*, 1185–1188. [[CrossRef](#)]
16. Morais, L.; Carvalho, M.D.G.; Roca, A.; Flannery, B.; Mandomando, I.; Soriano-Gabarró, M.; Sigauque, B.; Alonso, P.L.; Beall, B. Sequential multiplex PCR for identifying pneumococcal capsular serotypes from South-Saharan African clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* **2007**, *56 Pt. 9*, 1181–1184. [[CrossRef](#)]
17. Geno, K.A.; Gilbert, G.L.; Song, J.Y.; Skovsted, I.C.; Klugman, K.P.; Jones, C.; Konradsen, H.B.; Nahm, M.H. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 871–899. [[CrossRef](#)]
18. Elberse, K.E.; van de Pol, I.; Witteveen, S.; van der Heide, H.G.; Schot, C.S.; van Dijk, A.; van der Ende, A.; Schouls, L.M. Population structure of invasive *Streptococcus pneumoniae* in The Netherlands in the pre-vaccination era assessed by MLVA and Capsular Sequence Typing. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20390. [[CrossRef](#)]
19. Bentley, S.D.; Aanensen, D.M.; Mavroidi, A.; Saunders, D.; Rabinowitsch, E.; Collins, M.; Donohoe, K.; Harris, D.; Murphy, L.; A Quail, M.; et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet.* **2006**, *2*, e31. [[CrossRef](#)]
20. Tzanakaki, G.; Tsopanomalou, M.; Kesanopoulos, K.; Matzourani, R.; Siomalala, M.; Tabaki, A.; Kremastinou, J. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae type b* and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Microb. Infect.* **2005**, *11*, 386–390. [[CrossRef](#)]

21. Pai, R.; Gertz, R.E.; Beall, B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 124–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Velusamy, S.; Tran, T.; Mongkolrattanothai, T.; Walker, H.; McGee, L.; Beall, B. Expanded sequential quadriplex real-time polymerase chain reaction (PCR) for identifying pneumococcal serotypes, penicillin susceptibility, and resistance markers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *97*, 115037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lawrence, E.R.; Griffiths, D.B.; Martin, S.A.; George, R.C.; Hall, L.M. Evaluation of semi-automated multiplex PCR assay for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and serogroups. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 601–607. [[CrossRef](#)]
24. Carvalho, M.D.G.; Pimenta, F.C.; Jackson, D.; Roundtree, A.; Ahmad, Y.; Millar, E.V.; O'Brien, K.; Whitney, C.G.; Cohen, A.L.; Beall, B.W. Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 1611–1618. [[CrossRef](#)]
25. Azzari, C.; Moriondo, M.; Indolfi, G.; Massai, C.; Beccioli, L.; de Martino, M.; Resti, M. Molecular detection methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by *Streptococcus pneumoniae* in Italian children. *J. Med. Microbiol.* **2008**, *57*, 1205–1212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Azzari, C.; Moriondo, M.; Indolfi, G.; Cortimiglia, M.; Canessa, C.; Beccioli, L.; Lippi, F.; de Martino, M.; Resti, M. Realtime PCR is more sensitive than multiplex PCR for diagnosis and serotyping in children with culture negative pneumococcal invasive disease. *PLoS ONE*. **2010**, *5*, e9282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Marchese, A.; Esposito, S.; Coppo, E.; Rossi, G.A.; Tozzi, A.; Romano, L.; da Dalt, G.; Schito, C.; Principi, N. Detection of *Streptococcus pneumoniae* and identification of pneumococcal serotypes by real-time polymerase chain reaction using blood samples from Italian children ≤ 5 years of age with community-acquired pneumonia. *Microb. Drug Resist.* **2011**, *17*, 419–424. [[CrossRef](#)]
28. Blaschke, A.J.; Heyrend, C.; Byington, C.; Obando, I.; Vazquez-Barba, I.; Doby, E.H.; Korgenski, E.K.; Sheng, X.; Poritz, M.A.; Daly, J.A.; et al. Molecular analysis improves pathogen identification and epidemiologic study of pediatric parapneumonic empyema. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2011**, *30*, 289–294. [[CrossRef](#)]
29. Magamani, V.; Wolter, N.; Tempia, S.; du Plessis, M.; de Gouveia, L.; von Gottberg, A. Challenges of using molecular serotyping for surveillance of pneumococcal disease. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 3271–3276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Tin Tin Htar, M.; Christopoulou, D.; Schmitt, H.J. Pneumococcal serotype evolution in Western Europe. *BMC Infect. Dis.* **2015**, *15*, 419. [[CrossRef](#)]
31. Amin-Chowdhury, Z.; Groves, N.; Sheppard, C.L.; Litt, D.; Fry, N.K.; Andrews, N.; Ladhani, S.N. Invasive pneumococcal disease due to 22F and 33F in England: A tail of two serotypes. *Vaccine* **2021**, *39*, 1997–2004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]