



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE DELL'ETA' EVOLUTIVA

CICLO XXXI

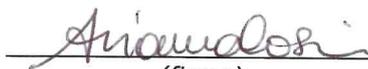
COORDINATORE Prof. MASSIMO STEFANI

***Impatto della vaccinazione anti-pneumococcica
sulle polmoniti complicate: dieci anni di
sorveglianza sanitaria con metodi molecolari***

Settore Scientifico Disciplinare MED/38

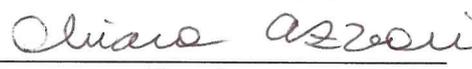
Dottorando

Dott. Casini Arianna


(firma)

Tutore

Prof.ssa Azzari Chiara


(firma)

Coordinatore

Prof. Stefani Massimo



Anni 2015/2018

INDICE

INTRODUZIONE	1	
CAPITOLO I: STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE		
1. Morfologia	4	
2. Sviluppo	6	
3. La capsula e la parete cellulare	8	
4. Meccanismo patogenetico	10	
5. Immunità innata e adattativa	17	
6. Epidemiologia	18	
7. Trasmissione e condizioni di infezione	20	
8. Sierotipi	23	
9. Manifestazioni cliniche	25	
10. Diagnosi	30	
CAPITOLO II: LA VACCINAZIONE ANTI-PNEUMOCOCCICA		
1. Cenni storici e vaccini polisaccaridici	40	
2. I vaccini coniugati: PCV7 e PCV13	44	
3. Il valore della vaccinazione anti-pneumococcica: evidenze dal mondo	46	
CAPITOLO III: SCOPO DELLO STUDIO		49
CAPITOLO IV: MATERIALI E METODI		
1. Disegno dello studio	51	
2. Casi in esame	51	
3. RT-PCR	52	
4. Sierotipizzazione	54	
5. Valutazione dell'incidenza delle PPE/PE e dell'impatto della vaccinazione	55	
6. Analisi statistiche	56	
CAPITOLO V: RISULTATI		58

CAPITOLO VI: DISCUSSIONE 66

BIBLIOGRAFIA 72

INTRODUZIONE

Lo streptococcus pneumoniae è l'agente eziologico responsabile di una serie di malattie comuni, che vanno da forme invasive e gravi (IPD, invasive pneumococcal disease) quali meningite, setticemia e polmonite batteriemia ad infezioni localizzate più lievi ma più diffuse (non-IPD) come la sinusite, l'otite media e la polmonite non batteriemia (1). Le malattie pneumococciche sono cause frequenti di morbilità e mortalità in tutto il mondo (2), anche se i tassi di malattia e morte sono più elevati nei paesi in via di sviluppo rispetto ai paesi industrializzati. Il germe è parte della flora commensale del tratto respiratorio superiore e viene trasmesso attraverso le goccioline respiratorie. L'infezione di altre parti del corpo, con conseguente malattia, si verifica attraverso la diffusione diretta o l'invasione del flusso sanguigno. La capsula polisaccaridica dello pneumococco è variabile e fa sì che si possano distinguere più di 90 sierotipi che non presentano però la stessa virulenza; solo una piccola parte è responsabile delle principali infezioni invasive (3).

La popolazione maggiormente colpita è rappresentata dai bambini e dagli anziani. La colonizzazione delle nicchie mucosali nasofaringee è comune nella prima infanzia e correla con una facile diffusione bambino-bambino e/o bambino-adulto, con il possibile evolversi in infezioni Pneumococciche (4,5). Nell'adulto la gran parte delle patologie scatenate è rappresentata dalla polmonite con manifestazioni cliniche eterogenee e gravità variabile (6,7).

L'introduzione nel 2000 negli Stati Uniti del vaccino coniugato anti-pneumococco 7-valente (PCV7, con i sierotipi 4,6B,9V,14,18C,19F,23F) ha ridotto drasticamente

le IPD in soggetti vaccinati e non, attraverso una immunità diretta e di gregge (8,9). Gli stessi effetti si sono osservati in Europa dove, in contrapposizione ad una significativa riduzione delle IPD negli adulti correlata al PCV7, è stato osservato un rapido incremento nelle IPD di quei sierotipi non inclusi nel vaccino (10,11). E' stato ipotizzato che la protezione di gregge sia stata ottenuta grazie alla riduzione dei sierotipi vaccinali nelle vie respiratorie alte nei bambini immunizzati, con conseguente interruzione della catena di contagio portatore-soggetto non immunizzato (12,13). Nell'era pre-PCV7 i sierotipi inclusi nel vaccino non solo erano i maggior responsabili delle IPD nei bambini ma anche i più diffusi nei giovani portatori sani in Europa e negli Stati Uniti (13-16). Questa situazione è oggi presente in quei paesi dove non esiste un programma vaccinale con il vaccino 7-valente (17).

In Italia, così come negli altri stati, il PCV7 è stato utilizzato fino al 2010 e poi sostituito con un vaccino coniugato anti-pneumococco che ha conferito un ampliamento della copertura vaccinale per altri 6 sierotipi (1, 3, 5, 6A, 7F, 19A), il PCV13.

Nonostante l'ampia disponibilità di vaccini efficaci, lo *Streptococcus pneumoniae* continua ad essere la principale causa di polmoniti e infezioni batteriche invasive che colpiscono i bambini e la popolazione adulta (18). La polmonite acquisita in comunità (CAP) nei bambini può associarsi a complicazioni come gli empiemi o effusioni parapneumoniche (19) ed è causa frequente di morbilità e mortalità nei pazienti ospedalizzati (20). Nonostante i benefici della vaccinazione con il 7-valente, i tassi di ospedalizzazioni associate ad empiemi è aumentato nel tempo a causa dei sierotipi 1,3,7F,19A (21-23). Recenti studi riportano una riduzione

dell'incidenza degli empiemi e dei tassi di ospedalizzazioni tra i pazienti pediatrici dopo il PCV13 (24-27). Tuttavia la distribuzione epidemiologica dei sierotipi e il potere della vaccinazione per l'immunità di gregge rimangono ancora non chiari. Una partecipazione attiva da parte della comunità scientifica ed una costante sorveglianza risulta fondamentale per monitorare l'incidenza dello pneumococco e conoscere le principali caratteristiche epidemiologiche con le quali si presenta. Individuare nuovi sierotipi emergenti, capire l'impatto che un vaccino può avere sull'immunità diretta e di gregge permette di intervenire con programmi vaccinali adeguati, di migliorarne e potenziarne le coperture.

Dal 2005 il laboratorio di Immunologia dell'Ospedale Pediatrico Meyer di Firenze è responsabile di un progetto per la diagnosi delle malattie batteriche invasive e raccoglie campioni dagli ospedali situati su tutto il territorio nazionale. I dati e le informazioni relativi a ciascun campione sono stati raccolti in un registro di sorveglianza molecolare. Questo studio si pone come obiettivi quelli di descrivere l'eziologia dei versamenti parapneumonici (PPE) e degli empiemi pleurici (PE) nella popolazione pediatrica italiana in un arco temporale di dieci anni, di valutare l'impatto del vaccino coniugato anti-pneumococco e di determinare la sensibilità della RealTime-PCR come tecnica diagnostica delle PPE, mediante l'analisi retrospettiva dell'ampio numero di dati raccolti.

CAPITOLO I: STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

1. MORFOLOGIA

Nel 1881 il generale e batteriologo statunitense Sternberg annunciò, in contemporanea a Pasteur, la scoperta di un nuovo agente patogeno causa della polmonite, lo Streptococcus Pneumoniae.

La sua morfologia è stata definita mediante colorazione di Gram nel 1926 e ne è stata osservata la crescita per la prima volta su terreno liquido nel 1974 (28)

È un gram-positivo, privo di motilità, asporigeno e anaerobio facoltativo, con preferenza a crescere in anaerobiosi in quanto capace di un metabolismo energetico esclusivamente basato sulla fermentazione dei carboidrati in acido lattico e pertanto indifferente alla presenza o meno di ossigeno. Al microscopio le singole cellule, con diametro di circa 1 micrometro, hanno una forma lanceolata o piriforme e si presentano generalmente appaiate a due a due (diplococco) in corrispondenza della parte più estesa della cellula. Per questo un tempo era noto come Diplococcus pneumoniae o Diplococcus lanceolatus (fig.1).

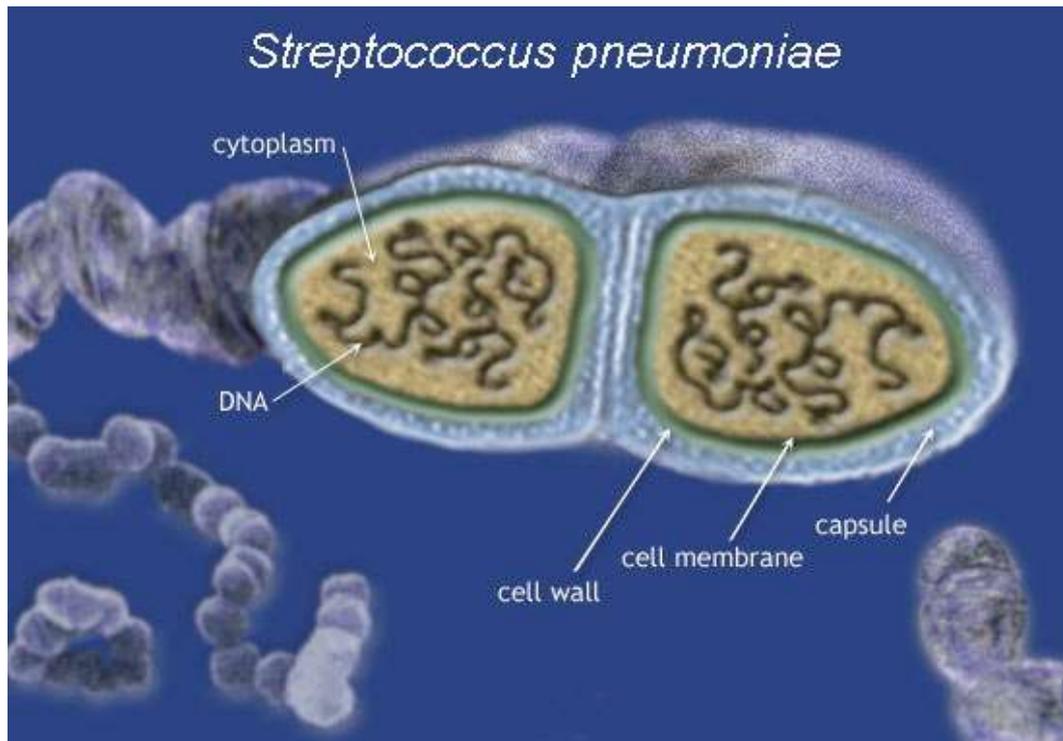


Fig.1 Streptococcus Pneumoniae

In materiali biologici come escreato, pus, essudato e nei tessuti dell'ospite si può presentare anche sotto forma di catenelle e tale tendenza viene incrementata quanto si trova in ambienti poco favorevoli alla crescita, per esempio in presenza di anticorpi tipo-specifici o in carenza di Mg^{2+} (29).

È un batterio quasi costantemente dotato di una capsula polisaccaridica ricca di antigeni tipo-specifici, che rappresenta il fattore essenziale di virulenza del batterio.

Solo infatti i ceppi capsulati risultano patogeni per l'uomo (30).

Gli pneumococchi capsulati si sviluppano diffusamente nei terreni liquidi, tendendo a sedimentare solo quando il terreno diviene acido; diversamente i ceppi non capsulati crescono in ammassi granulari che presentano una maggiore tendenza a sedimentare rapidamente (31).

Sebbene lo pneumococco sia un Gram-positivo, in coltura le cellule che sono nella fase finale dello sviluppo e iniziano ad invecchiare, diventano Gram-negative. Si osserva una progressiva riduzione del numero delle cellule e una tendenza della coltura a diventare chiara. Questi cambiamenti sono dovuti all'azione degli enzimi autolitici che in un primo momento rendono Gram-negative le cellule e successivamente ne provocano la lisi (32).

2. SVILUPPO

Gli Pneumococchi sono batteri piuttosto delicati che muoiono facilmente fuori dall'organismo e crescono scarsamente nei normali terreni nutritivi. In vitro i terreni più idonei per la coltivazione contengono un infuso fresco di bue, il 10% di siero, lo 0,1% di glucosio. Crescono bene in un'atmosfera contenente dal 5% al 10% di CO₂ e la temperatura di crescita ottimale sono 37°C. Il pH ottimale è 7,8 ed è necessario cambiare spesso il terreno di coltura per evitarne l'abbassamento che determinerebbe l'uccisione del batterio. Essendo un parassita anerobio facoltativo, utilizza un metabolismo energetico di tipo fermentativo con produzione finale di acido lattico, tuttavia in presenza di ossigeno atmosferico possono svolgere reazioni ossidative attraverso il sistema degli enzimi flavoproteici. In questo caso il prodotto finale di reazione è rappresentato da H₂O₂ che se accumulato nel terreno danneggerebbe irrimediabilmente la membrana batterica con conseguente morte dello pneumococco. Per questo motivo è bene arricchire il terreno con una fonte di catalasi come i globuli rossi. In piastre di agar-sangue (5%) gli pneumococchi si aggregano a formare colonie rotonde con bordi ben delimitati, lucide e non pigmentate che raggiungono un diametro di circa 1 mm dopo 24-26 ore di

incubazione. Generalmente tanto maggiore è lo spessore della capsula tanto più grandi e mucoidi risultano le colonie. Con l'invecchiamento le colonie andranno incontro nella parte centrale- più vecchia- ad autolisi, per cui esse avranno il centro depresso e i bordi con il tipico aspetto a "pedina di dama". Le colonie in presenza di ossigeno sono circondate da un alone α -emolisi, in aerobiosi da β -emolisi. E' proprio il tipo di emolisi prodotta in piastra agar-sangue uno dei criteri sulla base dei quali si classificano gli streptococchi: α -emolitici o viridanti. Lo *Streptococcus Pneumoniae* e la maggior parte degli streptococchi presenti nel cavo orale sono circondati da un alone incompleto verdastro dovuto ad un prodotto dell'ossidazione del ferro dell'emoglobina. Gli streptococchi viridanti invece sono caratterizzati da un alone ben evidente di emolisi completa (29, 33).

Per lo sviluppo di pneumococchi sono stati allestiti anche terreni sintetici che risultano essere utili per ottenere prodotti e frazioni macromolecolari degli pneumococchi poiché i loro costituenti sono dializzabili. Tuttavia questi terreni sono troppo complessi e costosi per essere utilizzati routinariamente.

Un fattore non comune richiesto per la loro crescita è rappresentato dalla colina un componente della parete del batterio. La sostituzione nel terreno della colina con l'etanolamina dà origine a malformazioni sulle cellule pneumococciche.

Nell'uomo questo germe colonizza preferenzialmente le mucose del tratto respiratorio superiore.

Al di fuori dell'organismo umano la sopravvivenza dello pneumococco è limitata, dato che è scarsamente resistente ad agenti chimici e fisici. Infatti viene ucciso dai disinfettanti più comuni dopo pochi minuti e dal calore a 55°C in 20 minuti (28).

3. LA CAPSULA E LA PARETE CELLULARE

La struttura superficiale più importante è la capsula che rappresenta un fattore essenziale di virulenza del batterio. Questa è costituita da grossi polimeri polisaccaridici che formano gel idrofilo sulla superficie del microrganismo; alcuni pneumococchi hanno una struttura lineare di unità basali costituite da uno o più monosaccaridi, altri sono forniti da un maggior numero di unità che si organizzano in strutture ramificate. Sulla base di questi polisaccaridi capsulari è possibile distinguere più di 90 sierotipi di *Streptococcus Pneumoniae*, classificati in diversi sistemi. Per la capacità di questi polisaccaridi di presentare reazioni crociate con antigeni capsulari, strutturalmente simili, di altri tipi di pneumococchi o di altre specie batteriche, la classificazione più seguita riunisce i vari sierotipi con reazioni crociate in 40 “gruppi”.

La capsula ha grandi capacità immunogene, come dimostrato dal fatto che l'immunizzazione attiva o passiva verso uno specifico polisaccaride conferisce resistenza verso l'infezione causata da pneumococchi omologhi. La virulenza è correlata sia alle dimensioni della capsula che alla struttura. Infatti pneumococchi dello stesso tipo con capsula incompleta risultano meno virulenti dei ceppi pienamente capsulati, ma sono più virulenti delle varianti non capsulate, pneumococchi con capsula di uguale dimensione ma diversa struttura tipo-specifica sono caratterizzati da gradi diversi di virulenza (34).

Quando lo pneumococco entra in contatto con l'organismo sfrutta la virulenza della capsula per inibire l'opsonizzazione da parte della componente C3b del complemento dell'ospite, prevenendo così di essere fagocitato (35).

Al di sotto della capsula ci sono altre strutture antigeniche che vanno a formare la parete cellulare. Come quella di tutti i Gram-positivi, è costituita da peptidoglicano e acidi teicoici. Nello strato di peptidoglicano subunità alternate di N-acetilglucosamina e di N-acetilmuramico sono annesse a catene oligopeptidiche, che a loro volta sono legate trasversalmente da ponti di pentaglicina. Buona parte degli acidi teicoici invece contengono fosforilcolina e sono legati covalentemente ai residui di N-acetilmuramico del peptidoglicano a formare il cosiddetto “antigene C”, uniformemente distribuito sul versante esterno ed interno della parete cellulare. Questo carboidrato specie-specifico differisce dal carboidrato gruppo-specifico osservato da Lancefield negli pneumococchi β -emolitici. L’antigene C in presenza di Ca^{2+} precipita con una frazione sierica, la proteina-C-reattiva (PCR), prodotta dall’organismo umano durante il processo infiammatorio. Il complesso antigene C-PCR può così attivare la via del complemento e stimolare la fagocitosi (36). Lo stesso antigene C può trovarsi legato ad un lipide di membrana a formare l’antigene di Forssmann che nelle cellule in attiva divisione lega e dunque inattiva l’autolisina pneumococcica, enzima responsabile della digestione della parete cellulare. In condizioni che promuovono l’arresto della moltiplicazione batterica, l’autolisina si libera tagliando i legami amidici tra i ponti amminoacidici e la catena glicanica del peptidoglicanico e iniziando così il processo di lisi della parete batterica (34).

Altri due antigeni somatici, oltre all’antigene C, sono l’antigene R e la proteina M. il primo così denominato perché fu individuato per la prima volta da pneumococchi non capsulati in fase rugosa (da cui R) sembra essere specie-specifico mentre il secondo è tipico-specifico ed è dotata di un debole potere antifagocitario e favorisce l’accumulo dei batteri nel sito d’infezione (28).

4. MECCANISMO PATOGENETICO

La capsula è la conditio sine qua non del potere patogeno di ogni stipo pneumococcico: i polisaccaridi capsulari infatti sono essenzialmente privi di tossicità ma svolgono una potente azione antifagocitaria. Per le sue proprietà acide e idrofile la capsula favorisce la sopravvivenza degli pneumococchi in un mezzo liquido. Le nicchie mucosali nasofaringee e i siti d'infezioni dell'apparato respiratorio dove si ha un'abbondante produzione di muco sono un perfetto habitat che protegge gli pneumococchi dalla fagocitosi e che permette loro di crescere liberamente. Al contrario diventano moderatamente sensibili alla digestione quando giacciono su una superficie come la parete bronchiale o alveolare o un deposito di fibrina.

La sopravvivenza del microrganismo alle superficie delle mucose è inoltre favorita dalla produzione di un enzima capace di distruggere gli anticorpi secretori (IgA) della sottoclasse 1, denominato IgA1-proteasi (31).

Altri fattori di virulenza risiedono nelle proteine di superficie. Ne esistono almeno 500 alcune associate alle membrana oltre alla parete cellulare. Fra queste ultime è importante una famiglia di proteine leganti colina (CBP). Tutti i membri condividono l'estremità C-terminale legata alla colina mentre l'estremità N-terminale differiscono in base alle diverse funzioni. Fattori come PspA (fattore protettivo), LytA, B, C (autolisina), CpbA (adesina) sono determinanti della virulenza appartenenti a questa famiglia di proteine (33).

Lo pneumococco poi produce numerose sostanze tossiche: la pneumolisina è una emolisina appartenente alla famiglia delle citolisine tiol-dipendenti. Come la streptolisina O degli streptococchi emolitici è una proteina monomerica che

polimerizza sulla membrana delle cellule sensibili, formando oligomeri eptamerici tubulari che si inseriscono nella porzione lipidica della cellula attaccata formando così dei pori che alterano gli scambi della cellula con l'ambiente causandone la morte per apoptosi. La pneumolisina inoltre inibisce il battito delle cellule ciliate che rivestono il tratto respiratorio, così come la proliferazione linfocitaria e l'attività fagocitaria dei neutrofili. Infine può stimolare le cellule del sistema immunitario a produrre citochine infiammatorie (37).

Produce anche una neuroamidasi in grado di attaccare glicoproteine e glicolipidi delle membrane cellulari, potenziando l'azione citotossica della pneumolisina e una ialuronidasi (invasina) che può agevolare l'infezione nei tessuti.

Anche la stessa autolisina, precedentemente descritta, sembra potenziare l'azione tossica dello *S. pneumoniae*. Infatti, grazie alla sua capacità di lisi della parete batterica, da un lato favorisce la liberazione della pneumolisina, dall'altra si liberano frammenti di peptidoglicano e di acido teicoico che costituiscono potenti promotori della risposta infiammatoria oltre che essere in grado di attivare il complemento per via alternativa.

Vengono considerati fattori di virulenza anche i pili. Queste strutture filamentose che partono dalla superficie cellulare agevolano l'adesione promuovendo così la colonizzazione delle vie respiratorie. Inoltre inducono la produzione di TNF da parte del sistema immunitario durante l'invasione dell'organismo.

In ogni infezione invasiva si susseguono fasi diverse: adesione e colonizzazione, invasione, infiammazione ed in alcuni casi perfino lo shock. In ciascuna di queste fasi il germe usa i suoi fattori di virulenza (riassunti in tabella) per superare la barriera immunitaria dell'ospite.

FATTORI DI VIRULENZA	MECCANISMI PATOGENETICI
Capsula	Inibisce l'opsonizzazione e la fagocitosi
Pili	Inizia l'adesione cellulare, stimola la produzione di TNF
Parete cellulare	Ha un ruolo proinfiammatoria: <ul style="list-style-type: none"> • produzione IL1 con successivo danno epiteliale • aumento della permeabilità vasale • attivazione dei neutrofilo • interferenza con la via alternativa del complemento
Pneumolisina	Ha un azione citotossica/citolitica a seconda della sua concentrazione
Neuramidasi	Favorisce l'esposizione dei recettori
Autolisina	Rilascia pneumolisina, ac.tecoico e frammenti di peptidoglicano che potenziano l'infiammazione
Permeasi	Facilita l'adesione
PspA	Interferisce con il ruolo protettivo del complemento
H2O2	Induce danno epiteliale

Proteasi di IgA1	Riduce i meccanismi immunitari mucosali da parte delle IgA1
------------------	---

Adesione e colonizzazione

Dopo pochi minuti dalla penetrazione del cavo orale le cellule di *S. pneumoniae* incontrano le secrezioni di muco. I polisaccaridi della capsula sono carichi negativamente e questo contribuisce ad aumentare la loro repulsione dagli acidi sialici dei mucopolisaccaridi che compongono le mucose. Tramite questa interazione chimica la capsula riduce l'intrappolamento del germe nel muco consentendo l'avvicinamento alla superficie epiteliale. Il primo contatto germe-ospite avviene grazie ai pili che consentono al microrganismo di aderire strettamente all'epitelio. Esistono mutanti privi di pili meno abili nel processo di adesione (38). In questa prima fase la capsula polisaccaridica non facilita il germe. Pneumococchi capsulati aderiscono con più difficoltà all'epitelio rispetto a quelli non capsulati. Alcuni studi di microscopia hanno dimostrato che durante la colonizzazione gli pneumococchi aderenti all'epitelio tendono a perdere la capsula mentre questa rimane presente nei germi non aderenti. Infatti la maggior parte degli pneumococchi isolati mostra una variazione di fase tra due forme che possono essere distinte dalla morfologia della colonia, opaca o trasparente. Durante le fasi iniziali di colonizzazione prevalgono colonie trasparenti con una capsula sottile o del tutto prive della capsula. Questi fenomeni di trasformazione sono strategie che il germe adotta per insinuarsi nel nuovo habitat offerto dall'ospite (39, 40). Una volta superato l'epitelio le forme capsulate sono più capaci di invadere l'ambiente (41).

Altre molecole oltre ai pili giocano un ruolo nell'adesione e centrale è l'importanza della parete cellulare. Questa ricca di residui di fosforilcolina offre il perfetto substrato per i recettori per la colina presenti sulle cellule epiteliali. In effetti, batteri privati sperimentalmente della fosforilcolina legano con minor affinità le cellule bersaglio (42). Importanti in questa fase sono anche alcune proteine di superficie tra cui l'adesina PsaA (Pneumococcal surface adhesin) codificata dal gene *psa*, capace di indurre direttamente adesione ma anche inducendo la produzione di una seconda adesina, il CbpA (coline binding protein A). Questa è maggiormente espressa nelle colonie trasparenti a conferma del perché queste forme riescono ad aderire meglio all'epitelio (43).

Una volta avvenuta l'adesione si ha la colonizzazione dell'agente patogenico. Tuttavia il microrganismo può non essere patologico. Infatti molti individui colonizzati dallo pneumococco sono semplicemente portatori e sviluppano una risposta immunitaria sierotipica-specifica.

Invasione

Il più noto fenomeno di invasione è la polmonite. Questa di per sé è già una malattia grave ma può rappresentare anche il focolaio di partenza di condizioni patologiche peggiori quali la batteriemia o la sepsi. Tuttavia non sempre le vie respiratorie sono la porta d'ingresso del germe; molti sono i casi di batteriemia e sepsi da pneumococco in cui però non si individua il focolaio di partenza (44). La capacità di invasione è molto più elevata nelle forme capsulate ed è correlata anche al tipo di capsula. La stessa opsonizzazione della capsula da parte del complemento è maggiore in alcuni sierotipi rispetto ad altri; i sierotipi che hanno una capsula mal opsonizzabile vengono fagocitati di meno e sono meno potenti nell'indurre la

produzione di anticorpi specifici (45, 46). Tuttavia in linea generale i polisaccaridi capsulari interferiscono con la fagocitosi andando a limitare l'azione di opsonizzazione del frammento C3b coinvolto nella via alternativa del complemento (47, 48). La capsula da sola non può rappresentare l'unica arma di difesa contro le barriere immunitarie dell'ospite e spiegare il potere invasivo del microrganismo. Capsule identiche possono avere caratteristiche di invasività diverse in base ai diversi fattori di virulenza presenti (49). Uno di questi è l'antigene CbpA che sembra svolgere un ruolo essenziale nel passaggio dello pneumococco attraverso la barriera emato-encefalica (50). Se lo pneumococco riesce a sfuggire dalla fagocitosi da parte dei granulociti dell'ospite, inizia l'invasione.

Inflammation

Superate le prime barriere dell'immunità innata, quando lo pneumococco entra nella fase di invasione attiva la cascata infiammatoria mediante la stimolazione e rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL1, IL6, TNF), l'attivazione della via alternativa del complemento e la cascata di coagulazione (51, 52). In questa fase la parete batterica ha un ruolo fondamentale come dimostrato sperimentalmente che l'inoculo delle sole componenti della parete batterica può riprodurre quasi completamente la sintomatologia di un'infezione batterica invasiva (53). Questa non è una peculiarità dello pneumococco ma di tutti i microrganismi che condividono le stesse molecole della parete cellulare che attivano i medesimi meccanismi patogenetici. I meccanismi attivati dalle diverse componenti della parete batterica sono: la liberazione di citochine pro-infiammatorie che esercita un effetto sui linfociti CD4+ che a loro volta stimolano la linea linfocitaria B a produrre anticorpi specifici contro la parete cellulare, l'attivazione della via classica del

complemento con liberazione dei fattori C3a e C5a, la produzione di IL1 da parte dei monociti. Un potenziamento di questa iniziale infiammazione è dovuto al rilascio della pneumolisina che si libera dagli stessi pneumococchi ad opera delle autolisine, aumentando significativamente l'infiammazione locale. Questa tossina non ha un recettore specifico ma si può legare ai residui di colesterolo. Sfruttando questa interazione, la pneumolisina crea dei pori all'interno del doppio strato fosfolipidico della membrana della cellula ospite e determina alterazioni che portano come conseguenza finale alla lisi cellulare. La pneumolisina è inoltre capace di promuovere il rilascio di altre citochine e la produzione di NO (54, 55). I meccanismi attivati dalla pneumolisina aumentano la permeabilità vasale ed inducono la formazione di essudato che inizialmente è sieroso ma diventa progressivamente purulento a causa dell'accumulo di leucociti richiamati dagli stimoli chemiotattici prodotti (52). Lo pneumococco può poi superare la barriera endoteliale e raggiungere il torrente circolatorio dando batteriemia e sepsi in poche ore. A livello celebrale invece l'infiammazione può portare ad edema cerebrale, ad aumento del flusso sanguigno per vasodilatazione ed il ridotto assorbimento di liquido cefalo-rachidiano. La conseguenza è l'aumento della pressione intracranica che a sua volta riduce il circolo ematico fino a portare ad ischemia e necrosi (43). Se si tiene di conto che la pneumolisina come altre sostanze hanno anche un'azione neurotossica diretta, si capisce perché le meningiti da pneumococco possono essere così severe e provocare gravi sequele.

5. IMMUNITA' INNATA E ADATTATIVA

L'immunità innata gioca un ruolo fondamentale nella difesa contro le pneumococco così come contro qualsiasi agente patogeno, poiché rappresenta la prima barriera del sistema immunitario dell'uomo. A partire dal tratto naso-faringeo, il riconoscimento microbiologico da parte dei Toll Like Receptors (TLRs) attiva innanzitutto i polimorfonucleati ed i macrofagi che cercano di fagocitare il microrganismo. TRL-4 sembra mediare l'azione pro-infiammatoria della pneumolisina, TRL-2 sembra modulare l'infiammazione nel sistema nervoso e i topi knock-out per TRL-9 sono più suscettibili ad infezioni da Pneumococco (56, 57).

Poiché la capsula antifagocitaria è il principale fattore di virulenza ed è fortemente immunogena, le immunoglobuline IgM, IgG ed IgA specifiche per il polisaccaride capsulare sono la migliore difesa dalle infezioni pneumococciche. Questi anticorpi compaiono già il quinto giorno di malattia ed esercitano un forte effetto opsonizzante. Una volta prodotti potranno rimanere in circolo anche per anni dopo l'infezione ed essendo tipo-specifico, forniscono una protezione solo per quel particolare sierotipo incontrato. Un soggetto guarito dalla polmonite di un tipo di pneumococco può in qualsiasi momento subire un secondo attacco di polmonite causata da un sierotipo diverso. Molte persone che non hanno mai contratto un'infezione da pneumococco possono avere un repertorio anticorpale per vari tipi di microrganismo; tale protezione può essere ottenuta o per essere stati portatori di pneumococchi per molti mesi o per aver ingerito polisaccaridi antigenici a reazione crociata, che si trovano nelle verdure (28).

Anticorpi diretti verso antigeni somatici dello pneumococco (antigene C, R e proteina M) non hanno alcun effetto protettivo.

La scarsa capacità che i bambini inferiori a due anni hanno di produrre anticorpi verso gli antigeni polisaccaridici della capsula può spiegare l'aumentata incidenza di infezioni pneumococciche nei primi anni di vita e la scarsa efficacia del vaccino polisaccaridico 23-valente (31).

6. EPIDEMIOLOGIA

Lo pneumococco è un batterio molto diffuso nella popolazione. È un comune abitante del tratto respiratorio superiore (naso e gola) di bambini e adulti sani, soprattutto nei periodi invernali e primaverili. Nella maggior parte dei casi il portatore non sa di ospitare il germe perché, in condizioni normali di immunità, l'incontro dello pneumococco con le vie aeree è asintomatico e questo si localizza senza dare alcun disturbo. Si stima che il 20-60% di bambini siano portatori dello *S.pneumoniae* e che la frequenza di isolamento del batterio raggiunga un picco nei primi due anni di vita, per poi ridursi gradualmente. Alcune condizioni quali l'allattamento al seno, la stagione, il fumo passivo, il precedente trattamento con antibiotici, alterazioni dell'immunocompetenza e la frequenza di asili facilitano lo stato di portatore dello pneumococco. Tra gli adulti i portatori faringei sono il 5-10%. Spesso lo stesso sierotipo persiste in modo continuativo per periodi estesi (da 45 giorni a 6 mesi) ma solo se lo stato di portatore permane per un tempo più lungo l'individuo può sviluppare una immunità locale o sistemica sufficiente a prevenire la riacquisizione dello stesso sierotipo a seguito di una successiva esposizione.

Lo pneumococco è una delle cause più comuni di batteriemia, polmoniti batteriche ed otite media ma anche di infezioni suppurative quali l'empima, la meningite, la peritonite e l'artrite. Le infezioni invasive pneumococciche possono colpire soggetti in qualsiasi età della vita ma sono più frequenti in bambini sotto i 5 anni e negli anziani (sopra i 65 anni). Secondo quanto riportato dalla Società Italiana di Igiene lo pneumococco è il microrganismo primario responsabile dell'otite media acuta in lattanti e bambini ed inoltre la prima causa di meningite e polmonite batterica contratta in comunità.

Il rapporto "interim" sulla situazione epidemiologica italiana tra il 2015 e il 2017 steso grazie al sistema di sorveglianza delle malattie batteriche invasive attivo nel nostro paese riporta 1531 casi di malattia invasiva da *S.pneumoniae* nel 2016, confermando un trend in aumento rispetto agli anni passati (i dati relativi al 2017 devono essere ancora confermati). Tuttavia questo potrebbe essere dovuto ad una maggiore sensibilità nella diagnosi ed un incremento delle segnalazioni dei casi. È da tenere in considerazione inoltre la diversa partecipazione delle Regioni alla sorveglianza e alla quota di sierotipizzazioni riportate incomplete e pertanto inutilizzabili ai fini della sorveglianza stessa. Il ricorso alla tipizzazione e una condivisione nazionale dei dati consentirebbe di stabilire l'esatta quota. Sempre nel 2016 i bambini di età inferiore ad un anno e gli ultra 65enni sono risultati la fetta di popolazione maggiormente colpita, 5 casi/ 100000 abitanti e 5,45 casi/ 100000 abitanti rispettivamente (58).

Dati europei mostrano un andamento della malattia pneumococcica invasiva analogo a quello italiano (60).

Complicazioni severe di una qualsiasi infezione pneumococcica possono portare talvolta a setticemia e sono principalmente questi i casi che risultano mortali. La frequenza e la gravità della malattia sono aumentate in pazienti splenectomizzati e con anemia falciforme, deficit dell'immunità, infezioni da HIV, neoplasie maligne, malattie croniche d'organo.

Gli pneumococchi sono quindi responsabili di una grande quantità di stati patologici e conseguentemente anche di importanti perdite economiche legate alle ospedalizzazioni e le cure mediche richieste a seguito dell'insorgenza della malattia pneumococcica. Alcuni dati forniti dall'OMS, relativamente all'Europa e agli Stati Uniti, riconducono allo Pneumococco il 30-50% delle polmoniti che richiedono un ricovero ospedaliero. Percentuale che aumenta nella popolazione infantile maggiormente colpita da infiammazioni estese ad un'ampia porzione di lobo polmonare (polmoniti lobari).

Per motivi poco noti, ma probabilmente multifattoriali, i maschi sono più frequentemente interessati delle femmine ed anche i nativi americani, dell'Alaska, di origine africana sono particolarmente suscettibili alla malattia pneumococcica invasiva (31, 59).

7. TRASMISSIONE E CONDIZIONI DI INFEZIONI

Le *S. pneumoniae* trova il suo habitat nelle nicchie mucosali delle vie superiori del tratto respiratorio nella prima infanzia e persiste come commensale asintomatico nel nasofaringe dei portatori sani (61, 62). Si diffonde facilmente dalla gola di un individuo a quella di un altro attraverso le goccioline di saliva o di muco, o per contatto con le dita od oggetti sporchi di secreto (63).

L'infezione pneumococcica generalmente insorge in modo sporadico; le epidemie di polmonite o altre localizzazioni del microrganismo sono rare ma si sono verificate in passato in campi di addestramento. La polmonite è raramente causata da inalazione dello pneumococco e diretto raggiungimento del polmone (cioè da infezione esogena diretta). E' piuttosto dovuta ad una iniziale e preliminare colonizzazione da parte dello pneumococco delle secrezioni delle alte vie aeree da dove, in condizioni predisponenti che fanno diminuire la resistenza delle mucose respiratorie, può diffondersi nel tratto profondo (polmoni) dopo qualche giorno o qualche settimana dal contatto (4). Se invece dal naso-faringe si localizza nell'orecchio medio, nel seno paranasale o nelle meningi, si possono sviluppare otiti, sinusiti e meningiti. Le infezioni delle valvole cardiache, delle ossa e delle articolazioni derivano dalla diffusione ematogena; l'infezione perinatale può essere conseguenza di una diffusione ematogena o per via ascendente dalle tube di Falloppio; l'infezione del sistema nervoso centrale può avvenire attraverso l'invasione del torrente circolatorio o il drenaggio dai vasi linfatici o venosi o per contiguità, per esempio in pazienti che hanno una deiscenza. Generalmente la barriera dell'immunità innata è sufficiente a bloccare la penetrazione dello pneumococco. Anche la presenza di altri batteri nel naso-faringe, come gli streptococchi alfa-emolitici, limita le sue possibilità replicative. Infatti, un aspetto importante per la trasmissione dello pneumococco è la formazione di biofilms. Questi sono delle vere e proprie comunità batteriche sessili che cooperano all'interno di una matrice autoprodotta di sostanze polimeriche per facilitare la persistenza e la diffusione dei ceppi virulenti (64, 65, 66). Tuttavia nel naso-faringe gli pneumococchi devono competere con le altre specie microbiche.

La frequenza e la gravità dell'infezione non è legata solo alla virulenza del ceppo e all'entità dell'inoculum, ma anche all'integrità delle difese dell'ospite (67). Condizioni come asplenia, anemia falciforme, AIDS, neoplasie, mieloma multiplo predispongono ad una più facile infezione pneumococcica (31); patologie a carico di difetti anticorpali o del sistema del complemento facilitano l'integrazione del microrganismo.

Pregresse infezioni virali portano generalmente ad un danno dell'epitelio ed un'alterazione delle difese immunitarie e lo pneumococco trae vantaggio da questa situazione contingente (68). Esperimenti su topi dimostrano come questi fattori facilitino le superinfezioni batteriche (69, 70). Accanto a questi meccanismi che sono comuni a tutti i virus, ne esistono alcuni peculiari esclusivi di alcuni soli. I virus influenzali e parainflenzali, ad esempio, possiedono la neuraminidasi che incrementano anch'esse l'adesione batterica all'epitelio (71, 72). E' ben noto che i casi di infezioni pneumococciche aumentano negli anni in cui si registrano più casi di influenza (73).

Il virus respiratorio sinciziale (RSV), invece, può formare dei complessi con lo pneumococco che aderiscono meglio all'epitelio delle vie respiratorie e che entrano più facilmente nel torrente circolatorio, del singolo pneumococco (74, 75).

Nella polmonite lobare comuni infezioni virali, compreso il raffreddore, aumentano la secrezione delle mucose potenziando la penetrazione pneumococcica. Ma possono essere predisponenti anche un'eccessiva assunzione di alcool e l'anestesia profonda poiché i secreti vengono aspirati facilmente dalla gola all'apparato respiratorio profondo (76).

Per questi motivi la vaccinazione annuale contro l'influenza nelle categorie maggiormente a rischio (bambini, anziani ed immunocompromessi) assume una grande importanza nella prevenzione delle malattie pneumococciche.

8. SIEROTIPI

Ad oggi si conoscono 92 sierotipi pneumococcici a loro volta raggruppati in 40 sierogruppi (77). Attualmente si fa riferimento alla nomenclatura con cui Lund ha classificato i vari tipi capsulari. Esso raggruppa i ceppi simili, per caratteristiche chimiche e immunologiche, assegnando un numero arabo seguito da una lettera maiuscola che indica i singoli sottotipi all'interno di un sierotipo (78). Esiste anche la possibilità di differenziare gli pneumococchi sulla base del genotipo; genotipi strettamente correlati si possono ritrovare in sierotipi diversi (79).

La distribuzione dei sierotipi capsulari varia in base tra gli adulti ed i bambini; nei lattanti, i più frequenti sono i sierotipi 1, 3, 6A, 7F e 19A. Cambia anche a seconda delle diverse regioni geografiche, dello stato di portatore ma l'associazione tra sierotipo e malattia rimane invariata.

I cambiamenti nella prevalenza dei sierotipi nella popolazione pneumococcica derivano da due importanti fenomeni: la sostituzione dei sierotipi, definito "serotype replacement" e il cambio dei sierotipi capsulari, "serotype capsular switching" (80). Il fenomeno di replacement è legato in piccola parte direttamente alla vaccinazione (81, 82, 83). Un esempio è l'introduzione nel 2000 negli Stati Uniti del vaccino coniugato anti-pneumococco 7-valente (PCV7, con i sierotipi 4,6B,9V,14,18C,19F,23F) che ha ridotto drasticamente le IPD in soggetti vaccinati e non, attraverso una immunità diretta e di gregge (84, 9). Gli stessi effetti si sono

osservati in Europa (85, 86) dove però, in contrapposizione ad una significativa riduzione delle IPD negli adulti correlata al PCV7, è stato registrato un rapido incremento nelle IPD di quei sierotipi non inclusi nel vaccino (10, 11). Altri fenomeni devono essere presi in considerazione per spiegare l'effetto di sostituzione dei sierotipi. Uno di questi è lo switch sierotipico legato ad una plasticità interna dello Pneumococco che facilmente scambia pezzi di DNA con altri pneumococchi o anche altri batteri. Questo comporta modifiche nella composizione dei polisaccaridi capsulari ma anche nuove caratteristiche funzionali del germe, tra le quali la più pericolosa è l'antibiotico-resistenza. I microrganismi diventano immuni alle terapie antibiotiche e più virulenti, sfuggendo così al sistema immunitario dell'ospite. Questa plasticità conferisce un vantaggio evolutivo allo pneumococco, determinandone la selezione dei ceppi più forti (87). Un altro fenomeno coinvolto nella sostituzione sierotipica è la sostituzione dei sierotipi circolanti nei portatori per uno spontaneo trend secolare (88). Tutti questi fenomeni esercitano una pressione maggiore sulla sostituzione sierotipica dell'introduzione dei vaccini (89, 90).

In generale i batteri sono fortemente promiscui e questa "vita sessuale" si traduce nella capacità di scambiare materiale genetico con germi della sua stessa specie o di altre. In questi processi è però possibile che avvengano delle sostituzioni e talvolta delezioni o inserzioni di basi. Per quanto riguarda lo pneumococco, questi fenomeni sono stati evidenziati fra differenti sierotipi e con specie di streptococchi correlati come *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pseudopneumoniae* (91). La conseguenza è una capsula modificata.

9. MANIFESTAZIONI CLINICHE

In base alla gravità dell'infezione pneumococcica si possono distinguere: le infezioni batteriche invasive (IPD), di cui fanno parte quadri clinici come sepsi meningite, polmonite complicata, osteomielite, artrite e forme più lievi (non-IPD) come polmonite, otite, sinusite, congiuntivite (1).

Polmonite pneumococcica

La colonizzazione delle vie aeree superiori da parte degli pneumococchi può avvenire già dopo il primo giorno dalla nascita. L'adesina pneumococcica, responsabile dell'aderenza alle cellule epiteliali, è indipendente dalla capsula e può legarsi con un recettore glicoproteico delle cellule ospite. Quando le prime barriere fisiche e dell'immunità innata sono abbassate, gli pneumococchi possono infettare l'albero respiratorio (76). La polmonite pneumococcica si sviluppa durante il decorso di infezioni virali o successivamente ad un pregresso contatto con un virus. In queste condizioni infatti si ha un aumento della produzione di secrezioni nel naso e nella faringe che aumenta la possibilità di inspirare pneumococchi. Una volta superata la barriera epiglottica, il muco liquido ricco di batteri cade per gravità nelle diramazioni bronchiali profonde che possono essere il lobo medio o il lobo inferiore di destra o il lobo inferiore di sinistra, dove si origina il primo focolaio d'infezione (28). La polmonite si espande con diffusione centrifuga. Gli pneumococchi si moltiplicano grazie alla protezione che la capsula e lo stesso muco offrono al germe, ed iniziano un processo infiammatorio. Ad un primo passaggio di proteine nello spazio aereo, vengono reclutati i polimorfonucleati seguiti poi dai macrofagi che fagocitano i frammenti di fibrina e di cellule, insieme a quelli del batterio. Come conseguenza di ha un accumulo di essudato negli alveoli, contenente neutrofili ed

eritrociti. In questo stadio l'essudato alveolare è simile all'escreato del paziente. Contemporaneamente si sviluppa l'immunità umorale, cioè gli anticorpi diretti contro i polisaccaridi della capsula, per quello specifico ceppo. Questi compaiono sia nel torrente circolatorio che localmente a livello polmonare e alveolare, dove a contatto con il germe esercitano un'azione di opsonizzazione. La progressione dell'infezione, in assenza di un trattamento antibiotico, dipende proprio dal rapporto tra la capacità moltiplicativa dello pneumococco e la capacità delle difese immunitarie di arrestare l'invasione batterica e distruggere gli agenti patogeni. E' per questo che soggetti con scarsa capacità immunitaria come bambini, anziani o immunocompromessi, si difendono con maggior difficoltà da queste infezioni. Quando vengono coinvolti gli alveoli situati al di sotto della pleura si sviluppa una pleurite e l'infezione può estendersi fino alla cavità pleurica. Se a questo livello si ha un accumulo di liquido pleurico si parla di effusione parapneumonica (PPE) e se non controllato si può evolvere in formazioni ascessuali con formazioni di pus. Si parla in questo caso di empiema pleurico (PE). Entrambe fanno parte delle polmoniti complicate acquisite in comunità (CAP).

Spesso la polmonite pneumococcica si presenta in forma multilobare a causa del flusso del trasudato infetto mediante la combinazione della respirazione, della tosse e della gravità. Se lo pneumococco non viene fagocitato può essere attraversare i vasi linfatici e gettarsi nel torrente circolatorio dando origine ad una batteriemia. Da qui possono andare a localizzarsi in altre sedi dell'organismo come meningi, valvole cardiache, articolazione con conseguenze gravi.

Generalmente il periodo di incubazione del germe è di 1-3 giorni. Ad una tosse insistente si associa uno stato febbrile con brividi e dispnea. La produzione di espettorato e dolore toracico acuto sono altre manifestazioni cliniche.

Meningite

Lo pneumococco è il secondo agente responsabile di meningite dopo la *Neisseria Meningitidis*. La meningite batterica può essere secondaria ad una batteriemia o partire da focolai già preesistenti quali, otiti, mastoiditi, sinusiti. Una volta penetrati nel liquido cefalo-rachidiano, gli pneumococchi sono liberi di circolare e non incontrano forti resistenze per le basse concentrazioni di fattori del complemento e di anticorpi nel liquido. Tuttavia gli antigeni somatici della capsula stimolano un'intensa risposta infiammatoria locale con produzione di citochine pro-infiammatorie e mediatori della flogosi. La conseguenza è il richiamo e accumulo di neutrofili, un'aumentata permeabilità vascolare, un'alterazione della barriera emato-encefalica e trombosi vascolare (92). Il quadro non si configura come una sepsi gravi ma la sintomatologia è di varia natura e spesso simile a quella meningococcica. Si manifesta con comparsa improvvisa di febbre, cefalea, rigidità nucale, spesso accompagnata nel bambino più grande da altri sintomi quali nausea, vomito, fotofobia confusione mentale, letargia. Nei neonati invece alcuni di questi sintomi non sono evidenti; si possono però manifestare febbre, convulsioni, pianto continuo, irritabilità, sonnolenza, inappetenza (93).

La presenza di convulsioni focali è spesso un fattore prognostico sfavorevole di successivi e permanenti danni neurologici. Alcuni di questi possono essere deficit focali, paralisi facciale, sordità, atassia e si manifestano a distanza di pochi giorni dall'esordio della meningite. Complicazioni severe sono l'edema cerebrale, che può

insorgere nelle prime 48 ore dell'esordio, e l'ascesso cerebrale, che può insorgere in qualsiasi momento (94).

Osteomielite

È un'infezione e infiammazione dell'apparato osseo-articolare che interessa sia le strutture ossee che la cavità midollare (95). E' generalmente dovuta a diffusione ematogena di un focolaio attivo distante che può interessare le ossa lunghe, specialmente femore, tibia e omero. Può anche derivare da lesioni traumatiche profonde o gravi fratture esposte (96). I sintomi sono febbre elevata, sintomi sistemici (anoressia, irritabilità, malessere generale) e locali (dolore, limitazione dei movimenti, edema, eritema) (97).

Artrite

È un'infiammazione dell'articolazione causata dalla localizzazione articolare di un germe. Generalmente è monoarticolare e colpisce soprattutto le grandi articolazioni come anca, ginocchio e spalla (98). Lo pneumococco è causa rara di artrite purulenta acuta. Si può trovare in corso di batteriemia e invadere la membrana sinoviale. La fagocitosi da parte delle cellule infiammatorie e dei fibroblasti provoca una massiva liberazione di enzimi proteolitici che causano la necrosi della sinovia e talvolta quella della cartilagine. L'accumulo di liquido sinoviale aggrava il quadro clinico, poiché favorisce ulteriormente la distruzione di questi elementi (99). L'articolazione, sede d'infezione, si presenta tumefatta, calda, dolorante e spesso si è incapaci di esercitarne un controllo. La febbre coesiste quasi sempre. Nei lattanti è più difficile individuare le manifestazioni cliniche; il rilievo della patologia può avvenire talvolta soltanto durante il cambio dei pannolini, quando è

possibile accorgersi del dolore e della ridotta motilità di un arto. Nel bambino che cammina si può osservare una zoppia (100).

Otite media acuta

È la più frequente infezione delle vie superiori nei bambini e rappresenta un vero e proprio problema di sanità pubblica. La sede dell'infezione o dell'infiammazione è l'orecchio medio. Il raffreddore, la causa più comune negli infanti, favorisce la diffusione dello pneumococco in alto lungo la tuba di Eustachio, condotto che collega la parte posteriore del naso all'orecchio medio. Questo condotto può essere ostruito dall'infiammazione o dall'ingrossamento delle adenoidi, spesso associato alle infezioni del naso e della gola. Di conseguenza, il liquido prodotto dall'infezione, insieme al pus, non defluisce attraverso il condotto ma si accumula nell'orecchio medio (101). I bambini hanno diverse caratteristiche che facilitano l'insorgenza della malattia come il diametro più piccolo dell'orecchio, larghezza, lunghezza e angolazione orizzontale ridotte della tuba di Eustachio. Nel bambino le manifestazioni cliniche sono l'improvvisa otalgia, febbre, stato di agitazione e talvolta perdita dell'udito, individuabile solo mediante un esame accurato. All'otoscopia sono visibili bombature e sofferenze del timpano. Nel lattante invece la sintomatologia è più sfumata e aspecifica: vomito, diarrea, perdita di appetito. A seguito della rottura del timpano può fuoriuscire un secreto purulento che può presentare qualche venatura di sangue (102).

Sinusite

Quando si ha un'infezione o un'infiammazione a livello delle mucose dei seni paranasali si parla di sinusite. La mucosa infiammata aumenta il proprio volume, determinando un restringimento degli osti di comunicazione tra i seni paranasali e

le cavità nasali. Questo porta ad un ristagno del muco all'interno dei seni, offrendo così un ambiente ideale per la crescita dello pneumococco. Si così una sovrapposizione tra infiammazione ed infezione. La manifestazione clinica più frequente è la persistenza dei sintomi respiratori per un periodo che va tra i 10 ed i 30 giorni; superato tale limite si parla di sinusite cronica. Il bambino presenta rinorrea acquosa che con il passare dei giorni diventa sempre più densa, torbida e purulenta. La tosse è un sintomo persistente tutta la durata di questa condizione clinica, specialmente nelle forme croniche. Spesso si può avere gola arrossata e difficoltà a deglutire poiché a causa dell'ostruzione nasale si è costretti alla respirazione a bocca aperta. La secrezione nasale e la cefalea sono meno frequenti nelle forme acute dove è rara anche la presenza di uno stato febbrile (103).

Congiuntivite

Lo pneumococco può essere anche responsabile di congiuntivite infettiva che interessa lo strato mucoso più esterno che riveste la sclera dell'occhio e la superficie interna della palpebra (104) oltre al caratteristico color rossastro si possono associare fastidiosi sintomi di bruciore, secrezione mucopurulenta mono- o bilaterale e disturbi visivi (105).

10. DIAGNOSI

La presentazione clinica delle polmoniti può variare con l'età, l'agente eziologico e con lo stadio di progressione della patologia. Nel neonato e nel piccolo lattante le manifestazioni possono essere varie o scarse e spesso non è semplice l'interpretazione per una minor possibilità d'interazione con il paziente. I bambini affetti da CAP possono presentare febbre, tachipnea, dispnea o difficoltà

respiratoria, tosse, respiro sibillante (106). La frequenza respiratoria (FR) è un sintomo importante e facile da valutare. Tuttavia nei primi tre giorni della polmonite è un parametro diagnostico meno sensibile e specifico (107, 108). La radiografia può aiutare quando c'è una sospetta diagnosi eziologica ma spesso non esiste concordanza tra i segni clinici di una polmonite generica e una radiografia del torace; è dimostrato in uno studio come di casi di polmonite diagnosticati clinicamente solo il 14% presentava una polmonite radiologicamente evidente (109). Per arrivare ad una diagnosi è quindi necessario l'impiego di indagini strumentali. Tra i primi esami che vengono richiesti nel paziente con stato febbrile associabile ad una infezione batterica invasiva ci sono, in tutti i protocolli, i comuni esami di laboratorio utilizzati come indici di infiammazione acuta (numero dei globuli bianchi con formula, velocità di sedimentazione e dosaggio della proteina C reattiva o della procalcitonina). La presenza di leucocitosi con neutrofilia associata ad elevati valori di PCR o procalcitonina indubbiamente può indirizzare verso un'infezione batterica (110, 114), ma la normalità di uno o più di tali valori non può escluderla. Ad esempio nel primo giorno di febbre questi parametri possono ancora essere normali (115). Inoltre infezioni virali come da Adenovirus possono condividere alterazioni ematochimiche simili (114). Dopo questi esami di primo livello è necessario procedere con la ricerca dell'agente eziologico, sia per l'impostazione di una corretta terapia che per una valutazione epidemiologica. Per ricercare lo pneumococco ci sono più indagini diagnostiche: esame batterioscopico diretto del campione (liquido pleurico, liquido cefaloarachidiano), esami colturali, ricerca di antigeni solubili o tecniche di biologia molecolare. Grazie a quest'ultima

metodica è possibile anche sierotipizzare lo pneumococco e pertanto conoscerne l'epidemiologia.

Metodo colturale

Gli esami colturali sono sempre stati considerati come test di riferimento per la diagnostica delle infezioni da pneumococco. Tutt'oggi molti ospedali mantengono questa metodica di ricerca del germe e la positività della coltura è considerata fondamentale per la diagnosi. Il campione biologico che può essere espettorato, liquido pleurico o sangue viene prima omogenizzato con acqua e perline di vetro in uno shaker meccanico, poi incubato su piastre di agar-sangue per 18 ore a 38° in un'atmosfera dal 5 al 10% di CO₂, dato che il 10% dei ceppi non riescono a moltiplicarsi alla concentrazione atmosferica di CO₂ (31). Nel caso dell'ispettorato, dove è possibile che sia presente una popolazione mista, è preferibile utilizzare terreni resi selettivi dall'aggiunta di farmaci (acido nalidixico) ai quali lo pneumococco è insensibile (29). Una volta ottenuta la crescita in coltura, gli pneumococchi possono essere differenziati dagli streptococchi viridanti, morfologicamente simili e circondati ugualmente da un alone di alfa-emolisi, tramite le seguenti tecniche:

- Solubilità all'optochina (o etilidrocupreina idrocloruro): dischetti di questa sostanza vengono posti sulla piastra di agar precedente seminata con gli pneumococchi. Dopo sole 24 ore, in prossimità dei dischetti di optochina, si possono osservare delle zone di inibizione della crescita batterica. Al contrario, gli streptococchi viridanti sono resistenti all'optochina (32, 115).
- Solubilità alla bile: l'amidasi è un enzima prodotta dagli streptococchi ed è in grado di scindere i legami covalenti specifici a livello del petidoglicano.

Questo enzima viene attivato dalla bile o dai Sali biliari come il desossicolato di sodio. Pertanto se si aggiungono alcune gocce di una soluzione al 10% di desossicolato di sodio ad una brodocoltura di pneumococchi, le cellule vengono rapidamente lisate al contrario degli streptococchi viridanti che mantengono la loro integrità in presenza di questa stessa sostanza (29, 115).

Una volta osservata una positività all'esame colturale, si deve eseguire la sierotipizzazione per l'identificazione del tipo capsulare. Con i metodi tradizionali viene utilizzata la reazione di rigonfiamento capsulare di Neufeld o quellung reaktion; il campione clinico o l'isolato viene posto su un vetrino e mescolato con un antisiero contro il polisaccaride capsulare, polivalente o tipo-specifico, ed il blu di metilene. Con l'osservazione al microscopio, in caso di una reazione positiva, si può vedere la capsula notevolmente ingrossata in conseguenza della precipitazione del materiale capsulare che diventa più compatto ed evidente (28, 115).

Sebbene la coltura sia stata una metodica importante e rimanga oggi una tecnica ampiamente diffusa, presenta dei limiti e una sensibilità non soddisfacente: per poter vedere la crescita del germe sono necessari alcuni giorni di attesa ed inoltre si possono avere risultati "falsi-negativi" a causa di molteplici fattori. Fra questi un volume di campione troppo piccolo, condizioni inadeguate di conservazione o di trasporto ma il problema più influente indubbiamente la precedente terapia antibiotica. In effetti in molti casi, il paziente pediatrico, prima che venga mandato alla struttura ospedaliera e sottoposto ad esami colturali per sospetta infezione batterica invasiva, ha già effettuato una terapia antibiotica domiciliare per giorni. Il che riduce la vitalità del germe, requisito indispensabile per la sua crescita su terreni

di coltura (116, 117). La risposta, falsamente negativa, è estremamente frustrante soprattutto quando il quadro clinico è fortemente indicativo per un'eziologia pneumococcica.

Per questo nuove tecnologie che possono affiancare i metodi colturali con una simile specificità ma maggiore sensibilità e non dipendente dalla vitalità del microrganismo sono sempre più d'interesse (118). L'analisi molecolare mediante RT-PCR è un'ottima tecnica diagnostica (119-122).

Metodo molecolare

I metodi molecolari sono strumenti importanti per la ricerca di molti patogeni responsabili di malattie invasive. Superano i limiti dei metodi colturali e sono risultati più sensibili (120, 123). Possono identificare piccolissime quantità di acidi nucleici di qualunque patogeno a partire da piccole quantità di campione, sono meno influenzati da precedenti terapie antibiotiche non dipendendo dalla vitalità del germe, sono effettuabili su varie tipologie di materiali biologici (sangue, urine, pus, liquor, liquido pleurico, liquido sinoviale, biopsie, tamponi) ed offrono risultati in tempi rapidi. Inoltre richiedono metodi semplici, attrezzature ridotte e costi bassi. Oltre a fare diagnosi di infezioni pneumococciche consentono di effettuare la tipizzazione. I metodi più utilizzati sono la Polymerase chain reaction (PCR) standard e la Real-Time (RT)- PCR.

La **reazione a catena della polimerasi** fu ideata nel 1983 da Kary B. Mullis, il quale vinse per questo il Premio Nobel per la Chimica (124, 125). Questa tecnica ha rivoluzionato la genetica molecolare. Ricostruisce in vitro uno specifico passaggio della duplicazione cellulare, cioè la *sintesi* di un segmento di DNA a doppia elica a partire da un filamento a singola elica. La PCR consente di

amplificare, senza la necessità di una cellula vivente, frammenti di acidi nucleici di cui se ne conoscano le sequenze target iniziali e finali, ottenendo miliardi di copie in tempi ridotti (126, 127). La parte nota di sequenza che deve essere una piccola regione conservata ed identificativa di uno specifico germe viene utilizzata per disegnare due oligonucleotidi sintetici, chiamati *primers*, complementari a tratti di sequenza che si trovano su lati opposti della regione che deve essere amplificata e su filamenti diversi (128). Questi oligonucleotidi servono per dare inizio alla sintesi del DNA che è catalizzata da una polimerasi isolata da un batterio termofilo (129); tale enzima, molto termostabile, non viene dunque denaturato dai ripetuti riscaldamenti che avvengono durante i cicli di reazione. Ogni ciclo è caratterizzato da tre fasi di reazione (denaturazione, annealing, prolungamento) con profili termici differenti. Generalmente i cicli sono ripetuti per circa 30-40 volte e non superano i 50 cicli poiché la quota di DNA amplificato raggiunge un plateau.

Nel caso dello pneumococco, il primo passo per costruire i primers è stato quello di identificare quei geni che fossero comuni al più alto numero possibile di sierotipi del germe. Sono stati testati, come possibile target di amplificazione, molti geni prima tra tutti il gene *psaA* codificante per l'adesina A di superficie (130). A partire da isolati batterici cresciuti in coltura, l'amplificazione con *psaA* ha dimostrato che questo gene è conservato in tutti i 90 sierotipi pneumococcici (131) ed è quindi un buon candidato per la diagnosi indipendentemente dal sierotipo. Il gene *ply* (132, 133) è codificante per una pneumolisina ed è anch'esso presente in tutti i sierotipi ma meno sensibile poiché non sembra talvolta in grado di distinguere pneumococchi atipici (134, 135) e soprattutto distinguere lo pneumococco dagli streptococchi alfa-emolitici (136). Da comparazioni effettuate su pieni il gene *lyt*

ha mostrato una sensibilità del 100% nell'identificazione dei soli ceppi pneumococcici e pertanto il suo impegno come target per la costruzione dei primers sembra indicare un'accuratezza di amplificazione maggiore (137).

La **RealTime-PCR** è stata messa a punto successivamente da Higuchi (138). E' un metodo di amplificazione e quantificazione simultanea del DNA (139); consente di monitorare l'avvenuta amplificazione del DNA nel corso della reazione, senza dover aspettare il termine della stessa. Questo comporta un abbattimento dei tempi necessari per ottenere un risultato e la possibilità di fare un'analisi in corso di reazione. Tale vantaggio è dovuto al fatto che nella miscela di reazione, oltre alla polimerasi e ai primers specifici per il gene target di interesse, vengono aggiunte sonde fluorescenti specifiche per la regione genomica da amplificare. Durante l'amplificazione, la velocità con cui il segnale fluorescente raggiunge un livello soglia, correla con la quantità di sequenza specifica, consentendo di fare un'analisi semi-quantitativa (140). La RT-PCR è anche molto sensibile, infatti riesce a rilevare meno di 5 copie di una sequenza e quantificare gli acidi nucleici fino a 5 unità logaritmiche. La possibilità di reazioni crociate è ridotta al minimo e il tempo di durata è breve. Bastano circa 35 minuti contro le 4 ore delle PCR standard per avere un risultato e questo rappresenta un vantaggio in ambito diagnostico. Correlare velocemente ad una clinica anche l'agente eziologico responsabile permette un intervento terapeutico mirato. Oltre alla durata più breve della procedura, una sostanziale differenza con la PCR tradizionale sta nel fatto che nella RT-PCR, l'amplificazione e l'analisi del prodotto avvengono contemporaneamente in corso di reazione grazie all'uso delle sonde ed inoltre la quantificazione avviene durante la

fase di amplificazione esponenziale (fig.2). Il metodo standard invece misura solo la quantità finale del prodotto (141).

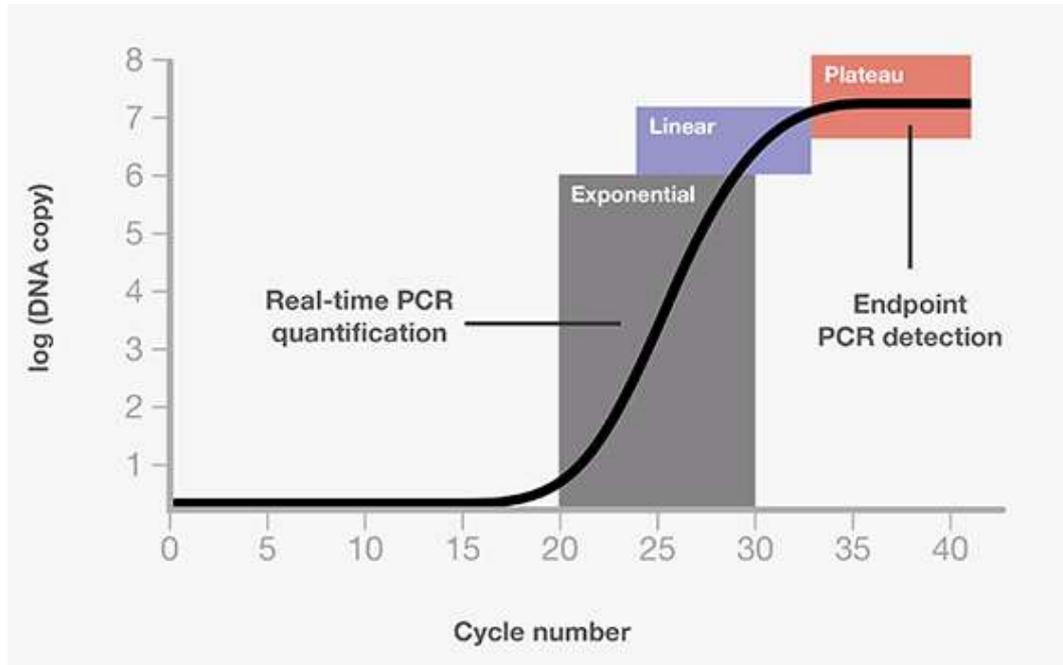


Fig 2. Fase di quantificazione: Real-time PCR vs PCR standard

Anche in questo caso il gene *lyt* appare il target più specifico (142). Potendo utilizzare fluorocromi diversi per marcare le sonde, la RT-PCR permette di amplificare più geni nella stessa reazione e realizzare così una reazione in multiplex. Si possono dunque creare pannelli diversi per individuare simultaneamente più germi che potrebbero essere causa di una stessa patologia (143).

In casi in cui un quadro clinico ponga il dubbio di infezione batterica ma il patogeno responsabile non possa essere ricondotto a nessuno dei più comuni agenti infettivi caratterizzabili mediante RT-PCR, è possibile utilizzare la sequenza intera di gene, ossia il **16s**. Questo è uno dei tre RNA ribosomiali che rappresenta un eccezionale orologio evolutivo ed è stato utilizzato per studiare la filogenetica dei procarioti. I

prodotti della PCR classica vengono sequenziati ed i dati vengono importati su programmi specifici che comparano la sequenza in esame con le sequenze già note e presenti in banche dati. Si tratta di una metodica complessa, lunga e che pecca nella specificità. Si può applicare a materiali biologici sterili e dove non risiedono generalmente biofilms composti da tanti germi diversi, altrimenti verrà individuata una flora mista e non il germe responsabile dell'infezione (144).

Sierotipizzazione

La sierotipizzazione è oggi indispensabile per monitorare l'epidemiologia delle infezioni pneumococciche e valutare gli effetti dei vaccini sulla distribuzione sierotipica, per capire eventuali shift di sierotipi.

Fino a non molti anni fa la tipizzazione veniva fatta su isolati da coltura (145, 146).

La conseguenza era che la caratterizzazione della capsula poteva essere fatta solo nei casi in cui la coltura risultava positiva. Lo sforzo dei ricercatori è stato quello di creare nuovi metodi capaci di permettere la tipizzazione direttamente da campione biologico, in modo da superare gli ostacoli presentati dal metodo colturale. Inoltre è stato importante sviluppare metodi che permettessero di individuare il maggior numero di sierotipi nel minor numero di reazioni. Sono stati messi appunto test di Multiplex PCR che hanno permesso di ottenere risposte in poco tempo e con minor dispendio di energie. Ad oggi è possibile raggruppare 31 coppie di primers in sole 9 reazioni multiple (147, 148).

L'utilizzo di questi metodi molecolari consente di ottenere dati di incidenza delle infezioni pneumococciche e della distribuzione dei sierotipi nel tempo più reali di quelli ottenibili con i metodi colturali, che a causa dei loro limiti portano a

sottostimare l'incidenza e pertanto a costruire con minor affidabilità un quadro epidemiologico completo.

I metodi molecolari di sierotipizzazione si sono rivelati molto utili anche per individuare le colonizzazioni multiple nei tratti naso-faringei dei portatori. Al contrario dalle colture cellulari è più difficile individuare colonizzazioni faringee ed a discriminare i diversi tipi di pneumococchi (149, 150).

CAPITOLO II: LA VACCINAZIONE ANTI- PNEUMOCOCCICA

1. CENNI STORICI E VACCINI POLISACCARIDICI

George M. Sterneberg e Louis J Pasteur indipendentemente isolarono per la prima volta lo pneumococco nel 1881. Durante la successiva decade questo patogeno fu al centro dell'attenzione scientifica e fu ritenuto una delle principali cause della polmonite, della batteriemia e della meningite (151)

Nel 1886, Albert Frankel fu il primo a dimostrare l'esistenza di una immunità umorale in seguito all'infezione pneumococcica nei conigli. Notò che gli animali guariti dall'infezione risultavano immuni ad un secondo contatto con il patogeno.

Georg Klemperer e suo fratello Felix dimostrarono nel 1891 che il siero, prodotto da conigli immunizzati tramite l'iniezione di pneumococchi uccisi o brodi di coltura filtrati, aveva effetti protettivi conferendo una immunità permanente a seconde infezioni. Nonostante i notevoli e gravi effetti collaterali, la terapia sierica risultò l'unico trattamento effettivo. Studi ulteriori sulla terapia con antisiero contribuirono alla scoperta del siero anti-pneumococco di sierotipo 1, seguiti dal sierotipo 2 e 3.

Nel 1910 Wright, in Sudafrica, sperimentò un vaccino a cellule intere su dei minatori ed avviò subito un trial clinico senza tenere di conto della specificità sierotipica. Il vaccino conferiva una protezione immunitaria riducendo i casi di polmonite nei vaccinati nei primi due mesi dopo il vaccino. Contemporaneamente nuovi metodi per distinguere i diversi sierotipi dello pneumococco venivano messi a punto in altri stati.

Intanto sempre in Africa, Lister sviluppò un metodo di tipizzazione differente basato sulla fagocitosi e l'agglutinazione specifica. Nel 1914 usò questo sistema di tipizzazione per sviluppare il primo vaccino a cellule intere con risposta anticorpale tipo-specifica, contenente tre sierotipi diversi da quelli trovati in Europa e in Nord America.

Tra il 1916 ed il 1917 Dochez e Avery isolarono quelli che oggi conosciamo come polisaccaridi capsulari ma che loro definirono "sostanze specifiche solubili dello pneumococco". Circa dieci anni dopo una serie di studi stabilirono che questi antigeni capsulari erano alla base della diversità sierotipica dello pneumococco.

Agli inizi degli anni '30 Felton dimostrò che l'iniezione di polisaccaridi purificati induceva una risposta anticorpale protettiva. Iniziarono così gli studi sui vaccini anti-pneumococcici derivati da componenti polisaccaridici capsulari. Nonostante il grande bisogno di un vaccino durante la seconda guerra mondiale per prevenire i frequenti casi di polmoniti da pneumococco nelle forze armate, solo nel 1945 fu dimostrata l'efficacia. Alla fine della seconda guerra mondiale furono messi in commercio due vaccini esavalenti, che furono velocemente rimpiazzati dall'introduzione degli antibiotici quali la penicillina, cloroamfenicolo e clorotetraciline. Tuttavia con il tempo l'aumento della dipendenza dalla terapia antibiotica nelle malattie pneumococciche invasive portò alla formazione di nuovi ceppi di pneumococchi resistenti agli antibiotici che causavano malattie da pneumococco. Questa situazione spostò nuovamente l'attenzione verso i vaccini, più di quanto non fosse avvenuto durante la guerra. A fine degli anni 80, in America fu introdotto un vaccino polisaccaridico 14-valente, consigliato agli adulti >50 anni e ai bambini <2 anni oltre che ad anziani in condizioni di salute compromessa,

capace di immunizzare dai ceppi responsabili del 60-70% delle IPD. Gli esperti riconobbero la necessità di espandere la copertura vaccinale a più sierotipi e nel 1983, sempre in America, fu introdotto il vaccino polisaccaridico 23-valente (sierotipi: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 15F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F) (152, 153).

PPSV23

Il vaccino polisaccaridico 23-valente è un vaccino inattivo preparato dagli antigeni capsulari polisaccaridici dello pneumococco purificati e derivati dai 23 sierotipi che costituiscono circa il 90% dei tipi alla base della malattia invasiva pneumococcica.

Queste componenti polisaccaridiche stimolano una reazione immunitaria di tipo primario ma non creano una memoria immunologica. Gli anticorpi possono essere rilevati dalla terza settimana successiva alla vaccinazione e diminuiscono dopo 3-5 anni (154).

L'Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) ha consigliato la vaccinazione per adulti sani oltre i 65 anni e soggetti di età compresa tra i 2 ed i 65 anni con fattori di rischio quali deficit immunitari da malattia (HIV, leucemie, linfomi, morbo di Hodgkin, mieloma multipla, neoplasie) o da terapia (trattamenti cortisonici, radio e chemioterapici), cardiopatie, patologie polmonari, diabete, alcolismo, epatopatie croniche (159), trapianti di rene (160), di midollo osseo (161), di cuore (162); soggetti che vivano in case di cura, strutture a lunga degenza e RSA.

I vaccini polisaccaridici hanno però dei limiti:

- la mancanza di una completa risposta prima dei 5 anni di età insieme alla scarsa immunogenicità per i sierotipi che danno infezioni nel bambino.

- la mancata stimolazione dei linfociti T e delle cellule di memoria; i polisaccaridi infatti non interagiscono con le cellule T del sistema immunitario (caratteristiche legate alla T-indipendenza dei polisaccaridici) ma solo con le cellule B e stimolano solo una risposta immunitaria di tipo primario. Lo switch isotipico delle IgM in IgG non viene promosso e pertanto non si forma la memoria immunologica che conferisce protezione duratura (156).

- la breve durata dell'efficacia. Non essendo in grado di indurre una memoria immunitaria, il titolo anticorpale diminuisce nel tempo e non si osserva una risposta anamnesticca dopo rivaccinazione (157).

- presenta il fenomeno dell'iporesponsività, cioè lo sviluppo di una risposta immunitaria con un titolo anticorpale ridotto dopo dosi successive di vaccino. Per tale motivo si raccomanda di non superare le 2-3 dosi nell'arco della vita.

Tutto ciò comporta una capacità protettiva insufficiente sotto i 2-3 anni (155) ed è proprio nei lattanti che si osserva la massima frequenza delle forme invasive.

In Italia il PPSV23 è stato commercializzato a partire dal 2000 ed indicato per l'immunizzazione attiva contro le malattie sostenute dai sierotipi pneumococcici presenti dal vaccino nei soggetti di età pari o superiori a 2 anni, ad elevato rischio patogenetico e mortalità da infezione pneumococcica ma non è efficace nella prevenzione dell'otite media acuta, della sinusite e delle comuni infezioni del tratto respiratorio superiore (157).

La scarsa immunogenicità di tale vaccino ha indotto quindi alla realizzazione di nuovi vaccini glicoconiugati, in cui i polisaccaridi capsulari sono legati chimicamente (coniugati) ad una proteina carrier altamente immunogena (carrier

proteico-anatossina tetanica o difterica-). Appartengono a questo gruppo di vaccini coniugati il 7-valente ed il 13-valente.

2. I VACCINI CONIUGATI: PCV7 E PCV13

La coniugazione dei polisaccaridi batterici con proteine carrier determina una risposta anticorpale T-dipendente conseguente all'attivazione delle cellule T CD4+ (163). La caratteristica principale di tale risposta è quella di indurre la produzione di anticorpi IgG ad elevata affinità ed un numero maggiore di cellule della memoria. La conseguenza è la formazione di una memoria immunologica che assicura una protezione prolungata (164).

Il primo vaccino reso disponibile sul mercato è stato il **vaccino coniugato 7-valente (PCV7)**, introdotto negli Stati Uniti nel 2000. Esistendo già più di 80 sierotipi e non essendo possibile coniugarli tutti al carrier proteico, sono stati scelti i 7 sierotipi maggiormente responsabili delle malattie invasive da pneumococco. Dati ottenuti sia in USA che in Europa prima della vaccinazione di massa avevano dimostrato che i sierotipi 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F erano proprio i responsabili dell'80-97.7% delle IPD (165-167).

Molti studi hanno messo in evidenza che l'introduzione del PCV7 ha avuto un impatto positivo sulle infezioni pneumococciche (168): ha ridotto il rischio di setticemie e meningiti (169), ha determinato una riduzione delle infezioni delle vie respiratorie alte ed inferiori (170), ha permesso di prevenire almeno il 25% di tutte le polmoniti dell'infanzia (171) ma anche l'otite media acuta (172). Inoltre ha avuto un importante impatto sulla colonizzazione; infatti alti livelli di anticorpi IgG sierici

contro i polisaccaridi capsulari pneumococcici correlano con un buon grado di protezione e prevenzione dello stato di portatore nel naso-faringe (173).

Altri studi negli Stati Uniti riportano dati sull'efficacia del vaccino nella drastica riduzione delle IPD in soggetti vaccinati e non, non solo attraverso una immunità diretta ma anche grazie ad una immunità di gregge (8,9). Gli stessi effetti si sono osservati in Europa dove, in contrapposizione ad una significativa riduzione delle IPD negli adulti correlata al PCV7, è stato osservato un rapido incremento nelle IPD di quei sierotipi non inclusi nel vaccino (10,11). E' stato ipotizzato che la protezione di gregge sia stata ottenuta grazie alla riduzione dei sierotipi vaccinali nelle vie respiratorie alte nei bambini immunizzati, con conseguente interruzione della catena di contagio portatore-soggetto non immunizzato (12,13). Nell'era pre-PCV7 i sierotipi inclusi nel vaccino non solo erano i maggior responsabili delle IPD nei bambini ma anche i più diffusi nei giovani portatori sani in Europa e negli Stati Uniti (13-16). Questa situazione è oggi presente in quei paesi dove non esiste un programma vaccinale con il vaccino 7-valente (17).

In Italia il PCV7 è stato reso disponibile sul mercato a partire dal 2002 ma non è più attualmente in commercio.

Nel febbraio 2010, la Food and Drug Administration (FDA) ha conferito la licenza al **vaccino anti-pneumococco 13-valente (PCV13)** (174) e nell'aprile dello stesso anno è stata autorizzata anche in Italia la sua commercializzazione (175).

Il PCV13 contiene i sette sierotipi del PCV7 e sei nuovi sierotipi aggiuntivi (1, 3, 5, 6A, 7F, 19A) (176). E' attualmente il vaccino coniugato con il più alto numero di sierotipi pneumococcici. Tra i nuovi antigeni capsulari, i sierotipi 1, 3, 7F, 19A sono più spesso associati a polmoniti complicate quali versamenti parapneumonici

(PPE) ed empiemi pleurici (PE) (22, 24, 177). Questi sierotipi insieme agli altri addizionati al PCV13 sono stati ritrovati raramente nelle vie respiratorie dei portatori italiani (178-180). Pertanto si potrebbe presupporre che il PCV13 non conferisca una protezione di gregge poiché non andrebbe ad influire sulla catena di contagio portatore-soggetto non immunizzato, contrariamente a quanto si pensa per il PCV7. Questo argomento è tutt'oggi molto dibattuto poiché i dati di altri paesi in letteratura sono contrastanti.

Secondo il piano nazionale prevenzione vaccinale (PNPV) 2017-2019, la vaccinazione con PCV13 è raccomandata:

- in tutti i nuovi nati: 3 dosi al 3°, 5° e tra l' 11° e 13° mese di vita;
- in bambini compresi tra i 12 e i 23 mesi: due dosi con intervallo di almeno 2 mesi fra le due somministrazioni;
- in bambini compresi tra 2 e 5 anni: una dose singola;
- in bambini mai vaccinati o che abbiano in precedenza completato il ciclo di vaccinazione con PCV7: una dose singola;
- nelle categorie a rischio fino a 5 anni una dose di PCV13 e nei soggetti ≥ 65 la vaccinazione con vaccino pneumococcico coniugato, seguita da una dose di vaccino polisaccaridico.

3. IL VALORE DELLA VACCINAZIONE ANTI-PNEUMOCOCCICA: EVIDENZE DAL MONDO

L'analisi del burden delle patologie infettive da *S. pneumoniae* è, ancora oggi, un tema di grande attualità perché meningite, sepsi, polmonite, otite media acuta rappresentano le conseguenze principali a seguito di una infezione pneumococcica

nella popolazione infantile. L'epidemiologia delle malattie da pneumococco è cambiata molto nel corso degli anni, soprattutto con l'introduzione di programmi vaccinali anti-pneumococco. Il primo vaccino coniugato commercializzato è stato il PCV7, seguito dal PCV10 e dal PCV13. A seconda del loro impiego e del loro spettro sierotipico di copertura, i vaccini anti-pneumococcici hanno avuto un impatto differente nei diversi paesi del mondo in cui sono stati utilizzati.

In meno di un decennio di utilizzo del PCV7 si è avuta una drastica riduzione delle infezioni da pneumococco in bambini: un lavoro sulla popolazione israeliana riporta una riduzione del 95% delle IPD causate dai 7 sierotipi inclusi nel PCV7. Parallelamente si è registrato un aumento delle IPD causate da quei sierotipi non presenti nel vaccino, in particolar modo il 19A e solamente dopo l'introduzione del PCV13 si è osservato nuovamente un decremento (181). Simili risultati sono stati ottenuti in Inghilterra ed in Galles dove la riduzione delle IPD da sierotipi inclusi nel PCV13 è stata del 90% in bambini di età < 2 anni (182).

In tutto il mondo l'introduzione del PCV13 ha determinato una riduzione significativa delle infezioni pneumococciche sostenute da sierotipi in esso presenti (183, 184). Importanti sono stati anche i dati che dimostrano come il PCV13 abbia portato ad un decremento dei casi di CAP. Confrontando paesi come Francia (185), Stati Uniti (186), Israele (187), dove è stato introdotto il vaccino 13-valente con Finlandia (188), Svezia (188), Brasile (189) e America Latina (190), dove viene utilizzato il PCV10, i casi di CAP si sono ridotti del 54-74% nei primi e solo del 22% nei secondi.

Anche in Italia (191) si sono osservate notevoli diminuzioni di IPD da sierotipi vaccinali nei bambini tra 0 e 4 anni soprattutto da quelle associate ai sierotipi 3, 6A e 19A.

Anche nella prevenzione contro l'otite media acuta l'impiego continuativo del PCV13 ha avuto un impatto positivo: in Israele i casi sono diminuiti del 77% (192) ed in Spagna del 69% (193).

CAPITOLO III: SCOPO DELLO STUDIO

Lo *Streptococcus pneumoniae* è un'ospite frequente delle vie respiratorie superiori da dove in presenza di concause predisponenti può raggiungere il tratto più profondo provocando la polmonite di cui è il più frequente agente eziologico.

La maggior parte dei bambini con polmonite di comunità, trattati a domicilio o in ospedale a seconda della gravità del quadro clinico, guarisce in maniera completa con il trattamento medico. In alcuni pazienti, tuttavia, l'evoluzione della malattia può subire un peggioramento e portare a complicanze come l'insufficienza respiratoria, il versamento pleurico, l'ascesso polmonare e la setticemia (194).

In tutto il mondo la polmonite è la prima causa di morte nei bambini. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Salute (OMS), nel 2015 più di 920 000 bambini sono morti a causa di polmonite e il 16% avevano meno di 5 anni (195). Inoltre le infezioni invasive sono anche la causa più frequente di ricovero ospedaliero nei bambini e negli adulti. Sempre alcuni dati forniti dall'OMS, relativamente all'Europa e agli Stati Uniti, riconducono allo *Pneumococco* il 30-50% delle polmoniti che, per la loro gravità, richiedono il ricovero in ospedale; tale percentuale sarebbe più alta nei bambini, visto che alcune stime riconducono allo *Pneumococco* quasi l'80% delle polmoniti lobari (in cui cioè l'infiammazione coinvolge una ampia porzione di lobo polmonare) (196).

L'infezione pneumococcica può essere prevenuta con la vaccinazione. La disponibilità del vaccino anti-pneumococcico coniugato (PCV), prima 7 valente, successivamente 10 valente (PCV10) ed infine 13 valente (PCV13) ha rappresentato un notevole passo avanti nella lotta contro le malattie infettive

pediatriche. La presenza nel vaccino di più recente sviluppo (PCV13) di anticorpi addizionali contro i sierotipi pneumococcici attualmente più implicati nelle patologie pediatriche (19A, 1, 3, 5, 6A, 7) ha portato nei bambini inferiori a 5 anni ad una riduzione del 55% delle infezioni gravi da Pneumococco.

Monitorare l'incidenza reale delle forme invasive causate da Pneumococco ma anche la distribuzione dei sierotipi circolanti è fondamentale per capire l'impatto della vaccinazione: per verificare cioè se avverrà una diminuzione dei sierotipi contenuti nel vaccino e cogliere per tempo l'eventuale emergenza di nuovi sierotipi, base per la messa a punto in futuro di nuovi vaccini. Tali dati portano informazioni aggiuntive ai dati relativi alla copertura vaccinale che sono un importante indicatore di esito di salute, permettendo una completa valutazione dei programmi vaccinali e di individuare eventuali aree d'intervento per migliorare le modalità d'offerta delle vaccinazioni.

A tal proposito è indispensabile avere a disposizione una tecnica diagnostica altamente sensibile e precisa.

Pertanto il presente studio, tramite un'analisi retrospettiva di tutti i dati presenti nel registro di sorveglianza molecolare, si è proposto di:

- descrivere l'eziologia di alcune polmoniti complicate acquisite in comunità nella popolazione pediatrica italiana,
- capire l'impatto che il vaccino coniugato ha avuto sulle PPE/PE,
- determinare la sensibilità della RT-PCR comparandola alla classica metodica microbiologica, nella diagnosi delle PPE.

CAPITOLO IV: MATERIALI E METODI

1. DISEGNO DELLO STUDIO

E' stato condotto uno studio osservazionale retrospettivo su pazienti ricoverati in strutture ospedaliere pediatriche o reparti pediatrici di ospedali generici italiani, con diagnosi di PPE, da Settembre 2006 a Dicembre 2017. I dati sono stati recuperati dal Registro Nazionale di Sorveglianza delle Malattie Batteriche Invasive che è stato iniziato dal Laboratorio di Immunologia dell'Ospedale Pediatrico Anna Meyer di Firenze (qui definito come laboratorio centrale) nel 2006 ed è stato allargato nel 2007 grazie a fondi dedicati derivati dal Centro per la prevenzione e il controllo delle malattie in Italia (CCM). Tutti gli ospedali pediatrici e le unità pediatriche sono stati invitati a parteciparvi. Ogni paziente di cui almeno un campione biologico sia stato testato mediante la Realtime-PCR presso il laboratorio centrale è stato incluso nel registro. Il metodo culturale non è stato considerato un criterio di inclusione ma i risultati, quando resi disponibili, sono stati registrati così come i dati clinici e di laboratorio. I bambini con malattie severe quali fibrosi cistica, immunodeficienze, problemi neurologici o con sospette infezioni nosocomiali sono stati esclusi dallo studio. Tutti i campioni inclusi sono stati raccolti come parte dell'attività diagnostica di routine e valutati in modo anonimo nello studio. Pertanto non è stata necessaria l'approvazione del comitato etico.

2. CASI IN ESAME

Sono stati considerati nello studio quei pazienti, tra 0 e 16 anni, con sospetto clinico e successiva conferma diagnostica di PPE e PE. Per definizione queste polmoniti

acquisite in comunità si caratterizzano per la presenza di febbre > 37,5°C, sintomi respiratori insorti acutamente (tachipnea, difficoltà respiratoria, tosse, dolore addominale, rantoli) e infiltrato polmonare lobare o segmentale con o senza versamento, rilevato mediante una radiografia del torace o l'analisi dei parametri chimico-fisici del liquido pleurico, quando presente (197,198).

3. RT-PCR

Dai centri partecipanti, i campioni per la diagnosi molecolare sono stati inviati, a temperatura ambiente, al laboratorio centrale utilizzando un corriere espresso notturno e analizzati il giorno stesso della consegna durante la regolare attività diagnostica di routine.

Il DNA genomico batterico è stato estratto a partire da 200 µl di campioni biologici di sangue e/o liquidi pleurici usando QIAmp Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguendo il protocollo di estrazione manuale per sangue e fluidi corporei e le istruzioni del produttore.

La diagnosi molecolare è stata effettuata mediante RT-PCR utilizzando un pannello di primers e sonde specifiche per la ricerca di 14 diversi patogeni più frequentemente in causa nelle malattie batteriche invasive in Italia: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp*, *Mycoplasma pneumonia*, *Fusobacterium spp* e *Adenovirus*. Quando la RT-PCR è risultata negativa per tutti i germi testati, le indagini sono proseguite andando ad amplificare e sequenziare il gene dell'RNA del 16s (RNA

altamente conservato che caratterizza la subunità minore dei ribosomi nelle cellule procariote. Questa porzione genica viene utilizzata per ricostruire la filogenesi a causa dei lenti tassi di evoluzione che la colpiscono. Tuttavia presenta regioni ipervariabili che possono fornire sequenze di firme specifiche per l'identificazione dei batteri).

I primers e le sonde sono state costruite utilizzando l'ABI Primer Express Software Package basato su sequenze già pubblicate dei geni identificativi dei vari batteri. Per la ricerca dello Pneumococco i primers e la sonda specifici sono riportati nella tabella di seguito:

GENE	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER	SONDA
Lyt A	5'- ACGCAATCTAGCA GATGAAGC-3'	5'- TGTTTGGTTGGTT ATTCGTGC- 3'	JOE- TTTGCCGAAAACG CTTGATACA GGG-6-CARBOXY- TETRAMETHYL- RHODAMINE(TAMRA)

Per l'amplificazione mediante ABI 7500 FAST RT-PCR (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) sono stati utilizzati 6 µl di DNA estratto in un volume finale di 25 µl contenenti la miscela di reazione TaqMan Universal Master Mix 2X (Applied Biosystem), primers specifici per ogni target alla concentrazione di 300 nM e sonda specifica alla concentrazione di 50 nM. Per ogni singolo germe sono

stati inclusi un controllo positivo (campione positivo al patogeno precedentemente testato) ed uno negativo (acqua distillata) per escludere eventuali problemi legati alla mix di reazione e per validare la seduta. Il profilo termico impostato è stato: 95°C per 10 minuti, seguiti da 45 cicli a due step di temperatura; 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto.

Il DNA genomico batterico è risultato positivo per lo pneumococco se si è osservato un incremento di segnale di fluorescenza per il gene *LytA* entro i 40 cicli di amplificazione, altrimenti è stato considerato negativo. Test di specificità erano stati condotti in precedenza (199). Tutti i campioni positivi sono stati sierotipizzati in un secondo momento.

4. SIEROTIPIZZAZIONE

Partendo dallo stesso estratto di DNA utilizzato per l'identificazione del germe, la determinazione del sierotipo è stata fatta tramite Multiplex Sequential PCR. 31 coppie di primers per i seguenti sierotipi 1, 3, 4, 5, 6A/B, 7F/A, 7C/B, 8, 9V/A, 10A, 11A/D/F, 12A/B/F, 14, 15A, 15B/C, 16F, 17F, 18A/B/C/F, 19A, 19F, 20, 22A/F, 23F, 31, 33A/F, 34, 35B, 35F, 38F sono state raggruppate in nove reazioni multiple seguendo la letteratura (4,5). I primers per *cpsA* (pneumococcal capsular polysaccharide synthesis gene) sono stati inclusi in ciascuna reazione come test di conferma.

Le PCR sono state svolte in volumi di 25 µl con una miscela contenente PCR Master Mix 1X (Qiagen) e primers (2 µM). 5 µl di DNA è stato usato in ogni reazione di PCR e l'amplificazione è stata eseguita in un sistema di PCR Perkin-Elmer GeneAmp 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con profilo termico

con le seguenti condizioni: 95° per 15 minuti seguiti da 35 cicli di amplificazione a 94° per 30 secondi, 54° per 90 secondi e 72° per 60 secondi. Lo step finale è rappresentato da un hold a 72°C for 10 minuti.

I sierotipi pneumococcici sono stati classificati come “sierotipi PCV7” (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F), “sierotipi PCV13” (sierotipi PCV7 + 1, 3, 5, 6A, 7F, 19) e “sierotipi non-PCV13” (i rimanenti sierotipi non inclusi nel vaccino PCV13).

I prodotti della PCR end-point sono stati analizzati con elettroforesi su gel di agarosio al 2% (NuSieve agarose gel Cambrex Bio Science, Inc, Rockland, ME) in TAE 1X buffer. I gel sono stati trattati con bromuro di etidio (0,5 µg/ml⁻¹) e le immagini su gel sono state registrate. Le dimensioni dei prodotti della PCR sono state determinate confrontandole con la dimensione dei markers di peso molecolare (100-bp ladder; Novagen, Inc.)

I campioni che sono risultati negativi per i sierotipi testati con la PCR multiplex, sono stati amplificati in RT PCR per i sierotipi 13, 21, 23A/B, 24, 39 in singole mix per ciascun sierotipo. Se nessuna positività è emersa, un ultimo tentativo di tipizzazione è stato eseguito seguendo il protocollo CST descritto da Elberse et al. nel 2015.

Se nessuna delle metodiche precedentemente descritte ha consentito la determinazione del sierotipo il campione è stato registrato come “non tipizzabile”.

5. VALUTAZIONE DELL'INCIDENZA DELLE PPE/PE E DELL'IMPATTO DELLA VACCINAZIONE

La popolazione toscana ammonta intorno a 3,6 milioni di residenti con circa 30000 nati per anno. Dal 2005 il laboratorio di immunologia è attivo nella sorveglianza

delle malattie pneumococciche invasive e responsabile della gestione mediante la diagnosi e l'archiviazione di tutti i casi pediatrici toscani, secondo decreto. Poiché è molto improbabile che manchino dei casi registrati, è stato possibile calcolare la reale incidenza delle PPE/PE in Toscana prima e dopo l'introduzione nel 2011 del vaccino 13-valente in bambini da 0-6 anni in un arco temporale decennale.

Più difficile è stata calcolarla nei casi provenienti dalle altre regioni italiane poiché la loro partecipazione al registro di sorveglianza e al presente studio è stata del tutto volontaria e non regolamentata da un'ordinanza obbligatoria. Dei casi pertanto non saranno stati né segnalati né riportati nel registro. L'incidenza dei casi di PPE calcolati sull'intera popolazione pediatrica nazionale non rispecchia dunque la reale incidenza in Italia ma consente tuttavia di capire l'impatto del PCV13. Sono stati comparati i bambini tra 0-6 anni, prima e dopo il PCV13, indipendentemente dallo stato vaccinale per capirne gli effetti e valutare se l'introduzione del 13 valente possa aver portato ad una immunità di gregge. È stato inoltre valutato l'impatto della vaccinazione sulla distribuzione dei sierotipi pneumococcici maggiormente responsabili degli empiemi.

6. ANALISI STATISTICHE

Tutti i dati sono stati elaborati con il software di statistica SPSS (Statistical Package for Social Science) ver 21.0 e considerati statisticamente significativi con $p < 0.05$. I risultati sono stati espressi come valore medio, mediana o deviazione standard quando appropriato. Il test del Pearson chi-square test e il Fisher's exact test sono stati usati per stimare differenze di gruppo in variabili suddivise per categorie. Cohen's kappa coefficient e McNemar test sono stati utilizzati per misurare la

concordanza fra i tests. Quando possibile, sono stati calcolati gli ODD Ratio (OD) e gli intervalli di confidenza (ICs) del 95%. Per le variabili continue è stato usato lo Student's t test.

CAPITOLO V: RISULTATI

Nel decennio dello studio sono stati raccolti i dati di 482 bambini con PPE di cui 273 maschi (56.6%; mean age, 5.69±3.70 years; median age, 4.71 years, range IQ, 3.09-7.49 years). I campioni sono stati inviati per l'analisi al laboratorio centrale da quasi tutte le regioni italiane in maniera uniforme e da quelle maggiormente popolate. Queste infatti rappresentano il 91,9% della popolazione italiana inferiore ai 16 anni (<http://demo.istat.it>)

Diagnosi eziologica

Complessivamente è stato possibile fare diagnosi nel 40,2% dei casi (194/482 pazienti). Di alcuni pazienti abbiamo ricevuto solo sangue periferico, di altri solo liquido pleurico, in pochi casi entrambi i materiali. Sono stati analizzati 207 campioni di liquido pleurico e 355 campioni di sangue. Le informazioni ottenute dai liquidi pleurici sono risultate più significative per individuare l'eziologia causa dell'empima. Infatti 160/207 (77,3%) campioni di liquidi pleurici sono risultati positivi contro 67/355 (18,9%) di sangue.

Dei 194 casi diagnosticati, lo Pneumococco è risultato il germe più rappresentativo (142/194; 73,2%), seguito dallo Streptococcus pyogenes (8,8%) e dallo Staphylococcus aureus (4,1%). La distribuzione di tutti gli agenti individuati è riportata nel grafico a torta in fig.3.

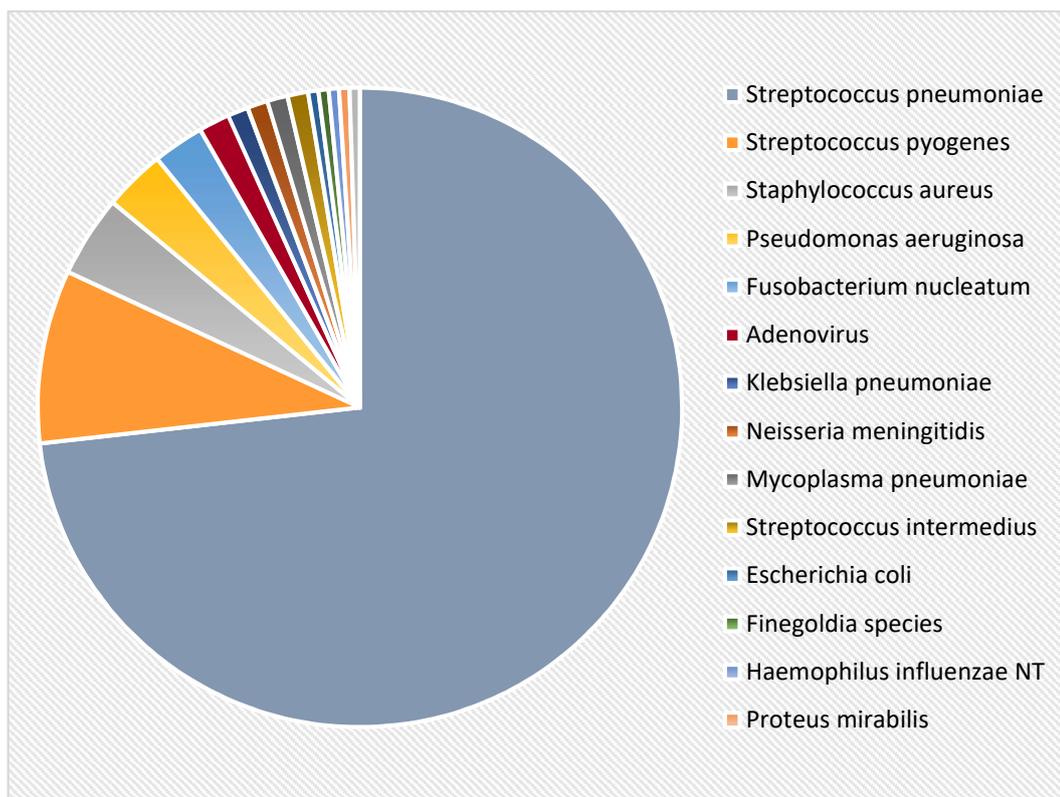


Fig. 3 Etiologia dell'empima pleurico in 194 bambini di età <16

Sono stati inoltre confrontati i casi prima dell'introduzione del PCV13, prendendo un arco temporale che va dal 2006 al 2010, e dopo comprendendo un lasso temporale tra il 2011 ed il 2017. Nell'era pre-PCV13 sono stati individuati 239 casi con PPE in 90 dei quali è stato identificato l'agente patogeno. Lo *S.pneumoniae* si è confermato essere maggiormente presente e precisamente nel 71,1% dei casi (64/90).

Nell'era post-PCV13 sono emersi 243 casi di PPE di cui 104 con eziologia definita. Analogamente a prima del 2011, la presenza dello *S.pneumoniae* è stata stimata nel 75% dei casi (78/104). E' da precisare che dei 78 casi positivi nell'era post PCV-13 la maggior parte dei bambini non erano stati vaccinati con il vaccino 13-valente; in 58/78 casi perché i bambini erano nati prima del 2011, in 9/78 perché o neonati che avevano contratto l'infezione prima della consueta somministrazione della dose

di vaccino prevista dal calendario vaccinale o per scelta dei genitori. Solamente 11/78 bambini avevano ricevuto il PCV13.

Sierotipizzazione dello *Streptococcus pneumoniae*

Grazie all'analisi con RT-PCR o alla PCR end point è stata valutata la distribuzione dei sierotipi prima e dopo il vaccino 13-valente sia nei bambini vaccinati che non. In totale è stato possibile sierotipizzare 127 campioni su 142 risultati, ad una prima analisi, positivi per il target pneumococcico *lytA*; 59 casi nell'era pre- PCV13 e 68 nell'era post-. Di questi ultimi 68 casi va precisato che solamente 9 bambini avevano ricevuto la vaccinazione con 13 valente. Come riportato in fig.4, i sierotipi maggiormente responsabili dell'insorgenza di empiemi sono stati 1 3 7F e 19A con una frequenza del 83% nell'era pre-PCV13 e 91,6% nell'era post, nei bambini che non avevano ricevuto la vaccinazione (n=59). Dei soli 9 casi positivi registrati in bambini vaccinati, solamente i sierotipi 1 e 3 sono stati rilevati con una distribuzione rispettivamente di 1/9 (11,1%) e 8/9 (88.9%).

I sierotipi non inclusi nel PCV13 non sono significativamente aumentati nel corso degli anni. Infatti, prima del 2011, si sono verificati 2/59 (3,4%) casi di cui uno di sierotipo 8 e l'altro sierotipo 20; dopo la vaccinazione con il 13 valente 4/68 (5,9%) casi con un sierotipo ciascuno tra 12, 24, 32, 35F.

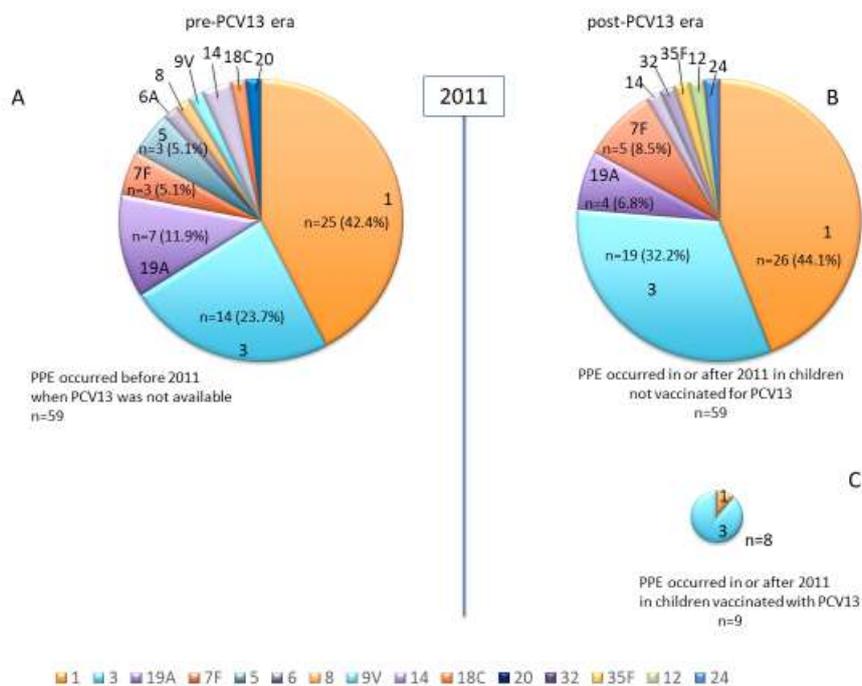


Fig.4 Distribuzione dei sierotipi pneumococcici prima il 2011 (A), dopo il 2011 (B) in bambini non vaccinati con PCV13 e dopo il 2011 (C) in bambini vaccinati con PCV13

Incidenza delle PPE e le PPE pneumococciche in Toscana

I diversi ospedali pediatrici e le unità di pediatria degli ospedali generici toscani hanno partecipato allo studio sin dall'inizio, inviando tutti i campioni dei pazienti con sospetta malattia batterica invasiva al laboratorio centrale. E' stato pertanto possibile calcolare la reale incidenza delle PPE in Toscana e valutare le PPE causate da Pneumococco. I dati sono stati ottenuti da un totale di 157 pazienti pediatrici. A prescindere dalla vaccinazione con PCV13, gli eventi di polmonite complicata dovute alle PPE in bambini tra 0-6 anni sono triplicate, da 3.04 casi per 100000 bambini nel 2007 a 9.17 casi per 100000 bambini nel 2010, per poi

progressivamente diminuire. Nel 2016 è stato registrato solo 1 caso su 100000 bambini e nessun caso nel 2017 (fig.5).

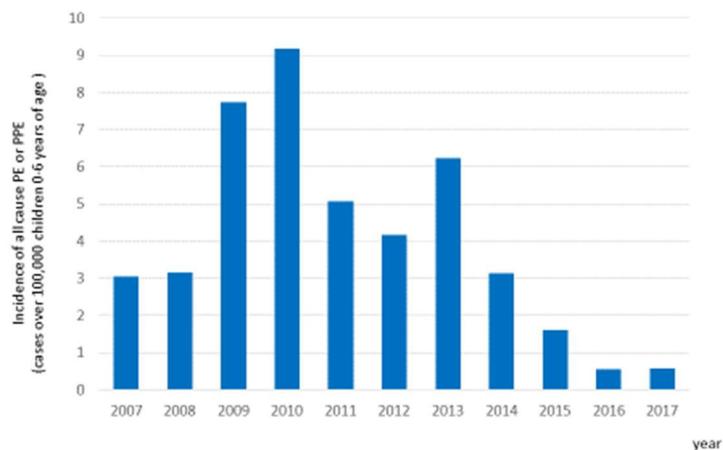


Fig.5 Incidenza delle PPE e PE nei bambini in Toscana tra 0-6 anni

Le PPE pneumococciche invece hanno rappresentato il 71,9% dei casi diagnosticati, confermando lo pneumococco come principale agente eziologico degli empiemi. Tra le PPE causate da pneumococco, 23 casi si sono presentati nell'era pre-PCV13 e 18 nell'era post-. Tutti i 18 casi dell'era post- si sono verificati in bambini non vaccinati con il PCV13; 16 bambini erano nati prima del 2011 e 2 dopo il 2011 ma uno non aveva ricevuto la vaccinazione per scelta dei genitori ed uno aveva contratto l'infezione nei primi mesi di vita.

Impatto della vaccinazione in Italia (era pre- vs e era post-)

Analizzando tutti i dati del registro di sorveglianza molecolare è stato possibile valutare l'incidenza dei casi di effusioni parapneumoniche ed empiemi in bambini tra 0-6 anni sul territorio nazionale. Come riportato in fig.6, i casi di PPE dopo il

2011 sono diminuiti rispetto all'era pre-PCV13, indicando un significativo impatto del vaccino 13-valente; la riduzione è significativa nei bambini tra 3-6 anni, fascia di età dove era stata registrata una maggior incidenza di PPE nell'era pre-PCV13. Tra 3-4 anni si è avuta una diminuzione dell' 81%, tra 4-5 anni del 95,9% e tra 5-6 anni del 100%. Dei casi di PPE pneumococciche nell'era post- 9/20 si sono verificati in bambini non vaccinati, cioè nel 45% dei casi.

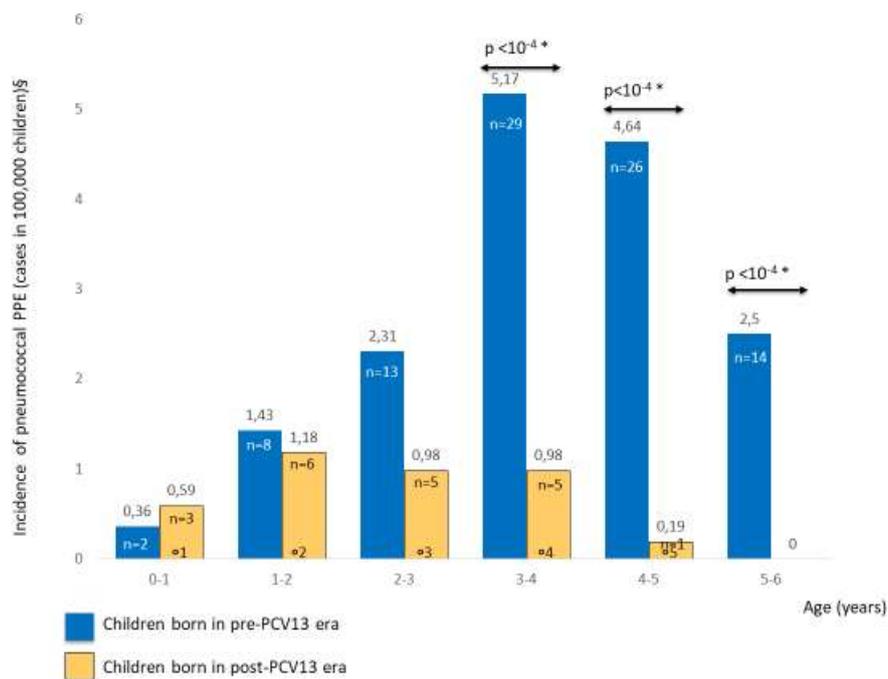


Fig.6 Impatto del vaccino PCV13 in bambini tra 0-6 anni in Italia

Osservando la distribuzione dei principali sierotipi causa degli empiemi non si sono verificati casi associati ai sierotipi 7F e 19A, si sono ridotti del 96,2% i casi associati al sierotipo 1 e del 67,3% al sierotipo 3. L'impatto del vaccino PCV13 sulla distribuzione sierotipica è riportata in fig.7. Da questa analisi sono stati esclusi i bambini nati dopo il 2011 che non hanno ricevuto la vaccinazione con 13-valente.

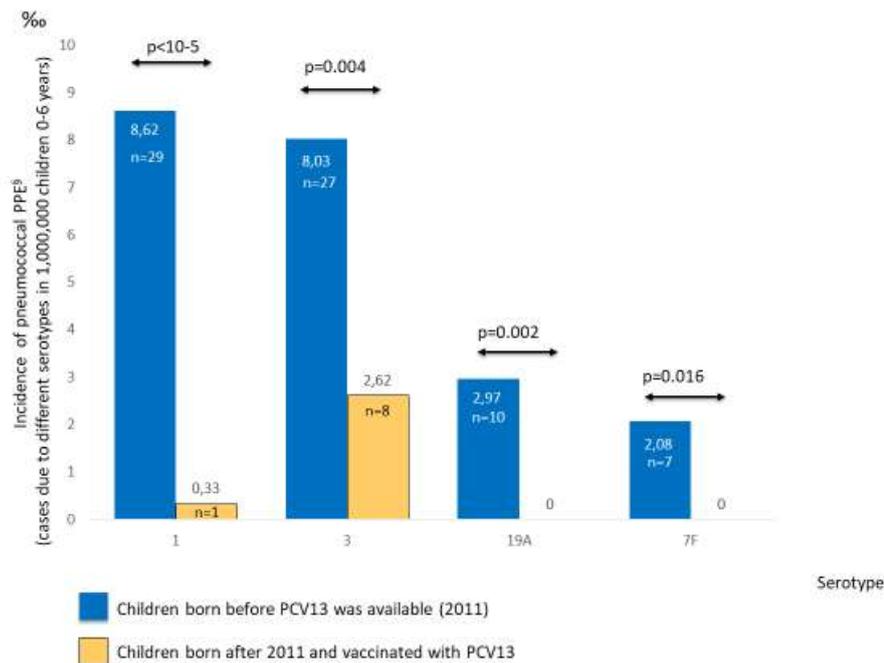


Fig.7 Impatto della vaccinazione con PCV13 sui principali sierotipi causa di empiemi in bambini tra 0-6 anni in Italia

Sensibilità della RT-PCR vs la coltura cellulare

Mediante RT-PCR sono stati processati complessivamente 203 campioni di liquidi pleurici e 357 campioni di sangue periferico mentre con la coltura cellulare rispettivamente 61 e 204 campioni. Con entrambe le tecniche sono stati analizzati 59 liquidi pleurici e 178 campioni di sangue intero. A partire da campioni di liquido pleurico, 160/203 (78,8%) casi analizzati con RT-PCR sono risultati positivi per almeno uno dei germi testati mentre solo 8/61 (13,1%) con la coltura cellulare. Pertanto l'analisi mediante RT-PCR è risultata sei volte più sensibile della coltura cellulare (OR 24.65, 95% CL 10.31-61.01, $p<10^{-5}$). I campioni di sangue intero sono risultati 64/357 (17,9%) positivi grazie all'indagine molecolare e 15/204 (7,4%) grazie alla tecnica microbiologica. In generale l'analisi con RT-PCR è

risultata 2,4 volte più sensibile della coltura cellulare (OR 2.75, 95% CL 1.48-5.20, $p < 10^{-4}$).

I risultati non sono cambiati in quei campioni, sia di liquido pleurico che di sangue, in cui entrambe le tecniche sono state utilizzate per l'indagine eziologica. La statistica calcolata è rispettivamente per i liquidi pleurici OR 0.023, 95% CI 0.001-0.137; Cohen's k coefficient 0.008; McNemar $p < 10^{-5}$; per i campioni di sangue periferico OR 0.129, 95% CI 0.033-0.365; Cohen's k coefficient 0.258; McNemar $p < 10^{-5}$).

CAPITOLO VI: DISCUSSIONE

Da ricerche approfondite in letteratura, questo lavoro risulterebbe essere uno dei più grandi studi in Europa condotto su un'ampia raccolta dati di pazienti pediatrici affetti da PPE. Confermando quanto già osservato precedentemente negli Stati Uniti e in Canada (22,200), in questo studio è emerso che lo *Streptococcus Pneumoniae* è il principale agente eziologico responsabile delle PPE. Infatti i casi associati a pneumococco sono stati oltre il 73%. Un'ampia varietà di altri organismi sono stati rilevati mediante la RT-PCR e dopo lo *S.Pneumoniae*, il secondo patogeno più comune è stato lo *S.pyogenes*, concorde con i dati pubblicati in recenti studi sulla popolazione infantile in Canada (121).

E' stato valutato l'impatto che il vaccino 13 valente ha avuto nella popolazione pediatrica prima e dopo la sua introduzione, prendendo come spartiacque il 2011. Se comparate l'era pre- e l'era post, il numero di eventi di PPE dovuti allo *S.Pneumoniae* è stato simile 71,1% vs 73,9%. Tuttavia più dell'85% dei bambini con diagnosi di PPE nell'era post- non erano stati vaccinati con il PCV13 poiché la maggior parte era grande quando il 13 valente è stato introdotto nei piani vaccinali e non erano stati pianificati in Italia programmi di vaccinazione con PCV13 per i bambini >2 anni, nonostante fosse stato dimostrato in altri stati la sua efficacia anche in età pediatrica avanzata.

In questo studio è stato dimostrato un significativo impatto del PCV13 sulle CAP complicate come le PPE: raggruppando i bambini per fasce di età e comparando le diverse classi prima e dopo il 2011, è stata trovata una differenza tra i due periodi maggiormente significativa con l'aumentare dell'età. Inoltre è stato registrato un

aumento parallelo del numero di bambini affetti da PPE nell'era pre PCV13, rafforzando quindi l'idea che il PCV13 abbia contribuito alla riduzione dei casi di PPE. Se i bambini non vaccinati nell'era post- vengono esclusi da questa analisi, l'incidenza appare significativamente diversa in tutte le classi di età ad eccezione del primo anno di vita. Questo dato era previsto dal momento che anche quando vaccinati i bambini in quella classe di età non avevano completato il programma di vaccinazione.

La distribuzione dei più comuni sierotipi causa di empiemi (1, 3, 19A, 7F) inoltre è risultata significativamente cambiata con l'introduzione del vaccino 13 valente. Infatti nei bambini vaccinati con PCV13 si è avuto una riduzione del 100% dei sierotipi 19A e 7F, di più del 95% del sierotipo 1 e circa del 67% del sierotipo 3. Un minor impatto del vaccino sul sierotipo 3 non è una sorpresa; recenti studi su altre IPD hanno dimostrato che l'efficacia del PCV13 contro il sierotipo 3 è inferiore rispetto agli altri sierotipi come 7F e 19A (83, 201, 202) . Inoltre per prevenire le polmoniti e le complicazioni legate ad infezioni da Pneumococco è necessaria una concentrazione di anticorpi polisaccaridici anticapsulari elevatissima che non sempre è possibile raggiungere con i classici protocolli di vaccinazione soprattutto per alcuni specifici sierotipi, quale ad esempio il 3(202). Dovrebbe essere presa in considerazione la possibilità di fare più dosi del vaccino al fine di ottenere un titolo anticorpale più elevato ed una protezione più garantita contro questo sierotipo.

Precedenti lavori su pazienti pediatrici hanno dimostrato che l'introduzione del PCV13 ha portato ad una significativa riduzione delle malattie pneumococciche invasive tuttavia l'incidenza dei sierotipi non inclusi nel vaccino è aumentata,

suggerendo il fenomeno della “sostituzione sierotipica” (83). Differentemente da ciò che è stato descritto nelle altre IPD, come sepsi e meningiti (83, 203), i nostri dati non confermano quest’ultima teoria. Non è stato infatti osservato nessun incremento di quei sierotipi esclusi dal PCV13. Una possibile spiegazione è che le PPE pneumococciche sono principalmente causate da un limitato numero di sierotipi (204). Fra questi i principali sono proprio 1, 3 e 19A che hanno un forte tropismo per il polmone e il tessuto pleurico come dimostrato in precedenti lavori (24, 204) e dall’aumento parallelo dell’incidenza delle PPE e di questi sierotipi negli anni precedenti alla vaccinazione (22,205).

Un’altra importante valutazione, condotta in questo studio, è stata osservare una possibile immunità di gregge conseguente alla vaccinazione. Dati emersi da più studi sulla vaccinazione con PCV7 avevano messo in evidenza un decremento dei sierotipi presenti nel vaccino in tutte le classi di età (206). Differentemente la protezione di gregge per i 6 sierotipi aggiunti nel PCV13 (1, 3, 5, 6A, 7F, 19A) è dibattuta (18, 207). I nostri dati suggeriscono un’immunità di gregge contro le PPE nei bambini non vaccinati dopo il 2011 ridotta, nonostante la copertura vaccinale dei neonati in Italia sia dell’85% (http://www.epicentro.iss.it/temi/vaccinazioni/dati_Ita).

La distribuzione sierotipica nelle PPE nei bambini non vaccinati con il 13 valente non è cambiata nel tempo ed i sierotipi più comuni sono rimasti i più rappresentativi; prima del 2011 l’incidenza è stata dell’83%, dopo l’introduzione del vaccino del 91,6%. Nel limitato numero di casi (n=10) individuati nei bambini vaccinati un singolo caso è stato causato dal sierotipo 1 e nove dal 3. Questi dati

sono concordi con quanto pubblicato recentemente in USA (27) e suggeriscono che la protezione contro le PPE non si può raggiungere con l'immunità di gregge.

La discrepanza sull'effetto protettivo di gregge tra il PCV7 ed il PCV13 è ancora da capire ed approfondire. Una possibile spiegazione sta nel fatto che i sierotipi presenti nel PCV7 sono stati frequentemente trovati nel tratto naso-faringeo dei portatori oltre che nelle IPD. Il vaccino eptavalente ha pertanto facilitato la riduzione di questi sierotipi nei tratti respiratori dei vaccinati, riducendo anche la possibilità di trasmissione tra il portatore e l'individuo che non ha sviluppato direttamente immunità (168,198). Diversamente i sierotipi aggiuntivi presenti nel PCV13 non sono stati trovati comunemente nei portatori Italiani (178,179). Pertanto l'impatto della vaccinazione sui portatori e di conseguenza sulla protezione di gregge contro le IPD può essere limitata. In questo caso la vaccinazione diretta di ciascun individuo aiuterebbe l'interruzione della catena di infezione.

I dati hanno mostrato inoltre che l'analisi a partire da liquido pleurico ha permesso più facilmente di arrivare ad una diagnosi eziologica piuttosto che da campioni di sangue intero; rispettivamente nel 73,3% dei casi contro il 18,9%. D'altronde la polmonite non è conseguenza di una prolungata batteriemia. Una complicazione dell'infiammazione localizzata invece può comportare l'invasione del torrente circolatorio da parte dell'agente patogeno e dare dunque batteriemia (24). L'indagine molecolare mediante RT-PCR si è verificata la metodica maggiormente sensibile per definire l'eziologia delle PPE. Nel sangue è stata fatta diagnosi nel 17,9% dei casi contro i 7,4% individuati con il metodo culturale, nel liquido pleurico addirittura nel 78,8% dei casi contro il 13,1%. Questi dati supportano

quanto precedentemente descritto in altri lavori (24,178,208,209). A sfavore del metodo culturale giocano le precoci terapie antibiotiche ed il collezionamento, l'invio e la conservazione dei campioni. Tutti questi fattori contribuiscono ad una riduzione nella sensibilità del metodo più di quanto non lo sia per la RT-PCR. La stabilità del DNA rispetto alla vitalità del batterio permane a temperatura ambiente anche per lunghi tempi.

Questo studio presenta però dei limiti. Innanzitutto non è stato possibile calcolare la reale incidenza delle PPE e delle PPE pneumococciche a livello nazionale, poiché la partecipazione delle regioni, ad eccezione della Toscana, al progetto di sorveglianza è stato su base volontaria e non seguendo un decreto amministrativo. Purquanto l'invio dei campioni, per l'analisi al laboratorio centrale da quasi tutte le regioni italiane, sia avvenuto in maniera uniforme e da parte di quelle maggiormente popolate, ci sono dei casi mancanti. Differentemente sono state possibile calcolarle a livello toscano dato che i dati di sorveglianza delle infezioni pneumococciche sono stati raccolti dallo stesso ospedale di terzo livello in cui tutti i casi di CAP complicate sono stati diagnosticati. E' pertanto improbabile la mancanza di alcuni casi. Tuttavia l'obiettivo di questo studio non è stato tanto la valutazione della reale incidenza delle PPE quanto valutare l'impatto che il vaccino PCV13 ha avuto sulle PPE pediatriche in un decennio di sorveglianza. Con 482 casi di PPE, di cui 194 con etiologia definita, questo registro rappresenta la più grande collezione di PPE pediatriche in Europa, secondo indagini in letteratura. I dati ottenuti in Toscana mostrano la reale incidenza delle PPE ed efficacia del vaccino rinforzando quanto osservato a livello nazionale.

Un altro limite è rappresentato dal pannello di soli 14 patogeni che è stato testato per ogni singolo campione, venendo a mancare la possibile diagnosi eziologica a carico di altri germi di origine batterica o virale. Ciononostante con il set di sonde e primers incluse nello studio è stato possibile identificare la causa quasi nell'80% dei liquidi pleurici. Anche mediante l'uso della sequenza 16s come target di amplificazione è stato possibile individuare altri patogeni. La metodica basandosi su una semplice PCR end point rimane comunque meno sensibile della RT-PCR (. Sarà interessante e necessario con futuri studi, valutare anche il ruolo delle infezioni virali nell'epidemiologia delle PPE/PE in Italia. In conclusione da questo studio è emerso che l'immunizzazione acquisita con PCV13 ha significativamente ridotto l'insorgenza di PPE nei vaccinati pediatrici, senza un aumento dello shift sierotipico e l'incremento delle PPE dovute ad altri patogeni. Inoltre una immunizzazione di gregge dalle PPE nella popolazione suscettibile sembra limitata e la RT-PCR nei liquidi pleurici è essenziale per fare diagnosi e per monitorare i programmi vaccinali.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Blasi F, Aliberti S, Bonanni P et al. Pneumococcal vaccination in adults: recommendations from the Italian Society of Respiratory Medicine (SIMeR) and the Italian Society of Hygiene, Preventive Medicine and Public Health (SIItI)]. *Epidemiol Prev.* 2014 Nov-Dec; 38(6 Suppl 2):147-51.
- 2) Varon E, Mainardi JL, Gutmann L. *Streptococcus pneumoniae*: still a major pathogen. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:401.
- 3) World Health Organization. Pneumococcal disease. www.who.int/immunization/diseases/pneumococcal/en/. Last update 29 September 2014
- 4) Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004;4:144-54
- 5) Almeida ST, Nunes S, Santos Paulo AC et al. Low prevalence of pneumococcal carriage and high serotype and genotype diversity among adults over 60 years of age living in Portugal. *One.* 2014; 9(3):e90974.
- 6) Torres A, Peetermans WE, Viegi G et al. Risk factors for community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Thorax* 2013;68:1057-65.
- 7) Torres A, Blasi F, Peetermans WE et al. The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33(7):1065-79.
- 8) Simonsen L, Taylor RJ, Young-Xu Y et al. Impact of pneumococcal conjugate vaccination of infants on pneumonia and influenza hospitalization and mortality in all age groups in the United States. *MBio* 2011; 2(1):e00309-10
- 9) Griffin MR, Zhu Y, Moore MR et al. US hospitalizations for pneumonia after a decade of pneumococcal vaccination. *N Engl J Med* 2013; 369(2):155-63.
- 10) Ardanuy C, Tubau F, Pallares R et al. Epidemiology of invasive pneumococcal disease among adult patients in Barcelona before and after pediatric 7-valent pneumococcal conjugate vaccine introduction, 1997–2007. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 57-64.
- 11) Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate

vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis* 2010; 14: e197-209.

- 12) Isaacman DJ, Strutton DR, Kalpas EA et al. The impact of indirect (herd) protection on the cost-effectiveness of pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Ther* 2008; 30(2):341-57.
- 13) O'Brien KL, Dagan R. The potential indirect effect on conjugate pneumococcal vaccines. *Vaccine* 2003; 21: 1815-25.
- 14) Bridy-Pappas AE, Margolis MB, Center KJ. *Streptococcus pneumoniae*: description of the pathogen, disease epidemiology, treatment and prevention. *Pharmacotherapy* 2005; 25:1193-212.
- 15) Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiology differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:83-93.
- 16) Sandgren A, Sjostrom K, Olsson-Liljequist B et al. Effect of clonal and serotype-specific properties on the invasive capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 2004; 189(5):785-96.
- 17) Khoshdel A, Rastabi RI, Doosti A et al. Prevalence of Heptavalent Vaccine-related Pneumococcal Serotypes in Nasopharyngeal carrier in children under five years old in Shahrekord, Iran by Multiplex-PCR during 2010-2011. *J Clin Diagn Res* 2014; 8(11):PC01-4.
- 18) Nieddu F, Moriondo M, De vitis E et al PCV13 serotype decrease in Italian adolescents and adults in the post-PCV13 era: Herd protection from children or secular trend? *Vaccine* 2017;13;35(11):1544-50.
- 19) Bradley JS, Byington CL, Shan SS et al. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2011;53:225-76.
- 20) [Lim WS, Rodrigo C. British Thoracic Society adult community acquired pneumonia audit 2012/13. 2013. Disponibile a: https://www.brit-thoracic.org.uk/document-library/audit-and-quality-improvement/audit-reports/bts-adult-community-acquired-pneumonia-audit-report-201213.](https://www.brit-thoracic.org.uk/document-library/audit-and-quality-improvement/audit-reports/bts-adult-community-acquired-pneumonia-audit-report-201213) Ultimo accesso 28 aprile 2015.
- 21) [Luna CM, Pulido L, Niederman MS](#) et al. Decreased relative risk of pneumococcal pneumonia during the last decade, a nested case-control study. [Pneumonia \(Nathan\)](#) 2018 Sep 25;10:9.
- 22) Strachan RE, Cornelius A, Gilbert GL, et al. Bacterial causes of empyema in children, Australia, 2007-2009. *Emerg Infect Dis*, 2011;17(10):1839-45.

- 23) Li ST, Tancredi DJ. Empyema hospitalizations increased in US children despite pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* 2010;125(1):26-33.
- 24) Resti M, Moriondo M, Cortimiglia M, et al. Community-acquired bacteremic pneumococcal pneumonia in children: diagnosis and serotyping by real-time polymerase chain reaction using blood samples. *Clin Infect Dis* 2010;51(9):1042-9.
- 25) Nath S, Thomas M, Spencer D et al. Has the incidence of empyema in Scottish children continued to increase beyond 2005? *Arch Dis Child*, 2015;100(3):255-8.
- 26) Saxena S, Atchison C, Cecil E et al. Additive impact of pneumococcal conjugate vaccines on pneumonia and empyema hospital admissions in England *J Infect* 2015;71:428-36.
- 27) Olarte L, Barson WJ, Barson RM, et al. Pneumococcal pneumonia requiring hospitalization in US children in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era. *Clin Infect Dis* 2017; 64(12):1699-704.
- 28) Davis DB, Dulbecco R, Eisen HN et al. "Microbiologia medica" Editoriale Grasso 1982 cap 17:pp.320-26.
- 29) La Placa M. "Principi di microbiologia medica". 13°ed. Società editrice Esculapio 2012;cap.15:pp229-233.
- 30) Azzari C, Moriondo M, Cortimiglia M et al. Potential serotype coverage of three pneumococcal conjugate vaccines against invasive pneumococcal infection in Italian children. *Vaccine* 30 (2012) 2701-2705.
- 31) Duguid JP, Marmian BP, Swain RHA. "Microbiologia medica" Editoriale Grasso 1982 cap.17: pp.320-26.
- 32) Boyd RF. "fondamenti di microbiologia medica" Antonio Delfino Editore, 1996 cap.17:pp 258-61.
- 33) Todar K 2012 cap 1. www.textbookofbacteriology.net
- 34) La Placa M. Principi di microbiologia medica. 13°ed. Società editrice Esculapio, 2005 cap.15:pp238-42.
- 35) Hyams C, Camberlein E, Cohen JM. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms *Infect Immun* 2010;78(2):704-15.
- 36) Murray P.R, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiologia medica*. 8° Edizione. Edra 2017
- 37) McDaniel LS, Thornton JA, McDaniel OD. Use of Cdna microarrays to analyze responses to pneumococcal virulence factors. *Indian J Med Res* 2004;119(Suppl):99-103.

- 38) Barocchi MA, Ries J, Zogaj X et al. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(8):2857-62.
- 39) Kim JO, Weiser JN. Association of intrastain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1988;177:368-77.
- 40) Conte MP, Mastromarino P. "Microbiologia medica, batteriologia e virologia". 4° ed 2015. Società editrice esculapio.
- 41) Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A et al. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 2005;73(8):4653-67.
- 42) Cabellos C, MacIntyre DE, Forrest M et al. Differing roles for platelet activating factor during inflammation of the lung and subarachnoid space. The special case of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Invest* 1992;90(2):612-18.
- 43) Gillespie SH, Balakrishnan I. Pathogenesis of pneumococcal infection. *J Med Microbiol* 2000;49(12):1057-67.
- 44) Balakrishnan I, Crook P, Morris R et al. Early predictors of mortality in pneumococcal bacteraemia. *J Infect* 2000;40(3):256-61.
- 45) Angel CS, Ruzek M, Hostetter MK. Degradation of C3 by streptococcus pneumoniae. *J Infect Dis* 1994;170:600-8.
- 46) Chudwin DS, Artrip SG, Korenblit A et al. Correlation of serum opsonins with in vitro phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1985;50:213-17.
- 47) Gordon DL, Johnson GM, Hostetter MK. Ligand-receptor interactions in the phagocytosis of virulent *Streptococcus pneumoniae* by polymorphonuclear leukocytes. *J Infect Dis* 1986;154(4):619-26.
- 48) Kelly T, Dillard JP, Yother J. Effect of genetic switching of capsular type on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1994;62:1813-19.
- 49) Abeyta M, Hardy GG, Yother J et al. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of streptococcus pneumonia. *Infect Immun* 2003;71:218-25.
- 50) Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J clin Invest* 1988;102(2):347-60.

- 51) Rijineveld AW, Floriquin S, Branger J. Et al. TNF-alpha compensates for the impaired host defense of IL-1 type I receptor-deficient mice during pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 2001;167(9):5240-46.
- 52) Rupprecht TA, Angele B, Klein M et al. Complement C1q and C3 are critical for the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the central nervous system *J Immunol* 2007;178(3):1861-69.
- 53) Carlsen BD, Kawana M, Kawana C et al. Role of the bacterial cell wall in middle ear inflammation caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1992;60:2850-54.
- 54) Nelson AI, Roche AM, Gould JM, et al. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun* 2003;71:218-25.
- 55) Quin LR, Moore QC, McDaniel LS et al. Pneumolysin, PspA and PspC contribute to pneumococcal evasion of early innate immune responses during bacteremia in mice. *Infect Immun* 2007;75:83-90.
- 56) Hoffmann O, Braun JS, Becker D. et al. TRL2 mediates neuroinflammation and neuronal damage. *J Immunol* 2007;178:6476-81.
- 57) Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol* 2007;9:633-44.
- 58) Rapporto "Interim" 2017, Sorveglianza delle malattie batteriche invasive in Italia con dati aggiornati al 19 marzo 2018. Dip. Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità Roma.
- 59) Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL et al. "Principi di medicina interna" 17° ed società italiana editrice McGraw-Hill parte 7 pp 850-56.
- 60) Invasive pneumococcal disease- Annual Epidemiological Report 2016. ECDC
- 61) Gray BM et al Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: antibody response to nasopharyngeal carriage of types 3, 19 and 23. 1981 *J. Infect Dis* 144:312-18.
- 62) Hogberg L, et al. Age- and serogroup-related differences in observed duration of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant pneumococci. 2007. *J Clin Microbiol* 45:948-52.
- 63) Nelson WE, Behrman RE, Kliegman RM et al. "Trattato di pediatria" XVII edizione ed Minerva Medica 2003 cap 167:pp.867-69.
- 64) Stoodley P, Sauer K, Davies DG, et al. Biofilm as complex differentiated communities. 2002 *Annu Rev Microbiol* 56:187-209.

- 65) Marks LR, Parameswaran GI, Hakansson AP. Pneumococcal Interactions with epithelial cells are crucial for optimal biofilm formation and colonization in vitro and in vivo. *Infect Immun* 2012 80(8):2744.
- 66) Lewis K Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. 2008 *Curr Top Microbiol Immunol* 322:107-131.
- 67) Bartolozzi G. "Pediatria: principi e pratica clinica". 4°edizione. Edra Masson 2013 33:688-99.
- 68) Kim PE, Musher DM, Glezen WP et al. association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution and the isolation of respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 1996;22(1):100-6.
- 69) Speshock JL, Doyon-Reale N, Rabah R et al. filamentous influenza A virus infection predisposes mice to fetal septicemia following superinfection with *Streptococcus pneumoniae* serotype 3. *Infect Immun* 2007;75(6):3102-11.
- 70) Smith MW, Schmidt JE, Rehg JE et al. induction pro- and anti-inflammatory molecules in a mouse model of pneumococcal pneumonia after influenza. *Compl Med* 2007;57(1):82-9.
- 71) McCullers JA, Bartmess KC. Role of neuroaminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J infect Dis* 2003;187(6):1000-9.
- 72) Peltola VT, Murti KG, McCullers JA. Influenza virus neuraminidase contributes to secondary bacterial pneumonia. *J Infect Dis* 2005;192(2):249-57.
- 73) O'Brien KL, Walters MI, Sellman J et al. Severe pneumococcal pneumonia in previously healthy children: role of preceding influenza infection. *Clin Infect Dis* 2000;30(5):784-9.
- 74) Hament JM, Aerts PC, Fleer A et al. Direct binding of respiratory syncytial virus to pneumococci: a phenomenon that enhances both pneumococcal adherence to human epithelial cells and pneumococcal invasiveness in a murine model. *Pediatr Res* 2005;58(6):1198-203.
- 75) Stark JM, Stark MA, Colasurdo GN et al. Decreased bacterial clearance from the lungs of mice following primary respiratory syncytial virus infection. *J Med virol* 2006;78(6):829-38.
- 76) Bartolozzi G, Guglielmi M *Pediatria: principi e pratica clinica*. Edizione Edra Masson 2003 cap 15:pp415-18.
- 77) Hackela M, Lascolsa C, Bouchillon S, et al. serotype prevalence and antibiotic resistance in populations. 2013 *Vaccine* 1;31(42):4881-7.

- 78) CDC laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus Pneumoniae* and *Hemophilus influenzae*. 1998 Chapt.VI pp18-19.
- 79) Hall LM. Application of molecular typing to the epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Pathol* 1988;51:270-74.
- 80) [Wyres](#) KL, [Lambertsen](#) LM, [Croucher](#) NJ et al. Pneumococcal Capsular Switching: A Historical Perspective *J Infect Dis* 2013 1; 207(3): 439-49.
- 81) Who. Position paper. 23 March 2007, 82nd year No.12 2007;82:93-104.
- 82) Steenhoff A, Shah SS, Ratner AJ. Et al. Emergence of vaccine-related pneumococcal serotype as a cause of bacteremia. *Clin Infect Dis* 2006;42:907-14.
- 83) Waight PA, Andrews NJ, Ladhani SN et al. 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;15(5):535-43.
- 84) Simonsen L, Taylor RJ, Young-Xu Y et al. Impact of pneumococcal conjugate vaccination of infants on pneumonia and influenza hospitalization and mortality in all age groups in the United States. *MBio* 2011;2(1):e00309-10.
- 85) Harboe ZB, Valentiner-Branth P, Benfield TL et al. Early effectiveness of heptavalent conjugate pneumococcal vaccination on invasive pneumococcal disease after the introduction in the Danish Childhood Immunization Programme. *Vaccine* 2010;28(14):2642–7.
- 86) Rodenburg G, de Greeff S, Jansen A et al. Effects of pneumococcal conjugate vaccine 2 years after its introduction, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 2010;16(5):816–23.
- 87) Gherardi G, Whitney CG, Facklam RR et al. Major related sets of antibiotic-resistant pneumococci in the United States as determined by pulsed-field gel electrophoresis and *pbp1a-pbp2b-pbp2x-dhf* restriction profile. *J Infect Dis* 2000;181:216-29 .
- 88) Butler JC, Breiman RF, Lipman HB et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994: implication for development of conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1995;171:885-9.
- 89) Dagan R, et al. Replacement independent of vaccine pressure. 47th ICAAC, Chicago, September 17-20,2007.

- 90) Dagan R, Givon-Lavi N, Leibovitz et al. Introduction and proliferation of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19° clones that cause acute otitis media in an unvaccinated population. *J Infect Dis* 2009;199:776-85.
- 91) Hanage WP, Fraser C, Tang J et al. Hyper-recombination, diversity and antibiotic resistance in pneumococcus. *Science* 2009;324:1454-7.
- 92) Bartolozzi G, Guglielmi M “Pediatria: principi e pratica clinica”. Edizione Edra Masson 2003 cap 24:pp983.
- 93) Contessa C, Baldo V. Infezioni da pneumococco. 2013, aggiornato 2018 www.vaccinarsi.org
- 94) Nelson WE, Behrman RE, Kliegman RM et al. “Trattato di pediatria” XVII edizione Minerva Medica, 2003 cap 594:pp.2040-44.
- 95) Kumar V, Abbas AK, Fausto N et al. Robbins Basic Pathology (8th ed.). Saunders Elsevier 2007 pp. 810–11.
- 96) Dich VQ, Nelson JD, Haltalin KC. Osteomyelitis in infants and children. A review of 163 cases. *Am J Dis Child* 1975;129:1273-78.
- 97) Nelson WE, Behrman RE, Kliegman RM et al. “Trattato di pediatria” XVII edizione Minerva Medica, 2003 cap 674:pp.2297-302.
- 98) Morlacchi C, Mancini A. *Clinica Ortopedica*. Piccin 2012 p.148.
- 99) Nelson WE, Behrman RE, Kliegman RM et al. “Trattato di pediatria” XVII edizione Minerva Medica, 2003 cap 146:pp.808-9.
- 100) Bartolozzi G, Guglielmi M “Pediatria: principi e pratica clinica”. Edizione Edra Masson 2003 cap 26:pp1026.
- 101) Wellington M, Hall CB., [Is pacifier use a risk factor for acute otitis media? A dynamic cohort study.](#), in *Fam Pract* 25(4), 2008, pp. 233-6.
- 102) Vierucci A, Careddu P, Castello MA et al. “Pediatria generale e specialistica” casa editrice Ambrosiana 2002 cap.10:310-15.
- 103) Bartolozzi G, Guglielmi M “Pediatria: principi e pratica clinica”. Edizione Edra Masson 2003 cap 17:pp690.
- 104) Richards A, Guzman-Cottrill JA, Conjunctivitis. in *Pediatr Rev* vol. 31, n° 5, May 2010, pp. 196–208.
- 105) Martin M, Turco JH, Zegans ME et al. An outbreak of conjunctivitis due to atypical *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med* 2003;348(12):1112-21.
- 106) De Seta L, Pannuti F, De Seta F. “La polmonite in età evolutiva: dalla diagnosi alla terapia”. *Quaderni acp* 2013;20(3):100-8.

- 107) Smyth A, Carty H, Hart CA. clinical predictors of hypoxaemia in children with pneumonia. *Ann Trop Paediatr* 1998;18(1):31-40.
- 108) Palafox M, Guiscafre H, Reyes H et al. diagnostic value of tachypnoea in pneumonia defined radiologically. *Arch Dis Child* 2000;82(1):41-5.
- 109) Hazir T, Nisar YB, Qazi SA et al. Chest radiography in children aged 2-59 months diagnosed with non-severe pneumonia as defined by World Health Organization: descriptive multicentre study in Pakistan. *BMJ* 2006;333(7569):629.
- 110) Pulliam PN, Attia MW, Cronan KM. C-reactive protein in febrile children 1 to 36 months of age with clinically undetectable serious bacterial infection. *Pediatrics* 2001;108(6):1275-9.
- 111) Murphy CG, van de Pol AC, Harper MB et al. Clinical predictors of occult pneumonia in the febrile child. *Acad Emerg Med* 2007;14(3):243-9.
- 112) Galeotto-Lacour A, Zamora SA, Gervais A. beside procalcitonin and C-reactive protein tests in children with fever without localizing sign of infection seen in a referral center. *Pediatrics* 2003;112(5):1054-60.
- 113) Isaacman DJ, Shults J, Gross TK et al. predictors of bacteremia in febrile children 3 to 36 months of age. *Pediatrics* 2000;106(5):977-82.
- 114) Peltola V, Mertsola J, Ruuskanen O. Comparison of total white blood cell count and serum C-reactive protein levels in confirmed bacterial and viral infections. *J Pediatr* 2006;149(5):721-4.
- 115) Pratt A, Attia MW. Duration of fever and markers of serious bacterial infection in young febrile children. *Pediatr Int* 2007;49(1):31-5.
- 116) Iacobelli J, Lippi F, Canessa C et al. "Diagnosi molecolare delle malattie invasive" aggiornamento scientifico 2010. www.aip-it.org
- 117) Resti M, Micheli A, Moriondo M et al. Comparison of the effect of antibiotic treatment on the possibility of diagnosis invasive pneumococcal disease by culture or molecular methods: a prospective, observational study of children and adolescents with proven pneumococcal infection. *Clin Ther* 2009;31(6):1266-73.
- 118) Murdoch DR. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. *CID* 2003;36:1162-70.
- 119) Azzari C, Nieddu F, Moriondo M et al. Underestimation of invasive meningococcal disease in Italy. *Emerg Infect Dis* 2016;22(3):469-75.
- 120) Azzari C, Moriondo M, Indolfi G et al. Realtime PCR is more sensitive than multiplex PCR for diagnosis and serotyping in children with culture negative pneumococcal invasive disease. *Plos one* 2010; 5(2):e9282.

- 121) Pernica JM, Moldovan I, Chan F et al. Real-time polymerase chain reaction for microbiological diagnosis of parapneumonic effusions in Canadian children. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2014;25(3):151-4.
- 122) Wagner K, Springer B, Imkamp F et al. Detection of respiratory bacterial pathogens causing atypical pneumonia by multiplex Lightmix RT-PCR. 2018;308(3):317-323.
- 123) Moriondo M, Nieddu F, Azzari C et al. Le infezioni pneumococciche dell'adulto in Italia e la possibilità di prevenzione. *Rivista Società Italiana di medicina generale* n2 2012.
- 124) Bartlett JMS, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology*. 2003;226(2):3-6.
- 125) Mullis KB. Process for amplifying, detecting and/or cloning nucleic acid sequences. US Patente 4,683,195.
- 126) Saiki R, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350-54.
- 127) Saiki R, Gelfand D, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239(4839):487-91.
- 128) PCR. Genetic Science Learning Center. University of Utah
- 129) Taq polimerasi: dalla banca dati Swiss-Prot www.uniprot.org
- 130) Verhelst R, Kaijalainen T, De Baere T et al. Comparison of five genotypic techniques for identification of optochin-resistant pneumococcus like isolates. *J Clin Microbiol*. 2003;41(8):3521-25.
- 131) Morrison KE, Lake D, Crook J et al. Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):434-37.
- 132) Toikka P, Nikkari S, Ruuskanen O et al. Pneumolysin PCR-based diagnosis of invasive pneumococcal infection in children. *J Clin Microbiol*. 1999;37(3):633-37.
- 133) Virolainen A, Salo P, Jero J et al Comparison of PCR assay with bacterial culture for detecting *Streptococcus pneumoniae* in middle ear fluid of children with acute otitis media. *J Clin Microbiol*. 1194;32(11):2267-70.
- 134) Hassan-King M, Baldeh I, Secka O et al. detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA blood cultures by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994;32(7):1721-4.

- 135) Suzuki N, Mayumi Y, Sinsaku M et al. Genotypic identification of presuptive *Streptococcus pneumoniae* bu PCR using four genes highly specific for *S. pneumoniae*. *J Med Microbiol* 2006;55:709-14.
- 136) Kaijalainen T, Rintamaki S, Herva E. et al Evaluation of gene-technological and conventional methods in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol Methods*. 2002;51(1):111-8.
- 137) Kaijalainen T, Saukkoriipi A, Bloigu A. et al. Real-time pneumolysin polymerase chain reaction with melting curve analysis differentiates pneumococcus from other alpha-hemolytic streptococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53(4):293-9.
- 138) Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS. Et al. Simultaneuos amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992;10:413-17.
- 139) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G et al. **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; 11: 1026-30.**
- 140) Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M. et al. The real-time polymerase chai reaction. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2,3):95-125.
- 141) Valasek MA, Repaj J. The power of real-time PCR *Advan Physiol Edu* 2005;29:151-59.
- 142) Carvalho MD, Tondella ML, MCCaustland K et al. Evaluation and improvement of real-time PCR detection assays to *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of Pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8):2460-66.
- 143) Moruzumi M, Kakayama E, Iwata S et al. Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *J Clin Microbiol* 2006;44(4):1440-6.
- 144) Valones MA, Guimaraes R, Brandao LA et al. Principles and applications of polymerase chian reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol* 2009;40:1-11.
- 145) O'Brien KL, Nohynek H. World Health Organization Pneumococcal Vaccine Trials Carriage Working Group. Report from a WHO Working Group: standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22(2):e1-11
- 146) Brito DA, Ramirez M, de Lencastre H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41(6):2378-84.

- 147) Pai R, Gertz RE, & Beall B. 2006 sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of Streptococcus Pneumoniae isolates. J Clin Microbiol 44, 124-131.
- 148) O'Halloran DM & Cafferkey MT 2005. Multiplex PCR for identification of seven Streptococcus pneumoniae serotypes targeted by a 7-valent conjugate vaccine. J Clin Microbiol 443, 3487-3490.
- 149) Rubin LG, Rizvi A. PCR-based assays for detection of Streptococcus pneumoniae serotypes 3, 14, 19F and 23F in respiratory specimens. J Med Microbiol 2004;53(Pt7):595-602.
- 150) Huebner RE, Dagan R, Porath N et al. Lack utility of seotyping multiple colonies for detection of simultaneous nasopharyngeal carriage of different pneumococcal serotypes. Pediatr Infect Dis J 2000;19(10):1017-20.
- 151) Watson DA, Musher JW, Jacobson JW et al. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. Clin Infect Dis 1993;17 pp 913-24.
- 152) Grabenstein JD, Klugman KP. A century of pneumococcal vaccination research in human. Clin Microb and Infect 2012;18(5):15-24.
- 153) Austrian R. A brief History of pneumococcal vaccines. Drug and Aging 1999;15(1):1-10.
- 154) Pneumovax. Banca dati farmaco AIFA. www.farmaci.agenziafarmaco.gov.it
- 155) Bartolozzi G, Vaccini e vaccinazioni. 3°edizione Elsevier, Ed 2012 cap. vaccini coniugati
- 156) Bona G, Nicolosi L, Salari P. Guida pratica alle vaccinazioni. Editem edizione 2014. Pag 52.
- 157) Gruppo di Lavoro del CNESPS. ISS. Dati ed evidenze disponibili per l'utilizzo dei vaccini anti-pneumococcici nei soggetti a rischio di qualsiasi età e per l'eventuale ampliamento dell'offerta ai soggetti anziani. Dic 2013 pp 11-12.
- 158) Morline DC, Siber GR, Samra Y et al. Normal IgG and impaired IgM response to polysaccharide vaccines in asplenic patients. J Infect Dis 1999;179:13-7.
- 159) American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Disease. Policy statement: recommendations for the prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal polysaccharide vaccine and antibiotic prophylaxis. Pediatrics 2000, 106:362-6.

- 160) Kazancioglu R, Sever MS, Yuksel-Onel D et al. Immunization of renal transplant recipients with pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin Transplant* 2000; 14:61-64.
- 161) Spoulou V, Victoratos P, Ioannidis et al. Kinetics of antibody concentration and avidity for assessment of immune response to pneumococcal vaccine among children with bone marrow transplants. *J Infect Dis* 2000; 182:965-9.
- 162) Blumberg EA, Brozena SC, Stutman P et al. Immunogenicity pneumococcal vaccine in heart transplant recipients *Clin Infect Dis* 2001; 32:307-10
- 163) Pollard AJ, Perret KP, Beverley PC. Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. *Nat Rev Immunol* 2009;9:213-20.
- 164) Cardinale F, Ciofi degli Atti M, Bartolozzi G et al. Basi genetiche della risposta immune alle vaccinazioni. *Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica* 2012;38-54
- 165) Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR et al. Which pneumococcal serogroups cause invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I *Clin Infect Dis* 2000;30(1):100-21.
- 166) Alpern ER, Alessandrini EA, McGowan KL et al. Serotype prevalence of occult pneumococcal bacteremia. *Pediatrics* 2001;108:23
- 167) Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C et al. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use. Part II *Clin Infect Dis* 2000;30(1):122-40
- 168) Fitzwater SP, Chandran A, Santosham M et al. The worldwide impact of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*, 2012;31(5):501-8.
- 169) Hsu H, Shutt K, Moore M et al. effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med* 2009;360:222-56.
- 170) Esposito S, Lizioli A, Lastrico A et al. impact on respiratory tract infections of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine administered at 3, 5 and 11 months age. *Respir Res.* 2007;8(1):12.
- 171) Grijalva CG, Nuorti JP, Arbogast PG et al. Decline in pneumonia admission after routine childhood immunization with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis. *Lancet* 2007;369:1179-86.
- 172) Eskola J, Kilpi T, Palmu A. otitis media study group. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med.* 2001;344(6):403-9.

- 173) Millar EV, O'Brien KL, Bronsdon MA et al. anticapsular serum antibody concentration and protection against pneumococcal colonisation among children vaccinated with 7-valent pneumococcal vaccine. *Clin Infect Dis.* 2007;44(9):1173-9.
- 174) CDC. Licensure of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine(PCV13) and Recommendations for use among children advisory committee on immunization practices (ACIP) 2010. www.cdc.gov
- 175) Delibera AIFA del 16-04-2010. GU n° 100 del 30-04-2010.
- 176) Prevenar 13. Banca dati farmaco AIFA. www.farmaci.agenziafarmaco.gov.it
- 177) Gherardi G, D'ambrosio F, Monaco M et al. Population structure of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Italy prior the implementation of the 7-valent conjugate vaccine(1999-2003). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28(1):99-103.
- 178) Tramuto F, Amodio E, Calamusa G et al. The BINOCOLO Group.Pneumococcal Colonization in the Familial Context and Implications for Anti-Pneumococcal Immunization in Adults: Results from the BINOCOLO Project in Sicily. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 6;18(1).
- 179) Azzari C, Cortimiglia M, Nieddu F, *et al.* **Pneumococcal serotype distribution in adults with invasive disease and in carrier children in Italy. Should we expect herd protection of adults through infants' vaccination?** *Hum Vaccin Immunother*, 2016;12:344-50.
- 180) Pasinato A, Indolfi G, Marchisio P, *et al.* **Pneumococcal serotype distribution in 1315 nasopharyngeal swabs from a highly vaccinated cohort of Italian children as detected by RT-PCR.** *Vaccine*, 2014;32(12):1375-81.
- 181) Ben Shimol S, Greenberg D, Givon-Lavi N et al. Early impact of sequential introduction of 7-valent and 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on IPD in Israeli children <5 years: an active prospective nationwide surveillance. *Vaccine* 2014;32(27):3452-59.
- 182) <https://www.gov.uk/government/publications/pneumococcal-disease-cases-caused-by-strains-covered-by-prevenar-13-vaccine>.
- 183) Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W, 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.
- 184) Jayasinghe S, Menzies R, Chiu C et al. Long-term impact on a “3+0” schedule for 7- and 13-valent pneumococcal disease in Australia, 2002-2014. *Clin Infect Dis.* 2017;64(2):175-83.

- 185) Angoulvant F, Levy C, Grimprel E et al. Early impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on community-acquired pneumonia in children. *Clin Infect Dis*. 2014;58(7):918-24.
- 186) Griffin Mr, Mitchel E, Moore M et al. Declines in pneumonia hospitalizations of children aged <2 years associated with the use of pneumococcal conjugate vaccines, Tennessee, 1998-2012. *MMWR* 2014;63(44):995-8.
- 187) Greenberg D, Givon-Lavi N, Ben-Shimol S et al. Impact of PCV7/PCV13 introduction on community-acquired alveolar pneumonia in children <5years. *Vaccine* 2015;33(36):995-8.
- 188) Palmu AA, Rinta-Kokko H, Nohynek H et al. Impact of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumonia in Finnish children in a nationwide population based study. *Plos One* 2017;12(3)e0172690.
- 189) Afonso ET, Minamisava R, Bierrenbach AL et al. Effect of 10-valent pneumococcal vaccine on pneumonia among children, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2013;19(4):589-97.
- 190) Sinflon. Summary of Product Characteristic.
- 191) ISS. Invasive Bacterial Diseases in Italy Report. 2017
- 192) Ben-Shimol S, Givon-Lavi N, Leibovitz E et al. Near-elimination of otitis media caused by 14-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV) serotypes in southern Israel shortly after sequential introduction of 7-valent/13-valent PCV. *Clin Infect Dis* 2014;59(12):1724-32.
- 193) Cilveti R, Olmo M, Perez-Jove J et al. Epidemiology of otitis media with spontaneous perforation of the tympanic membrane in young children and association with bacterial nasopharyngeal carriage, recurrences and pneumococcal vaccination in Catalonia, Spain. *Plos One* 2017;12(2):e0170316.
- 194) Polmonite www.salute.gov.it/portale/salute
- 195) Pneumococcal disease. <http://vk.ovg.ox.ac.uk/pneumococcal-disease>
- 196) <https://www.vaccinarsi.org/scienza-conoscenza/malattie-prevenibili/pneumocco>
- 197) McIntosh K. Community-acquired pneumonia in children. *N Engl J Med* 2002; 346(6):429-37.
- 198) Balfour-Lynn IM, Abrahamson E, Cohen G, et al; Paediatric Pleural Diseases Subcommittee of the BTS Standards of Care Committee. BTS guidelines for the management of pleural infection in children. *Thorax*, 2005;60 Suppl 1:i1-21.

- 199) Azzari C, Canessa C, Indolfi G et al. Pneumococcal DNA is not present in blood of healthy children. In program and in abstracts of the 7th International Symposium on pneumococci and pneumococcal diseases. Tel Aviv, Israel, 14-18 March 2010, pp213.
- 200) Grijalva CG, Nuorti JP, Zhu Y et al. Increasing incidence of empyema complicating childhood community-acquired pneumonia in the United States. *Clin Infect Dis*, 2010;50(6):805-13.
- 201) Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W, et al. Effectiveness of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for prevention of invasive pneumococcal disease in children in the USA: a matched case-control study. *Lancet Respir Med*, 2016;4(5):399-406.
- 202) Andrews NJ, Waight PA, Burbidge P, et al. Serotype-specific effectiveness and correlates of protection for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a postlicensure indirect cohort study. *Lancet Infect Dis*, 2014;14(9):839-46.
- 203) Ben-Shimol S, Givon-Lavi N, Grisaru-Soen G et al. Comparative incidence dynamics and serotypes of meningitis, bacteremic pneumonia and other-IPD in young children in the PCV era: Insights from Israeli surveillance studies. *Vaccine*, 2017: S0264-410X(17)30707-7.
- 204) Shigayeva A, Rudnick W, Green K, et al. Association of serotype with respiratory presentations of pneumococcal infection, Ontario, Canada, 2003-2011. *Vaccine*, 2016;34(6):846-53.
- 205) Byington CL, Spencer LY, Johnson TA, et al. An epidemiological investigation of a sustained high rate of pediatric parapneumonic empyema: risk factors and microbiological associations. *Clin Infect Dis*, 2002;34(4):434-40.
- 206) Miller E, Andrews NJ, Waight PA et al. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(10):760-8.
- 207) Regev-Yochay G, Katzir M, Strahilevitz J et al.. The herd effects of infant PCV7/PCV13 sequential implementation on adult invasive pneumococcal disease, six years post implementation; a nationwide study in Israel. *Vaccine*, 2017;35(18):2449-56.
- 208) Marimon JM, Morales M, Cilla G et al. Detection of bacteria and viruses in the pleural effusion of children and adults with community-acquired pneumonia. *Future Microbiol*, 2015;10(6):909-15.

- 209) Krenke K, Sadowy E, Podsiadły E et al. Etiology of parapneumonic effusion and pleural empyema in children. The role of conventional and microbiological tests. *Respir Med*, 2016;116:28-33.