



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof. Andrea Fausto Piana

**INDIRIZZO IN SANITÀ PUBBLICA ED EVIDENCE BASED
PREVENTION**

XXVII CICLO

***CARRIAGE* RINOFARINGEO: DISTRIBUZIONE DEI
SIEROTIPI DI *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* E DI
ALTRI PATOGENI RESPIRATORI**

Direttore:

Prof. Andrea Fausto Piana

Tutor:

Prof. Andrea Fausto Piana

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Silvia Deidda

Anno Accademico 2014 - 2015

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2011/2012 – XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag. 1
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pag. 2
1.2 <i>Neisseria meningitidis</i>	Pag. 5
1.3 <i>Haemophilus influenzae</i>	Pag. 9
1.4 Epidemiologia delle malattie invasive	Pag. 11
1.5 <i>Carriage</i>	Pag. 29
1.6 Vaccinoprofilassi anti-pneumococco, -meningococco, - <i>Haemophilus influenzae b</i>	Pag. 35
2. SCOPO DELLA RICERCA	Pag. 48
3. MATERIALI E METODI	Pag. 51
4. RISULTATI	Pag. 59
5. DISCUSSIONE	Pag. 64
6. BIBLIOGRAFIA	Pag. 71

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

1. INTRODUZIONE

Tra i principali agenti eziologici del distretto oro-faringeo alcuni batteri capsulati come lo *Streptococcus pneumoniae* (pneumococco), la *Neisseria meningitidis* (meningococco) e l'*Haemophilus influenzae*, rappresentano, in particolare nei bambini, i principali responsabili di malattie invasive, oltre che un importante carico di malattia non invasiva.

Le malattie batteriche invasive, cioè meningiti, sepsi, polmoniti batteriemiche ed altri quadri clinici con isolamento di batteri da siti normalmente sterili, rappresentano una importante causa di morbosità, e sono caratterizzate da una elevata frequenza di gravi complicanze (76).

Dal punto di vista clinico, queste malattie presentano una sintomatologia scarsamente specifica per singolo agente eziologico. L'accertamento della loro eziologia è quindi di estrema importanza, non solo ai fini terapeutici e per la eventuale profilassi dei contatti, ma anche per quanto riguarda la loro prevenzione primaria poiché alcune di esse sono prevenibili con la vaccinazione (82).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Il pneumococco o *Diplococcus pneumoniae* presenta numerosi caratteri morfologico-strutturali e metabolici identici a quelli degli streptococchi, ed è infatti denominato, oggi, più correttamente, *Streptococcus pneumoniae* (47). Lo *S.pneumoniae* è un batterio Gram positivo, catalasi negativo e anaerobio facoltativo che si trova normalmente in coppie isolate o in brevi catene; in coltura con agar sangue le colonie di *S. pneumoniae*, essendo α -emolitiche, appaiono circondate da un alone verdastro/marrone (Fig.1).

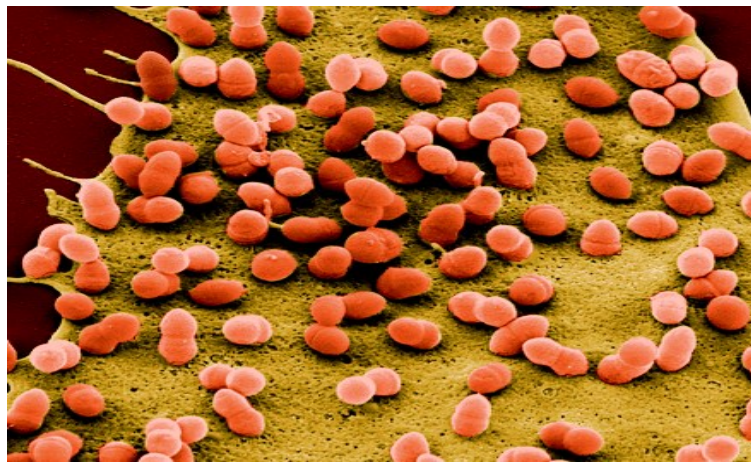


Fig.1 Scansione in microscopia elettronica di un preparato di *Streptococcus pneumoniae*

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

La maggior parte degli pneumococchi possiede una capsula costituita da polisaccaridi che rappresentano il fattore primario responsabile della virulenza. Solo i pneumococchi provvisti di capsula sono infatti patogeni per l' uomo e per gli animali. Le colonie vengono sierotipizzate sulla base del polisaccaride capsulare, composto da acido teicoico e fosforilcolina, di cui sono stati identificati più di 90 differenti immunotipi. I sistemi di classificazione impiegati sono due: nell'Americano i polisaccaridi vengono numerati secondo l'ordine di identificazione, mentre il più comune sistema di classificazione Danese è basato sul raggruppamento di microrganismi antigenicamente simili in relazione alla somiglianza dei polisaccaridi (8)

Il peptidoglicano e l'acido teicoico sono i principali costituenti della parete dello *Streptococcus pneumoniae*, l'integrità della cellula batterica dipende dall'attività di alcuni enzimi, come la trans- e la carbossipeptidasi. Gli antibiotici β -lattamici (penicillina compresa) inattivano questi enzimi, instaurando legami covalenti con i loro siti di attività. Il pneumococco possiede inoltre quattro proteine, che sono comuni a tutti i sierotipi e sono

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

essenziali per la virulenza, perché dotate fra l'altro, come i polisaccaridi, di un effetto anti fagocitico:

- Proteine A della superficie dello pneumococco (PspA), che si suddivide nella famiglia 1 e 2 (62)
- Adesina A della superficie (Psa)
- Pneumolisina (Ply)
- Autolisina (LytA)

La pneumolisina, che contiene un dominio legante la colina, interferisce con le risposte immunitarie e infiammatorie, inibendo una quantità di funzioni, fra le quali la fissazione del complemento e la fagocitosi. Verso queste proteine vengono sintetizzati anticorpi, anche nei bambini dei primi due anni di vita. Pneumococchi, mancanti di pneumolisina e di auto lisina hanno una ridotta virulenza (39).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

1.2 Neisseria meningitidis

La *Neisseria meningitidis* è un diplococco Gram negativo identificato per la prima volta nel 1887, anche se alcune forme morbose sostenute dal microrganismo erano già state descritte nel 1805 nel corso di un'epidemia a Ginevra. Ha una forma vagamente reniforme e generalmente le cellule sono disposte in coppie (diplococchi) in cui i batteri si guardano per la parte piano-concava, simulando quell'aspetto che viene indicato come “a chicco di caffè” (Fig. 2).

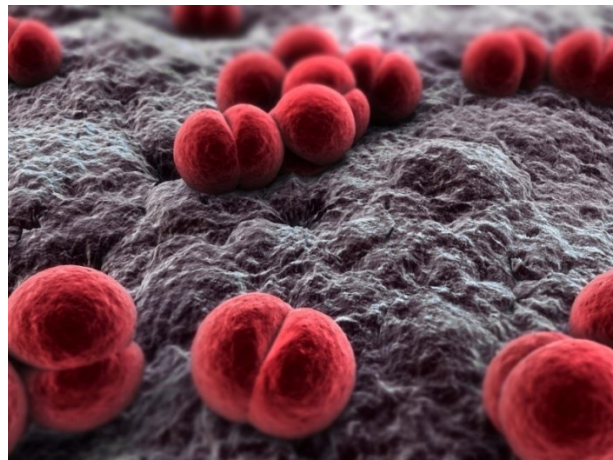


Fig.2 Scansione in microscopia elettronica di un preparato di *Neisseria meningitidis*

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

La neisseria è un batterio aerobio-anaerobio facoltativo, immobile, asporigeno, capsulato. Tutte le neisserie producono catalasi e sono positive alla reazione per la ossidasi. I meningococchi possiedono un antigene presente nella membrana esterna, comune a tutti i meningococchi e correlato con analoghi antigeni di altre neisserie (48). La capsula di natura polisaccaridica di cui sono provvisti, può presentare caratteristici antigeni diversi in base ai quali la maggior parte dei meningococchi può essere divisa in tredici sierogruppi, denominati rispettivamente A, B, C, D, H, I, K, L, X, Y, Z1, W-135 e 29E. Tuttavia, i gruppi A, B, C, W-135 e Y sono responsabili della grande maggioranza dei casi clinici. Il siero gruppo X è stato isolato solo in Africa centrale (4). La relativa prevalenza di ogni sottogruppo dipende dall'area geografica e da altri fattori, fra i quali l'età: mentre in Europa predominano i siero gruppi B e C, in Africa prevale il siero gruppo A (71). I polisaccaridi sono specifici per ogni siero gruppo e sono essenziali per la patogenicità del germe. I sierogruppi sono ulteriormente suddivisi, in sierotipi, sottotipi e immunotipi, a seconda delle differenze delle proteine della membrana esterna e dei polisaccaridi. Grazie alla capacità di scambiarsi materiale genetico, come capita in molte specie

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

batteriche, i diversi siero gruppi di *N. meningitis* possono cambiare il polisaccaride della capsula e con ciò il loro sierogruppo (*switch* della capsula), evadendo in tal modo all'immunità tipo-specifica e quindi con effetto negativo sull'efficacia della vaccinazione (1,69). L'Istituto Superiore di Sanità da 17 anni sta monitorando le caratteristiche fenotipiche dei meningococchi circolanti in Italia (54). Gli isolamenti di meningococco B mostrano un'ampia varietà di fenotipi: alcuni prevalgono in un certo periodo, per poi diminuire o scomparire, mentre altri emergono successivamente. La sorveglianza dei meningococchi assume un ruolo cruciale per dimostrare la circolazione di cloni ipervirulenti, allo scopo d'identificare nuove varianti e per monitorare la loro diffusione (26).

I meningococchi sono dotati di numerosi meccanismi, utili per evitare l'immunità degli esseri umani, sia la componente innata sia l'immunità adattativa (50).

Oltre al polisaccaride nella capsula, sulla superficie del meningococco sono presenti numerose proteine della membrana esterna e alcuni lipopolisaccaridi (endotossine), ai quali è dovuta la virulenza: mentre attraverso lo studio dei componenti della membrana esterna (polisaccaridi)

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

si stabilisce il sierogruppo, dalle caratteristiche dei lipo-olisaccaridi si stabilisce l'immunotipo e dalle differenze nelle proteine della membrana esterna s'identifica il sierotipo e il siero sottotipo. I lipopolisaccaridi della *N.meningitidis* si suddividono in 12 diversi immunotipi. La capsula del meningococco è importante per la trasmissione e per la colonizzazione: essa lo protegge dall'essiccamento, dalla fagocitosi, dall'opsonizzazione e dalla morte battericida, mediata dal complemento. Gli anticorpi diretti contro la capsula, che rappresenta l'obbiettivo principale dei vaccini polisaccaridici e coniugati, giocano un ruolo essenziale nella malattia meningococcica.

Alla virulenza del meningococco contribuiscono anche le proteine della membrana esterna. I pili per esempio, in numero di molte migliaia per ogni singola cellula batterica facilitano l'aggancio del meningococco alle cellule, facilitando il passaggio attraverso gli strati di muco e i movimenti delle ciglia delle cellule epiteliali cilindriche che tappezzano le vie aeree.

(71).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

1.3 *Haemophilus influenzae*

L'*Haemophilus influenzae* (Hi) è un piccolo batterio (0,3-1 µm), Gram negativo generalmente aerobio (può crescere come anerobio facoltativo), immobile, non sporigeno, di forma variabile; viene spesso descritto come un cocco-bacillo di forma pleiomorfica (Fig. 3).



Fig. 3 Scansione in microscopia elettronica di un preparato di *Haemophilus influenzae*

Venne riconosciuto per la prima volta, nel 1892, da Pfeiffer, che erroneamente lo ritenne responsabile dell'influenza: da qui il nome con il quale attualmente viene indicato: *H. influenzae*. Gli uomini sono i soli

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

ospiti naturali dell'*H. influenzae*. Come altri agenti infettivi invasivi (meningococco e pneumococco), l'*H. influenzae* possiede alcune strutture superficiali che sono essenziali per determinare la sua patogenicità: fra queste la principale è il polisaccaride della capsula: questo polisaccaride, un polimero del poliribosilribitolfosfato (PRP) è il principale fattore, associato alla virulenza. Secondo le caratteristiche antigeniche del polisaccaride capsulare, vengono riconosciuti, sei sierotipi principali, indicati con le lettere da “a” a “f”; accanto a questi esistono altri ceppi che non posseggono il polisaccaride capsulare e vengono perciò definiti come ceppi non tipizzabili (4).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

1.4 Epidemiologia delle malattie batteriche invasive

Le malattie invasive sono quadri clinici in cui i suddetti batteri hanno raggiunto siti normalmente sterili. In particolare le forme più frequenti sono le meningiti e le sepsi. Queste due forme spesso si sovrappongono per cui i batteri possono essere isolati contemporaneamente da entrambi i siti.

La meningite è un'inflammazione delle membrane (le meningi) che avvolgono il cervello e il midollo spinale.

La meningite batterica è l'infezione più comune del Sistema Nervoso Centrale. La sua importanza deriva oltre che dalla sua gravità, in quanto l'infezione progredisce rapidamente e può portare a morte, ma anche dalle conseguenze che può cagionare: danni permanenti e disabilità di vario ordine e grado. È questo il motivo per cui il solo sospetto di meningite in un paziente causa allarme e forti implicazioni emotive in tutto il personale sanitario coinvolto, dal medico di pronto soccorso al laboratorio chiamato alla diagnosi microbiologica. Proprio per quest'ultimo si pone la necessità di un approccio metodologico basato sulla rapidità, sulla accuratezza e soprattutto sulla scelta di sistemi che siano fortemente sensibili.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

La sepsi è una infiammazione sistemica causata dalla presenza dell'organismo nel sangue. La sua severità (a secondo del patogeno) può andare da una modesta febbre, che si risolve spontaneamente, sino a quadri con shock settici che possono evolvere in esito fatale (82).

Queste patologie colpiscono soprattutto i bambini sotto i 5 anni e altre fasce di età a seconda del germe. Infatti le forme da meningococco interessano, oltre i bambini piccoli, anche gli adolescenti e i giovani adulti, mentre le meningiti da pneumococco colpiscono soprattutto i bambini e gli anziani. L'introduzione dei vaccini nel calendario vaccinale pediatrico e dell'adolescente (solo per il meningococco) stanno riducendo il numero dei casi in questa fascia di età (4).

La malattia è più frequente tra la fine dell'inverno e l'inizio della primavera, anche se casi sporadici si verificano durante tutto l'anno.

Le persone che vivono e dormono in ambienti comuni, come gli studenti nei dormitori universitari o le reclute, hanno un rischio più elevato di meningite da meningococco e da *Haemophilus influenzae*.

Inoltre le infezioni delle prime vie respiratorie o alcune immunodeficienze possono determinare un maggior rischio di malattia meningococcica.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Immunodepressione, asplenia, insufficienza cardiaca, asma e l'HIV sono invece un fattore di rischio per la malattia invasiva pneumococcica.

I sintomi della meningite sono indipendenti dal germe che causa la malattia. I sintomi più tipici includono:

- irrigidimento della parte posteriore del collo (rigidità nucale)
- febbre alta
- mal di testa
- vomito o nausea
- alterazione del livello di coscienza
- convulsioni.

Nei neonati, alcuni di questi sintomi non sono evidenti. Si può però manifestare febbre, convulsioni, un pianto continuo, irritabilità, sonnolenza e scarso appetito.

Per quanto riguarda la sepsi i sintomi variano da una febbre transitoria (spesso più frequentemente chiamate batteriemie nel caso di infezioni da pneumococco) a invece infezioni sistemiche con compromissione di molti organi fino allo shock settico.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Nel contesto europeo, l'Italia si colloca come paese a bassa incidenza di malattia invasiva da meningococco, pneumococco ed *Haemophilus influenzae* (21).

In Italia dal 1994 è attivo un sistema di sorveglianza nazionale dedicato alle meningiti batteriche che dal 2007 si è ampliato a includere tutte le malattie invasive da meningococco, pneumococco ed *Haemophilus influenzae* (i batteri più frequentemente responsabili di sepsi). La sorveglianza è coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ed è estesa a tutto il territorio nazionale. Il sistema prevede la raccolta dei dati relativi ai casi di malattia, la tipizzazione dei ceppi isolati da parte dei laboratori ospedalieri e il loro invio al laboratorio di riferimento nazionale dell'ISS per una completa caratterizzazione microbiologica e/o diagnostica.

Da alcuni anni il SIMI (Sistema di sorveglianza delle malattie batteriche invasive coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità) riporta in un'apposita tabella i casi globali di malattia invasiva (meningite e sepsi) (42).

Da tali tabelle è evidente che, pur nella variabilità da un anno all'altro, il numero dei casi di meningite da pneumococco, è ancora piuttosto elevato con 200 e 300 casi/anno, in quanto, la vaccinazione con vaccino coniugato

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

ha avuto negli ultimi anni una diffusione troppo limitata in alcune regioni per accompagnarsi a una sensibile riduzione del numero dei casi. Tra il 1994 e il 2010 il numero dei casi non è diminuito in modo evidente, nonostante il progressivo diffondersi della vaccinazione in Italia; questa apparente anomalia è dovuta a molteplici fattori. Sono infatti migliorate enormemente le modalità di diagnosi eziologica, questa, oltre che con la classica coltura, viene effettuata con la PCR (4).

Nel 2014 sono stati segnalati 952 casi di malattia invasiva da pneumococco; il numero assoluto di casi è di poco diminuito rispetto al 2013 (977 casi) ma più alto degli anni precedenti (748 casi notificati nel 2011 e 813 casi nel 2012).

Persiste l'andamento in diminuzione nelle fasce di età da 0 a 5 anni; mentre si nota un aumento nelle altre fasce di età, in particolare negli anziani.

Il calo nella fascia di età 0-5 anni è verosimilmente legato all'aumento della copertura vaccinale; l'aumento rilevato negli adulti potrebbe essere attribuito a una crescente attenzione alla diagnosi e alla notifica delle sepsi dell'adulto, che rappresentano la patologia più frequente in questa fascia di

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

età, a seguito della loro inclusione nel sistema di sorveglianza a partire dal 2007 (Tab. 1).

	n.d.**	0	1 - 4		5 - 9		10 - 14		15 - 24		25 - 64		>64		TOTALE		
Italia																	
		N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000
2011 ⁵	1	24	4,32	58	2,53	20	0,70	1	0,04	12	0,20	236	0,70	396	3,22	748	1,23
2012 ⁵	0	24	4,52	36	1,62	21	0,75	7	0,25	8	0,14	252	0,77	465	3,76	813	1,37
2013 ⁵	0	16	3,05	40	1,81	34	1,21	10	0,36	11	0,19	348	1,06	518	4,10	977	1,64
2014	1	17	3,34	32	1,44	24	0,84	8	0,28	9	0,15	342	1,03	519	3,99	952	1,57
2015*	0	7		12		9		0		7		142		238			415

Tab. 1: Casi e incidenza di malattia invasiva da pneumococco per età e anno, in Italia (2011-2015).

Informazioni sul sierotipo sono disponibili per il 54% dei casi notificati nel 2014, una quota minore rispetto al 2013 (65%); sebbene la quota di ceppi tipizzati sia notevolmente aumentata rispetto al passato (soltanto il 32% dei casi notificati nel 2011 erano stati tipizzati) per l'invio di dati provenienti da laboratori di riferimento regionale o sovraregionale, non ancora, purtroppo, diffusi in tutta la Penisola.

Da tali dati emerge che il sierotipo 3 è risultato il più rappresentato tra i ceppi tipizzati (11,6%), seguito dai sierotipi 8 e 12F (Tab. 2).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Sierotipo	2011	2012	2013*	2014*	2015*	Sierotipo	2011	2012	2013*	2014*	2015*	Tipo di vaccino**	
	N						%						
3	24	62	80	60	35	3	10,2%	12,8%	12,7%	11,6%	17,7%	PCV13	PPV23
8	9	22	38	41	16	8	3,8%	4,5%	6,0%	7,9%	8,1%		PPV23
12F	7	22	44	40	24	12F	3,0%	4,5%	7,0%	7,8%	12,1%		PPV23
19A	24	51	31	32	11	19A	10,2%	10,5%	4,9%	6,2%	5,6%	PCV13	PPV23
1	29	34	60	30	7	1	12,3%	7,0%	9,5%	5,8%	3,5%	PCV13	PPV23
7F	16	41	45	26	8	7F	6,8%	8,4%	7,1%	5,0%	4,0%	PCV13	PPV23
22F	17	28	26	21	12	22F	7,2%	5,8%	4,1%	4,1%	6,1%		PPV23
14	9	24	31	18	1	14	3,8%	4,9%	4,9%	3,5%	0,5%	PCV13	PPV23
12B	1	4	2	17	1	12B	0,4%	0,8%	0,3%	3,3%	0,5%		
10A	7	9	12	16	6	10A	3,0%	1,9%	1,9%	3,1%	3,0%		PPV23
9N	2	5	5	12	4	9N	0,8%	1,0%	0,8%	2,3%	2,0%		PPV23
20	6	19	16	11	3	20	2,5%	3,9%	2,5%	2,1%	1,5%		PPV23
23B	6	10	15	11	5	23B	2,5%	2,1%	2,4%	2,1%	2,5%		
33F	1	5	5	11	4	33F	0,4%	1,0%	0,8%	2,1%	2,0%		PPV23
6C	8	9	11	10	0	6C	3,4%	1,9%	1,7%	1,9%	0,0%		
4	7	9	10	9	4	4	3,0%	1,9%	1,6%	1,7%	2,0%	PCV13	PPV23
11A	2	15	12	9	5	11A	0,8%	3,1%	1,9%	1,7%	2,5%		PPV23
15A	5	10	13	9	3	15A	2,1%	2,1%	2,1%	1,7%	1,5%		
19F	9	10	15	9	6	19F	3,8%	2,1%	2,4%	1,7%	3,0%	PCV13	PPV23
23A	3	6	18	9	5	23A	1,3%	1,2%	2,8%	1,7%	2,5%		
23F	5	10	10	9	1	23F	2,1%	2,1%	1,6%	1,7%	0,5%	PCV13	PPV23
6A	3	9	7	9	6	6A	1,3%	1,9%	1,1%	1,7%	3,0%	PCV13	
24F	3	6	11	8	2	24F	1,3%	1,2%	1,7%	1,6%	1,0%		
15B	2	5	14	7	6	15B	0,8%	1,0%	2,2%	1,4%	3,0%		PPV23
15C	3	2	7	6	0	15C	1,3%	0,4%	1,1%	1,2%	0,0%		
24A	0	2	7	6	1	24A	0,0%	0,4%	1,1%	1,2%	0,5%		
35F	4	5	6	6	2	35F	1,7%	1,0%	0,9%	1,2%	1,0%		
9V	8	7	7	6	2	9V	3,4%	1,4%	1,1%	1,2%	1,0%	PCV13	PPV23
31	0	6	2	5	0	31	0,0%	1,2%	0,3%	1,0%	0,0%		
38	2	1	2	5	0	38	0,8%	0,2%	0,3%	1,0%	0,0%		
18A	3	2	12	5	2	18A	1,3%	0,4%	1,9%	1,0%	1,0%		
2	0	2	4	4	2	2	0,0%	0,4%	0,6%	0,8%	1,0%		PPV23
34	0	1	1	4	3	34	0,0%	0,2%	0,2%	0,8%	1,5%		

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

6B	4	5	4	4	1	6B	1,7%	1,0%	0,6%	0,8%	0,5%	PCV13	PPV23
16A	0	3	5	3	0	16A	0,0%	0,6%	0,8%	0,6%	0,0%		
19B	0	1	0	3	1	19B	0,0%	0,2%	0,0%	0,6%	0,5%		
33A	1	0	4	3	2	33A	0,4%	0,0%	0,6%	0,6%	1,0%		
5	1	0	4	2	1	5	0,4%	0,0%	0,6%	0,4%	0,5%	PCV13	PPV23
15F	1	2	1	2	0	15F	0,4%	0,4%	0,2%	0,4%	0,0%		
17F	0	1	0	2	0	17F	0,0%	0,2%	0,0%	0,4%	0,0%		PPV23
7B	0	0	1	2	0	7B	0,0%	0,0%	0,2%	0,4%	0,0%		
13	0	1	1	1	0	13	0,0%	0,2%	0,2%	0,2%	0,0%		
29	1	2	4	1	1	29	0,4%	0,4%	0,6%	0,2%	0,5%		
37	0	0	0	1	0	37	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%		
11B	0	0	0	1	0	11B	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%		
11C	0	0	1	1	0	11C	0,0%	0,0%	0,2%	0,2%	0,0%		
19C	0	1	3	1	0	19C	0,0%	0,2%	0,5%	0,2%	0,0%		
22A	0	1	0	1	0	22A	0,0%	0,2%	0,0%	0,2%	0,0%		
32F	0	0	0	1	0	32F	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%		
35A	0	0	0	1	0	35A	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%		
35B	0	2	3	1	1	35B	0,0%	0,4%	0,5%	0,2%	0,5%		
7A	1	3	1	1	0	7A	0,4%	0,6%	0,2%	0,2%	0,0%		
7C	0	0	0	1	0	7C	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%		
21	1	0	2	0	0	21	0,4%	0,0%	0,3%	0,0%	0,0%		
36	0	0	1	0	0	36	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%		
42	0	0	1	0	0	42	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%		
10B	0	2	0	0	0	10B	0,0%	0,4%	0,0%	0,0%	0,0%		
16F	0	0	4	0	1	16F	0,0%	0,0%	0,6%	0,0%	0,5%		
18C	1	6	2	0	1	18C	0,4%	1,2%	0,3%	0,0%	0,5%	PCV13	PPV23
18F	0	1	2	0	0	18F	0,0%	0,2%	0,3%	0,0%	0,0%		
25A	0	0	6	0	0	25A	0,0%	0,0%	0,9%	0,0%	0,0%		
25F	0	1	0	0	1	25F	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%	0,5%		
28A	0	0	0	0	1	28A	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%		
28F	0	0	1	0	0	28F	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%		
9A	0	0	1	0	0	9A	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%		
NTYP***	0	1	1	2	0	NTYP***	0,0%	0,2%	0,2%	0,4%	0,0%		
Totale	236	486	632	516	198	Totale	100%	100%	100%	100%	100%		

* Dati parziali.

** sono indicati i sierotipi contenuti nel vaccino coniugato 13-valente e i sierotipi contenuti nel vaccino polisaccaridico 23-valente.

*** Non Tipizzabili confermati dal laboratorio di riferimento dell'Istituto Superiore di Sanità

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Tab. 2: Distribuzione (numerosità assoluta e percentuale, in ordine di frequenza decrescente sui dati 2014) per sierotipo e per anno dei ceppi di pneumococco isolati da infezioni invasive e inviati all'Istituto Superiore di Sanità e/o tipizzati da altro laboratorio (2011-2015)

Di questi tre sierotipi solo il primo è presente nella composizione del vaccino glicoconiugato 13-valente mentre tutti sono presenti in quello polisaccaridico 23 valente. Sia l'8 che il 12F risultano in aumento rispetto al 2012, tuttavia questi aumenti in percentuale non necessariamente corrispondono ad un aumento dei casi da questi sierotipi non vaccinali, ma riflettono anche la diminuzione della circolazione dei sierotipi vaccinali.

Analizzando i sierotipi isolati da pazienti con età fra 0 e 4 anni (Tab. 3), si registra la netta diminuzione del sierotipo 14 presente nel vaccino 13 valente. Rimane invece elevata la frequenza dei sierotipi 1 e 19A che, malgrado siano contenuti nel vaccino 13 valente, continuano a essere tra i sierotipi più frequentemente isolati. Tra i sierotipi non-vaccinali più frequenti in questa classe di età vanno menzionati il sierotipo 12F e il 24F. Tali dati di siero prevalenza, seppur parziali, sono stati confermati anche nel 2015.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Sierotipo	2011	2012	2013*	2014*	2015*	Sierotipo	2011	2012	2013*	2014*	2015*	Tipo di vaccino**
	N						%					
12F	2	1	4	4	2	12F	3,7%	2,0%	10,8%	12,9%	15,4%	
19A	9	7		4	1	19A	16,7%	14,0%	0,0%	12,9%	7,7%	PCV13
1	10	4	4	3		1	18,5%	8,0%	10,8%	9,7%	0,0%	PCV13
24F		2	4	3	1	24F	0,0%	4,0%	10,8%	9,7%	7,7%	
10A	2	3	2	2	1	10A	3,7%	6,0%	5,4%	6,5%	7,7%	
15A	2	1	1	2		15A	3,7%	2,0%	2,7%	6,5%	0,0%	
23B	1	2	1	2		23B	1,9%	4,0%	2,7%	6,5%	0,0%	
33F		2	1	2		33F	0,0%	4,0%	2,7%	6,5%	0,0%	
14	3	8	1	1		14	5,6%	16,0%	2,7%	3,2%	0,0%	PCV13
20	2			1	1	20	3,7%	0,0%	0,0%	3,2%	7,7%	
15C	3		1	1		15C	5,6%	0,0%	2,7%	3,2%	0,0%	
15F				1		15F	0,0%	0,0%	0,0%	3,2%	0,0%	
24A			1	1		24A	0,0%	0,0%	2,7%	3,2%	0,0%	
33A				1		33A	0,0%	0,0%	0,0%	3,2%	0,0%	
35F	1	1		1		35F	1,9%	2,0%	0,0%	3,2%	0,0%	
6A				1		6A	0,0%	0,0%	0,0%	3,2%	0,0%	PCV13
9N		2		1		9N	0,0%	4,0%	0,0%	3,2%	0,0%	
3		5	1		2	3	0,0%	10,0%	2,7%	0,0%	15,4%	PCV13
21			1			21	0,0%	0,0%	2,7%	0,0%	0,0%	
29		1				29	0,0%	2,0%	0,0%	0,0%	0,0%	
11A		1				11A	0,0%	2,0%	0,0%	0,0%	0,0%	
12B					1	12B	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	7,7%	
15B					1	15B	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	7,7%	
18A	1					18A	1,9%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	
18C	1	1				18C	1,9%	2,0%	0,0%	0,0%	0,0%	PCV13
19F	3	1	1		1	19F	5,6%	2,0%	2,7%	0,0%	7,7%	PCV13
22F	4	1	3		1	22F	7,4%	2,0%	8,1%	0,0%	7,7%	
23A		1	1			23A	0,0%	2,0%	2,7%	0,0%	0,0%	
23F	2	1	1		1	23F	3,7%	2,0%	2,7%	0,0%	7,7%	PCV13
25A			4			25A	0,0%	0,0%	10,8%	0,0%	0,0%	
35B			1			35B	0,0%	0,0%	2,7%	0,0%	0,0%	
6B	1	2				6B	1,9%	4,0%	0,0%	0,0%	0,0%	PCV13
6C			1			6C	0,0%	0,0%	2,7%	0,0%	0,0%	
7A	1					7A	1,9%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

7F	4	3	2			7F	7,4%	6,0%	5,4%	0,0%	0,0%	PCV13
9V	2					9V	3,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	PCV13
NTYP***			1			NTYP***	0,0%	0,0%	2,7%	0,0%	0,0%	
Totale	54	50	37	31	13	Totale	100%	100%	100%	100%	100%	

* Dati parziali.

** Sono indicati i sierotipi contenuti nel vaccino coniugato 13-valente

*** Non Tipizzabili confermati dal laboratorio di riferimento dell'Istituto Superiore di Sanità

Tab. 3: Distribuzione per sierotipo e per anno (in ordine di frequenza decrescente sui dati 2014) dei ceppi di pneumococco isolati da infezioni invasive in bambini con età compresa tra 0 e 4 anni e inviati per tipizzazione all'Istituto Superiore di Sanità o tipizzati da altro laboratorio (2011-2015).

Tuttavia, è bene sottolineare che tale andamento può essere presentare differenze regionali sia per la diversa copertura vaccinale sia per la presenza/assenza di un sistema di sorveglianza attiva in ambito regionale.

Per quanto riguarda la *Neisseria meningitidis* nel 2014 sono stati segnalati 163 casi di malattia invasiva da meningococco, con un'incidenza pari a 0,27 casi per 100.000; peraltro, l'incidenza risulta in linea ai due anni precedenti (0,23 nel 2012 e 0,29 nel 2013) (Tab. 4).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

	0		1 - 4		5 - 9		10 - 14		15 - 24		25 - 64		> 64		TOTALE	
	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000
2011	18	3,24	23	1,00	19	0,67	11	0,39	32	0,53	36	0,11	13	0,11	152	0,25
2012	17	3,20	25	1,13	13	0,47	8	0,29	22	0,37	35	0,11	18	0,15	138	0,23
2013	21	4,01	27	1,22	11	0,39	13	0,46	26	0,44	51	0,16	23	0,18	172	0,29
2014	21	4,13	25	1,13	11	0,38	15	0,53	18	0,30	52	0,16	21	0,16	163	0,27
2015*	13		12		6		4		20		30		12		97	

* 2015 dati parziali; le incidenze non sono state calcolate essendo i dati parziali.

Tab. 4: Casi di incidenza di malattia invasiva da meningococco per età e per anno (2011-2015).

Nella maggior parte delle regioni l'andamento è pressoché stabile o presenta piccole oscillazioni nel triennio 2011-2014. Invece, si segnala nei dati provvisori del 2015, un aumento di casi di meningococco di tipo C in giovani adulti (21 casi si sono verificati tra i 18 e i 34 anni di età, di cui 17 in Toscana). Rispetto agli anni precedenti si nota un leggero aumento in Lombardia (30 casi nel 2011, 34 nel 2012, 42 nel 2013, 45 nel 2014).

L'incidenza della malattia invasiva da meningococco è maggiore nella fascia di età 0-4 anni e in particolare nel primo anno di vita in cui l'incidenza supera i 4 casi per 100.000. L'incidenza si mantiene elevata fino alla fascia 15-24 anni (in cui si rilevano 0,30 casi per 100.000 abitanti nel 2014) e diminuisce dai 25 anni in su.

Esaminando il numero assoluto di casi per sierogruppo, il meningococco B

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

rappresenta il sierogruppo più frequente (65%, 51%, 48%, 48% dei ceppi tipizzati rispettivamente nel 2011, 2012, 2013, 2014), seguito dal meningococco C (17%, 30%, 31%, 31% dei ceppi tipizzati nel 2011, 2012, e 2014) e dal meningococco di sierogruppo Y (14%, 17%, 16%, 13% dei ceppi tipizzati nel 2011, 2012, 2013, 2014) (Tab. 5).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

	Sierogruppo	0	1-4	5-9	10-14	15-24	25-64	> 64	TOTALE (N)	TOTALE %
2011	A	0	0	0	1	0	0	0	1	1%
	B	11	15	11	4	16	14	5	76	65%
	C	2	4	2	0	5	4	3	20	17%
	W	0	0	0	1	0	3	0	4	3%
	Y	1	1	3	2	2	6	1	16	14%
	TOTALE tipizzati (N,%)	14	20	16	8	23	27	9	117	
		78%	87%	84%	73%	72%	75%	69%	77%	
2012	A	0	1	0	0	0	0	0	1	1%
	B	10	11	6	3	8	9	8	55	51%
	C	1	4	1	2	7	14	3	32	30%
	W	0	0	0	0	0	1	0	1	1%
	Y	1	1	2	2	3	5	4	18	17%
	TOTALE tipizzati (N,%)	12	17	9	7	18	29	15	107	
		71%	68%	69%	88%	82%	83%	83%	78%	
2013	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
	B	12	17	2	2	11	9	3	56	48%
	C	3	5	2	1	3	22	0	36	31%
	W	0	1	0	1	0	1	2	5	4%
	Y	2	1	2	4	3	5	2	19	16%
	TOTALE tipizzati (N,%)	17	24	6	8	17	37	7	116	
		81%	89%	55%	62%	65%	73%	30%	67%	
2014	A	0	0	0	0	1	0	0	1	1%
	B	14	11	5	4	3	15	3	55	48%
	C	3	1	1	3	5	12	11	36	31%
	W	0	1	1	1	3	1	1	8	7%
	Y	1	2	1	1	1	6	3	15	13%
	TOTALE tipizzati (N,%)	18	15	8	9	13	34	18	115	
		86%	60%	73%	60%	72%	65%	86%	71%	
2015*	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
	B	8	5	4	2	4	8	3	34	43%
	C	2	1	1	1	10	15	5	35	44%
	W	2	0	0	0	1	0	1	4	5%
	Y	1	0	0	1	1	2	1	6	8%
	TOTALE tipizzati (N,%)	13	6	5	4	16	25	10	79	
		100%	50%	83%	100%	80%	83%	83%	81%	

*2015 Dati parziali

Tab. 5: Casi di malattia invasiva da meningococco per sierogruppo, età e anno (2011-2015) e percentuale di isolati sierotipizzati sul totale dei casi segnalati.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Il numero dei casi di infezioni invasive (meningiti e sepsi) da *Haemophilus influenzae* rimane limitato, sebbene si conferma l'incremento dell'incidenza nel corso degli ultimi 4 anni (da 0,08 casi per 100.000 nel 2011 a 0,13 per 100.000 nel 2013) (Tab. 6).

Italia																
	0		1 - 4		5 - 9		10 - 14		15 - 24		25 - 64		>64		TOTALE	
	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000
2011	3	0,54	2	0,09	1	0,04	1	0,04	2	0,03	18	0,05	22	0,18	49	0,08
2012	7	1,32	1	0,05	2	0,07	1	0,04	0	0,00	22	0,07	30	0,24	63	0,11
2013	4	0,76	3	0,14	3	0,11	0	0,00	1	0,02	29	0,09	38	0,30	78	0,13
2014	11	2,16	7	0,32	4	0,14	1	0,04	0	0,00	33	0,10	49	0,38	105	0,17
2015*	7		1		1		1		1		15		35		61	

Tab. 6: Casi e incidenza di malattia invasiva da *Haemophilus influenzae* per età e anno, in Italia (2011-2015).

I casi dovuti al sierotipo b, gli unici prevenibili mediante vaccinazione, si mantengono rari (nessun caso nel 2011, 6 casi nel 2012, 5 casi nel 2013, 7 casi nel 2014, 3 casi nel 2015) (43).

In Europa, nel 2012 sono stati segnalati, 20785 casi confermati di malattia pneumococcica invasiva (IPD), dei 27 Stati membri dell'UE / SEE con un tasso di notifica complessivo di 5,2 casi per 100 000. I neonati e gli anziani sono stati i più colpiti. Durante 2008-12, una costante tendenza alla

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

diminuzione è stata osservata per i casi sotto i cinque anni di età. L'incidenza è rimasta stabile in tutte le altre fasce d'età. La maggior parte delle infezioni sono state causate da sierotipi coperti dal 13-valente vaccino pneumococcico coniugato PCV13, mentre è stata osservata una diminuzione della percentuale dei sierotipi PCV7. I sierotipi non vaccinali 6C e 15A stanno diventando i più comuni.

Per quanto riguarda la malattia invasiva da meningococco (IMD), 3463 casi confermati sono stati segnalati nel 2012 dai 27 Stati membri dell'UE / SEE con un tasso di notifica globale di 0,7 casi per 100 000. Il sierogruppo B era predominante, soprattutto nei bambini, con un tasso 10 volte superiore rispetto al siero gruppo C. Tuttavia, la distribuzione di sierogruppi variava notevolmente da paese a paese, a seconda di quando è stata introdotta la vaccinazione con il sierotipo C (MCC). Nel complesso, un consistente andamento decrescente è stato osservato per sierogruppo B e C durante 2008-12, mentre vi è stato un aumento del sierogruppo Y, che colpisce soprattutto i bambini e gli anziani. Il sierogruppo A è in gran parte scomparso dall'Europa. Tuttavia, casi sporadici continuano a essere

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

segnalati. La disponibilità del vaccino contro il sierogruppo B potrebbe ridurre ulteriormente l'incidenza di questa malattia.

Per l' *H. influenzae* (Hi), 3545 casi confermati sono stati segnalati nel 2012 da 27 Stati membri dell'UE / SEE, con un tasso di notifica complessivo di 0,6 casi per 100 000. Il tasso di notifica più elevato è stato osservato nei bambini al di sotto un anno di età, sostenuto da ceppi non capsulati. Durante il periodo 2008-12, il tasso di notifica è aumentato, soprattutto nei bambini di età inferiore ai cinque anni, per i ceppi non capsulati, mentre è rimasto stabile per le infezioni sostenute dai sierotipi non-b. Grazie al successo dei programmi di vaccinazione anti-Hib, la malattia da Hi è notevolmente diminuita in Europa e continua ad esserlo, con tassi specifici per età <1 per 100 000 abitanti nei bambini di età inferiore ai cinque anni (24).

Per quanto concerne, invece, l'epidemiologia relativa ai tre microrganismi in ambito extra-europeo, dopo l'introduzione del vaccino coniugato pneumococcico 7-valente (PCV7) nel 2000, negli Stati Uniti, si è verificato un calo della malattia pneumococcica invasiva tra i bambini con meno di 5 anni. Prima dell'introduzione del PCV7, l'incidenza della malattia, per i

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

sierotipi presenti nel vaccino, tra i bambini di questa età era di circa 80 casi ogni 100.000 abitanti. Dopo l'introduzione del PCV7, i tassi di malattia a causa di questi 7 sierotipi è sceso drasticamente a meno di 1 caso su 100.000 fino al 2007.

L'introduzione del PCV7 ha ridotto anche il carico di malattia pneumococcica invasiva tra i bambini più grandi e adulti attraverso la riduzione della trasmissione dei sierotipi presenti nel vaccino (*herdprotection*). La diminuzione dell'incidenza dei casi di malattia invasiva tra gli adulti sono stati osservati già nel 2001 fino ad oggi con una riduzione dell'incidenza di 64-77%. Un aumento dei casi di malattia dovute ai sierotipi non inclusi nel PCV7 (*replacement disease*) si sono registrati in bambini e negli adulti ma in maniera inferiore rispetto alla riduzione complessiva della malattia. Con l'introduzione del vaccino pneumococcico coniugato 13-valente (PCV13), i casi di malattia invasiva a causa dei sierotipi addizionali coperti da PCV13 sono diminuiti notevolmente ma non quelli dovuti ai sierotipi presenti nel vaccino PCV7.

Il tasso della malattia da meningococco è diminuito negli Stati Uniti a partire dagli anni 90. Nel 2013 sono stati riportati 550 casi.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

La proporzione di casi dovuti a ciascun sierogruppo variava a seconda del gruppo di età. Il sierogruppo B causa approssimativamente il 60% dei casi tra i bambini con età inferiore ai 5 anni. I sierogruppi C, Y o W presenti nel vaccino coniugato causano approssimativamente due o tre casi di malattia meningococcica tra gli individui con età superiore a 11 anni (12).

1.5 Carriage

S. pneumoniae, *N. meningitidis* ed *H. influenzae* possono colonizzare l'oro-faringe e il naso-faringe, sia in età pediatrica che nella popolazione adulta, portando a uno stato di portatore (*carriage*) che può persistere da poche settimane a periodi sensibilmente più lunghi. In tale ambito, la colonizzazione batterica rappresenta un prerequisito, anche senza provocare alcuna infezione (31).

Molti rilevanti studi hanno monitorato il *carriage* batterico (74, 56).

Peraltro, monitorare lo stato di portatore rappresenta un utile strumento per l'attuazione di una corretta strategia di vaccinoprofilassi (74,75,2,6).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Gli pneumococchi sono abitanti comuni delle vie aeree superiori e possono essere isolati dal nasofaringe nel 5-70% dei bambini e degli adulti normali.

Il tasso del *carriage* pneumococcico (NP) è età-dipendente, a partire all'inizio del primo anno di vita e raggiunge il picco di 55% circa ai tre anni, con un continuo declino in età adulta (7).

Le percentuali di stato di portatore asintomatico variano con l'età, con l'ambiente e con la presenza d'infezioni delle vie aeree superiori. La durata dello stato di portatore è diversa per ogni sierotipo di pneumococco. Nei lattanti dei primi 2 mesi di età, gli pneumococchi colonizzano progressivamente le mucose nasofaringee, trasmessi dai fratelli maggiori e dagli adulti (40).

L'acquisizione del pneumococco e il conseguente stato di portatore aumentano progressivamente dal terzo al dodicesimo mese di vita, si stabilizzano durante il secondo anno per attenuarsi progressivamente, senza mai scomparire. Nelle comunità dal 27 al 58% degli studenti o dei residenti può essere portatore. Nelle caserme nel 50-60% del personale di servizio può albergare il pneumococco nel naso-faringe. La durata dello stato di portatore è varia ed è generalmente più lunga nei bambini che negli adulti.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Sebbene la prevalenza del *carriage* negli anziani è bassa, tende ad aumentare nei pazienti anziani che vivono in comunità e istituti (29).

Lo stato di portatore di per sé non rappresenta un rischio di malattia ma, talvolta, può essere alla base delle infezioni (10). Sebbene sia quasi sempre asintomatica, la colonizzazione pneumococcica rappresenta il primo passo nella via patogenetica del pneumococco fino alla malattia invasiva (7). Dalle prime vie aeree, il batterio può raggiungere anche i seni e l'orecchio medio e da qui, se le difese dell'organismo non lo contrastano validamente, può diffondersi ulteriormente provocando l'insorgenza di mastoiditi o meningiti (48). La condizione di portatore è asintomatica e si caratterizza per la presenza di sierotipi distinti in relazione all'età e alla regione geografica; nella stagione invernale la prevalenza dei portatori aumenta. I sierotipi più comunemente isolati nei portatori di età pediatrica sono il sierotipo 6, 14, 19 e 23, mentre quelli isolati negli adulti sono molto più numerosi; in oltre il 30% dei portatori vengono isolati più sierogruppi/sierotipi (8).

Nei bambini piccoli i sierotipi 3, 19 e 23 sono isolati più spesso dall'orecchio medio, mentre in tutte l'età i sierotipi 1 e 14 sono più spesso

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

isolati dal sangue, i sierotipi 6, 10 e 23 si ritrovano più spesso nel liquido cerebrospinale (37, 38).

In uno studio condotto in Italia (Milano, Genova) è stato ricercato il pneumococco nel naso-faringe di 2799 bambini sani: la quota di portatori è risultata pari all'8,6%. I sierotipi più rappresentati sono risultati il 3, 19F, 19, 6B e 14: il 63,2% dei ceppi isolati era incluso nel vaccino eptavalente (PCV7); la percentuale era più alta nei bambini al di sotto dell'anno di vita (73,1%) e nella fascia di età 2-5 anni (68,9%) (53). La via naturale dell'infezione da pneumococco inizia con la colonizzazione e può progredire fino alla malattia invasiva, se le naturali barriere immunologiche sono superate. Ne deriva che una prevenzione della colonizzazione, per esempio attraverso la vaccinazione con vaccini coniugati, costituisce una protezione verso la malattia invasiva; d'altra parte la prevenzione della colonizzazione nasofaringea può anche ridurre la diffusione orizzontale dello pneumococco, migliorando in tal modo l'immunità di gruppo (*herdimmunity*) (4).

Anche la *N. meningitidis*, così come il pneumococco, può colonizzare l'orofaringe e il nasofaringe, sia in età pediatrica che nella popolazione

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

adulta. Il *carriage* può persistere da poche settimane a più mesi, con una prevalenza nella popolazione che oscilla in genere tra il 5 e il 15%, con picchi nei mesi freddi che possono raggiungere il 30%. La durata dello stato di portatore dipende da caratteristiche dell'ospite e della comunità e può essere: transitorio, intermittente, duraturo o cronico (9). Dato che l'uomo è l'unico serbatoio dei meningococchi e che, dal punto di vista epidemiologico, la maggior parte dei casi di malattia invasiva non ha alcun rapporto con altri casi della comunità, se ne deduce che i portatori asintomatici rappresentano la sorgente più probabile per gli stipiti patogeni. Alcuni ceppi in particolare sono responsabili di meningite acuta e di epidemie. In determinate condizioni, la persistenza di uno specifico clone può perdurare nella popolazione anche fino a 6 anni, come è stato segnalato in una popolazione del Nord Italia (70). I più elevati valori di prevalenza sono stati riscontrati però nelle comunità chiuse di adolescenti o giovani adulti, dove risultano più probabili i contatti interpersonali, questo è stato rilevato in particolare tra le reclute e gli studenti di college. Lo stato di portatore di per sé rappresenta un processo naturale d'immunizzazione, che porta alla produzione di anticorpi protettivi appartenenti alle tre maggiori

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

classi di immunoglobuline (46). Non tutti i ceppi di *N. meningitidis* isolati dal nasofaringe del soggetto portatore sono suddivisibili nei siero gruppi conosciuti: circa un terzo è costituito da *N. meningitidis*, non gruppabile (18).

L' 80% dei bambini e degli adulti ospita ceppi non tipizzabili di *Haemophilus influenzae* nelle mucose delle vie aeree superiori. La colonizzazione è un processo dinamico: nuovi ceppi vengono acquisiti per rimpiazzare quelli vecchi che scompaiono. L'*Haemophilus influenzae* colonizza il nasofaringe del 3-5% dei bambini che vivono in comunità (nidi, scuole d'infanzia). La colonizzazione con un ceppo può durare da qualche giorno a qualche mese: è difficilmente eradicabile anche con gli antibiotici per via sistemica. Uno stato di portatore può persistere in seguito a un'infezione grave, trattata con successo con antibiotici.

L'introduzione del vaccino coniugato contro *H.influenzae b* (Hib) ha determinato una drastica riduzione delle malattie da *H.influenzae b* nei paesi industrializzati (61).

Questo risultato è stato accompagnato da alcuni cambiamenti epidemiologici nella malattia invasiva la più importante delle quali è stata

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

la variazione del sierotipo predominante da Hib a non tipizzabile (NTHi) (49, 33). Con l'utilizzo del vaccino coniugato Hib è stata dimostrata una forte riduzione del *carriage* faringeo del Hib (57), altri sierotipi potrebbero occupare la nicchia vacante risultante dal *replacement*, fenomeno simile a quello osservato per lo *Streptococcus pneumoniae* (45).

Uno studio sul *carriage* dell'*Haemophilus influenzae* è stato condotto in 717 bambini con età <6 anni dal mese di giugno 2012 a luglio 2013 in due grandi città italiane. Il 14,1 % è risultato positivo e di questi il 97% degli isolati è stato identificato come NTHi, 2 come tipizzabili e uno tipo f (34).

1.6 Vaccinoprofilassi anti-pneumococco, -meningococco, -*Haemophilus influenzae* B

La disponibilità di un vaccino efficace contro i ceppi più frequentemente in causa di *Streptococcus pneumoniae* rappresenta un obiettivo primario nel campo della salute pubblica (23, 27, 62).

Al momento attuale esistono due tipi di vaccino contro il pneumococco:

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

- Il vaccino polisaccaridico non coniugato 23-valente (PPV23), composto da polisaccaridi dei 23 tipi più frequentemente in causa.

La difficoltà fondamentale di questo vaccino è legato al fatto che il sistema immune di un bambino di meno di cinque anni di età, proprio il gruppo che rappresenta i più alti livelli di morbilità e di letalità per infezioni pneumococciche, non riconosce o riconosce in modo insufficiente i polisaccaridi della capsula del pneumococco e quindi non risponde con anticorpi della classe IgG e non attiva le cellule della memoria, per tale ragione il vaccino 23-valente non permette di proteggere sufficientemente i bambini nei primi anni di vita.

I vaccini cellule T indipendenti sembra che non prevengano il *carriage* della specie batterica dopo che la risposta immunitaria di breve durata è terminata (19).

- I vaccini polisaccaridici coniugati PCV7 (vaccino pneumococcico coniugato epta-valente, Prevenar 7, Pfizer), il 10-valente PCV10 (Synflorix, GSK) e il 13-valente PCV 13(Prevenar 13, Pfizer) che

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

contengono polisaccaridi batterici della capsula esterna del microrganismo sono attualmente i vaccini coniugati autorizzati.

Il polisaccaride viene convertito in un antigene T-dipendente dalla presenza di una proteina trasportatrice. La memoria a lungo termine delle cellule B matura in modo che il sistema immunitario, sia a breve che a lungo termine, evoca una risposta quando tali polisaccaridi si incontrano di nuovo. Questo riduce la colonizzazione dei sierotipi inclusi nel vaccino, aiutando a prevenire l'infezione anche nell'individuo molto giovane.

Nel 2000 il vaccino PCV7 formulato con antigeni polisaccaridici dei sette sierotipi isolati più frequentemente nel nord America è stato inizialmente utilizzato per l'immunizzazione di routine dei bambini negli USA (20). Sono state distribuite più di 200 milioni di dosi in oltre 88 Paesi, in 28 dei quali il PCV7 è stato inserito nei programmi d'immunizzazione nazionale (17). I sette sierotipi di pneumococco, scelti per far parte del vaccino eptavalente, sono quelli più spesso ritrovati negli USA: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Con questa scelta si coprono anche sierotipi che solitamente cross-reagiscono (77). In una conferenza, tenutasi a Berlino il 23-25 agosto

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

2000 sull'uso dei vaccini coniugati contro il pneumococco in Europa (67), fu valutato che il 50- 80%, dei sierotipi che in Europa causano malattie invasive, è coperto dai sierotipi contenuti nel vaccino coniugato eptavalente. La European Medicines Agency (EMA) ha concesso la licenza per PCV7 nel 2001. Il Ministero Italiano della Salute raccomandava inizialmente PCV7 per i bambini ad alto rischio, successivamente ha incluso il vaccino nel Piano Nazionale di Vaccinazione per il 2005-2007 (20).

La schedula del vaccino eptavalente pneumococcico coniugato(PCV7) ha notevolmente ridotto l'incidenza delle malattie da pneumococco nella popolazione pediatrica sia nei bambini vaccinati che negli individui non vaccinati di tutte le età (13).

Questo ha portato alla conclusione che PCV7 non solo era molto efficace nei bambini vaccinati, ma anche che potrebbe aver indotto l'*herd immunity* limitando la diffusione delle malattie pneumococciche nella popolazione che viveva nelle stesse aree geografiche dei bambini vaccinati.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Il CDC ha riportato una riduzione del 90% dell'incidenza di malattie invasive pneumococciche (IPDS) negli Stati Uniti causate da *Streptococcus pneumoniae* con l'introduzione del PCV7 nei bambini piccoli (11).

Dopo l'introduzione del PCV7 è stato riportato in tutto il mondo sia nei bambini che negli adulti, ma soprattutto negli anziani un calo significativo delle malattie da pneumococco delle mucose, come l'otite media acuta (OMA) e la polmonite non batteriémica (63, 36).

Mentre l'incidenza di malattie causate dai sierotipi presenti nel PCV7 hanno continuato a diminuire con l'introduzione di PCV7, diversi studi hanno documentato come si sia verificato un aumento dell'incidenza di infezioni causate dai sierotipi non PCV7, in particolare dei sierotipi 19A, 7F, 6A e 6C (13, 41, 55).

Per superare questo problema sono stati sviluppati nuovi vaccini che coprono più sierotipi in particolare quelli emergenti.

Al PCV7 hanno fatto seguito infatti: il 10-valente PVC coniugato con la glicoproteina-D dell'*Haemophilus influenzae*, che aggiunge i sierotipi 1,5, e il 7 F (PVC10); e il 13 valente PCV coniugato-CMR 197 che aggiunge i sierotipi 1,3 5, 6 A, 7F,e 19 A (PCV13).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Tutti i polisaccaridi capsulari dei 13 sierotipi inclusi nel PCV13 sono stati coniugati con il mutante non tossico della tossina difterica CRM197. Il PCV13 ha ottenuto la licenza per sostituire il PCV7 nel 2010 per i bambini tra 6 settimane e 5 anni di età sia negli Stati Uniti d'America sia nell'Unione Europea (30, 22).

A partire dalla immissione in commercio del primo vaccino anti-pneumococcico per l'infanzia (PCV7), avvenuta nel 2002, in Italia la vaccinazione anti-pneumococcica è stata offerta con modalità diversificata nelle diverse regioni. E' solo a partire dal 2009-2010 che il vaccino è stato offerto gratuitamente e, molto spesso con chiamata attiva, dalla maggior parte delle regioni, a tutti i nuovi nati e nel 2012 è stato inserito nel Piano Nazionale di Prevenzione Vaccinale 2012-2014 con l'obiettivo del raggiungimento e mantenimento nei nuovi nati di coperture vaccinali \geq 95% (65).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Vaccino	Ogg-30gg	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	7° mese	11° mese	13° mese	15° mese	⇨	6° anno	12°-18° anno	19-49 anni	50-64 anni	> 64 anni
DTPa		DTPa		DTPa			DTPa				DTPa**	dTpaIPV	1 dose dTpa*** ogni 10 anni		
IPV		IPV		IPV			IPV				IPV		3 Dosi: Pre Esposizione (0, 1, 6 mesi) 4 Dosi: Post Esposizione (0, 2, 6 sett. + booster a 1 anno) o Pre Esposizione Imminente (0, 1, 2, 12)		
Epatite B	EpB-EpB*	Ep B		Ep B*			Ep B								
Hib		Hib		Hib			Hib								
Pneumococco		PCV13		PCV13			PCV13	PCV13**			PCV13/PPV23 (vedi note)		PCV13		
MPRV							MPRV				MPRV				
MPR							MPR				oppure MPR + V	MPR + V	2 dosi MPR**** + V (0-4/8 settimane)		
Varicella								V							
Meningococco C							Men C o MenACWY coniugato	Men C o MenACWY coniugato				MenACWY coniugato 1dose			
Meningococco B		Men B	Men B		Men B		Men B	Men B							
HPV												HPV: 2-3 dosi (in funzione di età e vaccino), fino a età massima in scheda tecnica.			
Influenza							Influenza**					1 dose all'anno	1 dose all'anno		
Herpes Zoster													1 dose#		
Rotavirus		Rotavirus##													
Epatite A									EpA###			EpA###	2 dosi (0-6-12 mesi)		





	Cosomministrare nella stessa seduta		Opzioni di cosomministrazione nella stessa seduta o somministrazione in sedute separate
	Somministrare in seduta separata		Vaccini per categorie a rischio

Fig. 4 Calendario vaccinale per la vita (SItI, Sip, Fimp, Fimmg). (Società italiana di igiene (SItI), Società italiana di pediatria (Sip), Federazione italiana medici pediatri (Fimp), Federazione italiana medici di medicina generale (Fimmg)).

Il ciclo vaccinale prevede, per i nuovi nati, la somministrazione di tre dosi nel primo anno di vita (3°, 5°, 11° mese).

Se la vaccinazione inizia nel secondo semestre di vita, vanno eseguite ugualmente 3 dosi a distanza di sei-otto settimane l'una dall'altra; due dosi se si inizia dopo il compimento del primo anno; una dose se si inizia dopo il compimento del secondo anno.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

A settembre 2011, l'indicazione d'uso è stata estesa anche alla popolazione adulta di età uguale o superiore ai 50 anni; a febbraio 2013 è stata estesa anche ai soggetti di età compresa tra 6 e 17 anni e a maggio 2013 è stata ulteriormente estesa ai soggetti di età compresa tra 18 e 50 anni. Il PCV13 non è al momento autorizzato per la prevenzione delle polmoniti non batteriemiche nei soggetti al di sopra dei 17 anni.

I vaccini PCV producendo una risposta immunitaria forte e più duratura sono indicati nei bambini rispetto al PPV e più efficaci contro i sierotipi circolanti vaccino rispetto al PPV anche negli anziani (58, 16, 44).

Le prime ricerche sul vaccino contro il meningococco risalgono ai primi decenni del secolo, con risultati di scarsa rilevanza. Con la scoperta dei sulfamidici negli anni '30, l'interesse dei ricercatori si attenuò, finché successivamente l'insorgenza di ceppi resistenti non richiamò di nuovo l'interesse sulla preparazione di un vaccino. I primi vaccini sono stati preparati a partire dai polisaccaridi della capsula del meningococco. Da una decina di anni sono stati preparati vaccini polisaccaridici coniugati con proteine per allargare l'immunogenicità ai primi 4-5 anni di vita e per renderla più duratura (32, 72).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Oggi sono a disposizione quattro tipi di vaccini:

- Vaccino polisaccaridico tetravalente (A,C,W135,Y)
- Vaccino polisaccaridico coniugato, monocomponente (Men C)
- Vaccini polisaccaridici coniugati tetravalenti (A, C, W135, Y)
- Vaccino verso la *N. meningitidis* gruppo B

Negli ultimi 25 anni molte delle epidemie previste nel mondo, non si sono verificate grazie alla vaccinazione meningococcica (80).

Al giorno d'oggi i vaccini polisaccaridici in commercio nei paesi occidentali sono prevalentemente tetravalenti e comprendono i polisaccaridi A,C,W135e Y. I loro punti critici sono due:

- Sono poco immunogeni, eccetto il polisaccaride A, nei soggetti in età inferiore a 4-5 anni
- Presentano un' alta specificità di gruppo, per cui è necessario disporre di vaccini che comprendano tutti i gruppi di meningococco che si sono dimostrati patogeni per l'uomo.

Questo tipo di vaccini sono efficaci nello stimolare le cellule B del sistema immunitario, ma non la risposta T, principale responsabile della memoria immunologica, e sono detti pertanto timo-indipendenti.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Esiste inoltre un'altra importante conseguenza della somministrazione dei vaccini meningococcici polisaccaridici non coniugati: l'esposizione di lattanti o bambini a vaccini meningococcici costituiti da polisaccaridi "nudi" può diminuire le risposte successive ai vaccini coniugati e abbassare la concentrazione sierica a livelli non protetti (35). Questo fenomeno può portare a un aumento paradossale della suscettibilità, indotta dalla vaccinazione con polisaccaridi non coniugati. Il meningococco di tipo B rimane quindi il sierogruppo predominante in Europa, Nord e Sud America, Australia e Nuova Zelanda.

I più recenti vaccini coniugati, nei quali i polisaccaridi capsulari sono coniugati a proteine *carrier*, sono in grado di stimolare tanto la risposta B mediata quanto quella T-mediata, e sono quindi utilizzabili per ottenere memoria immune a lungo termine, nonché per indurre titoli anticorpali protettivi anche nei soggetti con meno di 2 anni di età. I vaccini coniugati sono disponibili in formulazioni monovalenti (A, utilizzato principalmente in Africa o C, ampiamente impiegato anche in Italia) o quadrivalenti (A, C, W135 e Y), anch'essi impiegati in Italia. Il primo paese ad introdurre la vaccinazione contro il meningococco C è stato il Regno Unito nel 1999. In

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Italia, il vaccino contro il meningococco C è stato incluso nel piano nazionale di prevenzione vaccinale PNPV 2012-2014 con una schedula di immunizzazione che prevede una dose singola tra il 13° e 15° mese di età. L'offerta attiva e gratuita è estesa agli adolescenti 11-18 anni come dose di recupero (5).

Il 19 Febbraio 2010, la Food and Drug Administration ha approvato il vaccino Men ACWY (*Menveo*) raccomandandolo con una sola dose a tutti i soggetti da 11 a 55 anni e a persone da 2 a 55 anni che siano ad aumentato rischio di malattia meningococcica, è entrato in commercio in Italia a metà Luglio del 2010.

Questo vaccino è immunogenico e ben tollerato, si differenzia in modo netto dal vaccino attualmente in commercio negli Stati Uniti (*Menactra*), in primo luogo perché è risultato immunogenico anche nei lattanti di pochi mesi di vita, e successivamente risulta capace di indurre la memoria immunologica (69).

Il vaccino multicomponente contro il meningococco B è stato sviluppato per proteggere i lattanti, i bambini, gli adolescenti e gli adulti dalla malattia invasiva causata da *N. meningitidis* di sierogruppo B (59).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Il 14 Gennaio 2013 la Commissione Europea ha autorizzato l'immissione sul mercato del vaccino contro il meningococco B di Novartis Vaccines con il nome di Bexsero® (4CMenB). L'autorizzazione alla commercializzazione è stata in seguito ufficializzata anche dall'Agenzia Italia per il Farmaco (AIFA) attraverso l'inserimento di Bexsero® in Gazzetta Ufficiale (ultimo aggiornamento 29 luglio 2013) (22).

Per la messa a punto del vaccino contro il meningococco B sono stati superati due importanti problemi legati alle caratteristiche del batterio: il primo è correlato all'antigene capsulare, ossia l'antigene che tradizionalmente viene usato nei vaccini glicoconiugati. Nel caso del meningococco di sierogruppo B il polisaccaride capsulare possiede una struttura riconosciuta dal sistema immunitario umano come "self" e di conseguenza non può essere utilizzato come antigene. In secondo luogo il meningococco B esiste in molteplici varianti, tutte in grado di determinare malattia invasiva. La combinazione dei diversi sottotipi varia da paese a paese e dunque è stato necessario identificare una formulazione unica in grado di prevenire la malattia causata da numerosi sottotipi (78).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

La scelta della collocazione delle dosi di meningococco B ha rappresentato un problema di non facile risoluzione, considerate le contrastanti necessità di effettuare 4 somministrazioni nel volgere di pochi mesi, di non effettuare più di 2 iniezioni simultaneamente e, nel limite del possibile, di evitare le co-somministrazioni del vaccino anti-meningococco B con altri vaccini, visto l'incremento delle febbri di grado moderato/elevato ad esse conseguente.

Un sempre maggior numero di somministrazioni di vaccini nei primi anni di vita hanno spinto le aziende produttrici di vaccini a introdurre in commercio numerosi vaccini combinati, che nella stessa fiala contenessero antigeni diversi.

Il vaccino contro Hib è contenuto nel vaccino esavalente coniugato.

L'Infanrixhexa è ben tollerato ed è immunogenico quando somministrato in 3 dosi (2, 4 e 6 mesi) a bambini sani anche la schedula 3, 5, 13 mesi, prevista in Italia, in Svezia e in Slovacchia, è risultata ugualmente immunogenica e ben tollerata (67).

È, al momento attuale, l'unico vaccino esavalente in commercio in Italia.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

2.SCOPO DELLA RICERCA

Tra i principali agenti eziologici del distretto oro-faringeo, alcuni batteri capsulati, lo *Streptococcus pneumoniae*, la *Neisseria meningitidis* e l'*Haemophilus influenzae* rappresentano, in particolare nei bambini, le principali cause di malattie invasive prevenibili attraverso vaccini, oltre che un importante carico di malattia non invasiva. Questi batteri, peraltro, trovano nel nasofaringe dei bambini stessi il *reservoir*, con un trend di prevalenza generalmente decrescente in funzione dell'età.

Studi nel settore evidenziano (51) che, peraltro, le vaccinazioni eseguite con vaccini polisaccaridici coniugati oltre a indurre una protezione diretta nei confronti delle malattie invasive e non invasive da parte di questi patogeni, possono portare anche ad una riduzione del *carriage* grazie alla produzione di anticorpi secreti a livello delle mucose. Questo fenomeno determina una protezione indiretta della popolazione (*herdprotection*) per la ridotta circolazione di tali patogeni. La valutazione dello stato di portatore, in particolare se monitorato nel tempo, può risultare pertanto un buon indicatore dell'efficacia dei vaccini coniugati.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Lo stato di portatore nasofaringeo pneumococcico è considerato come un prerequisito per lo sviluppo di malattie da pneumococco di conseguenza, la riduzione del *carriage* nasofaringeo attraverso la vaccinazione potrebbe rivelarsi utile anche per ridurre l'incidenza delle infezioni da pneumococco tra i bambini vaccinati, le loro famiglie e la comunità (68, 79). Inoltre, il monitoraggio dei cambiamenti del *carriage* nasofaringeo indotta dalla vaccinazione PCV13 è importante, non solo, per la valutazione dell'efficacia del vaccino, ma anche per monitorare un eventuale fenomeno di *replacement*, permettendo così di prevedere il possibile emergere di nuovi sierotipi causa di malattia invasiva.

Sulla base di tali premesse, risulta di particolare importanza valutare gli effetti indotti dalle diverse vaccinazioni antipneumococciche, nelle diverse aree territoriali e fasce di età.

Presso il Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Igiene e Medicina Preventiva dell'Università degli Studi di Sassari, è stato recentemente avviato un articolato progetto di ricerca, allo scopo di definire, relativamente ad una popolazione in età pediatrica (da 3 a 13 anni) del Nord Sardegna, il *carriage* rinofaringeo di alcuni dei principali

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

microrganismi responsabili di malattie invasive e la distribuzione dei differenti sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e di *Neisseria meningitidis* in relazione alla tipologia dei vaccini utilizzati al fine di valutare l'impatto esercitato dalle vaccinazioni.

Il presente lavoro di tesi, alla conclusione del triennio formativo nel Corso di Dottorato in Scienze Biomediche, indirizzo di Sanità Pubblica ed Evidence Based Prevention, riporta i risultati ottenuti.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

3.MATERIALI E METODI

Lo studio è stato articolato in diverse fasi. In una prima fase, è stata predisposta la documentazione necessaria per la richiesta di autorizzazione dello studio da parte del Comitato di Bioetica della ASL n.1 di Sassari, successivamente approvata con delibera VB1086 del 21/09/2012. Contestualmente, è stato predisposto il consenso informato scritto da distribuire ai genitori ed un questionario per la raccolta delle principali informazioni anagrafiche quelle relative allo stato generale di salute dei bambini ed il loro stato vaccinale. Nel complesso, sono stati arruolati 217 bambini di entrambi i sessi, provenienti da 4 Istituti scolastici della città di Sassari.

Presso gli ambulatori dei medici scolastici dei vari Istituti identificati, è stato eseguito il prelievo tramite l'utilizzo di tamponi oro-faringei.

Un tampone di cotone sterile, con la punta piegata ad angolo di 30 gradi è stato inserito attraverso la bocca e posto a 1,5 pollici nel rinofaringe, senza toccare l'ugola o la lingua, e lasciato in sede per 4 a 6 sec.

Per ciascun bambino è stato effettuato solo un tampone.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

I tamponi (Copan, SRK Solution) sono stati immediatamente seminati su terreni di isolamento, selettivi per gli stipti di interesse e per discriminare le specie patogene da altri microrganismi commensali dell'oro-faringe. Le piastre sono state trasportate tramite borse termostate nel Laboratorio di analisi microbiologiche della Sezione di Igiene e Medicina Preventiva del Dipartimento di Scienze Biomediche e poste ad incubare a 37 °C per 24/48 ore. In particolare, sono stati utilizzati terreni a base di agar sangue ed agar cioccolato, terreni utili al fine di mettere in evidenza alcune caratteristiche identificative delle due specie. Infatti, i pneumococchi, su terreni contenenti sangue, crescono formando colonie viridanti per emolisi incompleta. Successivamente, sulle colonie con tali caratteristiche, si è proceduto con la loro identificazione mediante il test di sensibilità all'antibiotico optochina (vengono considerati positivi gli aloni di inibizione di crescita maggiori di 14 mm). Per quanto riguarda la ricerca del meningococco, questo microrganismo, dopo la fase di crescita su terreno di coltura (le colonie su terreno agarizzato addizionato a sangue di montone appaiono a margini netti e di colore grigio), viene identificato

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

tramite colorazione di Gram e successiva identificazione biochimica con il sistema Vitek 2.

Contestualmente i suddetti tamponi, sono stati analizzati nel Laboratorio di Biologia Molecolare della Sezione di Igiene e Medicina Preventiva del Dipartimento di Scienze Biomediche per la ricerca di: *S.pneumoniae*, *N. meningitidis* e *Haemophylus influenzae*, attraverso tecniche diagnostiche molecolari messe a punto con la collaborazione dei ricercatori del Laboratorio di Immunologia, Dipartimento di Pediatria dell'Ospedale Anna Meyer di Firenze. In particolare, al fine di valutare sensibilità, specificità, valori predittivi delle metodiche molecolari adottate, precedentemente all'analisi sul campo, sono stati effettuati controlli di qualità intra- e inter-laboratorio, sottoponendo ad analisi campioni biologici di riferimento, messi a disposizione dall'Ospedale Meyer.

Tutti i campioni sono stati analizzati con metodica molecolare in PCR real-time, che, grazie all'utilizzo di una copia di *primer* e di una sonda marcata con sostanza fluorescente (*probe*), permette di evidenziare in tempi rapidissimi la presenza del DNA di uno specifico microrganismo e di valutare la quantità di DNA presente. Il protocollo operativo ha previsto,

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

dapprima, l'estrazione del campione mediante il QIAamp DNA Mini kit Qiagen.

Protocollo di estrazione del DNA.

- Aggiungere a 200 µl di campione 200 µl di Lysis Buffer e 20 µl di Proteinasi K.
- Vortexare brevemente e incubare a 56°C per 10 minuti.
- Centrifugare velocemente.
- Aggiungere 200 µl di ethanol (96-100%) e vortexare 10''.
- Trasferire il tutto in una colonnina Qiagen col filtro.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1'.
- Eliminare l'eluito e tenere il filtro da trasferire in un'altra colonnina.
- Aggiungere 500 µl di Washing Buffer 1.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1'.
- Eliminare l'eluito e trasferire il filtro in un'altra colonnina.
- Aggiungere 500 µl di Washing Buffer 2.
- Centrifugare a 14000 rpm per 3'.
- Eliminare l'eluito e trasferire il filtro in una nuova provetta.
- Aggiungere 200 µl di Elution Buffer.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1'.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

- Eliminare il filtro e tenere l'eluito nella provetta.
- L'eluito può essere stoccato a -20°C.

Successivamente all'estrazione del DNA batterico, l'analisi dei campioni è stata effettuata secondo la metodologia della PCR real-time utilizzando coppie di *primers* e *probe* che individuano geni particolarmente conservati da eventuali mutazioni del pneumococco, del meningococco e dell'*H. influenzae*: il gene *lyt A* (pneumococcal autolysin gene) del pneumococco, il gene *ctrA* (meningococcal capsular transfer gene) della *Neisseria meningitidis* e il gene *bexA* (capsule exporting gene) dell'*H. influenzae*. (Tab.7).

Gene	Forward primer	Reverse primer	Probe
<i>lytA</i>	5'-ACGCAATCTAGCAGATGAAGC-3'	5'-TGTTTGGTTGGTTATTCGTGC-3'	5'(JOE)-TTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGG-(TAMRA)-3'
<i>ctrA</i>	5'-GCTGCGGTAGGTGGTTCAA-3'	5'-TTGTCGCGGATTTGCAACTA-3'	6-FAM- ⁶⁸⁰ -CATTGCCACGTGTCAGCTGCACAT-(TAMRA)-3'
<i>bexA</i>	5'-GGCGAAATGGTGCTGGTAA-3	5'- GGCCAAGAGATACTCATAGAACGTT- 3'	NED-CACCACTCATCAAACGAATGAGCGTGG-(TAMRA)-3'

Tab. 7 Primer e probe dei geni *lyt A*, *ctr A* e *bexA*

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Per quanto concerne i meningococchi, successivamente alla loro identificazione di specie, sono stati sierotipizzati utilizzando il *Neisseria meningitidis* serogroups real-time PCR kit, Diagenode. Questa metodica consente di individuare i cinque sierogruppi: A, B, C, Y e W₁₃₅ responsabili di oltre il 99% delle infezioni meningococciche in Europa.

La sierotipizzazione dei campioni risultati positivi per la presenza dello *Streptococcus pneumoniae* è stata valutata utilizzando *primer/probe* scelti sulla base dei sierotipi presenti nei vaccini PCV7 e PCV13. (Tab 8)

Serotype	Forward primer	Reverse primer	Probe
1	CGTGC GGTAATTGAAGCTATGA	TGTGGCCCCAGCAACTCT	JOE-TGCTTGCCCTTGTATAGGGT
3	GGTCAGCAGAAAGTATGCATTGG	TCGTTTATCCAGGGTCTGATGA	JOE-TATTGGATGTGGTTTATCGTGAAGA
4	TGGGATGACATTCTACGCACTA	CCGTCGCTGATGCTTTATCA	FAM-TCCTATTGGATGGTTAGTTGGTGA
5	TTACGGGAGTATCTTATGTCTTTAA TGG	CAGCATTCCAGTAGCCTAAAAGTAG A	JOE-TTGTCTCAGCAACTCTATTGGCTGTGGG
6 A/B	AAGTTGCACTAGAGTATGGGAAG GT	ACATTATGTCCRTGTCTTCGATACAA G	FAM-TGTTCTGCCCTGAGCAACTGG
7A/F	GATGGCATGTGGCAAACCA	TTTGCCCTCCTTAATCATTTCAC	JOE-TTGGCTATCGGCATGGTGGT
9V/A	TGGAATGGGCAAAGGGTAGTA	TCGGTTCCCAAGATTTTCTC	FAM-TTAATCATGCTAACGGCTCATCGA
14	CGACTGAAATGTCAGTAGGAGAAG AT	AATACAGTCCATCAATTACTGCAAT ACTC	FAM- TGTCATTGTTGCCAATACTTGATGGTCTC
18B/C	CCTGTTGTTATTCACGCCTTACG	TTGCACTTCTCGAATAGCCTTACTC	FAM-AACCGTTGGCCCTTGTGGTGGA
19 A	TTCGACGACGTATCAGCTTCA	TCATTGAGAGCCTTAACCTCTTCA	JOE-ACCCAAAACGGTTGACGCATTATACT
19B/F	GGTCATGCGAGATACGACAGAA	TCCTCATCAGTCCCAACCAATT	FAM- ACCTGAAGGAGTAGCTGTGGAACGTTG
23F	TGCTATTTGCGATCCTGTTCAT	AGAGCCTCCGTTGTTTCGTAAA	FAM-TTCTCCGGCATCAAACGTTAAG

Tab. 8 *Primer e probe* dei sierotipi contenuti nei vaccini PCV 7 e PCV 13.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume pari a 25µl contenente 2x Taqman Universal Master Mix. Le sonde marcate con JOE. 5µl di DNA estratto è stato utilizzato per ogni reazione. Sono stati inclusi in ogni corsa un controllo negativo (H₂O) e un controllo positivo (DNA di *Streptococcus pneumoniae* isolato da campioni di sangue o CSF isolati da pazienti e conservati nella ceppo teca del Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale pediatrico Anna Meyer.

Protocollo di amplificazione del DNA

- Preparare unamix per N campioni in una provetta da 1,5 ml
 - 12,5µl di 2x Taqman UniversalMaster Mix
 - 3µl di PrimerForward+Reverse
 - 2µl di Probe
 - 2,5µl di H₂O

Aliquotare 20 µl della mix in provette da 1,5 ml

- Pipettare 5µl di DNA nella miscela PCR
- Aggiungere 5µl di Controllo PCR alla provetta di controllo positiva.
- Aggiungere 5µl di acqua distillata alla provetta di controllo negativa.
- Posizionare i campioni nel blocco termico preriscaldato e calibrato.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Il DNA è stato amplificato con l'ABI 7500 (AppliedBiosystem), utilizzando per tutti le coppie di *primers* gli stessi parametri di amplificazione:

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
1	95 °C	10 min	1
2	95 °C	15 min	45
3	60 °C	1min	

Venivano considerati negativi i campioni con emissione di fluorescenza successiva al 45 ciclo di amplificazione.

I risultati sono stati espressi come proporzioni (%) per quanto attiene alla prevalenza. Differenze tra i valori di prevalenza sono stati testati con il test z. Per i test statistici è stato scelto un livello di errore del primo tipo del 5%. Gli intervalli di confidenza al 95% per i valori di prevalenza sono stati calcolati con il software Stata 11 [STATA Corp. Stata Statistical Software Release 11. College Station, TX: StataCorp LP]

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

4. RISULTATI

Nel complesso, sono stati arruolati 217 bambini (43% femmine e 57% maschi) (Fig. 5); il 7,4% frequentava la scuola di infanzia, il 48,4% la scuola primaria ed il 44,2% la scuola media(Fig. 6).

Complessivamente, la prevalenza di *carriage*, analizzata con metodica molecolare, per almeno uno dei patogeni considerati è risultata pari al 22% (95% CI, 0,15-0,24) (Fig. 7).

I test colturali tradizionali hanno evidenziato una prevalenza nettamente inferiore del *carriage* sia per lo *S.pneumoniae* sia per la *N. meningitidis*. La prevalenza di *S. pneumoniae* con metodica colturale è risultata infatti del 6%, contro il 22% evidenziato con la metodica molecolare, mentre le metodiche colturali non hanno messo in evidenza nessuno stipite di *N. meningitidis* contro il 3% evidenziato con la metodica molecolare(Fig. 8). Analizzando i risultati ottenuti con le due metodiche ed applicando un test di *agreement*, emerge un valore tra i test del 78,3%; tuttavia, applicando il test di Cohen (Kappa di Cohen), coefficiente statistico che rappresenta il

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

grado di accuratezza e affidabilità oltre il caso in una classificazione statistica, si ottiene una scarsa concordanza (K: 0,149) (IC 95% 0.10- 0,20).

L'indice «Kappa» di Cohen

		Es. colturale		
		+	-	
PCR	+	7	41	48
	-	6	163	169
		13	204	217
Concordanza complessiva				0,78

Linee-guida di interpretazione:

Kappa	Concordanza
<0.01	nulla
0.01-0.20	scarsa
0.21-0.40	modesta
0.41-0.60	moderata
0.61-0.80	buona
0.81-1.00	eccellente

Agreement: 0,78
Kappa di Cohen: 0,149

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Analizzando in maniera più approfondita i 47 risultati discordanti, 41 sono risultati positivi alla *Real-Time* PCR ma negativi all'esame colturale. Questo evidenzia la grande capacità analitica delle metodiche molecolari nell'individuare la presenza di patogeni, anche se presenti in scarsa quantità o "stressati" per condizioni ambientali sfavorevoli, andando a ricercare i loro acidi nucleici. Dei 6 campioni risultati, invece, positivi all'esame colturale ma negativi alla PCR, 4 sono risultati falsi positivi in quanto positivi al test dell'optochina ma negativi ai più affidabili test sierologici; 2, invece, erano caratterizzati dall'aver un CT della *Real-Time* PCR particolarmente elevato e superiore al cut-off indicato per esprimere positività con la metodica molecolare.

Passando ad analizzare la prevalenza nelle diverse coorti, per almeno un microrganismo, l'andamento decresce in funzione dell'età. Il valore più elevato è stato riscontrato nei bambini della scuola di infanzia (87%)(95% CI, 0,61-0,95), 42%(95% CI, 0,33-0,47) nella scuola primaria ed il 13%(95% CI, 0,13-0,27) nella scuola media (Fig. 9).

Analizzando i risultati di prevalenza per singolo patogeno, emerge che i valori più elevati di prevalenza per *S. pneumoniae* si osservano nei

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

bambini della scuola di infanzia, 60%(95% CI, 0,34-0,73), seguiti da quelli della primaria, 23%(95% CI, 0,13-0,27) e da quelli della scuola media 16%(95% CI, 0,05-0,19) (Fig.10).

Per quanto riguarda *N. meningitidis*, l'unico sierogruppo identificato apparteneva al gruppo B, con una prevalenza del 20% (95% CI, -0,06-0,30) nella scuola d'infanzia, del 4% (95% CI,-0,06-0,06) nella scuola media, mentre, nessun campione è risultato positivo nella scuola primaria (Fig.11).

Anche per quanto riguarda l'*H.influenzae* la prevalenza decresce in funzione dell'età: il valore più elevato è stato riscontrato nella scuola d'infanzia 60%(95% CI 0,34-0,73), 26% (95% CI 0,17-0,31) nella scuola primaria ed il 3%(95% CI -0,07-0,05) nella scuola media.(Fig.12).

Analizzando i risultati ottenuti sulla ricerca dei sierotipi di pneumococco isolati dai bambini delle tre coorti, con particolare riguardo a quelli contenuti nei vaccini PCV7 e PCV 13, è stata rilevata una più elevata prevalenza per i sierotipi 18(38%), 4(11%) e 19F(4%) presenti nel vaccino PCV7, mentre oltre a quelli già citati, anche per i sierotipi 3 (17%), 5 (15%) e 19A (4%) compresi, invece, nel vaccino PCV13 (Fig. 13).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Una quota del 30% era rappresentata da altri sierotipi diversi da quelli contenuti nei suddetti vaccini (Fig. 13).

Analizzando la prevalenza di *S. pneumoniae* in funzione dello stato vaccinale dei soggetti, si evince dalla figura 14 che lo stato di portatore decresce in modo statisticamente significativo con l'avanzare dell'età nella coorte dei soggetti vaccinati: 60% (95% CI 0,34-0,73) nella scuola d'infanzia, 30% (95% CI 0,17-0,36), nella scuola primaria e 22%(95% CI-0,11-0,36) nella scuola media.

Appare interessante peraltro rilevare che tra i non vaccinati, unicamente presenti nella scuola primaria e media, è stata osservata una minore prevalenza del *carriage* (Fig. 14). Tale minore prevalenza risulta indipendentemente dal sierotipo (Fig. 15)

La prevalenza dei diversi sierotipi osservati nel *carriage* non appare legata in maniera significativa allo stato vaccinale dei soggetti (Fig. 15), in particolare si osserva una maggiore prevalenza del *carriage* dei sierotipi 18 e 5 in tutte e tre le categorie di vaccinati e non vaccinati.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

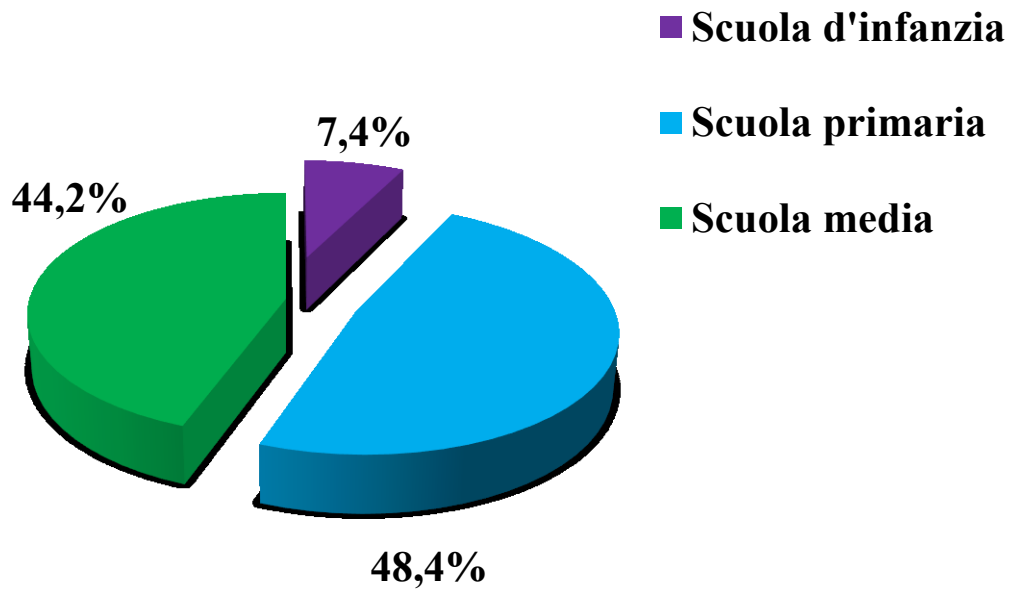


Fig.5 Divisione per fasce d'età

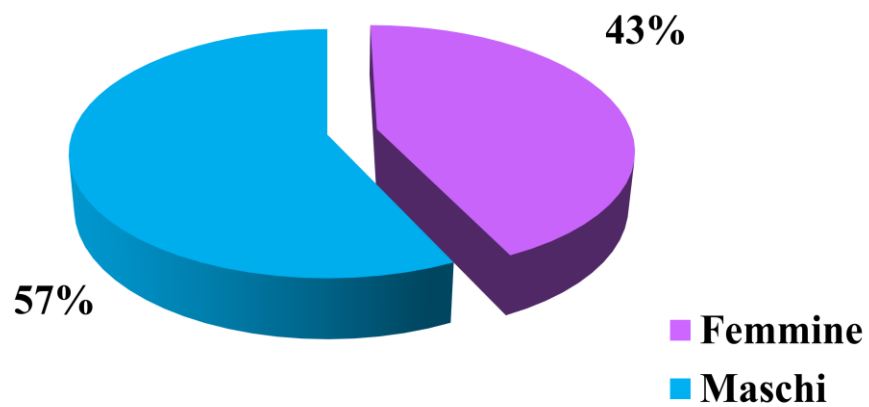


Fig. 6 Divisione per sesso

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

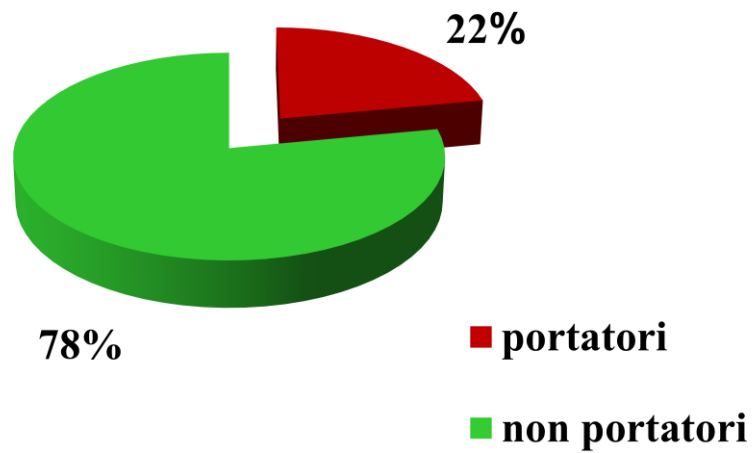


Fig. 7 Prevalenza del *carriage* per almeno un microrganismo

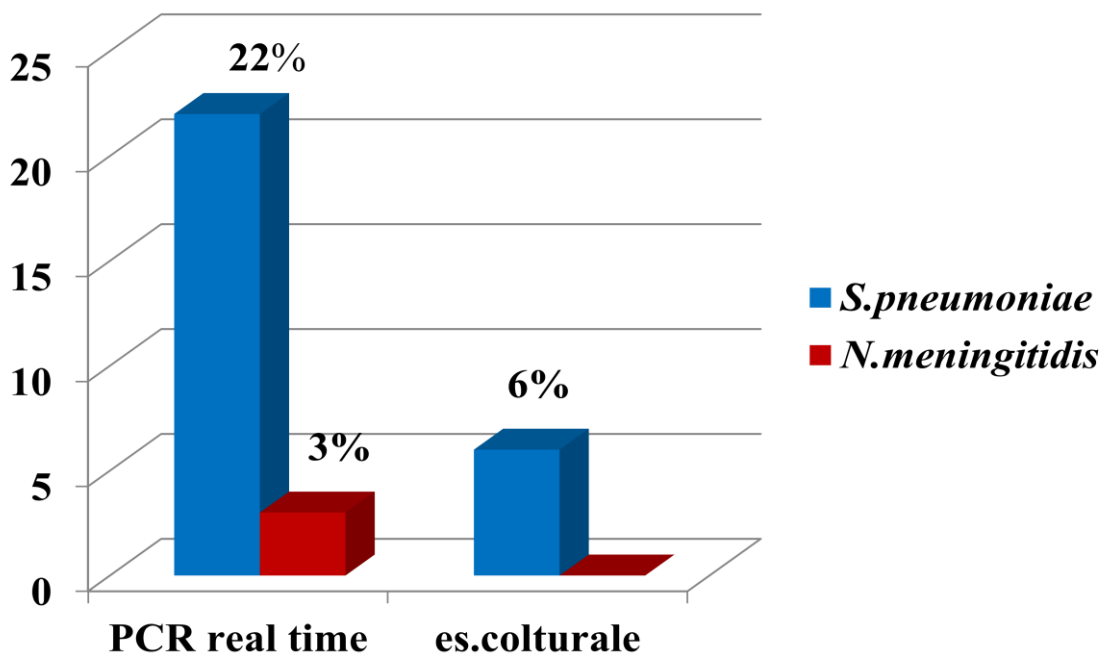


Fig. 8 Confronto tra metodiche molecolari e metodiche colturali

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

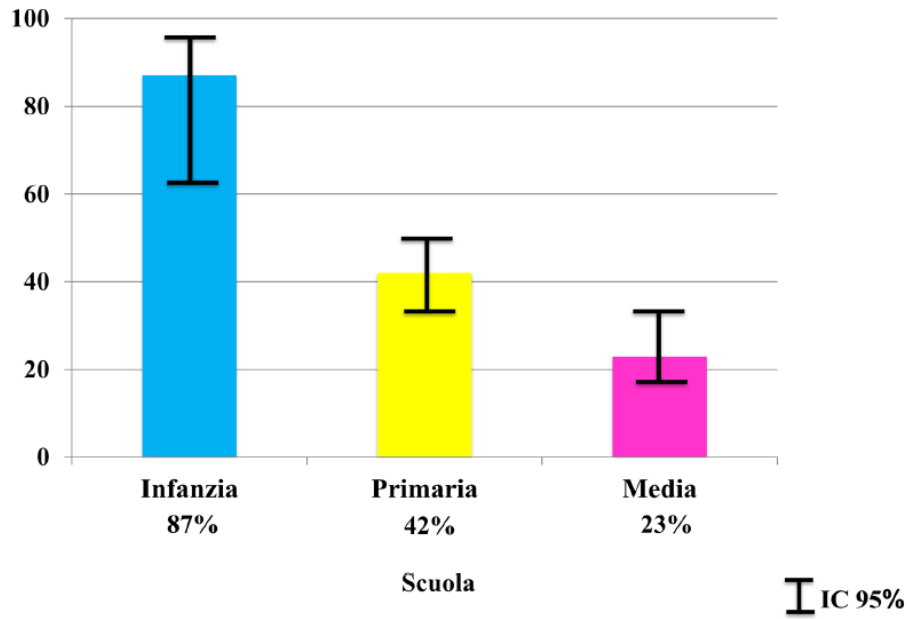


Fig. 9 Prevalenza per almeno un microrganismo nelle diverse coorti d'età

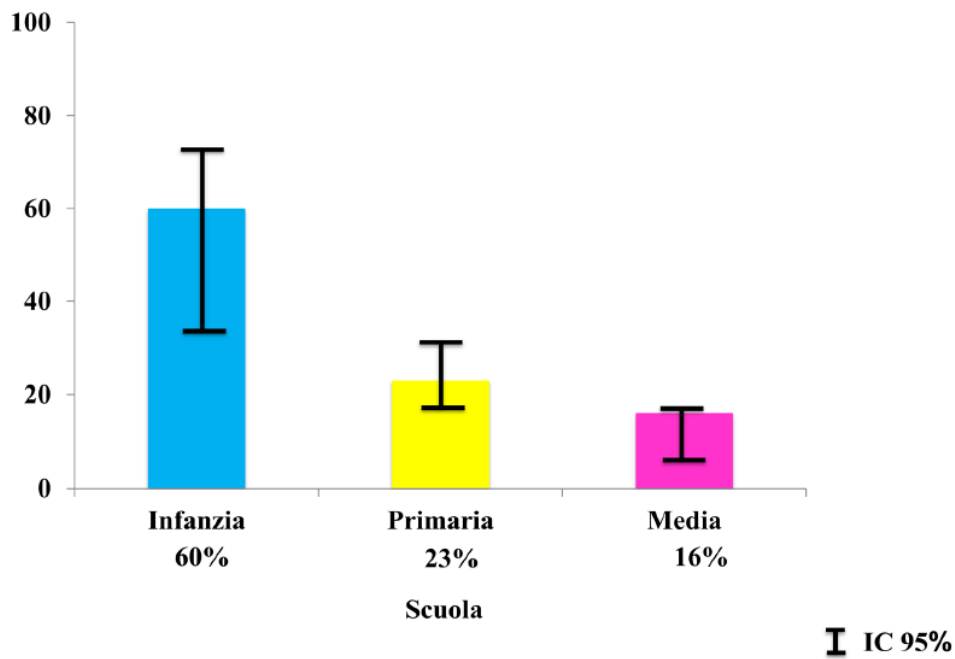


Fig. 10 Prevalenza *S.pneumoniae* nelle diverse coorti d'età

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

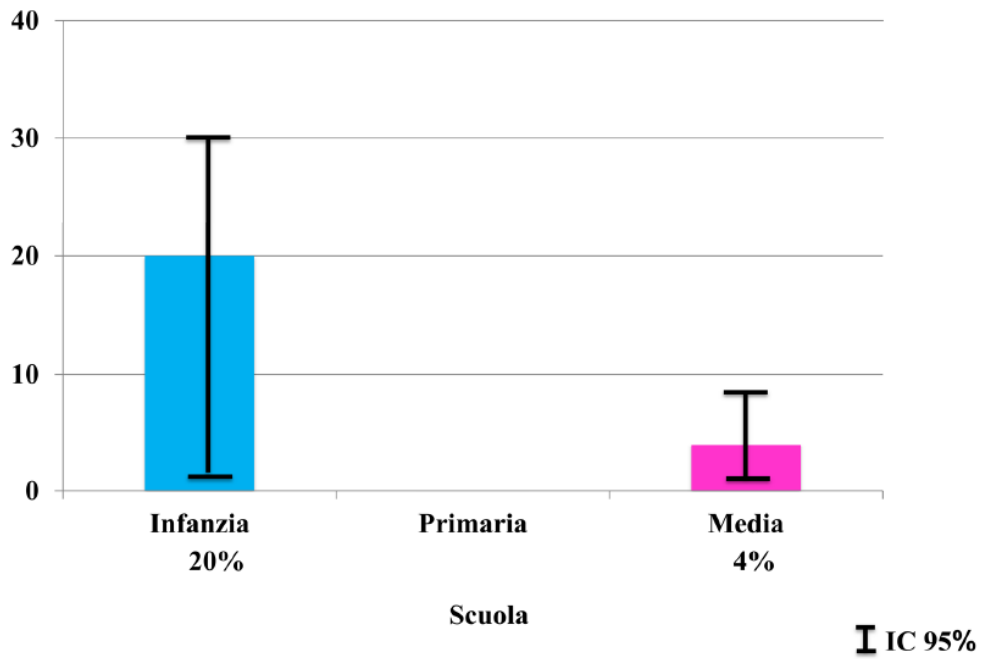


Fig. 11 Prevalenza *N.meningitidis B* nelle diverse coorti d'età

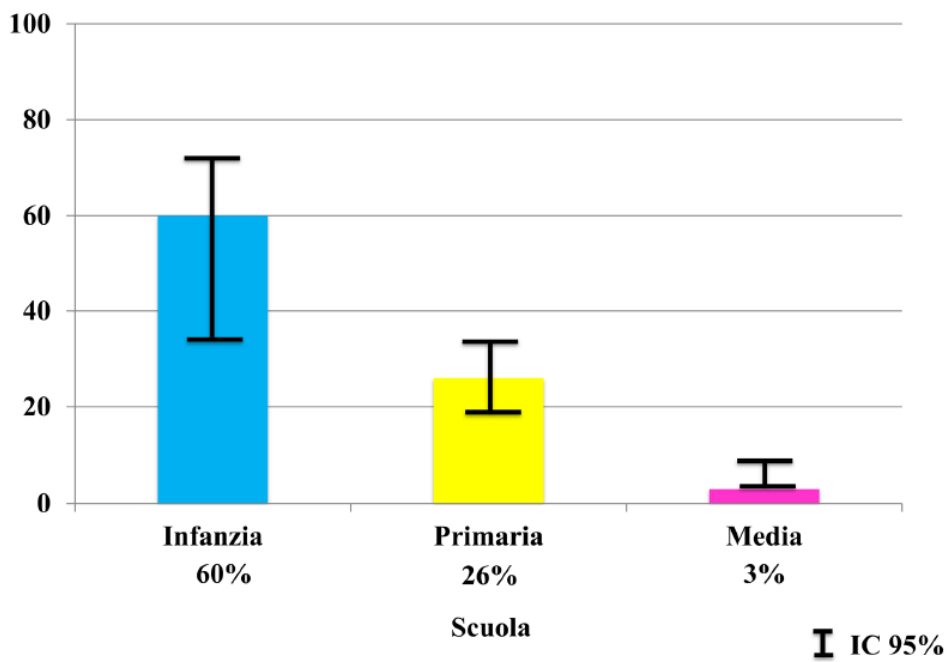


Fig. 12 Prevalenza *H.influenzae* nelle diverse coorti d'età

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

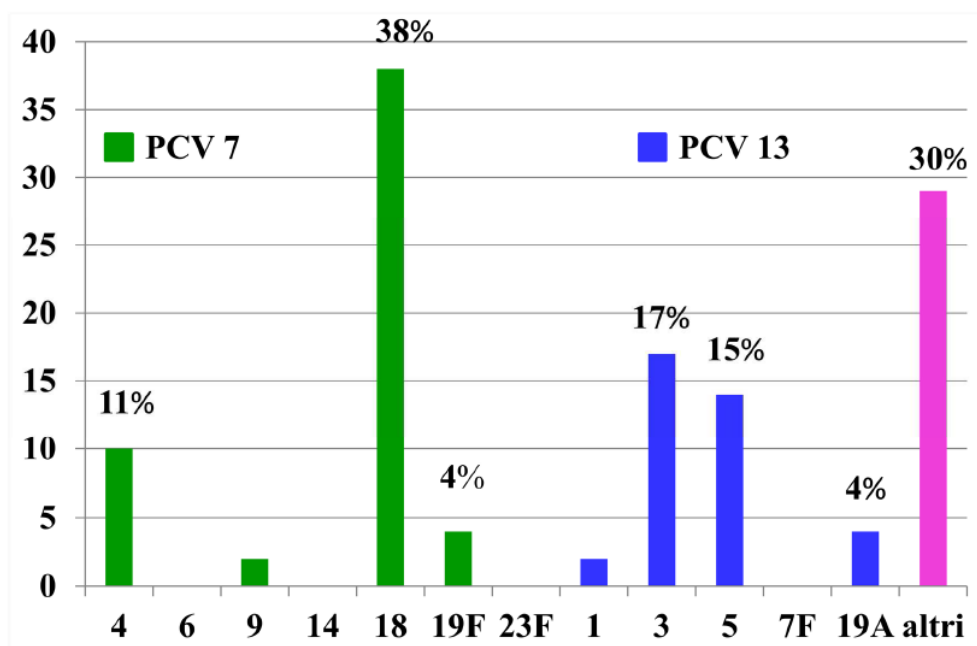


Fig. 13 Prevalenza dei diversi sierotipi *S.pneumoniae*

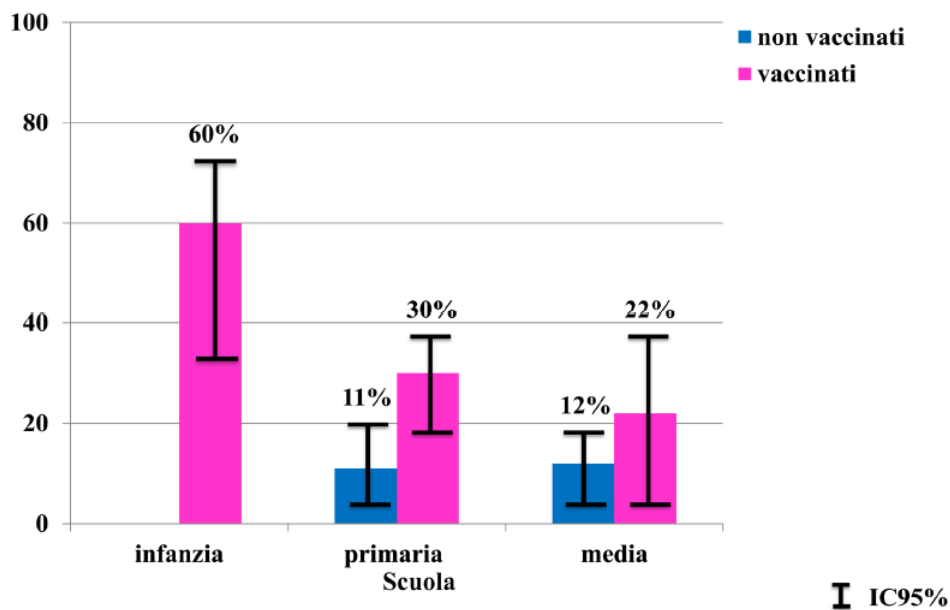


Fig. 14 Prevalenza *S.pneumoniae* in soggetti vaccinati e non vaccinati

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

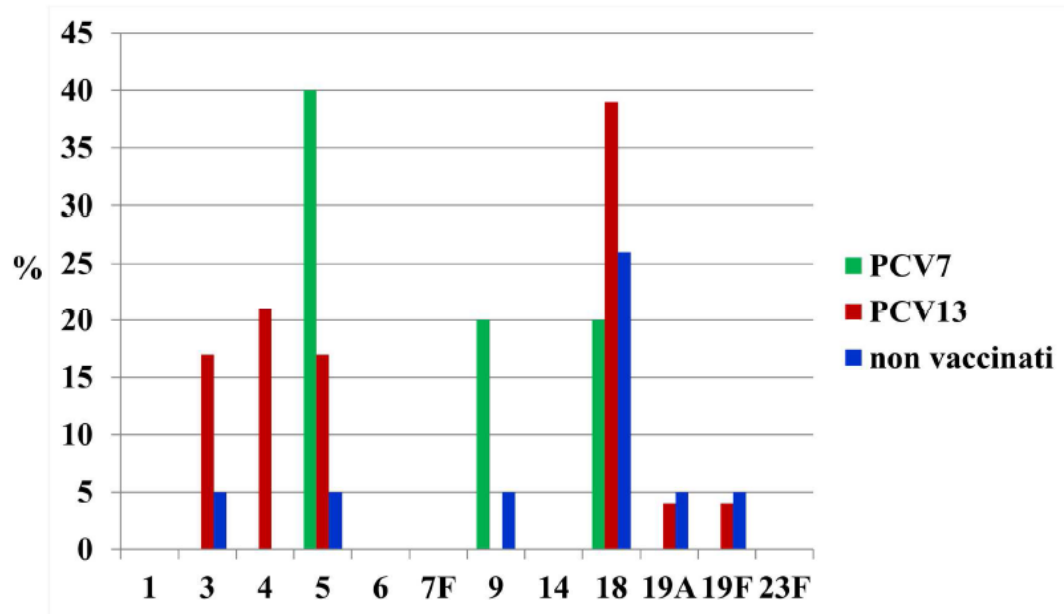


Fig. 15 Prevalenza sierotipi *S.pneumoniae* per tipologia di vaccinazione

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

5. DISCUSSIONE

Lo scopo del presente studio era di analizzare il *carriage* dei sierotipi di *S.pneumoniae* e di altri patogeni respiratori in tamponi orofaringei, in un campione di soggetti di età pediatrica, al fine di valutare l'impatto esercitato dalle vaccinazioni.

In primo luogo è stata evidenziata la scarsa affidabilità dei test colturali rispetto a quelli molecolari, particolarmente sensibili questi ultimi e più idonei a rilevare la presenza dei microrganismi ricercati in un sito anatomico ricco di flora microbica concomitante. Tale aspetto fa ipotizzare la conseguente sottostima diagnostica di casi di malattia invasiva sostenuta da tali microrganismi se l'analisi viene effettuata attraverso test colturali.

In diversi studi, infatti, i risultati ottenuti con i metodi molecolari sono stati paragonati con quelli ottenuti con i metodi colturali convenzionali e in ognuno di essi, qualunque fosse il gene utilizzato o il campione biologico di partenza, i metodi molecolari hanno dimostrato una sensibilità superiore a quelli colturali. In particolare, prendendo come riferimento la

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

positività dei test colturali, la sensibilità dei test molecolari (PCR o *real-time* PCR) non risulta inferiore a questi (28,73,81).

Peraltro i risultati ottenuti, in uno studio condotto, presso l' Ospedale Pediatrico Meyer, su una popolazione pediatrica dimostrano che i metodi molecolari sono almeno il doppio più sensibili dei metodi colturali nella diagnosi di meningite o sepsi e sono almeno 10 volte più sensibili nella diagnosi di polmonite pneumococcica (3).

L'analisi condotta nelle diverse coorti d'età ha messo in evidenza che lo stato di portatore per i tre microrganismi considerati è maggiormente presente nei bambini di 3-5 anni, con prevalenze decrescenti in funzione dell'età indipendentemente dalla vaccinazione.

Inaspettatamente lo stato di *carriage* per lo *Streptococcus pneumoniae* appare presente anche nei vaccinati e questo è attribuibile ad una diminuzione dei livelli anticorpali mano a mano che ci si allontana dalla data della vaccinazione, essendo il correlato di protezione per lo stato di *carriage* più elevato rispetto a quello per la protezione della malattia invasiva (15,66).

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Infatti, nella valutazione della immunogenicità dei vaccini pneumococcici coniugati, il correlato immunologico di protezione di 0,35 µg/mL si riferisce unicamente alle malattie invasive (meningite purulenta acuta, batteriemia occulta, sepsi), mentre per altre localizzazioni dello pneumococco, il correlato di protezione è più elevato. Per la prevenzione dello stato di portatore nasofaringeo, infatti, il correlato di protezione è risultato addirittura di 5µg/mL (14).

Ne consegue che quanto maggiore risulta il titolo di anticorpi postvaccinazione pneumococcica tanto maggiore appare la protezione nei confronti della colonizzazione nasofaringea.

Questo fenomeno avviene naturalmente anche in assenza di vaccinazione a seguito di colonizzazione/infezione da parte dei microrganismi. Nella storia naturale lo stato di portatore decresce con l'età a causa di una naturale e progressiva immunizzazione. Questo fenomeno spiega il basso tasso di *carriage* rilevato nei non vaccinati nelle coorti di soggetti più grandi, mentre essendo la vaccinazione nei neonati caratterizzata da una elevata copertura (superiore al 95% nella nostra realtà territoriale), non abbiamo dati relativi ai non vaccinati nei più piccoli.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Tale fenomeno di immunizzazione naturale interferisce con l'immunità conferita dalla vaccinazione. In ogni caso, i dati a nostra disposizione evidenziano che il ruolo della immunizzazione naturale, sembra prevalere su quello indotto dalla vaccinazione. È possibile che altri meccanismi immunologici di protezione vengano elicitati durante l'infezione/colonizzazione naturale oltre alla mera funzione secretoria anticorpale indotta dagli antigeni capsulari vaccinali.

Questo aspetto risulta di grande rilevanza in quanto da un lato è noto che i vaccini coniugati inducono una efficace protezione nei confronti delle malattie invasive nella età di maggior rischio (prima infanzia), dall'altro non sarebbe così importante il fenomeno di *replacement* indotto dalla vaccinazione in quanto la protezione nei confronti del *carriage* appare incompleta e non duratura.

Inoltre i risultati da noi ottenuti sulla ricerca dei sierotipi di pneumococco isolati dai bambini delle tre coorti, con particolare riguardo a quelli contenuti nei vaccini PCV7 e PCV 13, ha rilevato una più elevata prevalenza per i sierotipi 18 (38%), 4 (11%) e 19F (4%) presenti nel

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

vaccino PCV7, mentre oltre a quelli già citati, anche per i sierotipi 3 (17%), 5 (15%) e 19A (4%) compresi, invece, nel vaccino PCV13.

Sebbene in soggetti vaccinati il livello di anticorpi specifici rimanga sufficiente per prevenire l'infezione da malattia invasiva, lo stesso livello è insufficiente per prevenire la ricolonizzazione da ceppi presenti nei vaccini. Tuttavia la ricolonizzazione nasofaringea con i sierotipi del PCV7 non può essere considerata un fallimento vaccinale ma una inaspettata conseguenza della diminuzione fisiologica del livello anticorpale (60).

D'altra parte la ricolonizzazione da parte dei sierotipi vaccinali in soggetti vaccinati da più tempo limiterebbe questo fenomeno facendo invece emergere la necessità di una protezione diretta della popolazione anziana che non usufruirebbe di un effetto di *herd-protection*. Tale aspetto necessita di un continuo monitoraggio.

Inoltre nel complesso il 30% dei soggetti positivi per *S. pneumoniae* non presentavano sierotipi contenuti nei due tipi di vaccini.

Parte di questo fenomeno è attribuibile almeno nella immediatezza della vaccinazione ad un fenomeno di *replacement*.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

Appare interessante evidenziare che i campioni risultati positivi per *N. meningitidis* appartenevano al sierogruppo B e che il *carriage* per tale microrganismo è più elevato nei bambini di età dai 3-5 rispetto alla fascia degli adolescenti. Tale osservazione, assai rilevante dal punto di vista epidemiologico, testimonia l'effetto indiretto di protezione (*herdimmunity*) indotto dal vaccino coniugato nei confronti del sierogruppo C introdotto nella popolazione pediatrica con offerta attiva e gratuita a partire dall'anno 2007, nel secondo anno di età e nell'adolescenza.

È stato constatato che l'uso del vaccino coniugato contro il meningococco C si accompagna a una netta riduzione (67-75%) della prevalenza del meningococco C nel nasofaringe dei bambini vaccinati (64,52).

D'altro canto la prevalenza del *carriage*, per il meningococco di tipo B da noi evidenziata, desta preoccupazione anche per i recenti casi di malattia invasiva da meningococco di tipo B, verificatisi in questi ultimi anni soprattutto nel Nord dell'Isola, rendendo necessario il ricorso alla vaccinazione dell'infanzia anche contro questo sierogruppo. Vaccinazione raccomandata da diverse Società scientifiche e che, nelle more della sua implementazione nel nuovo Piano di Prevenzione Vaccinale Nazionale, la

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

nostra ASL ha autonomamente deciso di introdurre, alla luce degli eccellenti risultati ottenuti contro il meningococco di tipo C. Quindi sarà interessante verificare in futuro tale osservazione epidemiologica sul *carriage* alla luce della recente introduzione della vaccinazione anti meningococco B.

In conclusione le vaccinazioni dell'infanzia hanno contribuito ad un declino delle malattie invasive dovute ad alcuni batteri capsulati.

Il temuto pericolo del rimpiazzo, sebbene descritto non appare al momento erodere significativamente i vantaggi ottenuti con la vaccinazione,

Appare peraltro necessario, come raccomandato dalle linee guida dell'OMS, sorvegliare l'andamento della patologia ma anche del *carriage*, e dunque dei rischi derivanti per la popolazione.

In questo senso l'uso di metodiche molecolari da affiancare ai tradizionali metodi colturali può essere un valido aiuto.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

BIBLIOGRAFIA

1. **Alcalà B, Arreaza L, Salcedo C et al.** Capsule switching among C: 2b: P1. 2,5 meningococcal epidemic strains after mass immunization campaign, Spain. *Emerg Infect Dis* 8: 1512-4, 2002.
2. **Andrews N, Waight PA, Borrow R et al.**, “Using the indirect cohort design to estimate the effectiveness of the seven valent pneumococcal conjugate vaccine in England and Wales, *PLoS ONE*, vol. 6, n°. 12, 2011.
3. **Azzari C, Moriondo M, Indolfi G et al.** Molecular detection methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by *Streptococcus pneumoniae* in Italian children. *J Medicam Microbiol* 57:1205-12,2008.
4. **Bartolozzi G.** Vaccini e vaccinazioni. Elsevier III Ed. 2012.
5. **Beal B, McEllistrem MC, Gertz RE et al.** Pre-and postvaccination clonal compositions of invasive pneumococcal serotype for isolates

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

collected in the United States in 1999, 2001 and 2002. *J Clin Microbiol* 44: 999-1017, 2006.

6. **Bijlsma MW, Brouwer MC, Spanjaard L, van de Beek D, and van der Ende A.** A decade of herd protection after introduction of meningococcal serogroup C conjugate vaccination. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 59, n° 9, pp. 1216–1221, 2014.
7. **Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM.** *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*; 4:144–54, 2004.
8. **Bridy-Pappas AE, Margolis MB, Center KJ, Isaacman DJ.** *Streptococcus pneumoniae*: Description of the Pathogen, Disease Epidemiology, Treatment, and Prevention. *Pharmacotherapy*, 25(9):1193–212, 2005.
9. **Broome CV.** The carrier state: *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemother* 18 (Suppl): 25-34, 1986.
10. **Brueggerman AB, Peto TE, Crook DW et al.** Temporal and geographic stability of the serogroup-specific disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *J Infect Dis* 190: 1203-11, 2004.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di Streptococcus pneumoniae e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

11. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease—United States, 1998–2003. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, vol. 54, pp. 893–897, 2005.
12. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2013. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, *Streptococcus pneumoniae*, 2013.
13. **Conklin L, Loo JD, Kirk J et al.** Systematic review of the effect of pneumococcal conjugate vaccine dosing schedules on vaccine-type invasive pneumococcal disease among young children. *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 33, supplement 2, pp. S109–S118, 2014.
14. **Dagan R, Givon-Lavi N, Fraser D et al.** Serum serotype specific pneumococcal anti capsular immunoglobulin G concentration after immunization with a 9-valent conjugate pneumococcal vaccine correlate with nasopharyngeal acquisition of pneumococcus. *J Infect Dis* 192: 367-76, 2005
15. **Davis SM, Deloria-Knoll M, Kassa HT, O'Brien KL.** Impact of

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

pneumococ-cal conjugate vaccines on nasopharyngeal carriage and invasive disease among unvaccinated people: review of evidence on indirect effects. *Vaccine*, 32:133–45, 2013.

16. **Devine VT, Jefferies JM, Clarke SC, and Faust SN.** Nasopharyngeal Bacterial Carriage in the Conjugate Vaccine Era with a Focus on Pneumococci. Hindawi Publishing Corporation Journal of Immunology Research Volume , 8 pages 2015.
17. **Dinleyici EC, Yargic ZA.** Pneumococcal conjugated vaccines: impact of PCV-7 and new achievements in the post vaccine era. *Expert Rev Vaccines* 7: 1367-94, 2008.
18. **Dolan-Livengood JM, Miller YK, Martin Le et al.** Genetic basis for nongrupable *Neisseria meningitides*. *J InfectDis* 187: 1616-28, 2003.
19. **Douglas RM, Hansman D, Miles HB, and Paton JC.** Pneumococcal carriage and type-specific antibody. Failure of a 14-valent vaccine to reduce carriage in healthy children,” *The American Journal of Diseases of Children*, vol. 140, no. 11, pp. 1183–1185, 1986.
20. **Durando P, Crovari P, Ansaldi F, Sticci C, Turello V et al.** Universal childhood immunization against *Streptococcus pneumoniae*:

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

the five- year experience of Liguria Region, Italy. *Vaccine*. 27:3459-62, 2009.

21. **ECDC surveillance report**. Annual epidemiological report “Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data” 2013.
22. **EMA** (European Medicines agency), www.ema.europa.eu
23. **Eskola J. Kayhty H.** Pneumococcal vaccine. *Ballière’s Clinical Pediatrics* 5: 101-20, 1997.
24. **European Centre for Disease Prevention and Control**. Surveillance of invasive bacterial diseases in Europe, 2012. Stockholm: ECDC; 2015.
25. **European Medicines Agency**. European Published Assessment Reports, Prevenar 13, www.ema.europa.eu/ema/2014.
26. **Fazio C, Neri A, Tonino S et al.** Characterization of *Neisseria meningitidis* C strains causing two clusters in the North of Italy in 2007 and 2008. *Eurosurveillance* 14: 1-2, 2009.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

27. **Fedson DS, Amthony J, Scott G.** The Burden of pneumococcal disease among adults in developed and developing countries: what is and is not known. *Vaccine* 17: S11-8, 1999.
28. **File TM.** Community-acquired pneumonia. *Lancet* 2003,362: 1991-2001.
29. **Flamaing J, Peetermans WE, Vandeven J, Verhaegen J.** Pneumococcal colonization in older persons in a nonoutbreak setting. *J Am Geriatr Soc*;58:396–8, 2010.
30. **Food and Drug Administration, Vaccines: approved products.** Prevenar 13 pneumococcal 13-valent conjugate vaccine www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm201667.htm.2014.
31. **Ghaffar F, Friedland IR, and Mccracken GH Jr.** Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 18, n° 7, pp. 638–646,1999.
32. **Girard MP, Preziosi MP, Aguado MT, Kieny MP.** A review of vaccine research and development: Meningococcal disease. *Vaccine* 24: 4692-700, 2006.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

33. **Giufrè M, Cardines R, Caporali MG, Accogli M, D’Ancona F, Cerquetti M.** Ten years of Hib vaccination in Italy: prevalence of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* among invasive isolates and the possible impact on antibiotic resistance. *Vaccine*. 29:3857–62, 2011.
34. **Giufrè M, et al.** Carriage of *Haemophilus influenzae* in the oropharynx of young children and molecular epidemiology of the isolates after fifteen years of *H. influenzae* type b vaccination in Italy. *Vaccine* Article in press 2015.
35. **Granoff DM, Polland AJ.** Reconsideration of the use of meningococcal polysaccharide vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 26: 716-22, 2007.
36. **Griffin MR, Zhu Y, Moore, Whitney MR, and Grijalva CG.** U.S. hospitalizations for pneumonia after a decade of pneumococcal vaccination,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 369, no. 2, pp. 155–163, 2013.
37. **Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C et al.** The contribution of specific for conjugate vaccine formulation and use. Part II. *Clin Infect Dis* 30: 100-40, 2000.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

38. **Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C et al.** Which pneumococcal serogroup cause the most invasive disease: Implications for conjugate vaccine formulation and use. Part I. Clin Infect Dis 30: 100-21, 2000.
39. **Hirst RA, Gosai B, Rutman A et al.** *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin and autolysin has reduced virulence in meningitides. J Infect Dis 197: 744-51, 2008.
40. **Imöhl M, Van DerLinden M, Mutscher C, Reinert RR.** Serotype distribution of invasive pneumococcal disease during the first 60 days of life. Vaccine 28:4758-62, 2010.
41. **Isaacman DJ, McIntosh ED, and ReinertR,** “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. International Journal of Infectious Diseases, vol. 14, n°. 3, pp. e197–e209, 2010.
42. **Istituto Superiore di Sanità** “Dati di sorveglianza delle malattie batteriche invasive aggiornati al 10 aprile 2013.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

43. **Istituto Superiore di Sanità.** Rapporto malattie batteriche invasive. (Aggiornamento del 12 agosto 2015).
44. **Jackson LA, Gurtman A, van Cleeff M et al.** Immunogenicity and safety of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in pneumococcal vaccine-naive adults. *Vaccine*, vol. 31, n°. 35, pp. 3577–3584, 2013.
45. **Kayhty H, Auranen K, Nohynek H, Dagan R, Makela H.** Nasopharyngeal colonization: a target for pneumococcal vaccination. *Expert Rev Vaccines*;5:651–67, 2006.
46. **Kremastinou J, Tzanakaki G, Pagalis A et al.** Detection of IgG and IgM to meningococcal outer membrane proteins in relation to carriage of *Neisseria meningitidis* or *Neisseria lactamica*". *FEMS Immunol Med Microbiol* 24: 73-78, 1999.
47. **Kyaw MH, Christie P, Clarke SC et al.** Invasive pneumococcal disease in Scotland, 1999-2001: use of record linkage to explore associations between patients and disease in relation to future vaccination policy. *Clin Infect Dis* 37: 128391, 2003.
48. **La Placa M.** Principi di microbiologia medica XIII Ed 2012.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

49. **Ladhani S, Slack MP, Heath PT, et al.** Invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 1996–2006. *Emerg Infect Dis*; 16:455–63, 2010.
50. **Lo H, Tang CM, Exley RM.** Mechanism of avoidance of host immunity by *Neisseria Meningitidis* and its effect on vaccine development. *Lancet Infect Dis* 9:418-27, 2009.
51. **Loughlin AM, Hsu K, Silverio AL, Marchant CD, and Pelton SI.** Direct and indirect effects of PCV13 on nasopharyngeal carriage of PCV13 unique pneumococcal serotypes in Massachusetts’ children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 33, pp. 504–510, 2014.
52. **Maiden MCJ, Ibarz-Pavòn AB, Urwin R et al.** Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity. *J Infect Dis* 197: 737-43, 2008.
53. **Marchisio P, Eposito C, Schito GC et al.** Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children: implications for the use of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine”. *Emerg Infect Dis* 8: 479-84, 2002.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

54. **Mastrantonio P, Sofia T, Neri A et al.** Characterization of invasive meningococcal isolates from Italian children and adolescents. *Clin Microbiol Infect* 13: 100-3, 2007.
55. **Messina AF, Katz-Gaynor K, Barton T et al.** Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Dallas, TX, children from 1999 through 2005. *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 26, n° 6, pp. 461–467, 2007.
56. **Mobbs KJ, Van Saene HKF, Sunderland D, and Davies PDO,** Oropharyngeal Gram-negative bacillary carriage in chronic obstructive pulmonary disease: relation to severity of disease,” *Respiratory Medicine*, vol. 93, n° 8, pp. 540–545, 1999.
57. **Murphy TV, Pastor P, Medley F, Osterholm MT, Granoff DM.** Decreased *Haemophilus* colonization in children vaccinated type b conjugate vaccine”. *J Pediatr*;122:517–23, 1993.
58. **National Health Service.** The Safest Way to Protect Our Children from Pneumococcal Disease, NHS Factsheet, Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV) for Children. 2010.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

59. **Nuermberger E, Bishai WR.** The clinical significance of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae*: it's all relative. Clin Infect Dis 38: 99-103, 2004.
60. **Pasinato A, et al.** Pneumococcal serotype distribution in 1315 nasopharyngeal swabs highly vaccinated cohort of Italian children as detected by RT-PCR. Vaccine 32: 1375-1381, 2014.
61. **Peltola M.** Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates". Clin Microbiol;13:302–17.2000.
62. **Poland GA.** The prevention of pneumococcal disease by vaccine promise and challenges. Infect Dis Clin North Am 15: 97-122, 2001.
63. **Principi N, Baggi, Esposito S.** Prevention of acute otitis media using currently available vaccines. Future Microbiology, vol. 7, no. 4, pp. 457–465, 2012.
64. **Ramsay ME, Andrews NJ, Trotter CL et al.** Herd immunity from meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England: database analysis. BMJ 325: 365-6, 2003.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

65. **Rapporto 042** Dati e 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” Gruppo di Lavoro del CNESPS. Centro nazionale di epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute. ISS Dicembre 2013.
66. **Rennels MB, Edwards KM, Keyserling HL, Reisinger KS, Hogerman DA, MadoreDV, et al.** Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal vaccine conjugated to CRM197 in United States infants. *Pediatrics*, 101:604–11, 1998;
67. **Schmitt HJ, Knuf M, Ortiz E et al.** Primary vaccination of infant with diphtheria- tetanus- acellular pertussis-hepatitis B-inactivated polio virus and *Haemophilus influenzae* type b vaccines given as either or mixed injections. *J pediatr* 137: 304-12, 2000.
68. **Simell B, Auranen K, Kayhty H, Goldblatt D, Dagan R, and O'Brien K L,** The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Review of Vaccines*, vol. 11, n° 7, pp. 841–855, 2012.
69. **Snape MD, Pollard AJ.** Meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Lancet Infect Dis* 5: 21-30, 2005.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

70. **Stefanelli P, Fazio C, Neri A et al.** Long-term predominance of a rare meningococcal phenotype in a small geographic area". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 566-8, 2003.
71. **Stephens D, Greenwood B, Brandtzaeg P.** Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria Meningitidis*. *Lancet* 369:2196-210,2007.
72. **Taha MK et al.** Vaccine: Development and Therapy 2012:215-22 2012.
73. **Tarragò D, Fenolla, Sánchez-Tatay D et al.** Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*14:828-34, 2008.
74. **Tocheva AS, Jefferies JMC, Christodoulides M, Faust SN, and Clarke SC.** Distribution of carried pneumococcal clones in UK children following the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine: a 3-year cross-sectional population based analysis. *Vaccine*, vol. 31, n°. 31, pp. 3187–3190, 2013.
75. **Tocheva AS, Jefferies JMC, Rubery H et al.** Declining serotype coverage of new pneumococcal conjugate vaccines relating to the

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

carriage of *Streptococcus pneumoniae* in young children. *Vaccine*, vol. 29, n°. 26, pp. 4400–4404, 2011.

76. **Tunkel A, Schilder AG.** Acute Meningitis. In: **Mandell GL, Douglas RM, Bennet JE, editors. Mandell, Douglas, and Bennett. Principles and practice of infectious diseases, Sixth Edition ed.** Philadelphia: Elsevier. p. 1083-126, 2005.
77. **Väkeväinen M, Eklund C, Eskola J, Kayhty H.** Cross-reaction of antibodies to type 6B and 6 A polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*, evoked by pneumococcal conjugate vaccines in the infants. *J Infect Dis* 184: 789-93, 2001.
78. **Van de Beek D, Brouwer MC, Thwaites GE, Tunkel AR.** Advances in treatment of bacterial meningitis. *Lancet*;380(9854):1693-702, 2012.
79. **Van Hoek J, Sheppard CL, Andrews NJ et al.** Pneumococcal carriage in children and adults two years after introduction of the thirteen valent pneumococcal conjugate vaccine in England. *Vaccine*, vol. 32, pp. 4349–4355, 2014.

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari

80. **Vergnano S, Heath P.** *Neisseria meningitidis* serogrup A vaccine: an overview. *Expert Rev Vaccines* 2: 571-82, 2003.
81. **Werno AM, Muedoch DR.** Laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. *Clin Infect Dis* 46: 926-32, 2008.
82. www.epicentro.iss.it/problemi/meningiti/meningite.asp

Silvia Deidda

Carriage rinofaringeo: distribuzione dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* e altri patogeni respiratori

Tesi di dottorato in Scienze biomediche

Università degli Studi di Sassari