

Izabela Korona-Głowniak<sup>1\*</sup>, Anna Malm<sup>1</sup>

Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Wpłynęło w grudniu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Kolonizacja nosogardłowa przez *Streptococcus pneumoniae* jako prekursor choroby. 3. Czynniki chorobotwórczości *S. pneumoniae* i ich znaczenie w patogenezie zakażeń. 4. Patogeneza zakażenia pneumokokowego. 5. Odporność przeciwpneumokokowa gospodarza. 6. Profilaktyka zakażeń pneumokokowych. 7. Podsumowanie

#### ***Streptococcus pneumoniae* – colonization and pneumococcal disease**

**Abstract:** *Streptococcus pneumoniae* is a major cause of morbidity and mortality worldwide, especially in young children and elderly people. Pneumococcus is the leading cause of non-invasive (pneumonia, sinusitis, otitis media) and invasive (meningitis and bacteremia/sepsis) pneumococcal disease. The virulence of *S. pneumoniae* is dependent on numerous factors. Nasopharyngeal carriage of pneumococcus precedes disease and is the source of pneumococcal spread in the community. Although the relationship between carriage and disease is not well understood, a lot of data suggest that local or invasive infection is caused by serotypes which previously bind to the epithelial surface within the respiratory tract. Pneumococcal conjugate vaccines effectively prevent the most serious forms of pneumococcal disease caused by serotypes included in the vaccines and also reduce the risk of nasopharyngeal carriage by those serotypes. Recently, studies were carried out on the immunogenicity and significance of numerous protein virulence factors for the induction of serotype-independent protection against pneumococcal infection.

1. Introduction. 2. Nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* as disease precursor. 3. Virulence factors of *Streptococcus pneumoniae* and their impact on the development of pneumococcal disease. 4. Pathogenesis of pneumococcal disease. 5. Antipneumococcal host immunity. 6. Pneumococcal vaccines. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** choroba pneumokokowa, czynniki wirulencji, nosicielstwo, *Streptococcus pneumoniae*, szczepionki

**Key words:** carriage, pneumococcal disease, *Streptococcus pneumoniae*, virulence factors, vaccines

## **1. Wstęp**

*Streptococcus pneumoniae* jest jedną z najczęstszych przyczyn zachorowań i śmiertelności dzieci na świecie. Ponad 30 różnych jednostek chorobowych może być związanych z chorobą pneumokokową, jednak z klinicznego punktu widzenia najważniejsze znaczenie mają poważne inwazyjne zakażenia, takie jak zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, bakteremia/posocznica, zapalenie płuc z bakteriami, określane mianem Inwazyjnej Choroby Pneumokokowej (IChP). Do miejscowych infekcji o charakterze nieinwazyjnym wywołanych przez pneumokoki należą zapalenie ucha środkowego, zatok obocznych nosa oraz zapalenie płuc. Zakażenia te chociaż nie zagrażają życiu bezpośrednio, mogą powodować ciężkie i chroniczne powikłania, stanowiąc jeden z głównych problemów zdrowia publicznego na świecie [2, 17].

Globalna liczba przypadków choroby pneumokokowej u dzieci do 5 roku życia jest szacowana na 14,5 mln rocznie, z których ponad 800 tys. kończy się śmiercią [59]. Najwyższa zachorowalność i śmiertelność (90% zgonów) dzieci w wyniku choroby pneumokokowej dotyczy krajów rozwijających się, głównie Afryki i Azji

Południowo-Wschodniej. W Stanach Zjednoczonych ocenia się, że pneumokoki odpowiedzialne są za 3 tys. przypadków zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, 34 tys. przypadków bakteriemii, 175 tys. przypadków zapalenia płuc i 7 mln przypadków zapaleń ucha środkowego rocznie. Z powodu IChP umiera tam rocznie 5 tys. osób [64]. W Europie notuje się co roku około 260 tys. zachorowań o etiologii pneumokokowej u dzieci poniżej 5 roku życia, z których około 15 tys. kończy się śmiercią [59]. W Polsce dopiero w 2005 roku po raz pierwszy do rejestracji zachorowań prowadzonej przez Zakład Epidemiologii PZH została włączona inwazyjna choroba wywołana przez *S. pneumoniae*: zapalenie opon i/lub mózgu (B95.3/G04.2; G00.1), posocznica (A40.3), zapalenie płuc (J13), inna określona i nie określona (B95.3). W 2005 roku zgłoszono 176 przypadków IChP, w tym 111 to zapalenia opon i/lub mózgu; w 2006 roku zostało zgłoszonych 210 przypadków ogółem, w tym 116 to zapalenia opon i/lub mózgu, natomiast w latach 2010, 2011 i 2012 zostało zgłoszonych odpowiednio 364, 430 i 359 przypadków pneumokokowej choroby inwazyjnej (IPD) (zapadalność na 100 tys. osób odpowiednio 0,95, 1,12 i 0,93), włączając 180, 192 i 140 przypadki zapalenia opon

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin; e-mail: iza.glowniak@umlub.pl

i/lub mózgu. Dane te podawane są z zastrzeżeniem, że są niepełne, ale wzrastająca z roku na rok liczba rejestrowanych zachorowań, prawdopodobnie świadczy, że coraz więcej przypadków jest zgłaszanych [52]. Badania Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego (KOROUN) wskazują, że w 2010 roku najwyższą zapadalność na IChP zanotowano u dzieci do 5. roku życia (3,43/100 000), w tym zwłaszcza u dzieci do 2. roku życia (5,17/100 000), jak również u osób w wieku powyżej 60. roku życia (1,37/100 000) [81].

## 2. Kolonizacja nosogardłowa przez *Streptococcus pneumoniae* jako prekursor choroby

Głównym naturalnym rezerwuarem *S. pneumoniae* jest człowiek. Pomędzy poszczególnymi osobami bakterie są przenoszone drogą kontaktu bezpośredniego oraz drogą powietrzno-kropelkową. Częstość nosicielstwa jest największa u małych dzieci. Najwyższą częstość kolonizacji pneumokokami obserwuje się u dzieci do lat 5 (35–60%); stopniowo maleje ona z wiekiem. U dzieci ze szkół podstawowych częstość kolonizacji wynosi 29–35%, a u młodzieży i dorosłych 9–25%. Częstość nosicielstwa może być wyższa od przeciętnej w specyficznych sytuacjach, takich jak pobyt w żłobku, przedszkolu, domu opieki, więzieniu czy koszarach, gdzie częste kontakty między ludźmi przebywającymi na stosunkowo małej powierzchni sprzyjają rozprzestrzenieniu się drobnoustrojów [24, 25, 42, 60].

Istnieje wyraźna korelacja epidemiologiczna między liczbą zachorowań a częstością z jaką inwazyjne serotypy kolonizują zdrowe osoby. Z drugiej strony, choroba pneumokokowa występuje u niewielkiego odsetka skolonizowanych i zależy zarówno od tła genetycznego oraz aktualnego statusu immunologicznego gospodarza, jak również od wirulencji kolonizującego szczepu [25]. Okres kolonizacji może być bardzo różny i sięgać nawet kilku miesięcy. Średni czas trwania kolonizacji szacuje się na 31 dni u dorosłych i 60,5 dni u dzieci, a długość okresu nosicielstwa zależy od serotypu pneumokoka, wcześniejszej ekspozycji, jak również immunokompetencji gospodarza [36, 94].

Do większości zakażeń nie dochodzi podczas długotrwałego nosicielstwa pneumokoka, ale w następstwie kolonizacji nowym szczepem charakteryzującym się innym serotypem [29, 88]. Badania prowadzone podczas dwóch epidemii zapalenia płuc w koszarach wojskowych wykazały, że bezobjawowe nosicielstwo szczepu *S. pneumoniae* wiąże się z produkcją typowo swoistych przeciwciał przeciwotczkowych na poziomie pozwalającym zapobiec wywołaniu choroby przez szczep o danym serotypie. Z tych badań wynika, że aspiracja obecnych w nosogardzieli pneumokoków

w okresie pierwszych kilku tygodni kolonizacji może prowadzić do rozwoju choroby – zapalenia płuc, natomiast po tym czasie większość zdrowych nosicieli wydawała się być chroniona przed rozwojem tej choroby [55]. Powyższe sugestie potwierdzają badania innych autorów. Gray i wsp. [29] analizowali mikroflorę nosogardłową małych dzieci kilkakrotnie: co miesiąc do 6 miesiąca życia, a następnie co 2–3 miesiące do 2 roku życia. Poprzez korelację okresów kolonizacji nosogardzieli dzieci przez różne szczepy pneumokoków z chorobą pneumokokową potwierdzoną hodowlą (w 90% było to ostre zapalenie ucha środkowego) stwierdzono, że choroba związana była z pojawieniem się nowego serotypu. Mimo, że powszechny u badanych dzieci był długi czas nosicielstwa, to w 74% przypadków infekcja spowodowana była przez serotyp kolonizujący badane dziecko w czasie krótszym niż miesiąc przed wystąpieniem choroby.

Stwierdzono, że w trakcie różnych postaci choroby pneumokokowej obserwuje się zdecydowanie większą częstość nosicielstwa *S. pneumoniae* u chorych dzieci [20, 83]. Mimo, że wykrycie szczepów pneumokoka jednocześnie w nosogardzieli i miejscu fizjologicznie jałowym (ucho środkowe, płuca, krew) może oznaczać jedynie czasowy związek pomiędzy nosicielstwem a chorobą, jest jednak argumentem-potwierdzeniem, że obecność szczepu pneumokoka w nosogardzieli jest warunkiem koniecznym dla rozwoju choroby. W przypadku osób z ostrym zapaleniem ucha środkowego, od których szczep *S. pneumoniae* izolowano z wysięku z ucha środkowego, w większości przypadków (czasami nawet do 100%) szczep pneumokoka był izolowany jednocześnie z nosogardzieli chorej osoby [20, 68, 89].

Bezpośrednie powiązanie pomiędzy czasowym pojawieniem się szczepu pneumokoka w nosogardzieli a rozwojem IChP w następstwie tej obecności jest bardzo trudne do potwierdzenia, właśnie ze względu na różnice długości czasu nosicielstwa i inwazyjności różnych typów serologicznych. Serotypy wykrywane w czasie choroby pneumokokowej, które są zdolne do długiego okresu nosicielstwa, są również łatwiej izolowane w czasie badań wykrywających nosicielstwo, natomiast serotypy, krótko kolonizujące nosogardziel są rzadko izolowane w stanie nosicielstwa, jak np. serotypy 1, 5, 7, 12. Wynika to z krótkich czasowo epizodów nosicielstwa tych serotypów, bądź występowania ich w czasie wspólnej kolonizacji z innym dominującym serotypem [76].

## 3. Czynniki chorobotwórczości *S. pneumoniae* i ich znaczenie w patogenezie zakażeń

Pneumokok posiada liczne czynniki zjadliwości, które umożliwiają mu kolonizację błon śluzowych nosogardzieli gospodarza, jak i w sprzyjających warun-

kach wywoływanie zakażeń inwazyjnych. Wśród nich wymienia się ponad 500 powierzchniowych białek, którym przypisuje się znaczenie w patogenności, chociaż jedynie w przypadku kilku z nich rola ta została potwierdzona. Niektóre z nich są związanymi z błoną lipoproteinami, a inne są fizycznie związane ze ścianą komórkową, takie jak sześć białek wiążących penicylinę (PBP – penicillin binding protein), dwie neuraminidazy i proteaza IgA1. Wyjątkową grupą białek pneumokoków jest rodzina białek wiążących cholinę (CBP – choline binding protein). Dwanaście białek CBP, niekowalencyjnie związanych z choliną ściany komórkowej, ma charakter receptorów. Innymi białkami wchodzącymi w skład CBP są: powierzchniowe białko A (PspA – pneumococcal surface protein A), trzy autolizyny (LytA, LytB i LytC) oraz białko PspC [2, 72]. Białko PspC/CbpA (Pneumococcal surface protein C/Choline-binding protein A) jest adhezyną mającą osiem miejsc wiążących cholinę. Mutanty bakteryjne pozbawione tego białka są defektywne w kolonizacji nosogardzieli i nie potrafią wiązać się *in vitro* z różnymi komórkami człowieka. Białko PspC jest także zdolne do wiązania sekrecyjnych przeciwciał IgA1 oraz składnika C3 dopełniacza [4, 32].

Innym czynnikiem chorobotwórczości pneumokoków są składniki ściany komórkowej, w której z peptydoglikanem jest związany przez kwas N-acetylmuraminowy, polisacharyd ściany komórkowej, będący kompleksem kwasu teichojowego zawierającego fosforylocholinę. Fosforylocholina wchodząca w skład polisacharydu ściany komórkowej jest miejscem rozpoznawanym przez autolizynę LytA, która rozkłada peptydoglikan przez hydrolizę wiązania pomiędzy alaniną i kwasem N-acetylmuraminowym, dzięki czemu bierze udział w podziale komórki, a w pewnych warunkach indukuje lizę komórek pneumokoków (np. w czasie stacjonarnej fazy wzrostu) [2]. Ściana komórkowa pneumokoków jest potencjalnym induktorem zapalenia, prawdopodobnie przez aktywację dopełniacza na drodze alternatywnej. W czasie tego procesu produkowane są anafilatoksyny C3a i C5a, które zwiększają przepuszczalność naczyń, indukują degranulację mastocytów oraz powodują gromadzenie i aktywację leukocytów wielojądrowych oraz płytek krwi w ognisku zapalnym. Oczyszczona frakcja ściany komórkowej jest silnym stymulatorem (silniejszym od endotoksyny) produkcji interleukiny-1 (IL-1) przez ludzkie monocyty [15]. Fosforylocholina kwasu teichojowego i lipoteichojowego jest molekularnym kluczem umożliwiającym zakażenie, ponieważ pełni rolę zarówno adhezyny (specyficznie łączy się z receptorami wiążącymi cholinę, które są obecne na praktycznie wszystkich ludzkich komórkach) jak i miejsca wiążącego w pneumokokowych białkach CBP. Cholina jest rozpoznawana przez dwa składniki gospodarza: receptor czynnika aktywującego

jącego płytki (PAFr – platelet activating factor receptor) i białko C-reaktywne [2, 18].

Najlepiej poznanym białkiem pneumokoków o charakterze toksyny jest pneumolizyna, wpływająca *in vitro* na wiele komórek gospodarza i ich funkcjonowanie. Jest ona obecna wewnątrz cytoplazmy pneumokoków i uwalniana dopiero po lizie komórki spowodowanej przez autolizynę. Przy dużym stężeniu toksyny, gromadzi się ona w postaci oligomerów i tworzy transbłonowe pory, powodując lizę komórek. Przy niższym stężeniu, pneumolizyna stymuluje produkcję cytokin zapalnych przez monocyty: czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) i interleukinę 1 (IL-1) [1, 74]. Bezpośrednich dowodów dotyczących patogenności tej toksyny dostarczyły badania z zastosowaniem wyselekcjonowanych mutantów pneumokoków pozbawionych pneumolizyny, które charakteryzowały się zmniejszoną zjadliwością w porównaniu ze szczepami macierzystymi [6]. Dodatkowo stwierdzono, że właściwości cytolityczne oraz aktywujące dopełniacz są związane z odrębnymi regionami cząsteczki tego białka [73].

Funkcjonalnie, czynniki wirulencji pneumokoków można podzielić na dwie grupy działające w różnych etapach infekcji. Jedną grupę stanowią czynniki obecne na powierzchni komórki pneumokoka (PspA, białko wiążące czynnik H), które utrudniają fagocytozę poprzez hamowanie aktywacji dopełniacza i pełnią ważną rolę na początku infekcji. Czynniki drugiej grupy (polisacharyd ściany komórkowej, pneumolizyna) pełnią swoją rolę już po lizie komórek pneumokoków, kiedy to głównie poprzez aktywację dopełniacza wzmagają stan zapalny.

Otoczka od dawna jest uznawana za główny czynnik zjadliwości pneumokoków. Zbudowana jest z polimerów, tworzonych przez jednostki powtarzających się oligosacharydów, które zawierają od jednego do ośmiu monosacharydów. Otoczka posiada działanie antyfagocytarne, tworząc barierę chroniącą przed opsonizacją komórek bakterii przez składnik C3b dopełniacza oraz przez przeciwciała [96]. Ponadto, otoczka hamuje aktywację dopełniacza klasyczną drogą w wyniku hamowania wiązania przeciwciał IgG i białka C-reaktywnego [100]. W czasie zakażenia szczepy otoczkowe są 100 tys. bardziej wirulentne od szczepów nieposiadających otoczki. Obecnie znanych jest ponad 90 typów serologicznych *S. pneumoniae*, spośród których 20 jest odpowiedzialnych za około 90% zakażeń u ludzi [2]. Częstość występowania poszczególnych serogrup/serotypów zależy od położenia geograficznego, wieku pacjenta, jak również zmienia się na przestrzeni lat. Występowanie poszczególnych serotypów wydaje się być odmienne u dzieci i u dorosłych, jak również obserwuje się różnice w ich zdolności i długości czasu kolonizacji dróg oddechowych oraz inwazyjności [14, 30, 37]. Szczepo o odmiennych serotypach różnią się

opornością na fagocytozę *in vitro* oraz zdolnością do aktywacji odpowiedzi humoralnej, stąd też pewne serotypy są częściej związane z chorobami u ludzi. Szczepy należące do serotypów 1, 2, 3, 4, 5, 8, 46 rzadko występują u nosicieli, ale są izolowane z zakażeń inwazyjnych, natomiast szczepy zaliczane do serotypów 6, 7, 9, 12F, 14, 15, 18C, 19F, 24F, powszechnie kolonizują górne drogi oddechowe, ale są również odpowiedzialne za klinicznie istotne zakażenia u dzieci i dorosłych. U dzieci najczęściej spotykane są szczepy zaliczane do serogrup 6, 14, 19, 23 zwane „pediatrycznymi”. Są one powszechnie izolowane zarówno od nosicieli oraz jako czynniki etiologiczne choroby pneumokokowej w tej grupie [25, 34, 54].

Stale prowadzone są badania nad znaczeniem otoczki w procesie kolonizacji nosogardzieli. Stwierdzono, że bezotoczkowe mutanty są mniej zdolne do kolonizacji nabłonka dróg oddechowych, jednak z drugiej strony obecność grubej otoczki jest czynnikiem zmniejszającym efektywność tego procesu. Niewiele wiadomo na temat regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę otoczki, ale przypuszcza się, że w środowisku nosogardzieli zmniejsza się poziom ekspresji tych genów, natomiast zwiększa się poziom ekspresji genów kodujących czynniki niezbędne do adhezji [47, 57].

#### 4. Patogeneza zakażenia pneumokokowego

Komórki *S. pneumoniae* występują w trzech wyraźnie różniących się formach, tzw. *transparent*, typowa dla kolonizacji, *opaque*, występująca we krwi oraz pośrednia *semi-transparent*. Zmiana fazy, polegające na przejściu komórki typu *transparent* w *opaque* i na odwrót, ma charakter spontaniczny i jest uwarunkowana obecnością locus *opacity* w genomie. Komórki typu *transparent* charakteryzują się stosunkowo cienką otoczką, wysoką zawartością ufosforylowanej choliny w ścianie komórkowej, co stwarza możliwości zakotwiczenia licznych białek powierzchniowych, a także obecnością autolizyny LytA i adhezyny PspC w ścianie komórkowej, ułatwiających kolonizację nosogardzieli. Białek tych jest znacznie mniej u charakterystycznych dla bakterii form *opaque* [19]. Szczepy o fenotypie *transparent*, posiadające silniejsze zdolności adhezyjne, wywołują zlokalizowane infekcje, podczas gdy te o mniejszych zdolnościach adhezji (fenotyp *opaque*) powodują inwazyjne choroby, jak bakteriemia i zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych [98].

Wrotami zakażenia *S. pneumoniae* są górne drogi oddechowe. We wczesnej fazie kolonizacji komórki pneumokoka unikają usunięcia z powierzchni błon śluzowych, dzięki ujemnemu naładowaniu struktury otoczki, prawdopodobnie na drodze oddziaływań fizy-

kochemicznych [36]. Ujemnie naładowana otoczka uniemożliwia jednak skuteczną adhezję bakterii do komórek nabłonka gospodarza, dlatego w kolejnym etapie, komórka pneumokoka w celu neutralizacji jest w stanie wiązać z otoczenia dodatkowo naładowane molekuly, co prowadzi do ułatwienia procesu adhezji [28, 97]. W pierwszym etapie kolonizacji błony śluzowej nosogardzieli bakterie ulegają adhezji do komórek nabłonkowych z udziałem licznych czynników, do których należą: białko PspC, główna adhezyna niezbędna do skutecznej kolonizacji [4], pneumolizyna, białko uwalniane po autolizie pneumokoków, inicjująca prawdopodobnie procesy zapalne w nosogardzieli, niezbędne do ekspresji receptorów komórkowych [39, 74] oraz dwie neuraminidazy NanA i NanB, pełniące pomocniczą rolę w adhezji [90]. Neuraminidazy mogą ułatwiać wiązanie *S. pneumoniae* do komórek nabłonka, dzięki rozkładaniu kwasu sialowego, wchodzącego w skład glikolipidów i gangliozydów komórek nabłonkowych gospodarza, powodując odsłonięcie struktur wykorzystywanych jako receptory w procesie adhezji (N-acetyloglukozamina, NAcGlc), do których bakterie wiążą się poprzez białka powierzchniowe ściany komórkowej, takie jak PsaA (pneumococcal surface adhesin A) [41].

Kolonizacji nosogardzieli towarzyszy najczęściej zaburzenie pracy rzęsek wyścielających drogi oddechowe, które jest wynikiem destrukcyjnego działania pneumolizyny i wydzielanego przez pneumokoki nadtlenu wodoru, wytwarzanego przez oksydazę pirogromianową. Enzym ten został zidentyfikowany jako jeden z czynników odgrywających istotną rolę w kolonizacji nosogardzieli przez *S. pneumoniae* [74, 84]. Pneumokoki wytwarzają również kilka egzoenzymów, które modyfikują powierzchnię komórek gospodarza poprzez deglikozylację, eksponując w ten sposób nowe receptory do adhezji, hamując mechanizmy usuwania bakterii z błon śluzowych i dostarczając substancji odżywczych bakteriom [40, 50]. Niektóre izolaty pneumokoków są zdolne do wytwarzania struktur podobnych do fimbrii, które wystają poza wielocukrową otoczkę i biorą udział w adhezji do nabłonka dróg oddechowych [5].

Za najważniejsze działanie bezpośrednie na układ immunologiczny gospodarza należy uznać wydzielanie do środowiska proteazy, hydrolizującej przeciwciała klasy IgA1 oraz obniżenie poziomu składnika C3 dopełniacza, w czym prawdopodobnie odgrywa rolę pneumolizyna [1, 97]. Również ważną rolę odgrywa białko powierzchniowe PspA, które przeciwdziała wiązaniu składnika C3 dopełniacza i tym samym zapobiega lizie bakterii, pełniąc funkcję ochronną przed działaniem nieswoistych mechanizmów układu immunologicznego człowieka [70, 93]. Wykryte u pneumokoków białko PavA (pneumococcal adherence and virulence factor) wiążące fibronektynę również wydaje

się pełnić istotną, modulującą rolę zarówno w procesie adhezji, jak i w rozwoju inwazyjnych postaci choroby pneumokokowej [67].

Przekroczenie granicy pomiędzy bezobjawową kolonizacją a inwazyjną chorobą związany jest z pojawieniem się czynników pro-zapalnych takich, jak IL-1 czy TNF- $\alpha$ , co ma miejsce na przykład w przebiegu infekcji wirusowej. Rozwój kaskadowej reakcji procesu zapalnego zmienia liczbę i typ receptorów na powierzchni komórek nabłonkowych i śródbłonna. W obrębie pęcherzyków płucnych pneumokoki przylegają początkowo do ściany pęcherzyka, a dzięki właściwości przenikania w poprzek śródbłonna naczyń na drodze transcytozy, szybko przedostają się do krwi. Jeżeli w przebiegu infekcji pojawia się bakteriemia rośnie ryzyko wystąpienia zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Drogą krwi komórki bakterii mogą migrować do opon mózgowo-rdzeniowych, a po uszkodzeniu śródbłonna dotrzeć do przestrzeni podpajęczynówkowej. Alternatywną drogą dotarcia bakterii do opon mózgowo-rdzeniowych jest bezpośrednio transmisja z nosogardzieli [2, 60].

Przy nieobecności stanu zapalnego, adhezja do komórek nabłonkowych w płucach odbywa się przy udziale receptorów gospodarza posiadających specyficzne dwucukry (N-acetyloglukozamino- $\beta$ 1-4-galaktoza, N-acetylogalaktozamino- $\beta$ -1-3-galaktozamina), które są podobne do receptorów występujących na powierzchni komórek nabłonkowych nosogardzieli oraz adhezyn pneumokoków – fosforylocholin ściany komórkowej i białek adhezyjnych (np. PsaA) [87]. Pneumokoki posiadają również zdolność adhezji i inwazji komórek nabłonkowych płuc i śródbłonna w czasie stanu zapalnego, gdy obserwuje zwiększoną ekspresję receptora PAF na powierzchni. Kiedy komórka bakterii połączy się za pomocą bakteryjnej fosforylocholin (ChoP) z receptorem PAF, jest w stanie pokonać bariery biologiczne na drodze transcytozy, w tym barierę krew-mózg [71]. Pneumokoki wykorzystują naturalny mechanizm gospodarza adhezji i migracji przez warstwę nabłonkową i śródbłonna wydzielniczych IgA poprzez wiązanie się białka PspC bezpośrednio z receptorem polimerycznych przeciwciał (pIgR – polymeric-immunoglobulin receptor) [4]. Taką zdolność zaobserwowano u wirulentnych komórek o fenotypie *transparent*, podczas gdy komórki *opaque* bardzo słabo wiązały się i wnikały do wnętrza śródbłonna. Jak wykazały badania *in vitro*, adhezja pneumokoków i przejście przez barierę śródbłonna trwa około 4 godzin [18]. W jaki sposób komórki pneumokoków unikają zabicia w czasie endocytozy nie zostało jeszcze wyjaśnione.

W tym etapie infekcji aktywacja składników dopełniacza wzmacnia stan zapalny i wydaje się być punktem, w którym zakażenie rozwija się w sposób trudny do

zahamowania. Niekontrolowane namnażanie pneumokoków w płucach, płynie mózgowo-rdzeniowym czy uchu środkowym jest związane z lizą ich komórek i uwolnieniem składników ściany komórkowej oraz pneumolizyny. Obecność lizozymu w płynach ustrojowych w miejscu infekcji może powodować lizę komórek tych bakterii poprzez aktywację autolizyn. Rozpad komórek pneumokoków jest momentem zapoczątkowania procesu zapalnego, bezpośrednio przez gromadzenie i aktywację fagocytów, jak również pośrednio przez aktywację dopełniacza. Prawdopodobnie niekontrolowany rozwój stanu zapalnego jest odpowiedzialny za chorobotwórczość i śmiertelność w wyniku infekcji pneumokokowej, a eliminacja komórek bakterii z miejsca infekcji dzięki terapii antybiotykowej nie poprawia stanu chorego i nie zmienia przebiegu choroby. Ponadto, indukcja lizy komórek pneumokoków za pomocą skutecznych, bakteriobójczych antybiotyków, jak  $\beta$ -laktamy (zwłaszcza, gdy są podawane w późnym stadium infekcji) może nawet nasilić objawy kliniczne choroby [2].

## 5. Odporność przeciwpneumokokowa gospodarza

Naturalna odporność na zakażenie *S. pneumoniae* rozwija się podczas ekspozycji na drobnoustrój lub jego antygeny. W zakażonym organizmie powstają swoiste przeciwciała antyotoczkowe, głównie izotypu IgG2, które odgrywają istotną rolę jako opsoniny w procesie fagocytozy z udziałem leukocytów wielojądrazdowych oraz makrofagów pęcherzyków płucnych. Opsonizacja pneumokoków jest bardzo ważnym etapem, co potwierdza fakt, że zarówno nieefektywność fagocytozy (asplenia, neutropenia), jak i zaburzeń w produkcji przeciwciał (np. hipogammaglobulinemia, niezdolność do produkcji przeciwciał przeciwko antygenom polisacharydowym u dzieci, brak IgA) czy niespecyficznych opsonin (brak składników dopełniacza) są czynnikami predysponującymi do zakażeń pneumokokowych [61].

Od dawna uważa się, że pojawienie się odporności na zakażenie pneumokokowe jest związane przede wszystkim z obecnością przeciwciał antyotoczkowych. Jednak spadek nosicielstwa i zachorowalności związany z wiekiem, dotyczy większości serotypów i jest obserwowany również przy nieobecności powstałych w naturalny sposób przeciwciał antyotoczkowych. Sugeruje to istnienie uniwersalnego (powszechnego) mechanizmu ochrony przeciwpneumokokowej, prawdopodobnie niezależnego od serotypu pneumokoka. Wykazano, że donosowe podawanie myszom szczepionki zawierającej całe komórki bezotoczkowych pneumokoków zapobiega kolonizacji przez szczepy o różnych serotypach, co pozwala przypuszczać, że inne składniki układu

immunologicznego, poza przeciwciałami antyotoczkowymi, pełnią ważną rolę w tym procesie [13, 48, 56].

Ostatnio prowadzone badania na modelach zwierzęcych i u bezobjawowych nosicieli sugerują, że humoralna odpowiedź na pneumokokowe czynniki wirulencji, takie jak polisacharyd ściany komórkowej (głównie fosforylocholina), PsaA, PspA, PspC czy pneumolizynę może mieć również znaczenie w odporności przeciw pneumokokowej [62, 101]. W przypadku przetoczenia myszom ludzkich przeciwciał IgG przeciwko fosforylocholiny polisacharydu ściany komórkowej pneumokoka, obserwowano ochronę zwierząt przed inwazyjną infekcją [27]. Najbardziej prawdopodobny mechanizm ochronnego działania tych przeciwciał u myszy nie jest związany z fagocytozą, ale z neutralizacją prozapalnego działania fosforylocholiny jako ligandu dla białka C-reaktywnego [2]. Badania prowadzone w Finlandii [69] i Kenii [44] wykazały, że u dzieci do drugiego roku życia w trakcie nosicielstwa *S. pneumoniae* wzrasta poziom przeciwciał skierowanych przeciwko białkom pneumokoka. Podczas badań nad nosicielstwem pneumokoków u ludzi stwierdzono, że wrażliwość na kolonizację nie jest związana z poziomem przeciwciał antyotoczkowych w surowicy, natomiast u wszystkich skolonizowanych eksperymentalnie ochotników wykryto przeciwciała IgG w surowicy i sekrecyjne IgA skierowane przeciwko NH<sub>2</sub>-końcowemu regionowi białka PspA [51]. Okazało się również, że immunizacja donosowa myszy antygenem PsaA prowadzi do wytworzenia wysokiego poziomu ochrony przed nosicielstwem pneumokoków [12]. Mimo, że przeciwciała specyficzne dla polisacharydu ściany komórkowej, PspA czy pneumolizyny posiadają zdolność ochrony przed zakażeniem w mniejszym stopniu, wydaje się, że odpowiedź na kilka tych białek jednocześnie może zapewnić szeroką protekcję przed nosicielstwem w sposób niezależny od serotypu. Jednak ostatnie badania wykazały, że protekcja przeciwko kolonizacji pneumokokami jest zależna od limfocytów T CD4 i prawdopodobnie występuje niezależnie od pojawienia się przeciwciał [49]. Badania nosicielstwa *S. pneumoniae* u myszy, porównujące to zjawisko u myszy z defektem tworzenia przeciwciał i myszy z defektem limfocytów T, sugerują, że uczulone limfocyty T CD4 są kluczowe dla zjawiska usuwania pneumokoków ze śluzówek, natomiast przeciwciała skierowane przeciwko antygenom pneumokokowym mają wpływ, ale nie są wymagane dla ochrony przed kolonizacją [92].

Naturalna ekspozycja na pneumokoki indukuje powstanie u dzieci przeciwciał wydzielniczych klasy IgA, skierowanych przeciwko pneumokokowym białkom oraz wielocukrowi otoczkowemu [77, 78]. Mimo, że ochronna rola tych przeciwciał nie jest jeszcze jasna, badania na immunizowanych myszach potwierdzają ich ważną ochronną rolę przed kolonizacją nosogardzieli przez pneumokoki [11, 23].

## 6. Profilaktyka zakażeń pneumokokowych

W chwili obecnej dostępne są dwa rodzaje szczepionek przeciwko zakażeniom *S. pneumoniae*; w przypadku obu typów działanie protekcyjne opiera się na tworzeniu przeciwciał przeciwko antygenom wielocukrowej otoczki. Powstałe po immunizacji przeciwciała są zdolne do opsonizacji szczepów posiadających serotyp włączony do szczepionki.

Pierwsza generacja szczepionek to polisacharydowe 23-walentne szczepionki zawierające wielocukry otoczkowe pochodzące z 23 serotypów (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F). Skuteczność tych szczepionek zależy od wielu czynników i wynosi średnio u dorosłych 60–70%. Wytwarzanie swoistych przeciwciał przeciwko antygenom (co najmniej dwukrotny wzrost poziomu przeciwciał swoistych antygenowo) rozpoczyna się u 80% zdrowych dorosłych w ciągu 2–3 tygodni po szczepieniu. Szczepionka ta wykazuje dużą skuteczność w zapobieganiu inwazyjnym zakażeniom: pneumokokowemu zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych i bakteriemii u osób z prawidłową odpornością (57–85% skuteczności), u osób z współistniejącymi chorobami (65–84% skuteczności). Mniejszą skuteczność tej szczepionki stwierdzono w zapobieganiu nieinwazyjnemu zapaleniu płuc, a brak działania ochronnego przeciw infekcjom górnych dróg oddechowych [15, 17]. Ponadto, badania prowadzone w Wielkiej Brytanii, wskazują, że użycie tych szczepionek u osób starszych jest dyskusyjne ze względu na brak dowodów jej skuteczności w zmniejszeniu występowania IChP, mimo ich szerokiego stosowania od 2003 roku [91].

Szczepionka polisacharydowa, ze względu na zawartość antygenów wielocukrowych, które jako antygeny T-niezależne nie indukują u dzieci trwałej odporności poszczepiennej i pamięci immunologicznej, nie jest skuteczna u dzieci poniżej 2. roku życia, jak również cechuje się słabszą immunogennością u dzieci poniżej 7–8. roku życia. Wyjątek stanowią antygeny wielocukrowe serotypów 3 i 8, które nawet u małych dzieci są skutecznymi immunogenami [3, 17].

W grupie dzieci poniżej 2. roku życia, wykazano wysoką skuteczność szczepionek drugiej generacji, koniugowanych z białkami nośnikowymi o wysokiej immunogenności, jak np. anatoksyna błonicza, anatoksyna tężcowa, oczyszczona nietoksyczna odmiana toksyny maczugowca błonicy, meningokokowy kompleks białkowy błony zewnętrznej (OMPC – outer membrane protein complex). Jest to związane przede wszystkim z pobudzeniem odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego, zależnej od limfocytów T, które po kontakcie z kompleksami polisacharydowo-białkowymi uzyskują zdolność indukowania wzmożonej proliferacji antygenowo swoistych limfocytów B

oraz dojrzewania komórek pamięci immunologicznej. Uważa się, że po szczepieniu szczepionką koniugowaną uzyskuje się wyższe miano przeciwciał antyotoczkowych klasy IgA oraz IgG w surowicy [63]. Podskórna immunizacja myszy wykazała, że najskuteczniejszą ochroną przed kolonizacją pneumokokami było indukowanie przeciwciał izotypu IgG2a, charakteryzujących się zdolnością aktywacji dopełniacza [22]. Przyпуска się, że możliwym mechanizmem chroniącym dzieci przed kolonizacją *S. pneumoniae* uzyskiwanym po immunizacji domięśniowej koniugowanymi szczepionkami jest właśnie indukcja przeciwciał aktywujących dopełniacz [11].

Pierwsza koniugowana szczepionka 7-walentna (PCV7) została zarejestrowana w 2000 roku (w Polsce w 2001) i zawierała wielocukry otoczkowe szczepów najczęściej izolowanych z krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego u dzieci poniżej 6 roku życia w Stanach Zjednoczonych (4, 6B, 14, 19F, 18C, 23F, 9V) [33]. Badania przeprowadzone w Polsce wykazały, że serotypy szczepionkowe PCV7 reprezentują 80–85% szczepów izolowanych z nosogardzieli u zdrowych dzieci do 5. roku życia, a także od chorych z inwazyjnymi postaciami zakażeń [43, 58, 82, 85, 86].

Ocena efektów szczepień PCV7 na świecie wykazała blisko 98% skuteczność w zapobieganiu IChP wywołanej przez serotypy szczepionkowe u dzieci do 5 roku życia oraz zmniejszenie o 55% zapadalność na IChP wśród osób po 65. roku życia [7, 8, 95, 99]. Nie planowanym pierwotnie efektem szczepień, okazała się redukcja przypadków zapalenia płuc od 18% do 25% [9, 46, 102]. Ponadto, u dzieci szczepionych zanotowano blisko 60% redukcję przypadków zapalenia uszu wywołanych przez serotypy szczepionkowe, a 7% redukcję wywołanych przez szczepy nieszczepionkowe [65]. Badania nad skutecznością PCV7 przeprowadzone w Finlandii wskazały na zmniejszenie wszystkich epizodów ostrego zapalenia ucha środkowego o 7%, w tym zmniejszenie tych chorób o etiologii pneumokokowej o 34% oraz 57% skuteczność w zmniejszeniu liczby przypadków wywołanych przez serotypy zawarte w szczepionce [21]. Zmniejszenie skuteczności szczepienia w stosunku do zapalenia ucha środkowego i zapalenia płuc może wskazywać, że na ochronę przeciwko chorobom związanym z błonami śluzowymi układu oddechowego mogą wpływać jeszcze inne mechanizmy poza obecnością przeciwciał przeciwotoczkowych. Obserwowano również znaczne obniżenie liczby wizyt dzieci <2. roku życia związanych z ostrym zapaleniem ucha środkowego (do 42,7%) oraz redukcję zalecanych kuracji antybiotykowych o około 41,7% [31]. Stwierdzono, że szczepienie małych dzieci wywiera także efekt pośredni, wywołując tzw. odporność grupową (populacyjną), łącznie u dzieci i u dorosłych. Szczepionka koniugowana, zapobiegając naby-

waniu nosicielstwa przez dziecko, zmniejsza częstość występowania zakażeń inwazyjnych zarówno u dzieci nieszczepionych, jak i u dorosłych, głównie w dwóch grupach wiekowych: 20–40 lat (rodziców) i powyżej 60 lat (dziadków). Wynikiem odporności populacyjnej było także uzyskanie 40% spadku inwazyjnych zakażeń u noworodków i niemowląt do 90. dnia życia [16, 66]. Centers of Diseases Control and Prevention (CDC) oszacowało, że skuteczność szczepionki koniugowanej w Stanach Zjednoczonych w 2/3 przypadków może być przypisana właśnie odporności populacyjnej [53].

Jednak, stosowanie PCV-7 na szeroką skalę spowodowało wzrost występowania choroby pneumokokowej wywołanej przez serotypy nieszczepionkowe, np. w Stanach Zjednoczonych stwierdzono, że serotypy 3, 7F i 19A zaczęły dominować jako czynniki etiologiczne IChP u dzieci poniżej 5. roku życia [35, 75, 79]. Prawdopodobnie z powodu wymiany serotypów wywołujących infekcje nie obserwowano znaczącej zmiany w częstości IChP w Wielkiej Brytanii [26], czy częstości zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych we Francji [45].

Aby zwiększyć skuteczność szczepień i ominąć zjawisko wymiany serotypów, pojawiły się nowe koniugowane szczepionki zawierające w swym składzie większą liczbę serotypów. W 2009 roku zarejestrowano koniugowaną szczepionkę 10-walentną, zawierającą dodatkowo polisacharydy pochodzące serotypów 1, 5, i 7F pneumokoków, z których 8 jest sprzężonych z białkiem D pochodzącym z bezotoczkowych szczepów *Haemophilus influenzae*. Najnowsza szczepionka 13-walentna, wprowadzona w lutym 2010 roku, chroni przed zakażeniami serotypami 3, 6A i 19A zwiększając pulę serotypów 10-walentnej szczepionki, a tym samym obejmując ponad 80% inwazyjnych serotypów pneumokoka w większości regionów świata [38]. W następnych latach spodziewana jest rejestracja nowej 15-walentnej szczepionki koniugowanej [80]. Projektowanie nowych szczepionek zawierających coraz to większą liczbę wielocukrowych koniugatów jest bardzo drogie w produkcji, co wpływa na wysoką cenę szczepionek, a tym samym ogranicza możliwość ich stosowania w wielu krajach. Nowe badania prowadzone na modelach zwierzęcych oraz dotyczące nosicielstwa u ludzi wskazują, że w ochronie przeciwko kolonizacją i wystąpieniem choroby pneumokokowej biorą udział nie tylko przeciwciała skierowane przeciwko wielocukrowej otoczce pneumokoka, ale również te powstałe przeciwko antygenom białkowym tego drobnoustroju. W związku z tym przeprowadza się badania nad możliwością włączenia jako składników szczepionki przeciwko *S. pneumoniae* białek tego drobnoustroju, takich jak powierzchniowe białko PspA, adhezyna PsaA lub pneumolizyna, czego następstwem byłoby uzyskanie odporności na ponad 90 serotypów tego drobnoustroju [10].

## 7. Podsumowanie

Rozwój choroby pneumokokowej jest wynikiem wielokierunkowych i złożonych interakcji patogen-organism gospodarza. Pneumokok posiada wiele czynników wirulencji, które mają znaczenie zarówno dla kolonizacji nabłonka dróg oddechowych jak i inwazyjności danego szczepu. Warunkiem koniecznym do rozwoju choroby jest kolonizacja nosogardzieli przez *S. pneumoniae* i w większości przypadków jest to kolonizacja nowym serotypem.

Szerokie stosowanie szczepionek koniugowanych w niektórych krajach realnie zmniejszyło liczbę przypadków IChP powodowanej przez serotypy szczepionkowe, ale zaobserwowano wzrost liczby przypadków wywoływanych przez serotypy nieszczepionkowe. Można przypuszczać, że szczepionka przyszłości będzie zawierała jako antygeny pneumokokowe rekombinowane białka, które będą wykazywały wysoką immunogenność i będą uniwersalne dla wszystkich szczepów *S. pneumoniae*.

## Piśmiennictwo

- Alcantara R.B., Preheim L.C., Gentry-Nielsen M.J.: Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteriemia. *Infect. Immun.* **69**, 3569–3575 (2001)
- AlonsoDeVelasco E., Verheul A.F.M., Verhoef J., Snippe H.: *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis and vaccines. *Microbiol. Rev.* **59**, 591–603 (1995)
- American Academy of Pediatrics, Committee of Infectious Diseases: Policy statement: Recommendations for prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate vaccine (Prevnar), pneumococcal polysaccharide vaccine, and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics*, **106**, 362–366 (2000)
- Balachandran P., Brooks-Walter A., Virolainen-Julkunen A., Hollingshead S.K., Briles D.E.: Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **70**, 2526–2534 (2002)
- Barocchi M.A., Henriques-Normark B. i wsp.: A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2857–2862 (2006)
- Berry A.M., Alexander J.E., Mitchell T.J., Andrew P.W., Hansman D., Paton J.C.: Effect of defined point mutations in the pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **63**, 1969–1974 (1995)
- Black S., Shinefield H., Baxter R., Austrian R., Bracken L., Hansen J., Lewis E., Fireman B.: Postlicensure surveillance for pneumococcal invasive disease after use of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in Northern California Kaiser Permanente. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**, 485–489 (2004)
- Black S., Edwards K. i wsp.: Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **19**, 187–195 (2000)
- Black S.B., Hackell J. i wsp.: Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children younger than five years of age for prevention of pneumonia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **21**, 810–815 (2002)
- Briles D.E., Hollingshead S., Brooks-Walter A., Nabors G.S., Ferguson L., Schilling M., Gravenstein P., King J., Swift A.: The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. *Vaccine*, **18**, 1707–1711 (2000)
- Briles D.E., Miyaji E., Fukuyama Y., Ferreira D.M., Fujihashi K.: Elicitation of mucosal immunity by proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Adv. Otorhinolaryngol.* **72**, 25–27 (2011)
- Briles D.E., McDaniel L.S. i wsp.: Pneumococcal diversity: consideration for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 645–657 (1998)
- Brooks-Walter A., Briles D.E., Hollingshead S.K.: The pspC gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteriemia. *Infect. Immun.* **67**, 6533–6542 (1999)
- Brueggemann A.B., Peto T.E., Crook D.W., Butler J.C., Kristinsson K.G., Spratt B.G.: Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *J. Infect. Dis.* **190**, 1203–1211 (2004)
- Bruyn G.A., van Furth R.: Pneumococcal polysaccharide vaccines: indications, efficacy and recommendations. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **10**, 897–910 (1991)
- 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. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* **54**, 893–897 (2005)
- Centers for Disease Control: Prevention of pneumococcal disease recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *Morb. Mortal. Wkly Rep.* **46**, 1–24 (1997)
- Cundell D.R., Gerard N.P., Gerard C., Idanpaan-Heikkilä I., Tuomanen E.I.: *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, **377**, 435–438 (1995)
- Cundell D.R., Weiser J.N., Shen J., Young A., Tuomanen E.I.: Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **63**, 757–761 (1995)
- Eldan M., Leibovitz E., Piglansky L., Raiz S., Press J., Yagupsky P., Leiberman A., Dagan R.: Predictive value of pneumococcal nasopharyngeal cultures for the assessment of nonresponsive acute otitis media in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **19**, 298–303 (2000)
- Eskola J., Mäkelä P.H. i wsp.: Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N. Engl. J. Med.* **344**, 403–409 (2001)
- Ferreira D.M., Oliveira M.L., Moreno A.T., Ho P.L., Briles D.E., Miyaji E.N.: Protection against nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A). *Microb Pathog.* **48**, 205–213 (2010)
- Fukuyama Y., King J.D., Kataoka K., Kobayashi R., Gilbert R.S., Oishi K., Hollingshead S.K., Briles D.E., Fujihashi K.: Secretory-IgA antibodies play an important role in the immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J. Immunol.* **185**, 1755–1762 (2010)
- Garcia-Rodriguez J.A., Martinez M.J.F.: Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **50** (Suppl. S2), S59–73 (2002)
- Ghaffar F., Friedland I.R., McCracken G.H.: Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **18**, 638–646 (1999)
- Gladstone R.A., Jefferies J.M., Faust S.N., Clarke S.C.: Continued control of pneumococcal disease in the UK – the impact of vaccination. *J. Med. Microbiol.* **60**, 1–8 (2011)



27. Goldenberg H.B., McCool T.L., Weiser J.N.: Cross-reactivity of human immunoglobulin G2 recognizing phosphorylcholine and evidence for protection against major bacterial pathogens of the human respiratory tract. *J. Infect. Dis.* **190**, 1254–1263 (2004)
28. Gorter A.D., Hiemstra P.S., de Bentzmann S., van Wetering S., Dankert J., van Alphen L.: Stimulation of bacterial adherence by neutrophil defensins varies among bacterial species but not among host cell types. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **28**, 105–111 (2000)
29. Gray B.M., Converse G.M., Dillon H.C.: Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J. Infect. Dis.* **142**, 923–933 (1980)
30. Greenberg D., Givon-Lavi N., Newman N., Bar-Ziv J., Dagan R.: Nasopharyngeal carriage of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes during pediatric pneumonia as a means to estimate serotype disease potential. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **30**, 227–233 (2011)
31. Grijalva C.G., Poehling K.A., Nuorti J.P., Zhu Y., Martin S.W., Edwards K.M., Griffin M.R.: National impact of universal childhood immunization with pneumococcal conjugate vaccine on outpatient medical care visits in the United States. *Pediatrics*, **118**, 865–73 (2006)
32. Hammerschmidt S., Talay S.R., Brandtzaeg P., Chhatwal G.S.: SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol. Microbiol.* **25**, 1113–1124 (1997).
33. Hausdorff W.P., Bryant J., Paradiso P.R., Siber G.R.: Which pneumococcal serogroups cause the most invasive diseases: implications for conjugate vaccine formulation and use, Part I. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 100–121 (2000)
34. Hausdorff W.P., Feikin D.R., Klugman K.P.: Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect. Dis.* **5**, 83–93 (2005)
35. Hicks L.A., Whitney C.G. i wsp.: Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998–2004. *J. Infect. Dis.* **196**, 1346–1354 (2007)
36. Hill P.C., Townend J., Antonio M., Akisanya B., Ebruke C., Lahai G., Greenwood B.M., Adegbola R.A.: Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in rural Gambian villages: a longitudinal study. *Clin. Infect. Dis.* **50**, 1468–1476 (2010)
37. Högberg L., Geli P., Ringberg H., Melander E., Lipsitch M., Ekdahl K.: Age- and serogroup-related differences in observed durations of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant pneumococci. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 948–952 (2007)
38. Isaacman D.J., McIntosh E.D., Reinert R.R.: Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int. J. Infect. Dis.* **14**, e197–209 (2010)
39. Kadioglu A., Taylor S., Iannelli F., Pozzi G., Mitchell T.J., Andrew P.W.: Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect. Immun.* **70**, 2886–2890 (2002)
40. King S.J.: Pneumococcal modification of host sugars: a major contributor to colonization of the human airway? *Mol. Oral Microbiol.* **25**, 15–24 (2010)
41. King S.J., Hippe K.R., Gould J.M., Bae D., Peterson S., Cline R.T., Fasching C., Janoff E.N., Weiser J.N.: Phase variable desialylation of host proteins that bind to *Streptococcus pneumoniae* in vivo and protect the airway. *Mol. Microbiol.* **54**, 159–171 (2004)
42. Korona-Główniak I., Niedzielski A., Malm A.: Upper respiratory colonization by *Streptococcus pneumoniae* in healthy preschool children in south-east Poland. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **75**, 1529–1534 (2011)
43. Korona-Główniak I., Niedzielski A., Malm A., Niedzielska G. Serotypes and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* from adenoids in preschool children with recurrent upper respiratory tract infections. *Pol. J. Microbiol.* **62**, 385–390 (2013)
44. Laine C., Mwangi T., Thompson C.M., Obiero J., Lipsitch M., Scott J.A.: Age-specific immunoglobulin G (IgG) and IgA to pneumococcal protein antigens in a population in coastal Kenya. *Infect. Immun.* **72**, 3331–3335 (2004)
45. Levy C., Varon E., Bingen E., Lécuyer A., Boucherat M., Cohen R.; Bacterial Meningitis Study Group. Pneumococcal meningitis in French children before and after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **30**, 168–70 (2011)
46. Madhi S.A., Levine O.S., Hajjeh R., Mansoor O.D., Cherian T.: Vaccines to prevent pneumonia and improve child survival. *Bull. World Health Organ.* **86**, 365–372 (2008)
47. Magee A.D., Yother J.: Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **69**, 3755–3761 (2001)
48. Malley R., Lipsitch M., Stack A., Saladino R., Fleisher G., Pelton S., Thompson C., Briles D., Anderson P.: Intranasal immunization with killed unencapsulated whole cells prevents colonization and invasive disease by capsulated pneumococci. *Infect. Immun.* **69**, 4870–4873 (2001)
49. Malley R., Trzcinski K., Srivastava A., Thompson C.M., Anderson P.W., Lipsitch M.: CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 4848–4853 (2005)
50. Marion C., Limoli D.H., Bobulsky G.S., Abraham J.L., Burnaugh A.M., King S.J.: Identification of a pneumococcal glycosidase that modifies O-linked glycans. *Infect. Immun.* **77**, 1389–1396 (2009)
51. McCool T.L., Cate T.R., Moy G., Weiser J.N.: The immune response to pneumococcal proteins during experimental human carriage. *J. Exp. Med.* **195**, 359–365 (2002)
52. Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce. [http://www.pzh.gov.pl/epimeld/index\\_p.html](http://www.pzh.gov.pl/epimeld/index_p.html) (1.03.2013).
53. Moffitt K.L., Gierahn T.M., Lu Y.J., Gouveia P., Alderson M., Flechtner J.B., Higgins D.E., Malley R.: T(H)17-based vaccine design for prevention of *Streptococcus pneumoniae* colonization. *Cell Host Microbe*, **9**, 158–165 (2011)
54. Müller-Graf C.D.M., Whatmore A.M., King S.J., Trzcinski K., Pickerill A.P., Doherty N., Paul J., Griffiths D., Crook D., Dowson C.G.: Population biology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from oropharyngeal carriage and invasive disease. *Microbiology* **145**, 3283–3293 (1999)
55. Musher D.M., Groover J.E., Reichler M.R., Riedo F.X., Schwartz B., Watson D.A., Baughn R.E., Breiman R.F.: Emergence of antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* during outbreaks of pneumonia: association with nasopharyngeal colonization. *Clin. Infect. Dis.* **24**, 441–446 (1997)
56. Nabors G.S., Becker R.S. i wsp.: Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies. *Vaccine* **23**, 4257–4262 (2005)
57. Nelson A.L., Roche A.M., Gould J.M., Chim K., Ratner A.J., Weiser J.N.: Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect. Immun.* **75**, 83–90 (2007)

58. Niedzielski A., Korona-Głowniak I., Malm A., Mielnik-Niedzielska G.: Distribution of vaccine serotypes among *Streptococcus pneumoniae* colonizing the upper respiratory tract in healthy pre-school children in south-east Poland. *Otolaryngol. Pol.* **66**, 403–406 (2012)
59. O'Brien K.L., Cherian T. i wsp.: Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*, **374**, 893–902 (2009)
60. Obaro S., Adegbola R.: The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. *J. Med. Microbiol.* **51**, 98–104 (2002)
61. Obaro S.K., Monteil M.A., Henderson D.C.: Pneumococcal problem. *Br. Med. J.* **312**, 1521–1525 (1996)
62. Palaniappan R., Singh S., Singh U.P., Sakthivel K.S.K., Ades E.W., Briles D.E., Hollingshead S.K., Paton J.C., Sampson J.S., Lillard Jr J.W.: Differential PsaA-, PspA-, PspC-, and PdB-specific immune responses in a mouse model of pneumococcal carriage. *Infect. Immun.* **73**, 1006–1013 (2005)
63. Peters T.R., Edwards K.M.: Pneumococcal vaccines: present and future. *Pediatr. Ann.* **31**, 261–268 (2002)
64. Pneumococcal Disease – Centers for Disease Control and Prevention [www.cdc.gov/vaccines/pubs/.../pneumo.pdf](http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/.../pneumo.pdf)
65. Poehling K.A., Szilagyi P.G., Grijalva C.G., Martin S.W., LaFleur B., Mitchel E., Barth R.D., Nuorti J.P., Griffin M.R.: Reduction of frequent otitis media and pressure-equalizing tube insertions in children after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics*, **119**, 707–715 (2007)
66. Poehling K.A., Schaffner W. i wsp.: Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *JAMA*, **295**, 1668–1674 (2006)
67. Pracht D., Elm C., Gerber J., Bergmann S., Rohde M., Seiler M., Kim K.S., Jenkinson H.F., Nau R., Hammerschmidt S.: PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion and meningel inflammation. *Infect. Immun.* **73**, 2680–2689 (2005)
68. Radzikowski A., Skórka A., Mikołajczyk W., Woźniak M., Wysocki J.: Does nasopharyngeal bacterial flora predict etiology of acute otitis media in children? *Pediatr. Pol.* **86**, 620–623 (2011)
69. Rapola S., Käyhty H. i wsp.: Natural development of antibodies to pneumococcal surface protein A, pneumococcal surface adhesin A, and pneumolysin in relation to pneumococcal carriage and acute otitis media. *J. Infect. Dis.* **182**, 1146–1152 (2000)
70. Ren B., Szalai A.J., Hollinshead K., Briles D.E.: Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect. Immun.* **72**, 114–122 (2004)
71. Ring A., Weiser J.N., Tuomanen E.I.: Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier: molecular model of a novel bidirectional pathway. *J. Clin. Invest.* **102**, 347–360 (1998)
72. Rosenow C., Ryan P., Weiser J.N., Johnson S., Fontan P., Ortqvist A., Masure H.R.: Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **25**, 819–829 (1997)
73. Rossjohn J., Gilbert R.J.C., Crane D., Morgan P.J., Mitchell T.J., Rowe A.J., Andrew P.W., Paton J.C., Tweten R.K., Parker M.W.: The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* **284**, 449–461 (1998)
74. Rubins J.B., Janoff E.N.: Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. *J. Lab. Clin. Med.* **131**, 21–27 (1998)
75. Salleras L., Domínguez A., Ciruela P., Izquierdo C., Navas E., Torner N., Borrás E.: Changes in serotypes causing invasive pneumococcal disease (2005–2007 vs. 1997–1999) in children under 2 years of age in a population with intermediate coverage of the 7-valent pneumococcal conjugated vaccine. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 997–1001 (2009)
76. Simell B., Auranen K., Kayhty H., Goldblatt D., Dagan R., O'Brien K.L., for the Pneumococcal Carriage Group (Pneumo-Carr). The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev. Vaccines*, **11**, 841–855 (2012)
77. Simell B., Kilpi T.M., Käyhty H.: Pneumococcal carriage and otitis media induce salivary antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides in children. *J. Infect. Dis.* **186**, 1106–1114 (2002)
78. Simell B., Korkeila M., Pursiainen H., Kilpi T.M., Käyhty H.: Pneumococcal carriage and otitis media induce salivary antibodies to pneumococcal surface adhesin A, pneumolysin, and pneumococcal surface protein A in children. *J. Infect. Dis.* **183**, 887–896 (2001)
79. Singleton R.J., Hennessy T.W., Bulkow L.R., Hammit L.L., Zulz T., Hurlburt D.A., Butler J.C., Rudolph K., Parkinson A.: Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among Alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. *JAMA*, **297**, 1784–1792 (2007)
80. Skinner J.M., Heinrichs J.H. i wsp.: Pre-clinical evaluation of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. *Vaccine*, **29**, 8870–8876 (2011)
81. Skoczyńska A., Kuch A., Gołębowska A., Waśko I., Ronkiewicz P., Markowska M., Hryniewicz W.: Inwazyjna choroba pneumokokowi w Polsce w roku 2010. *Pol. Merk. Lek.* **31**, 80–85 (2011)
82. Skoczyńska A., Hryniewicz W.: Genetic relatedness, antibiotic susceptibility, and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* responsible for meningitis in Poland, 1997–2001. *Microb. Drug Resist.* **9**, 175–182 (2003)
83. Sleeman K.L., Daniels L., Gardiner M., Griffiths D., Deeks J.J., Dagan R., Gupta S., Moxon E.R., Peto T.E., Crook D.W.: Acquisition of *Streptococcus pneumoniae* and nonspecific morbidity in infants and their families: a cohort study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, 121–127 (2005)
84. Spellerberg B., Cundell D.R., Sandros J., Pearce B.J., Idänpää-Heikkilä I., Rosenow C., Masure H.R.: Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **19**, 803–813 (1996)
85. Sulikowska A., Grzesiowski P., Sadowy E., Fiett J., Hryniewicz W.: Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from nasopharynges of asymptomatic children and molecular analysis of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* strain replacement in the nasopharynx. *J. Clin. Microb.* **42**, 3942–3949 (2004)
86. Sulikowska A., Grzesiowski P., Taraszkiewicz M., Hryniewicz W.: Nosicielstwo nosogardłowe *Streptococcus pneumoniae* u dzieci do 5 roku życia w wybranych środowiskach w Warszawie. *Pediatr. Pol.* **78**, 377–384 (2003)
87. Swiatło E., Champlin F.R., Holman S.C., Wilson W.W., Watt J.M.: Contribution of choline-binding proteins to cell surface properties of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **70**, 412–415 (2002)
88. Syrjänen R.K., Auranen K.J., Leino T.M., Kilpi T.M., Mäkelä P.H.: Pneumococcal acute otitis media in relation to pneumococcal nasopharyngeal carriage. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, 801–806 (2005)
89. Syrjänen R.K., Herva E.E., Mäkelä P.H., Puhakka H.J., Auranen K.J., Takala A.K., Kilpi T.M.: The value of nasopharyngeal culture in predicting the etiology of acute otitis media in children less than two years of age. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**, 1032–1036 (2006)
90. Tong H.H., Blue L.E., DeMaria T.F.: Evaluation of virulence of the *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient

- mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect. Immun.* **68**, 921–924 (2000)
91. Trotter C.L., Waight P., Andrews N.J., Slack M., Efstratiou A., George R., Miller E.: Epidemiology of invasive pneumococcal disease in the pre-conjugate vaccine era: England and Wales, 1996–2006. *J. Infect.* **60**, 200–208 (2010)
  92. Trzcinski K., Thompson C., Malley R., Lipsitch M.: Antibodies to conserved pneumococcal antigens correlate with, but are not required for, protection against pneumococcal colonization induced by prior exposure in a mouse model. *Infect. Immun.* **73**, 7043–7046 (2005)
  93. Tu A.H., Fulgham R.L., McCrory M.A., Briles D.E., Szalai A.J.: Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **67**, 4720–4724 (1999)
  94. Turner P., Turner C., Jankhot A., Helen N., Lee S.J., Day N.P., White N.J., Nosten F., Goldblatt D.: A longitudinal study of *Streptococcus pneumoniae* carriage in a cohort of infants and their mothers on the Thailand-Myanmar border. *PLOS ONE*, **7**, e38271 (2012)
  95. Von Kries R., Siedler A., Schmitt H.J., Reinert R.R.: Proportion of invasive pneumococcal infections in German children preventable by pneumococcal conjugate vaccines. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 482–487 (2000)
  96. Watson D.A., Musher D.M., Verhoef J.: Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**, 479–490 (1995)
  97. Weiser J.N., Bae D., Fasching C., Scamurra R.W., Ratner A.J., Janoff E.N.: Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4215–4220 (2003)
  98. Weiser J.N., Markiewicz Z., Tuomanen E.I., Wani J.H.: Relationship between phase variation in colony morphology, intra-strain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immunol.* **64**, 2240–2245 (1996)
  99. Whitney C.G., Schuchat A.i wsp.: Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1737–1746 (2003)
  100. Winkelstein J.A.: Complement and the host's defense against the pneumococcus. *Crit. Rev. Microbiol.* **11**, 187–208 (1984)
  101. Zhang Q., Choo S., Finn A.: Immune responses to novel pneumococcal proteins pneumolysin, PspA, PsaA, and CbpA in adenoïdal B cells from children. *Infect. Immun.* **70**, 5363–5369 (2002)
  102. Zhou F., Kyaw M.H., Shefer A., Winston C.A., Nuorti J.P.: Health care utilization for pneumonia in young children after routine pneumococcal conjugate vaccine use in United States. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **161**, 1162–1168 (2007)