

ΕΘΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
Τομέας Δημόσιας Υγείας

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ

ΑΠΟΛΟΤΙΣΜΟΣ ΕΡΓΟΥ ΕΤΟΥΣ 2012

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ

Δρ. ΤΖΩΡΤΖΙΝΑ ΤΖΑΝΑΚΑΚΗ

Επιστημονικοί Συνεργάτες

Δρ Κων/νος Κεσανόπουλος

Δρ Αθανασία Ξηρογιάννη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το Κέντρο Αναφοράς ιδρύθηκε το 1989 και λειτουργεί από το 1993 στην Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας (ΕΣΔΥ) . Είναι μέλος της Ευρωπαϊκής Ένωσης Κέντρων Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (European Monitoring Group for Meningococci (EMGM) και ως εκπρόσωπος Νοτίου και Ανατολικής Ευρώπης συμμετέχει ενεργά στο 7μελές διοικητικό του συμβούλιο.

Σκοπός του είναι η διερεύνηση των αιτιολογικών παραγόντων που προκαλούν μηνιγγίτιδα (βακτηριακή ή ιογενή) όπως:

- *Neisseria meningitidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae type b*
- *Listeria monocytogenes*
- *Streptococcus spp.*,
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Haemophilus influenzae* (non b)
- *Staphylococcus aureus*

Αναλυτικότερα μελετάται:

- Η διερεύνηση των στελεχών *N.meningitidis* στον Ελληνικό πληθυσμό, καθώς επίσης και στον πληθυσμό των Βαλκανικών χωρών (Αλβανία, Βουλγαρία, Ρουμανία).
- Η επιδημιολογία της *N.meningitidis* (στελέχη, βιολογικά υλικά), ο έγκαιρος εντοπισμός εμφάνισης ή εισαγωγής νέων οροτύπων στην Ελλάδα.
- Η επιδημιολογία της μηνιγγίτιδας στην Ελλάδα ανά αιτία. Η μελέτη γίνεται με συμβατικές (καλλιέργεια, οροτυπία) και μοριακές τεχνικές όπως:

1. **μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR)** συμβατική για αναγνώριση της *Neisseria meningitidis* και για τις ορομάδες A,B,C,W-135 και Y

2. **Μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)**

3. Μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (**multiplex PCR**) για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* *Haemophilus influenzae type b* και *Listeria monocytogenes*.

4. Μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (**multiplex PCR**) για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *Streptococcus spp.*, (**group A και Group B**), *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* (**non b**) *Staphylococcus aureus*.

5. Μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (**multiplex PCR**) για την ταυτόχρονη τυποποίηση του μικροοργανισμού *Streptococcus pneumoniae* ως προς τους **9 κύριους οροτύπους** του (1, 3, 4, 6,14, 18, 19A, 19F, 23F). Και οι 9 ορότυποι περιλαμβάνονται στο νέο 13δύναμο συζευγμένο εμβόλιο.

6. Μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (**multiplex PCR**) για την ταυτόχρονη τυποποίηση του μικροοργανισμού *H. influenzae* (ως προς τους **5 κύριους οροτύπους** του (a, c, d, e, f)

7. Εφαρμογή μοριακών τεχνικών για την τυποποίηση *Neisseria meningitidis* μέσω των:

- i) Τεχνική του προσδιορισμού της αλληλουχίας των βάσεων (**Multilocus Sequence Typing MLST**) (σε στελέχη)
- ii) Προσδιορισμός της γενετικής συγγένειας της *Neisseria meningitidis* μέσω της αλληλούχησης των μεταβλητών περιοχών του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PorA (στελέχη, βιολογικά υλικά)
- iii) Προσδιορισμός της αλληλουχίας βάσεων του γονιδίου *fetA* (στελέχη, βιολογικά υλικά)
- iv) Τεχνική τυποποίησης της *Neisseria meningitidis* βασισμένη στην ομοιομορφία διαδοχικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του γονιδιώματος (**Variable Number Tandem Repeats -VNTR**) για την μοριακή τυποποίηση *Neisseria meningitidis* (στελέχη , βιολογικά δείγματα
- v) Τεχνική της *Neisseria meningitidis* βασισμένη στον τυχαίο πολλαπλασιασμό του πολυμορφισμού του DNA (**Random Amplification of Polymorphic DNA-RAPD**)

- Η συλλογή επιδημιολογικών στοιχείων για τα νέα εμβόλια.
- Η καταγραφή τάσεων αντοχής στα αντιβιοτικά των στελεχών *N. meningitidis*
- Η ενημέρωση του πληθυσμού για την μηνιγγίτιδα με την έκδοση ενημερωτικών εντύπων για τα συμπτώματα, την αντιμετώπιση και πρόληψη της νόσου.

Το Κέντρο συνεργάζεται αρμονικά με όλα τα νοσοκομεία της χώρας για την συλλογή των απαραίτητων στοιχείων. Σήμερα στο Κέντρο αποστέλλονται δείγματα για ταυτοποίησης/ τυποποίηση από το 80-90% των κρουσμάτων μηνιγγίτιδας ή και σηψαιμίας αλλά και βιολογικά υλικά από άλλες βακτηριακές λοιμώξεις όπως πνευμονίες, αρθρίτιδες και ωτίτιδες.

Από την θέση αυτή θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας αρχικά στην Ηγεσία του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ για την αμέριστη ηθική και οικονομική συμπαράσταση, το τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης και Παρέμβασης του ΚΕΕΛΠΝΟ για την ανταλλαγή επιδημιολογικών στοιχείων και τους γιατρούς (εργαστηριακούς και κλινικούς) όλων των νοσοκομείων της χώρας για την συνεργασία τους στην αποστολή δειγμάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	Σελίδα
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
A. ΔΗΛΩΘΕΝΤΑ ΚΡΟΥΣΜΑΤΑ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ	
<ul style="list-style-type: none"> • Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων μηνιγγίτιδας ανά αιτία 	7
<i>Neisseria meningitidis</i>	8
<ul style="list-style-type: none"> • Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων μηνιγγ/κής νόσου και επίπτωση ανά ηλικία 	
<ul style="list-style-type: none"> • Δηλωθέντα κρούσματα μηνιγγ/κής νόσου και επίπτωση ανά μήνα 	11
<ul style="list-style-type: none"> • Μηνιαία κατανομή επίπτωσης μηνιγγίτιδας ανά αιτία 	11
<ul style="list-style-type: none"> • Μηνιαία κατανομή επίπτωσης μηνιγγιτιδοκόκκου ανά έτος 	12
<ul style="list-style-type: none"> • Κατηγορία κατάταξης κρουσμάτων μηνιγγ/κής νόσου 	13
<ul style="list-style-type: none"> • Θνητότητα ανά αιτία και μικροοργανισμό 	14
<ul style="list-style-type: none"> • Διαχρονικός πίνακας κρουσμάτων μηνιγγίτιδας 1993-2012 	16
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Μηνιγγίτιδα από <i>Streptococcus pneumoniae</i> 	18
<ul style="list-style-type: none"> • Αριθμός κρουσμάτων και επίπτωση <i>S. pneumoniae</i> ανά ηλικία 	19
B. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΑ ΚΡΟΥΣΜΑΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ	21
<ul style="list-style-type: none"> • Τυποποίηση βιολογικών δειγμάτων ανά μικροοργανισμό 	21
<i>N. meningitidis</i>	22
<ul style="list-style-type: none"> • Τυποποίηση ανά οροομάδα 	
<ul style="list-style-type: none"> • Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά από κρούσματα 1993-2012 	23
<ul style="list-style-type: none"> • Αριθμός θανάτων και θνητότητα ανά οροομάδα 	24
<ul style="list-style-type: none"> • Κατανομή οροομάδων και επίπτωση κατά ηλικιακή ομάδα 	24
<ul style="list-style-type: none"> • Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στελεχών <i>N. meningitidis</i> (ορότυπος/ υπότυπος) 	25
<ul style="list-style-type: none"> • Μοριακή ταυτοποίηση (MLST, <i>porA</i>, VNTR) 	26
<ul style="list-style-type: none"> • Εφαρμογή μοριακών τεχνικών σε περιπτώσεις επιδημίας/έξαρσης κρουσμάτων 	27
<ul style="list-style-type: none"> • Ευαισθησία των στελεχών στα αντιβιοτικά 	28
<i>S. pneumoniae</i>	29
<ul style="list-style-type: none"> • Κατανομή οροτύπων <i>S. pneumoniae</i> 2012 	30
<ul style="list-style-type: none"> • Ορότυποι ανά ηλικία (2006-2012) 	
Βακτηριακές μηνιγγίτιδες άλλης αιτιολογίας	37
<ul style="list-style-type: none"> • Κατανομή βακτηριακών μηνιγγιτίδων ανά μικροοργανισμό και ηλικιακή ομάδα 	
Ιογενείς και λοιπές μηνιγγίτιδες	38
Δημοσιεύσεις/Διακρίσεις	39

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ορισμοί: σύμφωνα με τους ορισμούς κατάταξης (ΚΕΕΛΠΝΟ-2004) τα κρούσματα μηνιγγίτιδας κατατάσσονται στις παρακάτω 3 κατηγορίες:

1. **Ενδεχόμενο:** κατατάσσεται το κρούσμα με συμβατή εικόνα μηνιγγίτιδας
2. **Πιθανό:** κατατάσσεται το κρούσμα με συμβατή εικόνα μηνιγγίτιδας και θετικό με ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω ευρήματα:
 - Χαρακτηριστικά ευρήματα στην γενική εξέταση του ΕΝΥ
 - Ανίχνευση αντιγόνου του υπεύθυνου μικροοργανισμού σε φυσιολογικά άσηπτο κλινικό δείγμα
 - Επιδημιολογική σύνδεση με επιβεβαιωμένο κρούσμα
3. **Επιβεβαιωμένο:** κρούσμα με συμβατή κλινική εικόνα το οποίο έχει επιβεβαιωθεί εργαστηριακά:
 - Με συμβατικές τεχνικές (καλλιέργεια)
 - Με μοριακές τεχνικές (PCR)

Τα επιδημιολογικά στοιχεία που παρατίθενται στο πρώτο μέρος του απολογισμού, αφορούν τα δηλωθέντα κρούσματα μηνιγγίτιδας και των 3 κατηγοριών: **πιθανά, ενδεχόμενα** (σύμφωνα με τις δηλώσεις που εστάλησαν από τα νοσοκομεία στο ΚΕΕΛΠΝΟ) ή **επιβεβαιωμένα** (όπως επιβεβαιώθηκαν από το Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας ή τα μικροβιολογικά εργαστήρια των νοσοκομείων).

Σημαντικό είναι το γεγονός ότι όσον αφορά την μηνιγγίτιδα από *N. meningitidis*, και *S. pneumoniae*, ένα πολύ μεγάλο ποσοστό (92% και 79% για την *N. meningitidis*, και *S. pneumoniae*, αντίστοιχα), επιβεβαιώθηκε αποκλειστικά από το Κέντρο Αναφοράς με την χρήση μοριακών τεχνικών (PCR, *porA* κλπ). Επιπλέον, με μοριακές τεχνικές επιβεβαιώνεται και ένα μεγάλο ποσοστό βακτηριακών μηνιγγιτίδων άλλης αιτιολογίας περίπου 50-60% ανά έτος που μέχρι την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση τους ως προς τα βακτήρια που την προκαλούσαν.

Α. ΔΗΛΩΘΕΝΤΑ ΚΡΟΥΣΜΑΤΑ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ :
Επιδημιολογικά στοιχεία

Κατά το χρονικό διάστημα Ιανουάριος – Δεκέμβριος 2012, δηλώθηκαν συνολικά **618** κρούσματα μηνιγγίτιδας, από τα οποία **61** κρούσματα αφορούσαν την μηνιγγιτιδοκοκκική νόσο που αντιστοιχούν σε επίπτωση **0,55** / 100.000 κατ. και 46 κρούσματα μηνιγγίτιδας/σηψαιμίας από στρεπτόκοκκο της πνευμονίας που αντιστοιχεί σε επίπτωση 0,41/100 000 κατ (**πίνακας 1**).

Πίνακας 1: Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων μηνιγγίτιδας ανά μικροοργανισμό (έτος 2012)

Μικροοργανισμοί	Ιανουάριος-Δεκέμβριος 2012		
	Νο Κρουσμάτων	%	Επίπτωση/100,000
Μηνιγγιτιδόκοκκος	61	9.9	0.55
Πνευμονιόκοκκος	46	7.44	0.41
Αιμόφιλος τύπου β	3	0.48	0.03
Κρούσματα Μικροβιακής (άλλο βακτήριο)	168	27.17	1.51
<i>Επιβεβαιωμένα</i>			
• <i>Streptococcus spp</i> (group A&B)	27		
• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0		
• <i>Haemophilus influenzae</i>	10		
• <i>Listeria monocytogenes</i>	8		
• <i>Staph. aureus</i>	19		
• <i>Acinetobacter baumani</i>	1		
• <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5		
Ιός	294	47.57	2.65
Αγνώστου αιτιολογίας	46	7.44	0.41
Σύνολο	618	100	5.57

Κρούσματα από *Neisseria meningitidis*

Παρατηρήθηκε αυξημένη επίπτωση (0.55/ 100 000) σε σχέση με το προηγούμενο έτος (2011, 0.50/100 000). Τα περισσότερα κρούσματα μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου εμφανίστηκαν σε βρέφη και παιδιά ηλικίας έως 4 ετών, ενώ αντίθετα, παρατηρήθηκε μείωση της επίπτωσης στην ηλικιακή ομάδα 5-9 (από 1.93 (2011) σε 1.74/100 000 κατ. Αντίθετα και για πρώτη φορά παρατηρήθηκε αύξηση της επίπτωσης στην ηλικιακή 15-19 από 0,99 (2011) σε 1.66/100 000 κατ.

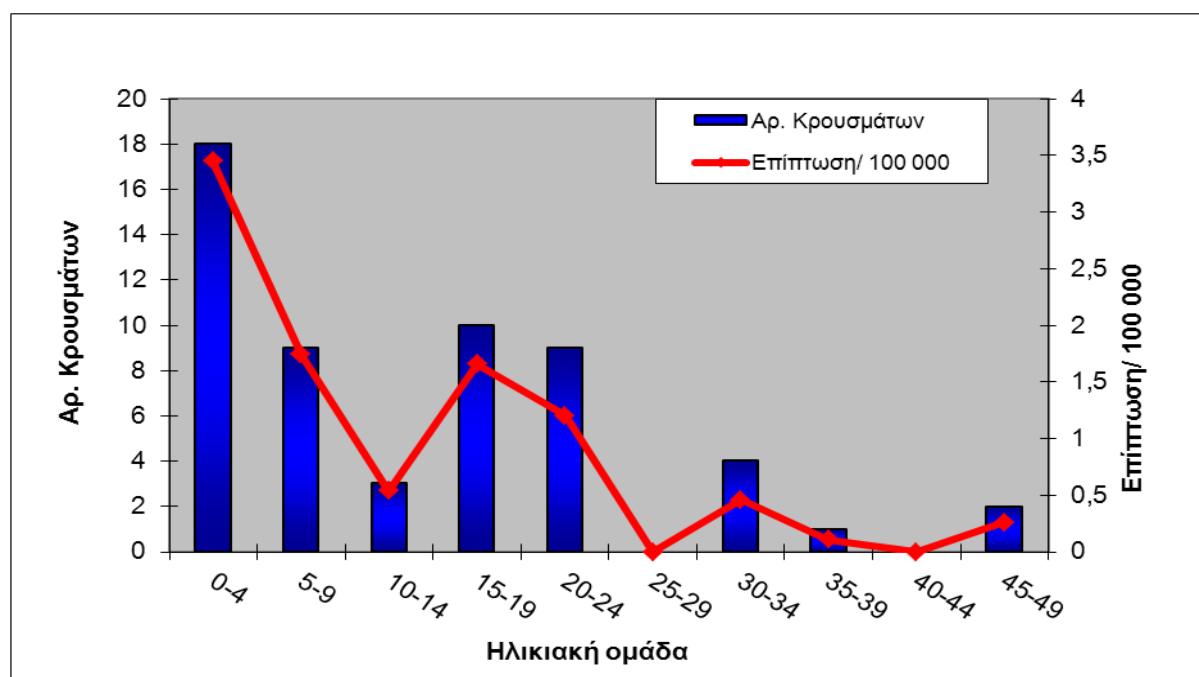
Ο αριθμός των δηλωθέντων κρουσμάτων και η επίπτωση κατά 5ετείς ομάδες ηλικίας φαίνονται στον **πίνακα 2** και στο **διάγραμμα 1**.

Πίνακας 2 : Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου και επίπτωση κατά πενταετείς ομάδες ηλικίας / 100.000 κάτοικους κατά το έτος 2012

ΗΛΙΚΙΑ	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ *	ΑΡ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ	ΕΠΙΠΤΩΣΗ /100,000
0-4	521113	18	3.45
5-9	516872	9	1.74
10-14	557841	3	0.54
15-19	603948	10	1.66
20-24	749359	9	1.2
25-29	845178	0	0
30-34	865538	4	0.16
35-39	878355	1	0.11
40-44	797489	0	0
45-49	782173	2	0.26
50-54	715016	0	0
55-59	679735	1	0.15
>60	2591312	4	0.15
ΣΥΝΟΛΟ	11.103.929	61	0.55

** Πληθυσμός 30^{ης} Ιουνίου 2005

Διάγραμμα 1. Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων μηνιγγ/κής νόσου και επίπτωση / 100.000 κατ ανά 5ετείς ομάδες ηλικίας (έτος 2012)



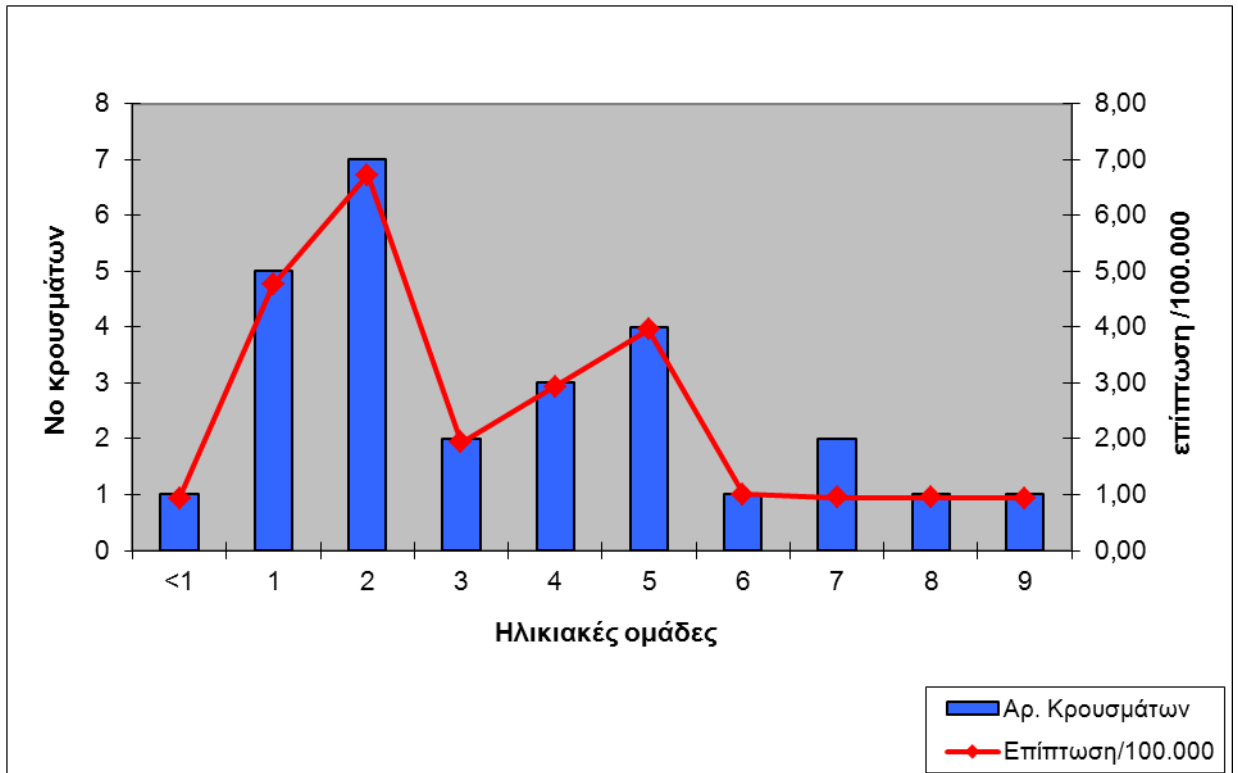
Από την ανάλυση των κρουσμάτων για την ηλικιακή ομάδα από 0-9 χρόνων φαίνεται ότι τα περισσότερα κρούσματα καταγράφηκαν στα βρέφη ηλικίας 1 και 2 ετών (4.76 και 6.72 /100 000) σε αντίθεση με τα προηγούμενα χρόνια όπου τα περισσότερα κρούσματα είχαν καταγραφεί στα βρέφη <1 έτους (πίνακας 3, διάγραμμα 2).

Πίνακας 3 : Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου και επίπτωση / 100.000 κάτοικους στην ηλικιακή ομάδα 0-9 χρόνων κατά το έτος 2011

ΗΛΙΚΙΑ	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ *	ΑΡ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ	ΕΠΙΠΤΩΣΗ /100000
<1	106388	1	0.94
1	105118	5	4.76
2	104135	7	6.72
3	103111	2	1.94
4	102361	3	2.93
5	101347	4	3.95
6	100312	1	1.0
7	102339	2	0.95
8	105220	1	0.95
9	107654	1	0.93
Σύνολο	1.037.985	27	2.60

* Πληθυσμός 30^{ης} Ιουνίου 2005

Διάγραμμα 2. Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων μηνιγγ/κής νόσου και επίπτωση / 100.000 κατ. στην ηλικιακή ομάδα 0-9 χρόνων (έτος 2012)



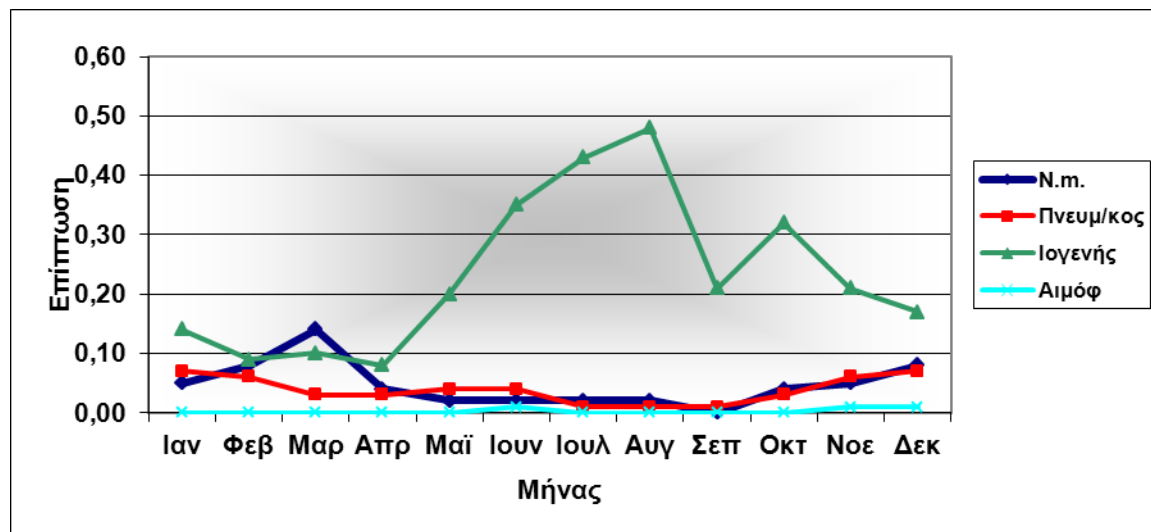
Εποχιακή κατανομή

Τα περισσότερα κρούσματα μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου σημειώθηκαν κατά τους χειμερινούς και πρώτους εαρινούς μήνες με τα περισσότερα κρούσματα παρατηρούνται τον μήνα Μάρτιο (πίνακας 4, διάγραμμα 3). Τα κρούσματα ιογενούς μηνιγγίτιδας σημειώθηκαν ως επί το πλείστον κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και ειδικότερα τους μήνες Ιούνιο- Αύγουστο (διάγραμμα 3).

Πίνακας 4: Δηλωθέντα κρούσματα μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου και επίπτωση (ανά 100.000 κατ.) ανά μήνα κατά το χρονικό διάστημα Ιανουάριος – Δεκέμβριος 2012.

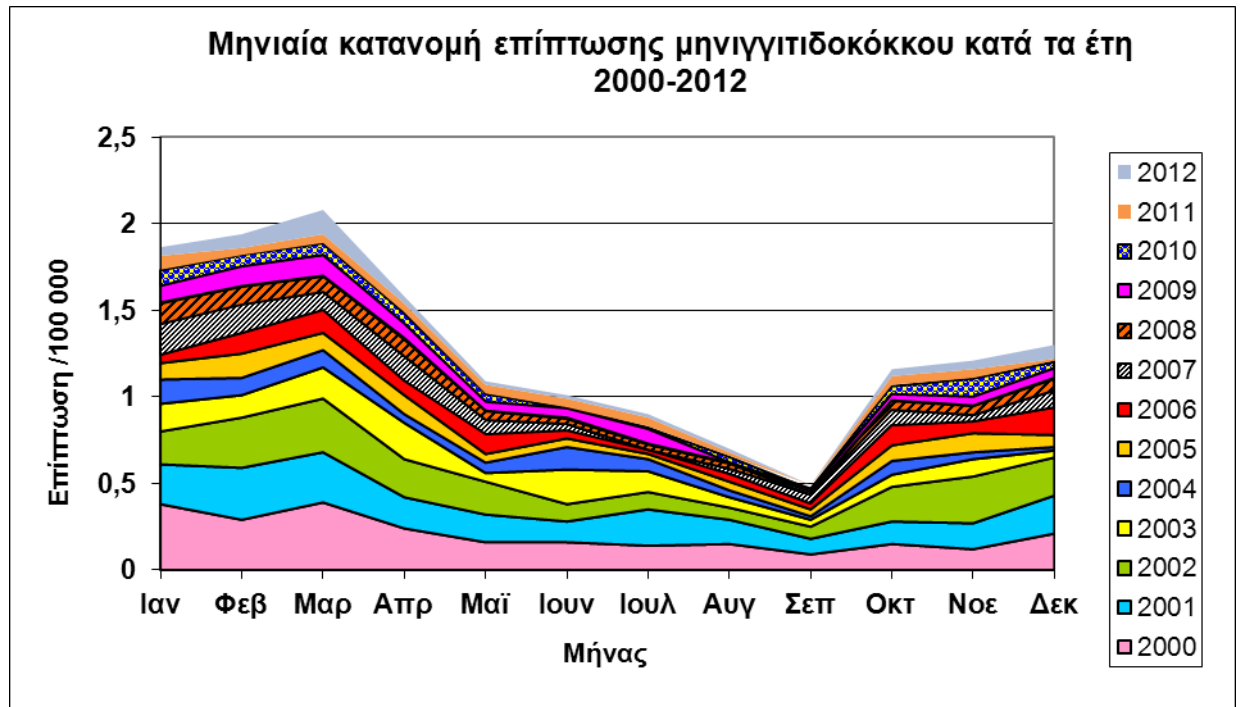
Μήνας	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΜΗΝ/ΚΟΚΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ	ΕΠΙΠΤΩΣΗ
Ιανουάριος	5	0.05
Φεβρουάριος	9	0.08
Μάρτιος	16	0.14
Απρίλιος	4	0.04
Μάιος	2	0.02
Ιούνιος	2	0.02
Ιούλιος	2	0.02
Αύγουστος	2	0.02
Σεπτέμβριος	0	0
Οκτώβριος	4	0.04
Νοέμβριος	6	0.05
Δεκέμβριος	9	0.08
Σύνολο	61	0.55

Διάγραμμα 3. Μηνιαία κατανομή επίπτωσης δηλωθέντων κρουσμάτων μηνιγγίτιδας ανά αιτία έτους 2012



Στο **διάγραμμα 4**, φαίνεται η μηνιαία κατανομή επίπτωσης της μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου κατά την τελευταία δεκαετία (2000-2012).

Διάγραμμα 4.



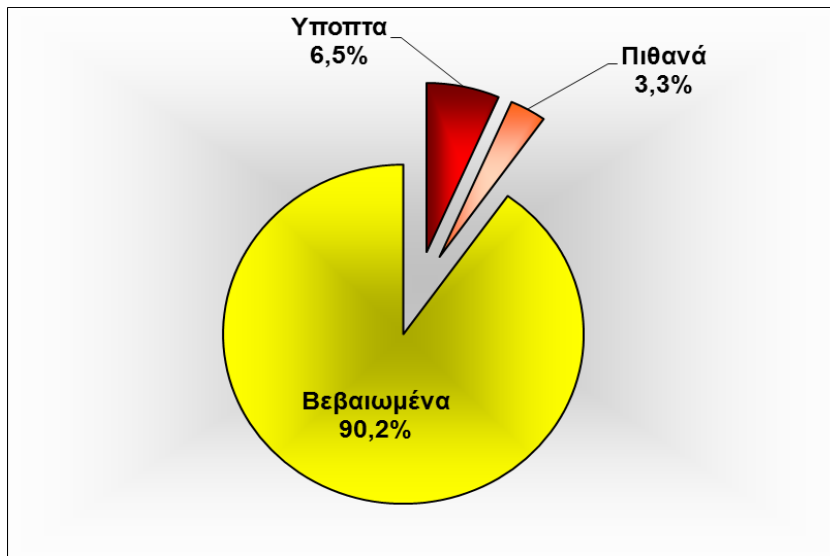
Κατάταξη των κρουσμάτων μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου

Τα δηλωθέντα κρούσματα μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου σύμφωνα με τους επιδημιολογικούς ορισμούς κατατάχθηκαν ως πιθανά σε ποσοστό **3,3%** και επιβεβαιωμένα σε ποσοστό **90,2%**, ενώ ποσοστό **6.5%** των παραπάνω κρουσμάτων κατάχθηκε στην κατηγορία των **ύποπτων κρουσμάτων** καθότι δεν εστάλησαν στο ΕΚΑΜ για περαιτέρω τυποποίηση/ταυτοποίηση (**Πίνακας 5, Διάγραμμα 5**).

Πίνακας 5: Κατηγορία κατάταξης κρουσμάτων μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου

Διάγνωση	Ιανουάριος – Δεκέμβριος 2012	
	Αριθμός κρουσμάτων	%
Ύποπτα	4	6.5
Πιθανά	2	3.3
Βεβαιωμένα	55	90.2
Σύνολο	61	100

Διάγραμμα 5. Κατηγορία κατάταξης κρουσμάτων μηνιγγ/κής νόσου



Το ποσοστό των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων είναι μεγαλύτερο από το 90%. Σε αυτό βοήθησε σε ένα σημαντικά μεγάλο βαθμό η εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Ιδιαίτερα βοήθησε η εφαρμογή μιας νέας τεχνολογίας της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης multiplex Fast PCR όπου μειώθηκε σημαντικά ο χρόνος επιβεβαίωσης των κρουσμάτων σε λιγότερο από 2 ώρες για 4 βακτήρια υπό διερεύνηση.

ΘΝΗΤΟΤΗΤΑ :

Η συνολική θνητότητα από μηνιγγίτιδα οιασδήποτε αιτιολογίας ανήλθε σε 2,58 (16 θάνατοι) η οποία ήταν αυξημένη σε σχέση με το προηγούμενο 2011 (1.25, 6 θάνατοι)

Σημαντική αύξηση της θνητότητας παρατηρήθηκε στα κρούσματα μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου όπου ανήλθε στο **11.47** σημαντικά αυξημένη σε σχέση με το 2011 όπου η θνητότητα είχε ανέλθει στο 1.8. (**Πίνακας 6**).

Η θνητότητα από *S. pneumoniae* διατηρήθηκε στα ίδια επίπεδα σε σχέση με το προηγούμενο έτος (**Πίνακας 6**)

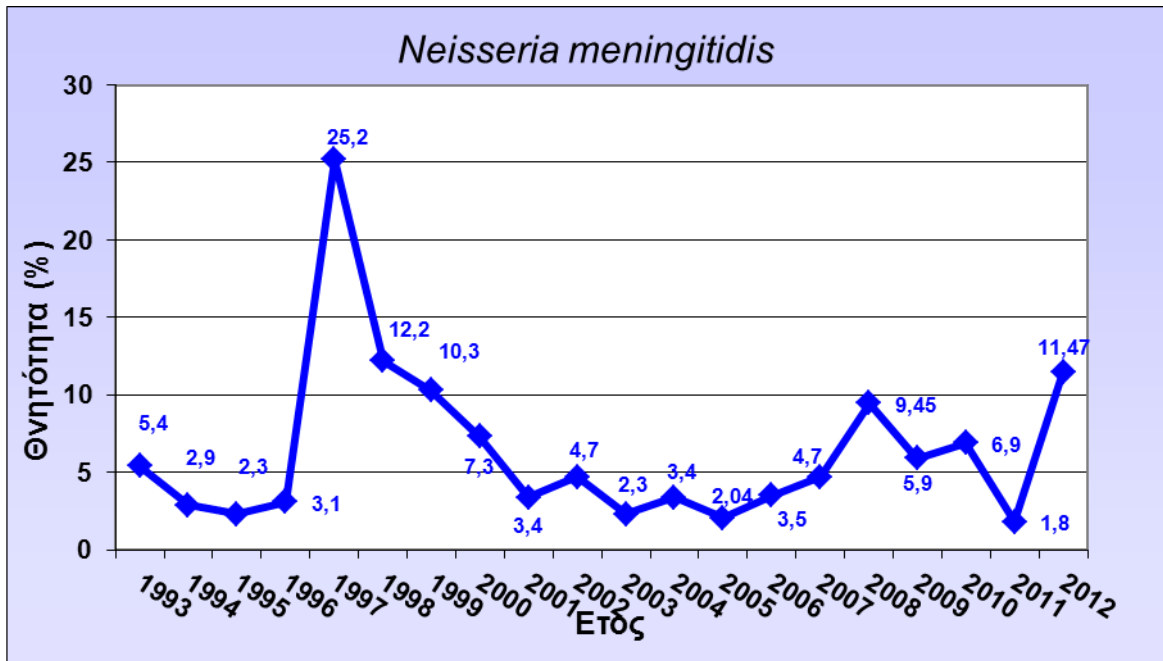
Πίνακας 6 : Αριθμός δηλωθέντων θανάτων μηνιγγίτιδας ανά μικροοργανισμό κατά το χρονικό διάστημα Ιανουάριος – Δεκέμβριος 2012

Μικροοργανισμοί	Ιανουάριος – Δεκέμβριος 2012				
	Αριθμός κρουσμάτων	Αριθμός θανάτων	%	Θνητότητα 2012	Θνητότητα 2011
Μηνιγγιτιδόκοκκος	61	7	43,75	11,47	1,8
Πνευμονιόκοκκος	46	3	18,75	6,52	6,5
Αιμόφιλος b	3	0	0	0	0
Μικροβιακή (άλλο βακτήριο)	168	6	37,5	3,57	0,64
Ιός	294	0	0	0	0
Αγνώστου αιτιολογίας	46	0	0	0	2,8
Σύνολο	618	16	100	2,58	1,25

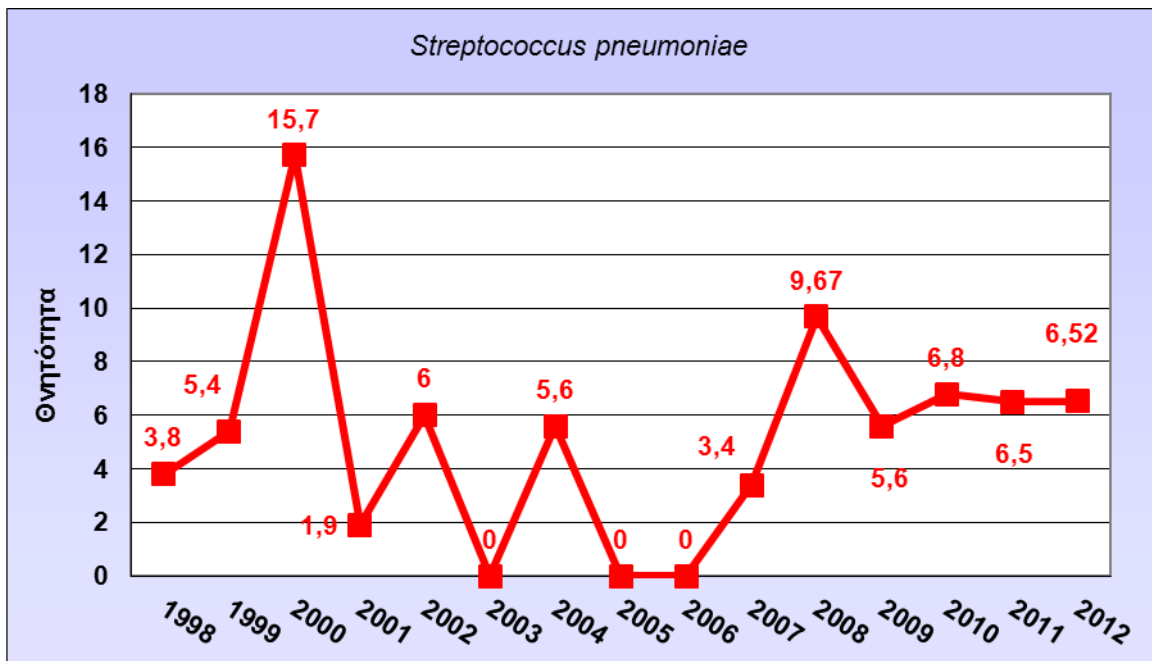
Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, 7 θανατηφόρα κρούσματα προκλήθηκαν από μηνιγγιτιδόκοκκο, 3 από πνευμονιόκοκκο, ενώ υπόλοιποι 6 θάνατοι προκλήθηκαν από μηνιγγίτιδα άλλης βακτηριακής αιτιολογίας (*Klebsiella pneumoniae* (3 θάνατοι), *Citrobacter* (1 θάνατος)). Ανάλυση των παραπάνω 4 θανάτων σε σχέση με την ηλικία παρατηρήθηκε ότι τα άτομα που κατέληξαν ήταν ηλικίας >50 ετών. Τέλος, 2 θάνατοι προκλήθηκαν από μηνιγγίτιδα αγνώστου αιτιολογίας καθότι η καλλιέργεια ήταν αρνητική και στα 2 δείγματα και δεν κατέστη δυνατή η αποστολή βιολογικού δείγματος από τα περιφερειακά νοσοκομεία στο Κέντρο Αναφοράς για περαιτέρω ταυτοποίηση του μικροοργανισμού).

Η θνητότητα από **μηνιγγιτιδόκοκκο** και **πνευμονιόκοκκο** των τελευταίων 19 ετών φαίνεται στα **διαγράμματα 6α και 6β**.

Διάγραμμα 6α. Θνητότητα μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου (1993-2012)



Διάγραμμα 6β. Θνητότητα πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας (1998-2012)



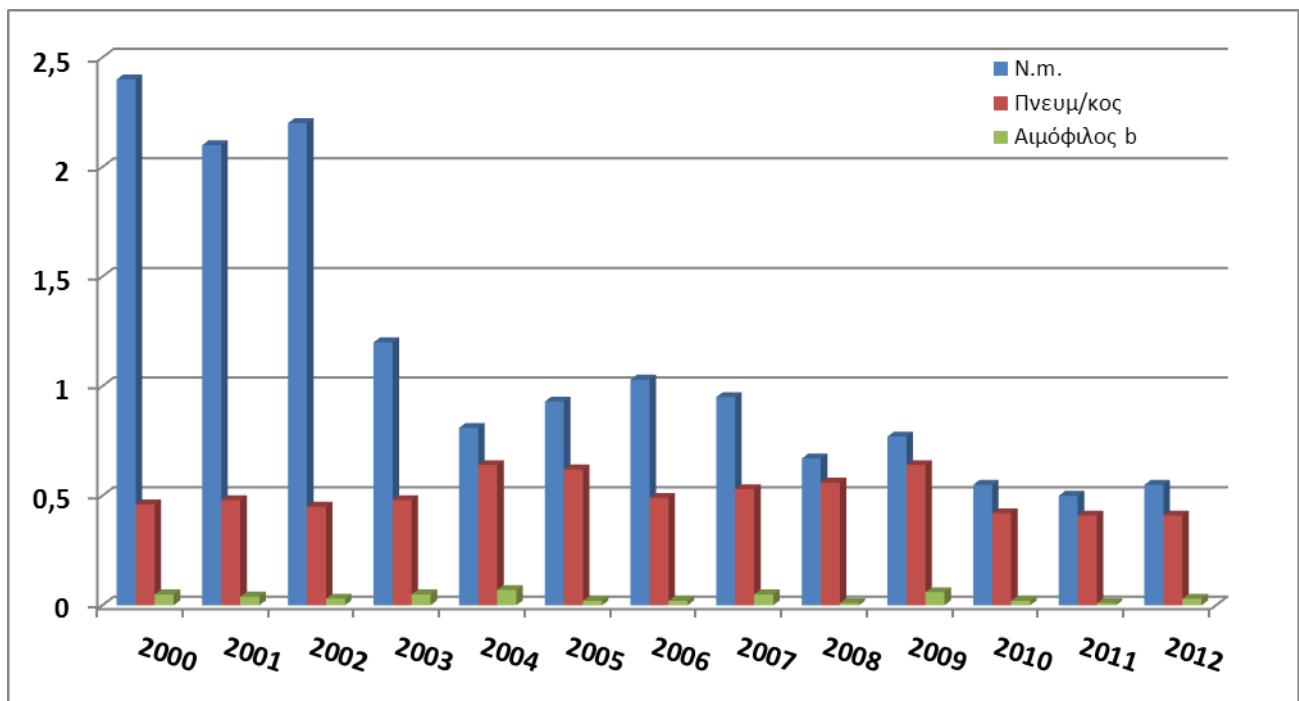
Διαχρονική πορεία δηλωθέντων κρουσμάτων μηνιγγίτιδας

Από τα επιδημιολογικά δεδομένα, φαίνεται ότι ο αριθμός των κρουσμάτων – ιδιαίτερα αυτά που προκαλούνται από *Neisseria meningitidis* – ενώ παρέμεινε σταθερός κατά την διετία 2001-2002, παρουσίασε μείωση κατά τα έτη 2003-2004, ενώ παρατηρήθηκε μικρή αύξηση των κρουσμάτων κατά την διετία 2005-2006. Κατά την διετία 2007-2009 παρατηρείται μείωση των κρουσμάτων αυτών με περαιτέρω μείωση κατά το χρονικό διάστημα 2010-2012.

Αντίθετα, παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού κρουσμάτων μηνιγγίτιδας από πνευμονιόκοκκο κατά το χρονικό διάστημα 2000-2005 (51-69 κρούσματα), παρουσιάζοντας μικρή μείωση το έτος 2006 (55 κρούσματα) ενώ κατά την διετία 2007-2009 παρουσίασε μικρή αύξηση. Κατά το 2010, παρατηρήθηκε μείωση των κρουσμάτων (44 κρούσματα) με ελαφριά αύξηση το έτος 2011 (46 κρούσματα). Κατά το έτος 2012 ο αριθμός των κρουσμάτων παρέμεινε σταθερός. (πίνακας 7, διάγραμμα 7).

Η επίπτωση/100 000 του αιμοφίλου της ινφλουένζας ομάδας b παραμένει σταθερά χαμηλή και για το 2012, με εξαίρεση το έτος 2009 όπου η επίπτωση ανήλθε σε 0,06 ανά 100 000.

Διάγραμμα 7. Δηλωθέντα κρούσματα βακτηριακής μηνιγγίτιδας ανά αιτία (2000-2012)



Πίνακας 7. Δηλωθέντα κρούσματα μηνιγγίτιδας 1993- 2012

ΕΤΟΣ	Συνολο κρουσμάτων (επίπτωση)	N. meningitidis (επίπτωση)	Πνευμ/κος (επίπτωση)	Αιμοφιλος (επίπτωση)	Βακτηριακές μηνιγγίτιδες (άλλες)	Ιογενείς
1993	55 (0,5)	55 (0,5)	NA	NA	NA	NA
1994	70 (0,63)	70 (0,63)	NA	NA	NA	NA
1995	138 (1,25)	86 (0,78)	NA	2 (0,01)	34	16
1996	133 (1,21)	98 (0,89)	NA	0	20	15
1997	225 (2,0)	147 (1,34)	8 (0,07)	1 (0,009)	1	68
1998	393 (3,58)	262 (2,39)	26 (0,23)	5 (0,04)	38	62
1999	640 (5,8)	215 (1,9)	37 (0,33)	2 (0,01)	124	262
2000	855 (7,8)	261 (2,4)	51 (0,46)	6 (0,05)	131	406
2001	1429 (13,0)	234 (2,1)	53 (0,48)	5 (0,04)	125	984
2002	702 (6,4)	233 (2,2)	50 (0,45)	4 (0,03)	80	276
2003	518 (4,7)	131 (1,2)	53 (0,48)	6 (0,05)	102	188
2004	544 (4,9)	89 (0,81)	71 (0,64)	8 (0,07)	146	199
2005	641 (5,8)	98 (0,93)	69 (0,62)	3 (0,02)	185	232
2006	600 (5,4)	114 (1,03)	55 (0,49)	3 (0,02)	141	233
2007	1170 (10,54)	106 (0,95)	59 (0,53)	6 (0,05)	168	799
2008	715 (6,44)	74 (0,67)	62 (0,56)	1 (0,01)	166	356
2009	647 (5,83)	85 (0,77)	71 (0,64)	7 (0,06)	138	280
2010	531 (5,05)	58 (0,55)	44 (0,42)	2 (0,02)	134	216
2011	477 (4,03)	55 (0,50)	46 (0,41)	1 (0,01)	156	183
2012	618 (5,57)	61 (0,55)	46 (0,41)	3 (0,03)	168	294

Μηνιγγίτιδα από *Streptococcus pneumoniae*

Η αύξηση των κρουσμάτων μηνιγγίτιδας από *Streptococcus pneumoniae* τα τελευταία χρόνια, οδήγησε στην ανάγκη της ανάλυσης των κρουσμάτων ανά ηλικία. Από τα 799 κρούσματα μηνιγγίτιδας από πνευμονιόκοκκο, που καταγράφησαν τα 9 τελευταία χρόνια, τα 388 (~50 %) αφορούσαν 2 ηλικιακές ομάδες: την ηλικιακή ομάδα **<1-4 χρόνων** σε ποσοστό 24,1% (193/799) και την ηλικιακή ομάδα άνω των **60 χρόνων** (195/799, 24,4%). Τα υπόλοιπα 411 κρούσματα, κατανεμήθηκαν στις ηλικιακές ομάδες 5-59 (**Πίνακας 8**). Ο δε αριθμός των κρουσμάτων ανά έτος και η επίπτωση ανά ηλικιακή ομάδα φαίνονται στον **πίνακα 9** ενώ συνολικά τα κρούσματα και η επίπτωση στο **διάγραμμα 8**.

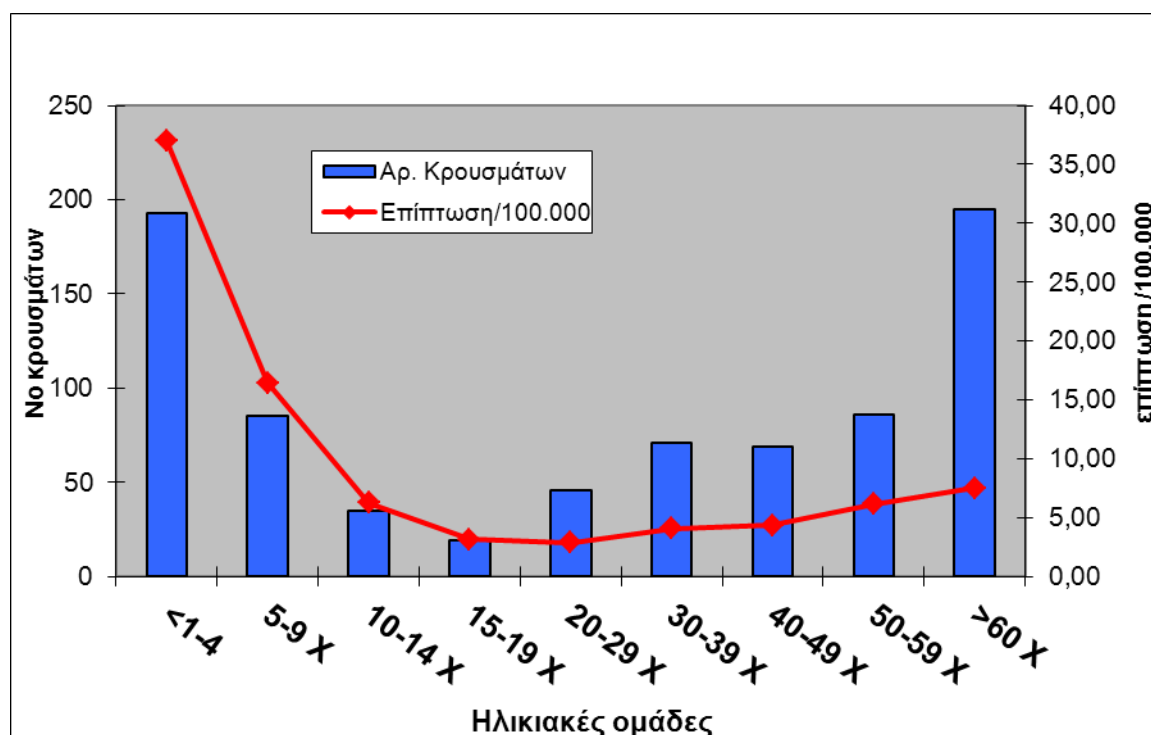
Πίνακας 8. Αριθμός κρουσμάτων πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας ανά ηλικία (2003-2012)

Ηλικιακή ομάδα	Νο κρουσμάτων	Ποσοστό (%)	Επίπτωση /100 000
<1-4	193	24,1	36,35
5-9	85	10,63	15,69
10-14	35	4,4	5,79
15-19	19	3,0	2,47
20-29	46	5,7	2,57
30-39	71	8,9	4,46
40-49	69	8,6	4,24
50-59	86	10,76	15,44
>60	195	24,4	7,57
ΣΥΝΟΛΟ	799	100	

Πίνακας 9. Επίπτωση πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας σε σχέση με την ηλικία (2006-2012).

ΕΤΟΣ /	No κρουσμάτων (επίπτωση ανά 100,000 κατ)									
Ηλικιακή ομάδα	<1-4	5-9	10-14	15-19	20-29	30-39	40-49	50-59	>60	Σύνολο
2006	14 (2.69)	7 (1.16)	2 (0.27)	2 (0.24)	3 (0.17)	9 (0.66)	3 (0.21)	6 (0.045)	8 (0.33)	55 (0.5)
2007	16 (3.16)	12 (2.27)	5 (0.83)	2 (0.27)	4 (0.25)	2 (0.13)	2 (0.14)	7 (0.57)	9 (0.38)	59 (0.53)
2008	11 (2.11)	6 (1.16)	2 (0.36)	2 (0.33)	4 (0.25)	5 (0.29)	8 (0.51)	6 (0.43)	17 (0.66)	61 (0.55)
2009	8 1,54	9 1,74	4 0,72	2 0,33	3 0,37	7 0,80	5 0,64	10 1,43	23 0,89	71 (0,64)
2010	10 (1.98)	5 (0.95)	0	0	1 (0.12)	3 (0.38)	0	4 (0.63)	9 (0.38)	44 (0.42)
2011	9 (1,73)	3 (0,58)	4 (0,72)	1 (0,17)	2 (0,13)	7 (0,40)	4 (0,25)	6 (0,43)	10 (0,39)	46 (0,41)
2012	9 (1,73)	2 (0,39)	0 (0)	1 (0,17)	5 (0,31)	2 (0,11)	10 (0,63)	3 (0,22)	14 (0,54)	46 (0,41)

Διάγραμμα 8. Αριθμός κρουσμάτων και επίπτωση πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας ανά ηλικία (2003-2012)



Για το έτος 2012, από τα συνολικά 46 κρούσματα μηνιγγίτιδας από *S. pneumoniae*, τα περισσότερα (14/46, 30,4%) ανήκαν στην ηλικιακή ομάδα ασθενών >60 ετών. Ακολουθεί για πρώτη φορά ότι η ηλικιακή ομάδα ασθενών 40-49 ετών (10/46, 21,8%) με επόμενη την ηλικιακή ομάδα <1-4 ετών (9/46, 19,6%), με επίπτωση 0,54, 0,63 και 1,73 ανά 100 000 κατ αντίστοιχα

Β. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΑ ΚΡΟΥΣΜΑΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ

Στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας, εξετάστηκαν **συνολικά 718 δείγματα** κατά την διάρκεια του έτους 2012. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν με συμβατικές και μοριακές τεχνικές 718 δείγματα βιολογικών υλικών (ΕΝΥ, αίμα και πλευριτικά υγρά κλπ). Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν 18 μηνιγγιτιδοκοκκικά στελέχη, 10 στελέχη *S. pneumoniae*, 4 στελέχη *H. Influenzae* και ένα στέλεχος στρεπτοκόκκου. Όλα τα παραπάνω προήλθαν από **546 ασθενείς (πίνακας 10)**.

Πίνακας 10. Εξετασθέντα δείγματα ανά μικροοργανισμό και προέλευση

Μικροοργανισμός	Νο Ασθενών	ΑΙΜΑ	ΕΝΥ	Άλλα βιολογικά υγρά	Στελέχη	ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
<i>N. meningitidis</i>	55	29	43		18	90
<i>S. pneumoniae</i>	50	14	20	Πλευριτικό υγρό=20 Άλλο =3	10	67
<i>H. Influenzae b</i>	3	2	2			4
Βακτηριακές μηνιγγ	143	61	117	πλευριτικό=12 άλλο=1	4 Hinf 1 strept	196
Ιογενείς μηνιγγ	108	34	102	Αρθρικό=1		137
Αγνώστου αιτιολογίας	67	18	37	Πλευριτικό= 15, αρθρικό= 6		76
Εμπύρετα	123	69	69	πλευριτικό=10		148
ΣΥΝΟΛΟ	549	227	390	68	33	718



Neisseria meningitidis

Από τα 718 δείγματα βιολογικών υλικών, επιβεβαιώθηκαν **ως θετικά για *N. meningitidis* (με PCR) τα 90 δείγματα** προερχόμενα από **55 ασθενείς** με ύποπτη, πιθανή ή βεβαιωμένη κλινική εικόνα μηνιγγιτιδοκοκκικής μηνιγγίτιδας.

1. Φαινοτυπικά Χαρακτηριστικά-Οροομάδες

Από τα 18 μηνιγγιτιδοκοκκικά στελέχη τα οποία εστάλησαν, στα 13 υπήρξε η δυνατότητα αποστολής και βιολογικών υλικών -πριν την απομόνωση των στελεχών- και τα οποία επιβεβαίωσαν την διάγνωση της νόσου.

Ως προς την οροομάδα, ταυτοποιήθηκαν **53 κρούσματα**. Στην οροομάδα **B** ανήκε ποσοστό 86.8 % (46/53), στην οροομάδα **A** ανήκε 1 (1/53, 1.8%), των περιπτώσεων ενώ στις οροομάδες **W-135** και **Y** τυποποιήθηκαν 1/53, 1.8%

και 3/53, 5,66% αντίστοιχα. Κανένα από τα στελέχη/ βιολογικά υλικά δεν τυποποιήθηκε ως προς την **οροομάδα C** ενώ ένα μικρό ποσοστό 3,7% (2/53) ήταν μη τυποποιήσιμο ως προς τις οροομάδες (non-groupable, NG) (**Πίνακας 11**).

Πίνακας 11 : Ορολογική τυποποίηση μηνιγγιτιδοκόκκων κατά το έτος 2012
(με συμβατικές και μοριακές τεχνικές)

Οροομάδες	Ιανουάριος – Δεκέμβριος 2012	
	Αριθμός στελεχών/ βιολ. υλικών	%
A	1	1,8
B	46	86,8
C	0	0
W-135	1	1,8
Y	3	5,6
N.G.	2	3,7
Σύνολο	53	100

Παρατήρηση: 8 επιπλέον δείγματα επιβεβαιώθηκαν με καλλιέργεια σε περιφερειακά νοσοκομεία και δεν εστάλησαν στο ΕΚΑΜ για περαιτέρω τυποποίηση (οροομάδα, ορότυπος, υπότυπος).

Πίνακας 12. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά *N. meningitidis* που απομονώθηκαν στην Ελλάδα (1993 – 2012).

ΕΤΟΣ	Στελέχη /βιολ. (No)	Επικρατούντες φαινοτυπικοί χαρακτήρες- ΟΡΟΜΑΔΕΣ									
		B		C		A	W-135 και Y	NG			
		No	(%)	No	(%)	No	(%)	No	(%)		
1993	29	14	(48,3)	11	(37,3)	0	0	5	(17,2)		
1994	30	16	(53,3)	13	(43,4)	0	0	1	(3,4)		
1995	32	16	(50)	15	(46,9)	1	(3,1)	0	0		
1996	88	25	(28,4)	48	(54,5)	0	6	(6,8)	7	(7,9)	
1997	72	25	(34,7)	46	(63,9)	1	(1,4)	0	0		
1998	109	49	(44,9)	46	(42,2)	5	(4,6)	3	(2,8)	6	(5,5)
1999	127	70	(55,1)	29	(22,8)	6	(4,7)	3	(2,3)	19	(15,0)
2000	161	80	(49,6)	20	(12,4)	9	(5,6)	15	(9,3)	37	(23,0)
2001	158	69	(43,7)	14	(8,9)	31	(19,6)	11	(7,0)	33	(20,9)
2002	174	75	(43,1)	11	(6,3)	19	(10,9)	20	(11,5)	49	(28,1)
2003	101	53	(52,5)	2	(2,0)	17	(16,8)	6	(5,9)	23	(22,8)
2004	63	43	(68,2)	0	(0)	3	(4,8)	0	(0)	17	(27,0)
2005	80	54	(67,5)	3	(3,8)	4	(5,0)	2	(2,5)	17	(21,2)
2006	93	71	(76,34)	6	(6,45)	1	(1,07)	3	(3,22)	12	(12,9)
2007	86	66	(76,8)	7	(8,1)	0	1	(1,1)	12	(14,0)	
2008	64	54	(84,4)	5	(7,8)	3	(4,7)	0	2	(3,1)	
2009	71	46	(64,8)	2	(2,08)	0	2	(2,8)	21	(29,6)	
2010	46	40	(87,0)	1	(2,2)	0	0	5	(10,8)		
2011	39	35	(89,7)	2	(5,1)	1	(2,6)	0	1	(2,6)	
2012	53	46	(86,8)	0	1	(1,8)	4	(7,5)	2	(3,7)	

Θνητότητα ανά οροομάδα

Η **θνητότητα** του μηνιγγιτιδοκόκκου ανήλθε στο 11,47 σημαντικά αυξημένος σε σχέση με το 2011 όπου η θνητότητα ανήλθε στο 1,8%. Από τα 7 συνολικά θανατηφόρα κρούσματα 4 εστάλησαν στο Κέντρο Αναφοράς για περαιτέρω τυποποίηση/ ταυτοποίηση ως προς την οροομάδα. (πίνακας 13).

Πίνακας 13. : Αριθμός θανάτων και θνητότητα ανά οροομάδα *N. meningitidis* (επί των βεβαιωμένων).

Οροομάδες	Ιανουάριος – Δεκέμβριος 2012			
	Αριθμός ασθενών	Αριθμός θανάτων	%	Θνητότητα
A	1	0		
B	46	3	75	6,52
C	0	0		
W-135	1	0		
Y	3	1	25	33,3
N.GROUP	2	0		
Σύνολο	53	4		7,54

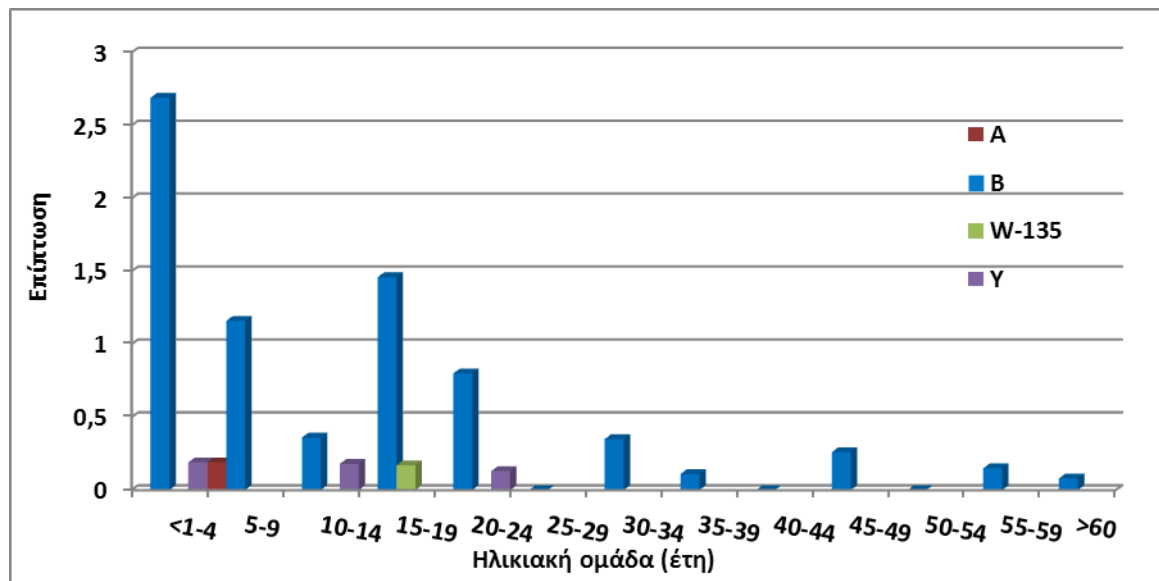
Στον **Πίνακα 14** και στο **διάγραμμα 9**, απεικονίζεται η επίπτωση / 100.000 κατοίκους των οροομάδων του μηνιγγιτιδοκόκκου ανά ηλικιακή ομάδα.

Πίνακας 14: Κατανομή σε οροομάδες (SG) του μηνιγγιτιδοκόκκου και επίπτωση (rate) ανά 100.000 κατοίκους κατά πενταετείς ηλικιακές ομάδες (Ιανουάριος – Δεκέμβριος 2012)

ΗΛΙΚΙΑ	ΠΛΗΘ.	A	rate*	B	rate	C	rate	W	rate	Y	rate	NG	rate
0-4	521113			14	2,69					1	0,19	1	0,19
5-9	516872	1	0,19	6	1,16							1	0,19
10-14	557841			2	0,36					1	0,18		
15-19	603948			9	1,46			1	0,17				
20-24	749359			6	0,8					1	0,13		
25-29	845178			0									
30-34	865538			3	0,35								
35-39	878355			1	0,11								
40-44	797489			0									
45-49	782173			2	0,26								
50-54	715016			0									
55-59	679735			1	0,15								
>60	2591312			2	0,08								
ΣΥΝΟΛΟ	11103929	1	0,01	46	0,41	0	0	1	0,01	3	0,03	2	0,02

*rate: επίπτωση

Διάγραμμα 9. Επίπτωση ανά ηλικία και ορομάδα (ανά 100,000 κατ) της *N. meningitidis* κατά το έτος 2012.



2. Φαινοτυπικά Χαρακτηριστικά-Ορότυποι/Υπότυποι

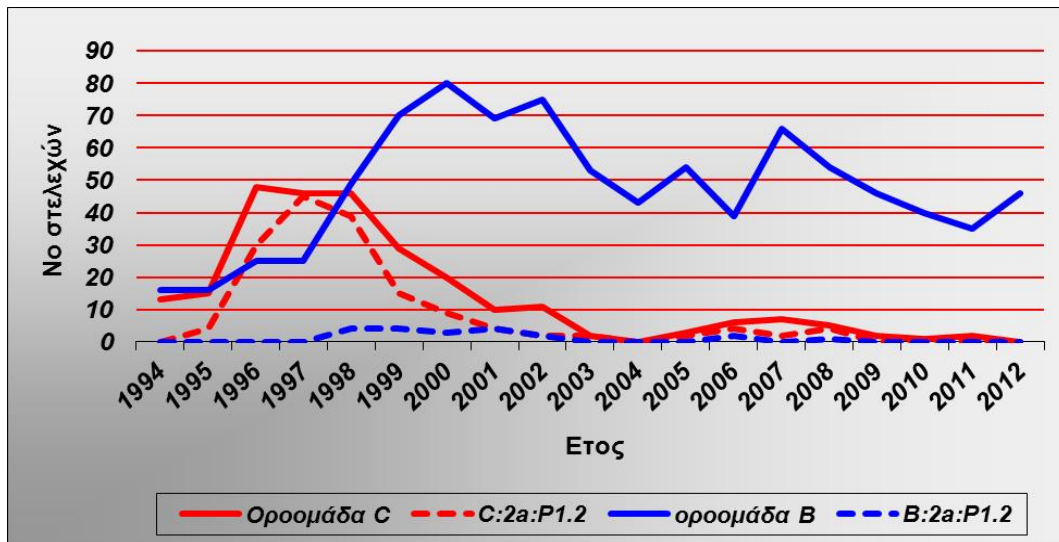
Από τα 18 στελέχη τα οποία εστάλησαν στο ΕΚΑΜ το έτος 2012, έγινε φαινοτυπική διερεύνηση για την «παρουσία» επιδημικού κλώνου.

Η πλειοψηφία των στελεχών της ορομάδας Β ανήκε στους φαινότυπους B:4:P1.4/NT (10/18, 55,6) και B:15:P1.7/P1.9 (3/18, 16,7%) ενώ κανένα από τα στελέχη της ορομάδας Β με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά «επιδημικού κλώνου» (δηλ Β ή C:2a:P1.2 δεν απομονώθηκε κατά το έτος 2012 (**πίνακας 15 Διάγραμμα 10**) Κανένα από τα στελέχη δεν ανήκε στην ορομάδα C ενώ τα 3 στελέχη ορομάδας Y είχαν τα ίδια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά.

Πίνακας 15. Επικρατέστερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των μηνιγγιτιδοκοκκικών στελεχών τα οποία απομονώθηκαν το έτος 2012

ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ (ΟΡΟΟΜΑΔΑ, ΟΡΟΤΥΠΟΣ/ΥΠΟΤΥΠΟΣ)	ΑΡ. ΣΤΕΛΕΧΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ (%)
B:4	10	55,6
B:15	3	16,7
Άλλοι ορότυποι/ορομάδες	5	27,7
ΣΥΝΟΛΟ	18	100

Διάγραμμα 10. Παρακολούθηση του επιδημικού κλώνου στην Ελλάδα (1993-2012).

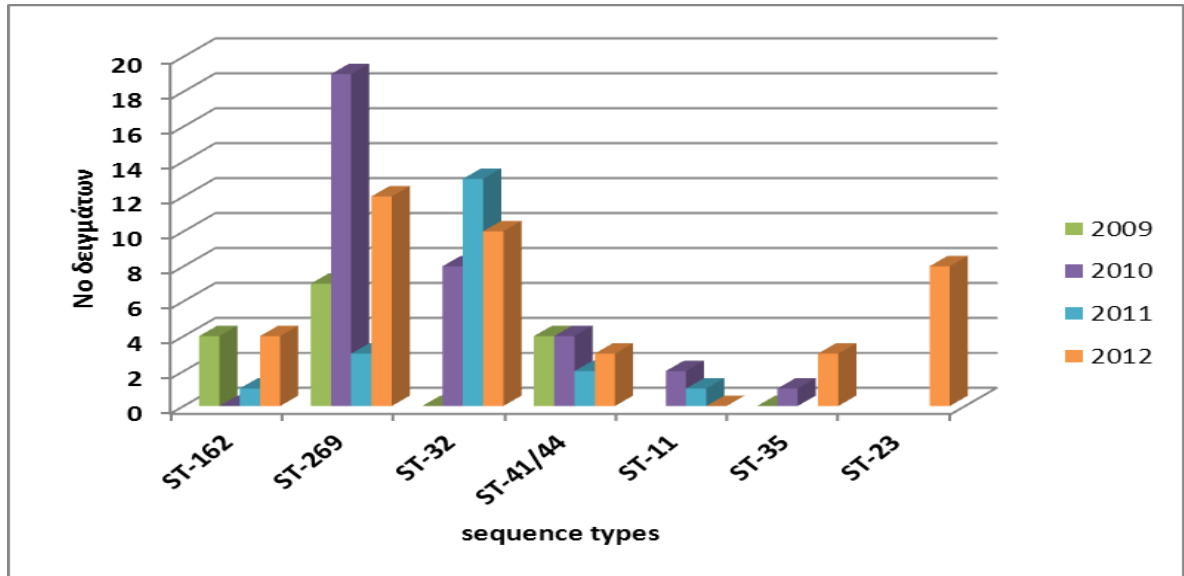


3. Γονοτυπικά χαρακτηριστικά

3.1. Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων (Multilocus Sequence Typing – MLST).

Η γονιδιακή ανάλυση με την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής του προσδιορισμού της αλληλουχίας των βάσεων (Multilocus Sequence Typing -MLST) η οποία εφαρμόζεται στο ΕΚΑΜ από το 1999 έδειξε ότι τα στελέχη με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά «επιδημικού κλώνου» (οροτύπου 2a και υποτύπου P1.2, ή P1.5) ανεξάρτητα από οροομάδα, ανήκουν στον ίδιο κλώνο (Sequence type 11). Παρατηρήθηκε αύξηση των κρουσμάτων από τον κλώνο ST-269 cc (επικρατέστερος το 2010 αλλά μειωμένος το 2011) και του ST-32 cc (δεύτερος επικρατέστερος το 2010 και 2011). Για πρώτη φορά εμφανίστηκε ο κλώνος ST-23 cc, συνάρτηση της εμφάνισης στελεχών οροομάδας Y (Διάγραμμα 11).

Διάγραμμα 11. Επικρατέστεροι Sequence Types (ST) στην Ελλάδα (2009-2012)



1.2. Προσδιορισμός γονοτυπικών χαρακτηριστικών με την μέθοδο της αλληλούχισης του γονιδίου *porA*.

Σκοπός της μοριακής τεχνικής είναι διερεύνηση της γενετικής συγγένειας ανάμεσα στα στελέχη ή βιολογικά υλικά θετικά για *N. meningitidis* η οποία βασίζεται στον προσδιορισμό των αλληλουχιών των 3 μεταβλητών περιοχών του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *porA*. Βάση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, το αλλήλιο (allele) 19-1, 15-11 36 ($n=14$), επικρατεί στα στελέχη και τα βιολογικά υλικά θετικά για *N. meningitidis* οροομάδας B, ακολουθούμενο από το αλλήλιο 7, 16, 35 ($n=12$) για τις μεταβλητές περιοχές (VR) VR-1, VR- 2 και VR-3 αντίστοιχα. Το επικρατέστερο αλλήλιο των 3 δειγμάτων οροομάδας Y ήταν το 5-1, 10-1 36-2.

3.3. Εφαρμογή των μοριακών τεχνικών για την τυποποίηση της *Neisseria meningitidis* σε περιπτώσεις εμφάνισης δύο ή περισσότερων κρουσμάτων στον ίδιο χώρο (σχολεία, παιδικοί σταθμοί κλπ)

Το Κέντρο Αναφοράς, με την εφαρμογή των παρακάτω μοριακών τεχνικών, μπορεί να αναγνωρίσει και να τυποποιήσει -σε στελέχη ή βιολογικά υλικά από ασθενείς κοινού περιβάλλοντος - τον κλώνο ο οποίος είναι υπεύθυνος για την επιδημία ή την έξαρση των κρουσμάτων σε σχολεία, παιδικούς σταθμούς κλπ.

1. Τεχνική του πολλαπλασιασμού μεταβλητού μεγέθους επαναλαμβανόμενων περιοχών του γονιδιώματος για τον φυλογενετικό συσχετισμό των στελεχών -βιολογικών υλικών (Variable Tandem Repeat Analysis- **VNTR**).

2. Τεχνική του τυχαίου πολλαπλασιασμού του πολυμορφισμού του DNA έτσι ώστε να καταδεικνύει την ομοιότητα μεταξύ των στελεχών (Random Amplification of Polymorphic DNA-**RAPD**).
3. Η τεχνική του προσδιορισμού των γονοτυπικών χαρακτηριστικών με την μέθοδο της αλληλούχισης του γονιδίου *porA* (***porA* sequencing typing**) και του γονιδίου *fetA* (***fetA* sequencing typing**)

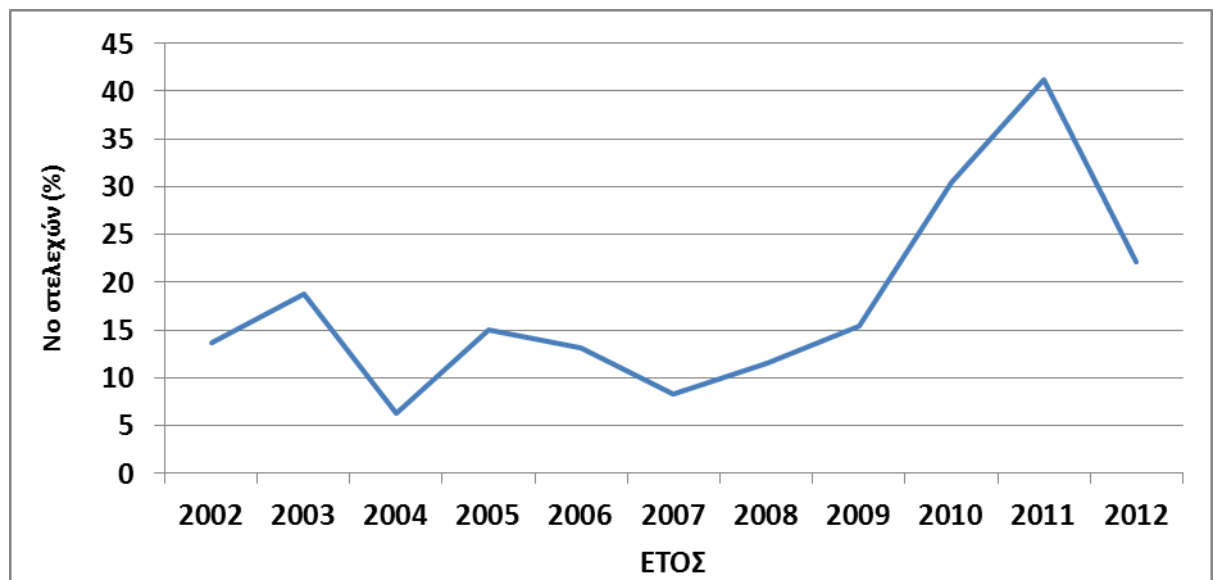
4. Ευαισθησία στα αντιβιοτικά.

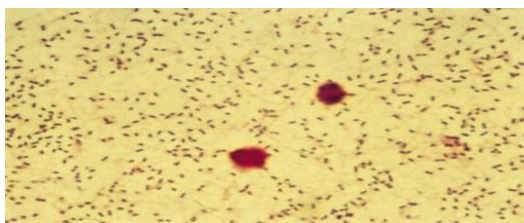
Η ευαισθησία των στελεχών στα αντιβιοτικά παρακολουθείται στενά μετά την εμφάνιση στελεχών ανθεκτικών στην πενικιλίνη και ριφαμπικίνη όπως έχουν ήδη εμφανιστεί στην Ισπανία τα τελευταία χρόνια.

Σε όλα τα στελέχη εφαρμόζεται η μέθοδος της Ελάχιστης Ανασταλτικής Πυκνότητας (MIC) σε 9 αντιβιοτικά πρώτης επιλογής και χημειοπροφύλαξης. Ανθεκτικό στελέχος στην πενικιλίνη ορίζεται κατά τους Vazquez και συν. όταν η τιμή της Ελάχιστης Ανασταλτικής Πυκνότητας είναι >1 mg/ml ενώ στελέχη με MIC ≥ 0.094 και < 1.0 mg/ml ορίζονται ως στελέχη μειωμένης ευαισθησίας στην πενικιλίνη.

Από τα αποτελέσματα προέκυψαν ότι 4 από τα 18 στελέχη (22,2) είχαν μειωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη (MIC ≥ 0.094 mg/ml), ποσοστό μειωμένο σε σχέση με τα προηγούμενα έτος (Διάγραμμα 12) Όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στα αντιβιοτικά : κεφακλόρη, κεφτριαξόνη, κiproφλοξακίνη, κεφοταξίμη, χλωραμφαινικόλη, τετρακυκλίνη, ριφαμπικίνη και ερυθρομυκίνη.

Διάγραμμα 12. Διαχρονική πορεία της μειωμένης ευαισθησίας στην πενικιλίνη των στελεχών *N. meningitidis* κατά το χρονικό διάστημα 2002-2012.





Streptococcus pneumoniae

Η αύξηση των κρούσμάτων μηνιγγίτιδας από *S. pneumoniae* οδήγησε το Κέντρο Αναφοράς αρχικά στην μοριακή ταυτοποίηση των κλινικών δειγμάτων με πιθανή εικόνα βακτηριακής μηνιγγίτιδας ως προς το βακτήριο αυτό. Από τα 70 κρούσματα **πνευμονιοκόκκου** (46 μηνιγγίτιδες και 24 πνευμονίες) απεστάλησαν στο Κέντρο Αναφοράς τα **26 κρούσματα μηνιγγίτιδας** τα οποία και επιβεβαιώθηκαν (με PCR) καθώς επίσης και τα **24 κρούσματα πνευμονίας**.

Περαιτέρω, έγινε η μοριακή τους τυποποίηση ως προς τους 9 συχνότερους ορότυπους, δεδομένου ότι και οι 9 ορότυποι περιλαμβάνονται στο 13δύναμο συζευγμένο εμβόλιο και είναι σημαντική η επιδημιολογική διερεύνηση και παρακολούθηση της τάσης των οροτύπων που επικρατούν μετά τον εμβολιασμό. Στον **πίνακα 16** φαίνονται οι επικρατέστεροι ορότυποι του πνευμονιοκόκκου κατά το έτος 2012.

Πίνακας 16. Επικρατέστεροι ορότυποι *S. pneumoniae* οι οποίοι προκαλούν Μηνιγγίτιδα/πνευμονία κατά το έτος 2012.

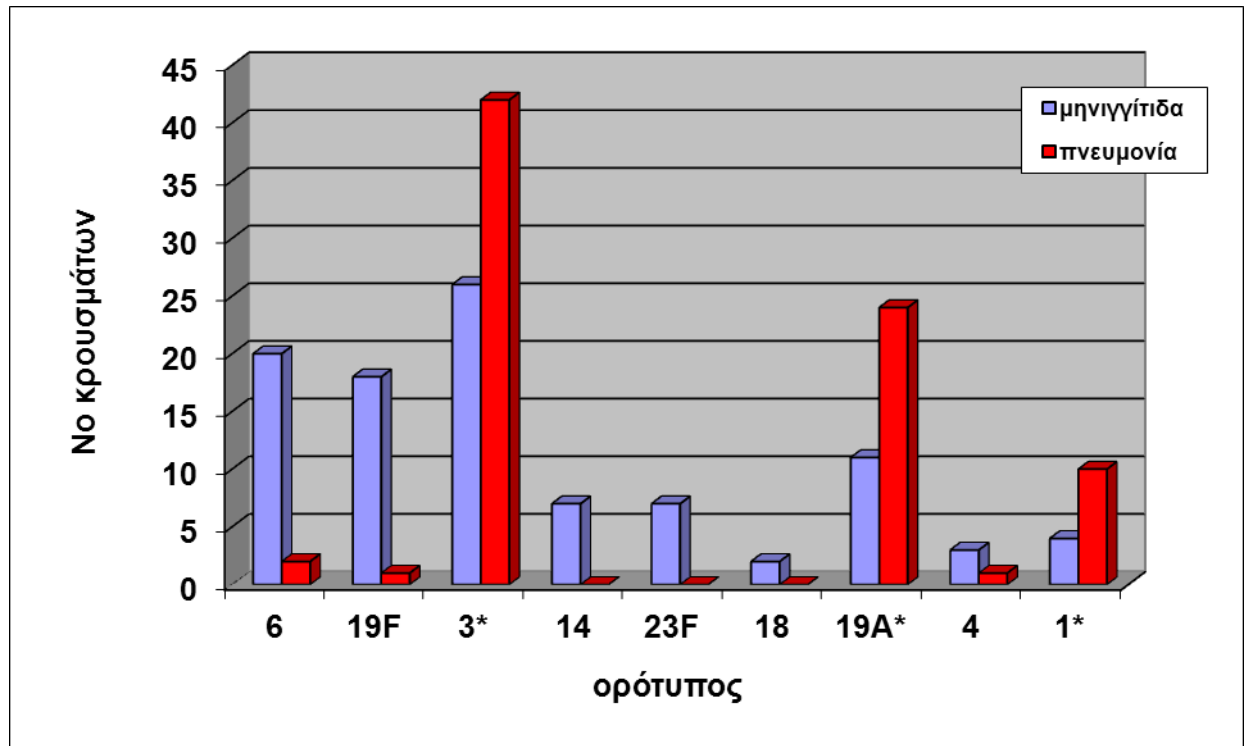
Ορότυπος	Μηνιγγίτιδες (%)	Πνευμονίες (%)	ΣΥΝΟΛΟ (%)
6			
19F			
3	6	23,0	16
14		1	4,16
23 F			
18			
19A	2	7,6	3
4		1	4,16
1			
Άλλοι ορότυποι	18	69,2	3
ΣΥΝΟΛΟ	26*	24	100

* Τα 20 δείγματα ήταν θετικά ως προς την καλλιέργεια αλλά δεν εστάλησαν στο ΕΚΑΜ για περαιτέρω τυποποίηση ως προς τον ορότυπο

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι οι επικρατέστεροι ορότυποι που προκαλούν μηνιγγίτιδα και πνευμονία επί του συνόλου για το έτος 2012 είναι ο ορότυπος **3** (31,4%), σε μικρότερο ποσοστό ακολουθεί ο **19A (7,14%)** (πίνακας 16).

Από τα συνολικά δεδομένα της δετίας (2006-2012) φαίνεται ότι μηνιγγίτιδα προκαλούν μία πληθώρα οροτύπων ενώ αντίθετα, στις πνευμονίες επικρατούν οι ορότυποι 3, 19A (**Διάγραμμα 13**).

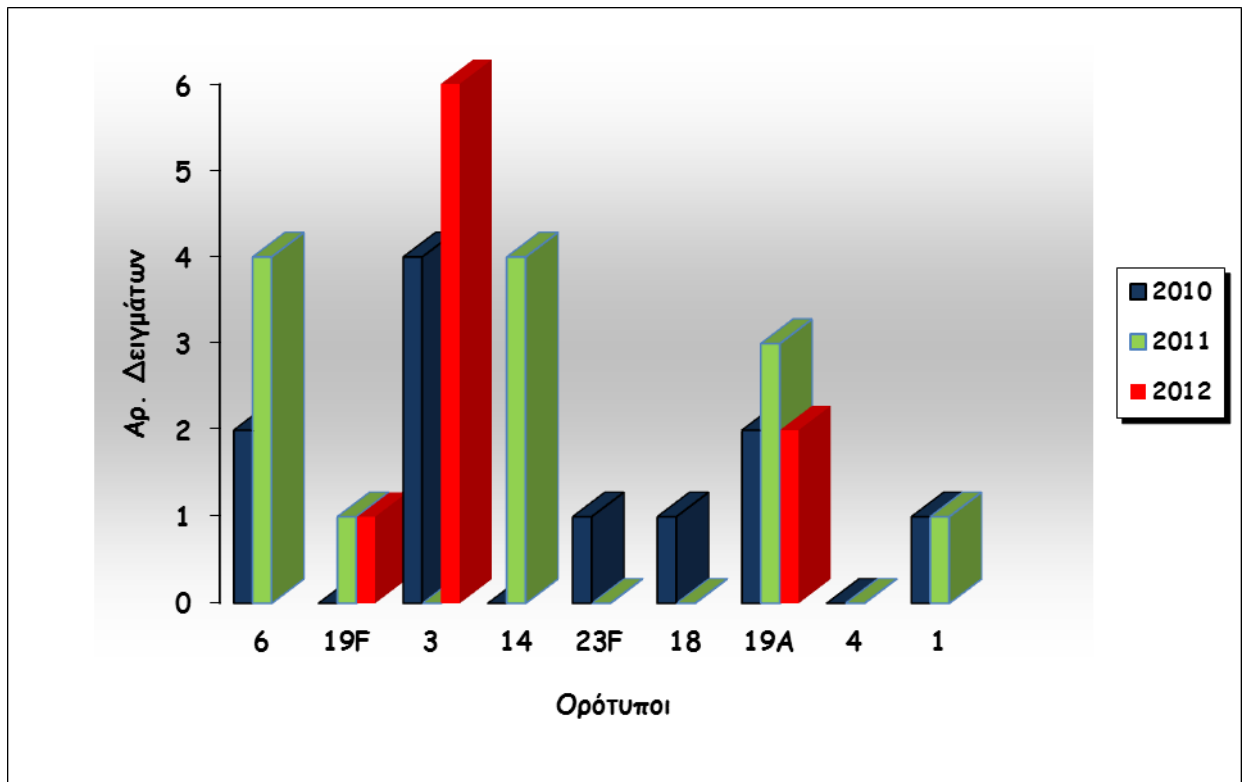
Διάγραμμα 13. Επικρατέστεροι ορότυποι *S. pneumoniae* οι οποίοι προκαλούν μηνιγγίτιδα και πνευμονία (2006-2012).



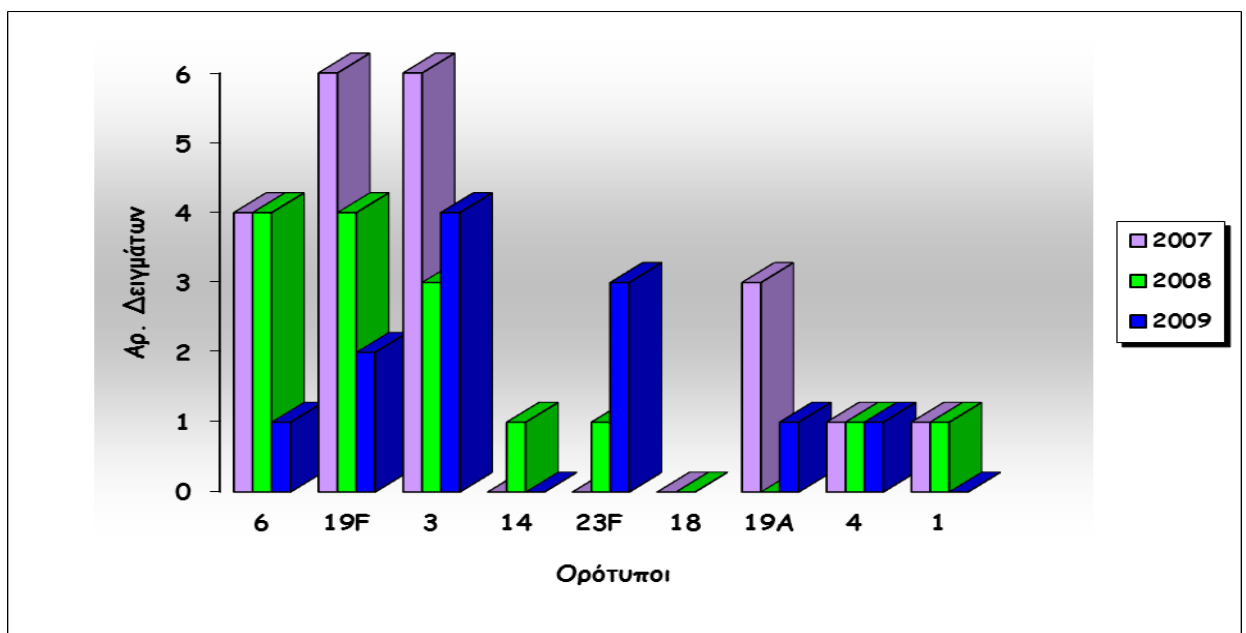
Μηνιγγίτιδα από *S. pneumoniae*

Αναλυτικότερα, για τις **μηνιγγίτιδες** που προκαλούνται από πνευμονιόκοκο, επί του συνόλου των 26 δειγμάτων, τυποποιήθηκαν ως προς τον ορότυπο ποσοστό 30,7% (8/26). Ο επικρατέστερος ορότυπος ήταν ο **3 σε ποσοστό 23%**. Οι τάσεις των οροτύπων του πνευμονιοκόκκου φαίνονται στα **διαγράμματα 14** και **15** για τις τριετίες 2010-2012 και 2007-2009 αντίστοιχα..

Διάγραμμα 14. Επικρατέστεροι ορότυποι *S. pneumoniae* οι οποίοι προκαλούν μηνιγγίτιδα στην Ελλάδα την τελευταία 3ετία (2010-2012).



Διάγραμμα 15. Επικρατέστεροι ορότυποι *S. pneumoniae* οι οποίοι προκαλούσαν μηνιγγίτιδα στην Ελλάδα κατά την τριετία 2007-2009.

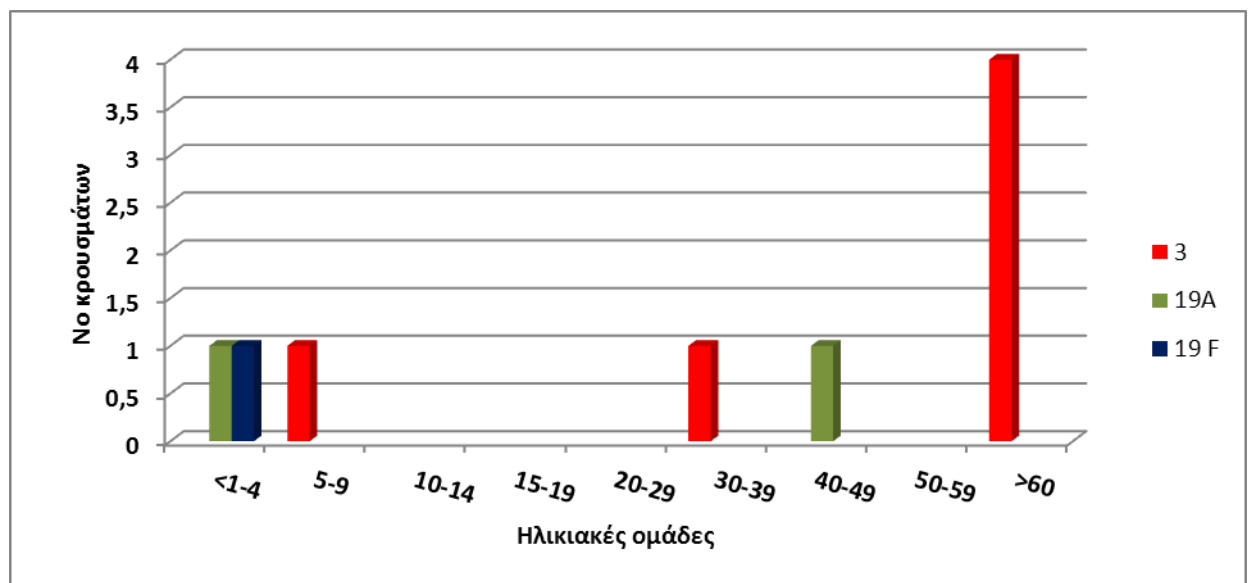


Ανάλυση των οροτύπων σε σχέση με την ηλικία για το έτος 2012 προκύπτει ότι ο **ορότυπος 3** επικρατεί στις ηλικιακές ομάδες 5-9 ετών, 30-39 ετών και σε ηλικίες μεγαλύτερη των 60 ετών (πίνακας 17, διάγραμμα 16).

Πίνακας 17. Ανάλυση των οροτύπων πνευμονιοκόκκου που προκαλούν μηνιγγίτιδα ανά ηλικία μηνιγγίτιδα (Ιανουάριος-Δεκέμβριος 2012).

ΟΜΑΔΑ (έτη) /Ορότυπος	1*	3*	4	6	14	18	19A*	19 F	23F	NT
<1-4							1	1		4
5-9		1								
10-14										
15-19										1
20-29										3
30-39		1								
40-49							1			4
50-59										1
>60		4								4
ΣΥΝΟΛΟ		6					2	1		17

Διάγραμμα 16: Ανάλυση των οροτύπων πνευμονιοκόκκου που προκαλούν μηνιγγίτιδα (επί των 9 θετικών για ορότυπο δειγμάτων) ανά ηλικία (Ιανουάριος- Δεκέμβριος 2012).

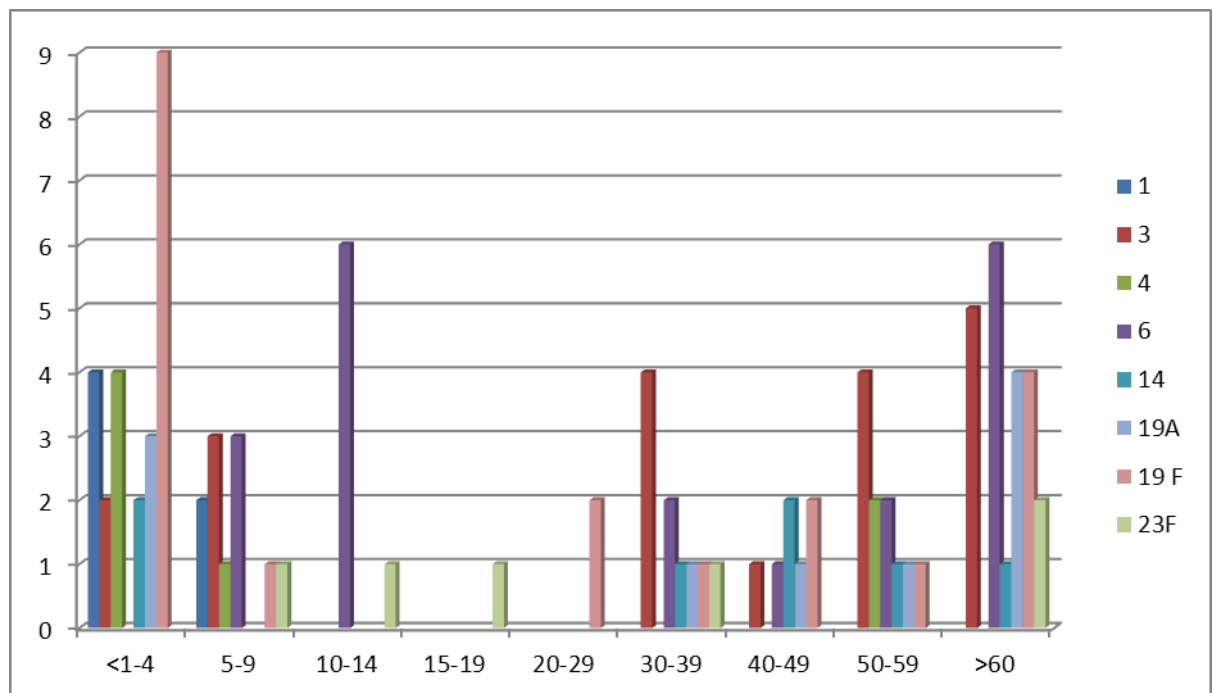


Ανάλυση των οροτύπων σε σχέση με την ηλικία για την εξαιτία 2006-2012, προκύπτει ότι οι **ορότυποι 6** (περισσότερο στους ενήλικες >30 ετών), **19F** (ηλικίες <1-9 και >20 ετών) και ο **3** (ως επί το πλείστον στους ενήλικες >30 ετών) είναι οι επικρατέστεροι (πίνακας 18, διάγραμμα 17).

Πίνακας 18: Ανάλυση των οροτύπων πνευμονιοκόκκου που προκαλούν μηνιγγίτιδα ανά ηλικία μηνιγγίτιδα (2006-2012).

ΟΜΑΔΑ (έτη) /Ορότυπος	1*	3*	4	6	14	18	19A*	19 F	23F	NT
<1-4	4	2		4	2	1	3	9		22
5-9	2	3	1	3				1	1	20
10-14				2					1	13
15-19									1	6
20-29								2		10
30-39		4		2	1		1	1	1	5
40-49		1		1	2		1	2		11
50-59		4	2	2	1		1	1		12
>60		5		6	1	1	4	4	2	25
ΣΥΝΟΛΟ	6	19	3	20	7	2	10	20	6	124

Διάγραμμα 17: Ανάλυση των οροτύπων πνευμονιοκόκκου που προκαλούν μηνιγγίτιδα ανά ηλικία (2006-2012).



Πνευμονία από *S. pneumoniae*

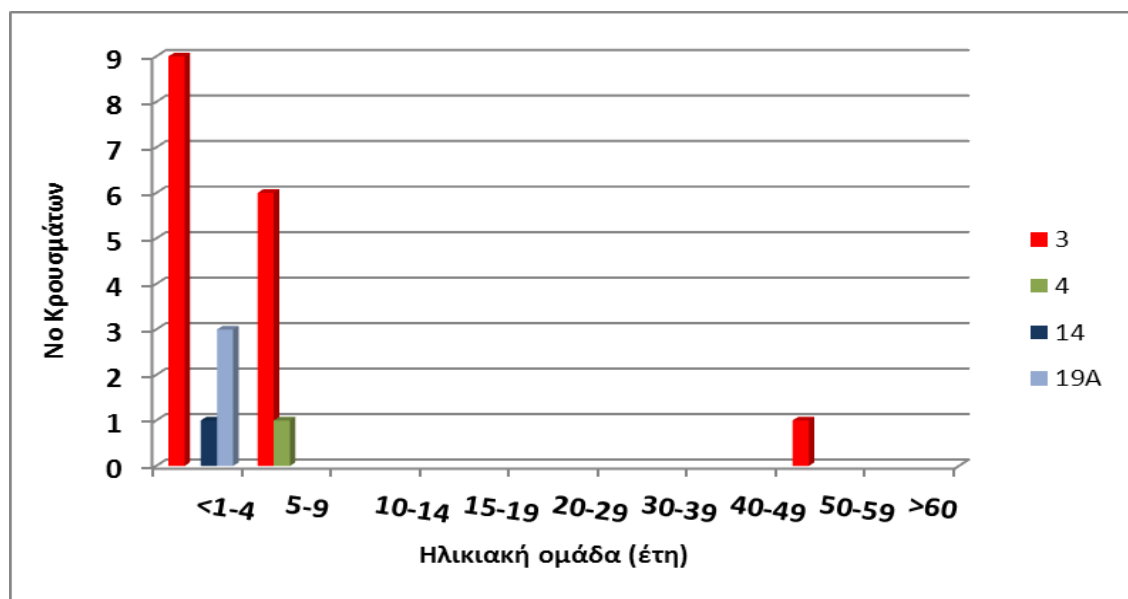
Όσον αφορά τις *πνευμονίες* επί του συνόλου των 24 δειγμάτων, ποσοστό 92% τυποποιήθηκε ως προς τον ορότυπο (22/24). Από αυτά, ποσοστό 70,8% (17/24) ανήκε στον ορότυπο 3, ακολουθούμενος από τους οροτύπους 19A (3/24, 12,5%) (Πίνακας 19).

Ανάλυση των κρουσμάτων ανά ηλικία, παρατηρείται ότι τα περισσότερα περιστατικά σημειώθηκαν στις ηλικίες <1-4 και 5-9 ετών. Ορότυπος 3 ήταν ο επικρατέστερος στις ηλικίες αυτές (πίνακας 19, διάγραμμα 18)

Πίνακας 19: Ανάλυση των οροτύπων πνευμονιοκόκκου που προκαλούν πνευμονία ανά ηλικία (Ιανουάριος-Δεκέμβριος 2012)

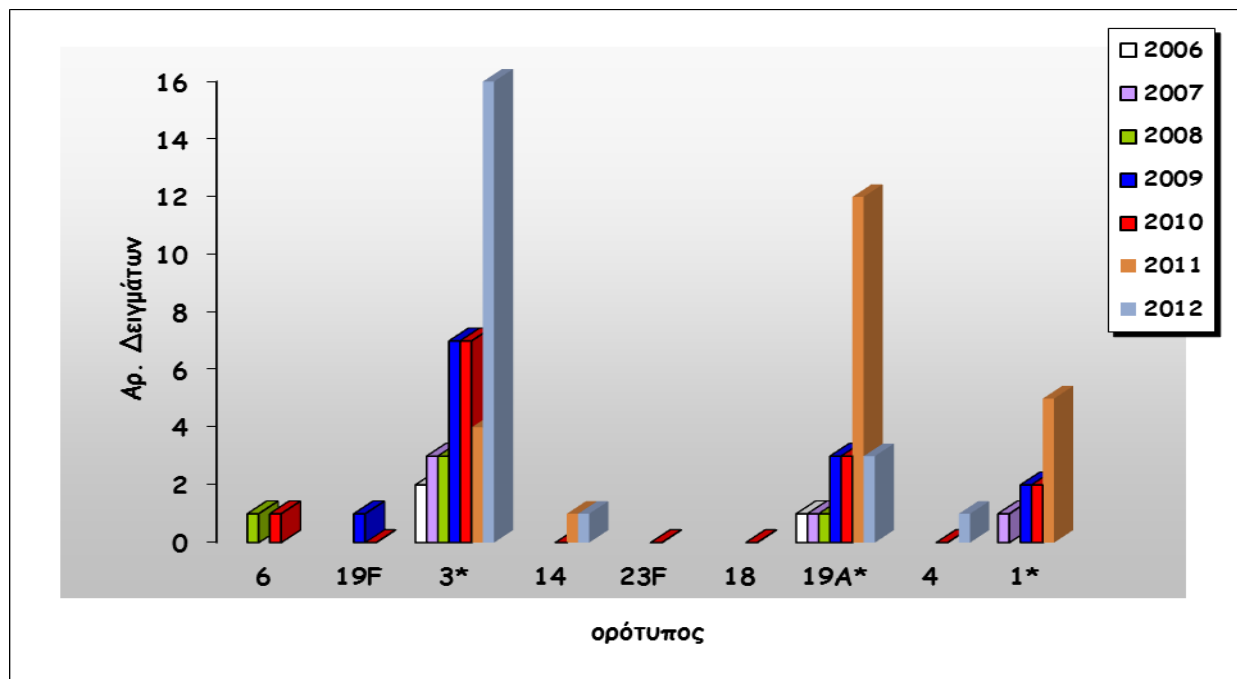
ΟΜΑΔΑ (έτη) /Ορότυπος	1	3	4	6	14	18	19A	19 F	23F	NT	ΣΥΝΟΛΟ
<1-4		9			1		3				13
5-9		6	1							1	8
10-14											
15-19										1	1
20-29											
30-39											
40-49											
50-59		2									2
>60											
ΣΥΝΟΛΟ		17	1		1		3			2	24

Διάγραμμα 18. Επικρατέστεροι ορότυποι *S. pneumoniae* οι οποίοι προκαλούν πνευμονία στην Ελλάδα (Ιανουάριος- Δεκέμβριος 2012)



Στο **διάγραμμα 19** φαίνεται η διαχρονική πορεία των κρουσμάτων πνευμονίας κατά την εξαετία 2006-2012 σε σχέση με τους ορότυπους

Διάγραμμα 19. Επικρατέστεροι ορότυποι *S. pneumoniae* οι οποίοι προκαλούν πνευμονία στην Ελλάδα την τελευταία δετία (2006-2012)

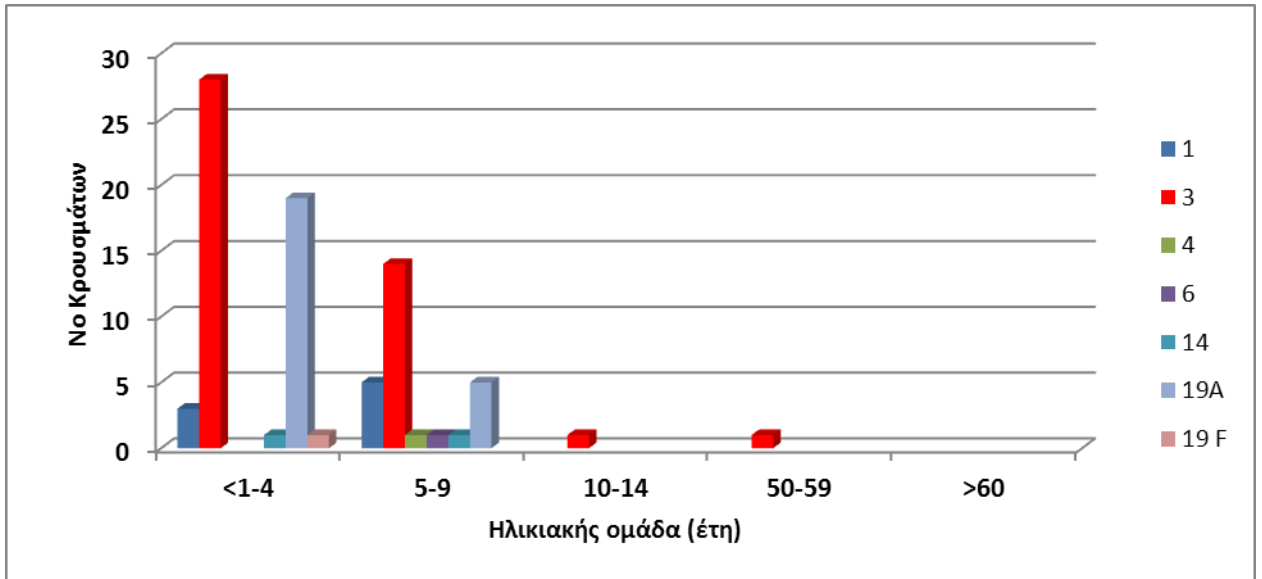


Στον **Πίνακα 20** και στο **διάγραμμα 20** αναλύονται οι ορότυποι ανά ηλικία κατά την δετία 2006-2012

Πίνακας 20: Ανάλυση των οροτύπων πνευμονιοκόκκου που προκαλούν πνευμονία ανά ηλικία (2006-2012)

ΟΜΑΔΑ (έτη) /Ορότυπος	1	3	4	6	14	18	19A	19 F	23F	NT
<1-4	3	28			1		19	1		17
5-9	5	14	1	1	1		5			13
10-14		1								
15-19										1
20-29										
30-39										
40-49										
50-59		1								
>60										
ΣΥΝΟΛΟ	8	44	1	1	2	0	24	1	0	31

Διάγραμμα 20. Ανάλυση των οροτύπων πνευμονιοκόκκου που προκαλούν πνευμονία (επί των θετικών για ορότυπο δειγμάτων) ανά ηλικία (2006-2012).



Βακτηριακές μηνιγγίτιδες άλλης αιτιολογίας

Το Κέντρο Αναφοράς στην προσπάθειά του να ταυτοποιήσει ένα μεγάλο αριθμό βακτηριακών μηνιγγιτίδων που προκαλούνται από άλλους μικροοργανισμούς, ανέπτυξε μία πολυπλεκτική PCR (multiplex PCR) για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes* *Staphylococcus aureus*. απευθείας σε βιολογικά υλικά (Xirogianni και συν. 2009).

Από τα 168 δηλωμένα κρούσματα βακτηριακής μηνιγγιτίδας άλλης αιτιολογίας, τα 130 (77,3%) εστάλησαν στο ΕΚΑΜ για περαιτέρω διερεύνηση. Με την εφαρμογή της παραπάνω τεχνικής τυποποιήθηκαν ως θετικά 61 από αυτά (46.9%), προερχόμενα από 61 ασθενείς. Από αυτά, τα 27 ταυτοποιήθηκαν ως *Streptococcus spp.*, (εκ των οποίων 2 τυποποιήθηκαν ως *S. agalactiae* και 1 ως *S. pyogenes*), 10 *Haemophilus influenzae (non b)*, 8 ως *Listeria monocytogenes* και 19 δείγματα ως *Staphylococcus aureus* (Πίνακας 22).

Τα περισσότερα κρούσματα που ταυτοποιήθηκαν ως *Streptococcus spp* σημειώθηκαν στην ηλικιακή ομάδα <1-4 (8 κρούσματα) με επίπτωση 1.54 ανά 100 000 αντίστοιχα.

Παρατηρήθηκε αύξηση των κρουσμάτων μηνιγγιτίδας από *Haemophilus influenzae* τα οποία ήταν μη τυποποίησιμα ως προς τον ορότυπο, (NT), (Πίνακας 22)

Πίνακας 22. Κατανομή των βακτηριακών μηνιγγιτίδων και επίπτωση ανά μικροοργανισμό και ηλικιακή ομάδα (2012)

Ηλικία	streptococcus spp		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Haemophilus spp</i>	
	NO Κρουσμ	Rate*	NO Κρουσμ	rate	NO Κρουσμ	rate	NO Κρουσμ	rate	NO Κρουσμ	rate
<1-4	8	1,54			3	0,58	3	0,58	4	0,77
5-9	4	0,77							6	1,16
10-14	3	0,54			1	0,18	3	0,54		
15-19										
20-29	2	0,13					2	0,13		
30-39										
40-49							1	0,06		
50-59	5	0,36			1	0,07	3	0,22		
>60	5	0,19			3	0,12	7	0,27		
ΣΥΝ	27	0,24	0		8	0,07	19	0,17	10	0,09

 Rate: επίπτωση ανά 100 000 κατ

Από τα 13 δείγματα πλευριτικού υγρού, οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί ήταν κατά κύριο λόγο οι:

- *Streptococcus spp* (n=6) : στις ηλικιακές ομάδες <1-4 χρόνων (n=3) και 5-9 ετών (n=3).
- *H.influenzae* (n=3): στην ηλικιακή ομάδα <1-4 ετών
- *Staphylococcus aureus* (n=1): ηλικιακή ομάδα >60

Ιογενείς και λοιπές μηνιγγίτιδες

1. Ιογενείς μηνιγγίτιδες

Από τα 294 δηλωθέντα κρούσματα μηνιγγίτιδας ιογενούς αιτιολογίας, επιβεβαιώθηκαν τα 21 και αφορούσαν ως επί το πλείστον εντεροϊούς (n=17), ερπητοϊούς (n=2), West Nile virus (n=1) και chikungunya virus (n=1).

2. Λοιπές μηνιγγίτιδες

Από τα 216 δείγματα προερχόμενα από 186 ασθενείς αρνητικά στην PCR, 2 δείγματα τυποποιήθηκαν ως φυματιώδης μηνιγγίτιδα από το Κέντρο Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων, 46 δείγματα καταγράφηκαν ως αγνώστου αιτιολογίας (προερχόμενα από 46 ασθενείς) ενώ 149 δείγματα προερχόμενα από 139 ασθενείς ήταν με εμπύρετο.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Οι παρακάτω δημοσιεύσεις έγιναν στα πλαίσια των επιδημιολογικών δεδομένων που διαθέτει και συλλέγει το Κέντρο Αναφοράς. Επιπλέον, νέες μοριακές τεχνικές αναπτύχθηκαν στα πλαίσια της εφαρμογής και βελτιστοποίησης για την ταχύτερη διάγνωση των βακτηριακών μηνιγγιτίδων καθώς επίσης και για την επιδημιολογική διερεύνηση τοπικών επιδημιών.

1. Xirogianni A, Tsolia M, Voyiatzi A, Sioumala M, Makri A, Argyropoulou A, Paniara O, Markoulatos P, Kourea-Kremastinou J and Tzanakaki G . Diagnosis of Upper and Lower Respiratory Tract Bacterial Infections with the Use of Multiplex PCR Assays. J Diagnostics, 2013 April [Epub ahead of print]
2. Priftis KN, Litt D, Manglani S, Anthracopoulos MB, Thickett K, Tzanakaki G, Fenton P, Syroggiannopoulos GA, Voyiatzi A, Douros K, Slack M, Everard ML. Streptococcus pneumoniae and non-typable Haemophilus Influenzae causing bacterial bronchitis in children and the impact of vaccination. Chest 2013; Jan;143(1):152-7.
3. Titmarsh CJ, Moscovis SM, Hall S, Tzanakaki G, Kesanopoulos K, Xirogianni A, Scott RJ, Blackwell CC Comparison of cytokine gene polymorphisms among Greek patients with invasive meningococcal disease or viral meningitis. J Med Microbiol. 2013 Feb 1. [Epub ahead of print]
4. Tzanakaki G, Paparoupa M, Kyprianou M, Barbouni A, Eugen-Olsen J, Kourea-Kremastinou J. Elevated soluble urokinase receptor values in CSF, age and bacterial meningitis infection are independent and additive risk factors of fatal outcome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31(6):1157-62
5. Karpathios T, Moustaki M, Yialouros P, Sarifi F, Tzanakaki G, Fretzayas A. HSV-2 meningitis disseminated from a herpetic whitlow. Paediatr Int Child health 2012; 32(2):121-2
6. Broker M, Jacobsson S, Kuusi M, Pace D, Simones MJ, Skoczynska A, Taha MK, Toropainen M, Tzanakaki G. Meningococcal serogroup Y emergence in Europe: update 2011 . Hum Vaccin Immunother 2012; 8 (12) (ahead of print)
7. Tzanakaki G, Paparoupa M, Kyprianou M, Barbouni A, Eugen-Olsen J, Kourea-Kremastinou J. Elevated soluble urokinase receptor values in CSF, age and bacterial meningitis infection are independent and additive risk factors of fatal outcome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31(6):1157-62
8. Spoulou V, Tzanakaki G, Lekka S, Chouliaras G, Ladis V, Theodoridou M. Natural and vaccine-induced immunity to Neisseria meningitidis serogroup C in asplenic patients with β -thalassemia Vaccine. 2011 Jun 15;29(27):4435-8.
9. Ili S, Spanaki AM, Raissaki M, Spoulou VI, Fitrolaki MD, Kanariou M, Tzanakaki G, Briassoulis G. Complicated Pneumococcal Meningitis in a Fully Vaccinated Child: Value of Magnetic Resonance Imaging Monitoring. Neuropediatrics. 2011; 42(6):240-4
10. Papavasileiou K, Papavasileiou E, Tzanakaki G, Voyiatzi A, Kremastinou J, Chatzipanagiotou S. Acute bacterial meningitis cases diagnosed by culture and PCR in

a children's hospital throughout a 9-year period (2000-2008) in Athens, Greece. *Mol Diagn Ther* 2011; 15(2):109-13

11. Ladhani S, Slack MP, Heath PT, von Gottberg A, Chandra M, Ramsay ME; European Union Invasive Bacterial Infection Surveillance participants. Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 1996-2006. *Emerg Infect Dis*. 2010 Mar;16(3):455-63
12. Taha MK, Hedberg ST, Szatanik M, Hong E, Ruckly C, Abad R, Bertrand S, Carion F, Claus H, Corso A, Enríquez R, Heuberger S, Hryniewicz W, Jolley KA, Kriz P, Mollerach M, Musilek M, Neri A, Olcén P, Pana M, Skoczynska A, Sorhouet Pereira C, Stefanelli P, Tzanakaki G, Unemo M, Vázquez JA, Vogel U, Wasko I. Multicenter study for defining the breakpoint for rifampin resistance in *Neisseria meningitidis* by *rpoB* sequencing *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Sep;54(9):3651-8
13. Xirogianni A, Tzanakaki G, Karagianni E, Markoulatos P, Kourea-Kremastinou J. Development of a single-tube polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus* spp. directly in clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Feb;63(2):121-6.
14. Irine- Ikbale Sakou, Georgina Tzanakaki, Maria N. Tsolia, Maria Sioumala, Anastasia Barbouni, Miltiades Kyprianou, Vana Papaevangelou, Artemis Tsitsika, Caroline C. Blackwell, Dimitris Kafetzis, Jenny Kremastinou. Investigation of serum bactericidal activity in childhood and adolescence 3-6 years after vaccination with a single dose of serogroup C meningococcal conjugate vaccine. *Vaccine*, 2009, 27 4408-4411.
15. Kesanopoulos K, Tzanakaki G, Sioumala M, Kourea-Kremastinou J Direct application of variable number tandem repeats polymerase chain reaction in clinical samples obtained from patients with meningococcal disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Jul 18.
16. Drakopoulou Z, Kesanopoulos K, Sioumala M, Tambaki A, Kremastinou J, Tzanakaki G. Simultaneous single tube assay for the identification of 5 most common meningococcal serogroups directly in clinical samples. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Jul;53(2):178-82
17. Papapetropoulou M, Tzanakaki G, Papapetropoulos S, Guevara-Salcedo A, Leontsini F, Kremastinou J, Karpathios Th. Bacterial meningitis caused by penicillin –resistant *Neisseria lactamica* *J of Pediatric Infectious Dis* 2008, 3: 137-139
18. Spoulou VI, Moschou CK, Tzanakaki G, Theodoridou MC .Conjugate vaccine-induced immunological priming is not protective against acute meningococcal C infection. *Vaccine*. 2007 Oct 10;25(41):7012-3.
19. Kafetzis DA, Staboulidis KN, Tzanakaki G, Kremastinou J, Sklevaki CL, Konstantopoulos A, Tsolia M. Meningococcal group C disease in Greece during 1993-2006: the impact of an unofficial single dose vaccination scheme adopted by most paediatricians. *Clin Microbiol and Infect* 2007; 13:539-552.
20. Taha MK, Vazquez JA, Hong E, Bennet D, Bertrand S, Bukovski S, Cafferkey T, Carion F, Christiancen J, Diggle M, Edwards G, Enriquez R, Fazio C, Frosch M, Heuberger S, Hoffmann S, Jolley K, Tzanakaki G, Vogel U, Zarantonelli M. Target gene sequencing to characterize the penicillin G susceptibility of *N. meningitidis*. *AAC* 2007; 51:2784-92.

21. Σιουμάλα Μ, Τζανακάκη Τ, Κεσανόπουλος Κ, Λεβειδιώτου Σ, Κρεμαστινού Τ. Ταυτόχρονη ανίχνευση εννέα κύριων οροτύπων *Streptococcus pneumoniae* σε βιολογικά υλικά με την μέθοδο της stepdown multiplex PCR. Δελτίο Μικροβιολογικής Εταιρίας 2007, 52(3): 173-179
22. Spoulou V, Moschou CK, Tzanakaki G, Theodoridou MC. Conjugate vaccine-induced immunological priming is not protective against acute meningococcal C infection. *Vaccine*, 2007, 25: 7012-13
23. Tzanakaki G, Kesanopoulos K, Tsolia M, Levidiotou S, Pangalis A, Liakou V , Voyiatzi A, Papavasiliou E, Kansouzidou A, Foustoukou M, Blackwell CC, Kremastinou J. Phenotypic assessment of *N. meningitidis* isolates obtained from patients with invasive meningococcal disease in Greece, 1993-2003: implications for serogroup B vaccines based on PorA serosubtype antigens. *Vaccine*, 2006; 24:819-825.
24. Tsolia M, M. Theodoridou , G. Tzanakaki , V. Vlachou, G. Mostrou, M. Foustoukou, A. Pangalis P. Kalabalikis, Kremastinou J and A. Constantopoulos. Serogroup A invasive meningococcal disease in children in Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006 Jul; 25 (7) : 449-56.
25. Tzanakaki G, Kesanopoulos K, Yazdankhah S, Levidiotou S, Kremastinou J, Caugant DA. Conventional and molecular investigation of meningococcal isolates in relation to two outbreaks in the area of Athens. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(10):1024-6 .
26. Levidiotou S, Vrioni G, Tzanakaki G, Papa C, Gesouli H, Gartzonika C, Papamichail D, Kremastinou J. Serotype distribution of *Streptococcus. Pneumoniae* in north-western Greece and implications for vaccination programme. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 48(2) :179-82.
27. Taha MK, Alonso JM, Caffrekey M, Caugant DA, Clarke S, Diggle M, Fox A, Frosch M, Gray S, Guiver M, Heuberger S, Kalmusova J, Kesanopoulos K, Klem AM, Kriz P, Marsh J, Molling P, Murphy K, Olcen P, Sanou O, Tzanakaki G, Vogel U. Interlaboratory comparison of PCR-based identification and genogrouping of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 144-149.
28. K Kesanopoulos, G Tzanakaki, S Levidiotou, C Blackwell and J Kremastinou. Evaluation of touch-down real-time PCR based on SYBR green I fluorescent dye for the detection of *N. meningitidis* in clinical samples *FEMS Immun Med Microbiol* 2005; 43:419-424.
29. K Kesanopoulos, G Tzanakaki, A Velegraki, N Tegos, DA. Caugant, P Menounos, J Kourea-Kremastinou and S Levidiotou-Stefanou. Rapid molecular identification of *Neisseria meningitidis* isolates by polymerase chain reaction- single strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP) and its comparison with other molecular and conventional methods. *FEMS Immun Med Microbiol* 2005; 45(2):143-9.
30. Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumala M, Tabaki A, Kremastinou J . Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *N. meningitidis*, *H. influenzae* type b and *streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microb Infect* 2005, 11(5):386-90.
31. S. Yazdankhah, K Kesanopoulos, G. Tzanakaki, J Kremastinou and DA. Caugant. Variable-Number Tandem Repeats Analysis of Meningococcal Isolates Belong to the Sequence Type-162 Complex. *J. Clin Microbiol* 2005; 43 (9):4865-7.

32. J. Braun, J. Beuth, CC Blackwell, S. Giersen, P Higgins, G. Tzanakaki, H. Unverhau, DM Weir. *Neisseria meningitidis*, *N. lactamica* and *Moraxella catarrhalis* share cross-reactive carbohydrate antigens. *Vaccine* 2004; 22:898-908.
33. S. Yazdankhah, P Kriz, G Tzanakaki, J Kremastinou, J Kalmoulova, M Musilek, T Alvestad, K Jolley, D Wilson, N McCarthy, D Caugant and M Maiden. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from Czech Republic, Greece and Norway. *J. Clin Microbiol* 2004; 42 (11): 5146-53.
34. M Tsolia, A. Fretzayas, H Georgouli, G Tzanakaki, S Fessatou, G Liapi-Adamidou, A Konstantopoulos. Invasive Meningococcal Disease presenting as Henoch Schonlein purpura. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 776-779
35. J. Braun, J. Beuth, CC Blackwell, S. Giersen, P Higgins, G. Tzanakaki, H. Unverhau, DM Weir. *Neisseria meningitidis*, *N. lactamica* and *Moraxella catarrhalis* share cross-reactive carbohydrate antigens. *Vaccine* 2004; 22:898-908.
36. S. Yazdankhah, P Kriz, G Tzanakaki, J Kremastinou, J Kalmoulova, M Musilek, T Alvestad, K Jolley, D Wilson, N McCarthy, D Caugant and M Maiden. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from Czech Republic, Greece and Norway. *J. Clin Microbiol* 2004; 42 (11): 5146-53.
37. M Tsolia, A. Fretzayas, H Georgouli, G Tzanakaki, S Fessatou, G Liapi-Adamidou, A Konstantopoulos. Invasive Meningococcal Disease presenting as Henoch Schonlein purpura. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 776-779
38. M. Tsolia, M. Theodoridou, G. Tzanakaki, P Kalabalikis, E. Urani, G. Mostrou, A. Pangalis, A. Zaphiropoulou, C. Kassiou, D. Kafetzis, CC Blackwell, J Kremastinou and Th Karpathios. The evolving epidemiology of invasive meningococcal disease: a two year prospective, population –based study in children in the area of Athens. *FEMS Immun Med Microbiol* 2003; 36:87-94
39. N. Siafakas, P. Markoulatos, C. Vlachos, G. Stanway, G. Tzanakaki, and J Kremastinou. Molecular sub-grouping of enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. *Mol and Cell Probes* 2003;17:2113-123
40. J Kremastinou, G. Tzanakaki, S. Levidiotou, F. Markou, E. Themeli, A. Voyiatzi, E. Psoma, M. Theodoridou, CC Blackwell. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *N. lactamica* in Northern Greece. *FEMS Immun Med Microbiol* 2003; 39:23-29
41. G. Tzanakaki, M. Tsolia, V. Vlachou, M. Theodoridou,, A. Pangalis, M. Foustoukou, Th Karpathios, CC Blackwell, J Kremastinou. Evaluation of non-culture diagnosis of invasive meningococcal disease by polymerase chain reaction (PCR). *FEMS Immun Med Microbiol* 2003; 39:31-36
42. Μ. Κανελλοπούλου, Τ. Τζανακάκη, Ν. Σκαρμούτσου, Μ. Μαρτσούκου, Α. Χαραλαμποπούλου, Μ. Αγγελίδου, Τ. Κουρέα-Κρεμαστινού, Ε. Παπαφράγκας. Απομόνωση *Neisseria meningitidis* σε εκκρίσεις κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. *Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρίας*, 2003, 48 (6): 352-356.

43. J. Vazquez, L. Arreaza, C. Block, I. Erhard, S. Gray, S. Heuberger, S. Hoffman, P. Krizova, P. Nicolas, P. Olcen, A. Skoczynska, L. Spanjaard, P. Stefanelli, M-K Taha, and **G. Tzanakaki**. Interlaboratory comparison of agar dilution and E-test methods for determining the MICs of antibiotics used in management of *Neisseria meningitidis* Infections . Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3430-3434.
44. N. Siafakas, P. Markoulatos, G. Stanway, G. Tzanakaki, and J Kremastinou. A reliable RT-PCR/RFLP assay for the molecular classification of enterovirus reference and wild type strains to either of the two genetic clusters on the basis of 5'-UTR. Mol and Cell Probes 2002;16:209-216
45. Τ. Τζανακάκη, Μ. Τσολιά, Α. Πάγκαλη, Μ. Θεοδορίδου, Μ. Φουστούκου, Ε. Αλεξάνδρου, Α. Ζαφειροπούλου, Β. Βλάχου, Θ. Καρπάθιος και Τ. Κρεμαστινού. Ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για την ταχεία διάγνωση της μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου. Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική. 2002; Περίοδος Β', Τόμος 7, Τεύχος 1:27-32.
46. Antignac A, Kriz P., G. Tzanakaki, J-M Alonso and M-K Taha. Polymorphism of *Neisseria meningitidis* penA gene associated with reduced susceptibility to penicillin. J Antimicrob Chemother 2001; 47:285-296
47. G. Tzanakaki, R. Urwin, M. Musilek, P. Kriz, J Kremastinou, A. Pangalis, CC Blackwell and MC Maiden. Phenotypic and genotypic approaches to characterization of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and their close family contacts. J. Clin Microbiol 2001;39:1235-1240
48. P. Markoulatos, A. Georgopoulou, N. Siafakas, E. Plakokefalos, G. Tzanakaki and J Kremastinou. Laboratory diagnosis of common Herpes virus infections of the central nervous system by Multiplex PCR assay. J. Clin Microbiol 2001; 39:4426-4432
49. Α. Βογιατζή, Γ Τζανακάκη, Μ Βελονάκης, Α. Παπανικολάου-Παπαναγιώτου, Ν. Βακάλης και Τζ Κουρέα-Κρεμαστινού. Επιδημιολογική μελέτη μετακινούμενων πληθυσμών για φορεία του μικροοργανισμού *Neisseria meningitidis*. Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 2000, 45 (1): 22-28.
50. Kremastinou J. G. Tzanakaki, Velonakis E, Voyiatzi A, Nikolaou A, Elton RA, Weir DM, Blackwell CC. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* among ethnic Greek school children from Russian immigrant families in Athens. FEMS Immunology and Medical Microbiology 1999; 23 (1): 13-20
51. Kremastinou J., G. Tzanakaki, Kansouzidou A, Pangalis A, Danielides V, Kouppari G, Lada E, Kriz P, Musilek M, Weir DM, Blackwell CC. Recent emergence of serogroup C meningococcal disease in Greece. FEMS Immunology and Medical Microbiology 1999; 23 (1): 49-55
52. Kremastinou J., G. Tzanakaki, A. Pangalis, M. Theodoridou, DM. Weir and CC Blackwell. Detection of IgG and IgM outer membrane proteins in relation to carriage of *Neisseria meningitidis* or *Neisseria lactamica*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 1999; 24 (1): 73-78
53. M. Connolly N. Noah and the European Meningitis surveillance Group* (G. Tzanakaki and J. Kremastinou). Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-96. Epidemiol Infect 1999, 122:41-49

54. Κρεμαστινού Τ. και Τ. Τζανακάκη. Επιδημιολογικά στοιχεία της μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου στην Ελλάδα 1993-1998. Επιδημιολογικό Δελτίο Λοιμωδών Νοσημάτων Ελλάδος. 1999;13:81-82.
55. G. Tzanakaki, P. Kriz, J. Kremastinou, M. Musilek, L. Smart, C.C. Blackwell. Reactivity of the new monoclonal antibody '22' with meningococcal strains isolated from patients and carriers in Greece. FEMS Immunology and Medical Microbiology 1997; 19: 1-5
56. Κρεμαστινού Τζένη, Τζωρτζίνα Τζανακάκη, Αριστέα Βελεγράκη. Η Μηνιγγιτιδοκοκκική Νόσος (βιβλίο) Αθήνα 1996
57. J. Kremastinou, G. Tzanakaki, P.H. Karafoti, RA Elton, DM Weir, CC Blackwell. Distribution of ABO and Lewis blood groups in Greece. Gene Geography, 1996; 10: 201-205
58. Kremastinou J, Tzanakaki G, Blackwell CC, Kallergi C, Chronas C, and Weir DM. Parental smoking and carriage of *Neisseria meningitidis* among Greek school children. Scand. J of Infectious Dis 1994; 26: 719-723
59. Καλλέργη Κ., Τζανακάκη Τ., Βακάλης Ν., Blackwell C.C., D.M. Weir Φατούρος Ν., και Τ. Κρεμαστινού. Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη φορεία της *Neisseria meningitidis* σε πληθυσμό νεοσύλλεκτων. Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, 1994, 39 465-474

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

1996. Ειδικό Βραβείο 17^ο Εθνικού Συνεδρίου Μικροβιολογίας

Τζανακάκη Τ, Πάγκαλη Α, Αλεξάνδρου Ε, Μπониάτση Λ, Σκανδάμη Ε, Διανηλίδης Β, Κανσουζίδου Α, και Κρεμαστινού Τ. Ορολογική τυποποίηση και ευαισθησία στα αντιβιοτικά στελεχών *N. meningitidis* από ασθενείς.

1998. Πρώτο Βραβείο Αμφιαράειου Ιδρύματος Χημειοθεραπευτικών Μελετών

Τζανακάκη Τ, Καραγκούνη Ε, Ηλιάδης Π, και Κρεμαστινού Τ.: Παραγωγή νεύου μονοκλωνικού αντισώματος έναντι των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης στελεχών *N. meningitidis* που απομονώνονται στην Ελλάδα.

2000. 1^ο βραβείο 19^ο Εθνικού Συνεδρίου Μικροβιολογίας

Θεμελή Ε, Τζανακάκη Τ, Λεβειδιώτου Σ, Βογιατζή Α, Κρεμαστινού Τ. PCR: μία πολύτιμη μέθοδος για την τυποποίηση των μη-τυποποιήσιμων μηνιγγιτιδοκοκκικών στελεχών (NG) που απομονώθηκαν από φορείς.

2005. Βραβείο «Αντιγόνης Αρσένη»

(στα πλαίσια των εργασιών του 2^ο Εθνικού συνεδρίου Κλινικής Μικροβιολογίας)
Κεσανόπουλος Κ, Τζανακάκη Τ, Τσοπανομίχαλου Μ, Σιουμάλα Μ, Ματζουράνη Ρ, Ταμπάκη Α και Κρεμαστινού Τ. Ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *N. meningitidis*, *Str. pneumoniae* και *H. influenzae type b* με την μέθοδο της multiplex PCR .

2008. Πρώτο Βραβείο 5^ο Πανελληνίου Συνεδρίου Ιατρικής Βιοπαθολογίας

Ξηρογιάννη Α, Τζανακάκη Τζ, Μακρή Α, Αρφυροπούλου Α, Βογιατζή Α, Καραγιάννη Ε, Μάρκου Φ, Καλημερατζή Κ, Πανιάρα Ο, Κρεμαστινού Τζ. Ανάπτυξη τετραπλής PCRγια την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *H. influenzae*, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus*, *streptococcus spp* σε βιολογικά υλικά