



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

TESE DE DOUTORADO

**EFEITO DA VACINA PNEUMOCÓCICA 10-VALENTE EM EVENTOS DE
COLONIZAÇÃO NASOFARÍNGEA EM CRIANÇAS NA CIDADE DE SALVADOR-
BAHIA.**

MILENA SOARES DOS SANTOS

Salvador-Bahia

2015

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**EFEITO DA VACINA PNEUMOCÓCICA 10-VALENTE EM EVENTOS DE
COLONIZAÇÃO NASOFARÍNGEA EM CRIANÇAS NA CIDADE DE SALVADOR-
BAHIA.**

MILENA SOARES DOS SANTOS

Orientadora: Professora Dra. Joice Neves Reis Pedreira

Tese apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Biotecnologia em
Saúde e Medicina Investigativa
para obtenção do grau de Doutor.

Salvador-Bahia

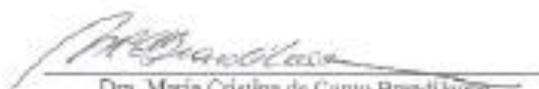
2015

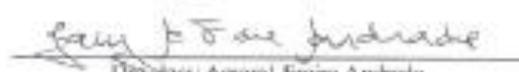
" EFEITO DA VACINA PNEUMOCÓCICA 10-VALENTE EM EVENTOS DE COLONIZAÇÃO
NASOFARÍNGEA EM CRIANÇAS NA CIDADE DE SALVADOR-BAHIA."

MILENA SOARES DOS SANTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA


Dr. Maria Cristina de Castro Brandão
Pesquisadora
IAL


Dr. Lucy Amaral Freire Andrade
Professora Associada
FAMED


Dr. Maria da Conceição Chagas de Almeida
Pesquisadora
CPqGM/FIOCRUZ

*Este trabalho é dedicado a todas as
crianças envolvidas no estudo, com o
sincero desejo que a saúde seja uma
prioridade em suas vidas.*

FONTES DE FINANCIAMENTO

CNPq, mediante apoio financeiro recebido conforme Edital MCT/CNPq N° 14/2010 – Universal – Faixa B – Processo N° 482755/2010-5.

AGRADECIMENTOS

- A Deus por me proporcionar saúde, coragem e resignação durante esta caminhada;
- À minha orientadora Dra. Joice Neves Reis Pedreira pela oportunidade de ser inserida em uma equipe de pesquisa, pela participação desde a minha formação acadêmica e pelas suas inestimáveis contribuições científicas e profissionais e acima de tudo, por acreditar no meu potencial;
- A toda a equipe de docentes, discentes, servidores e secretariado do Curso de Pós-Graduação de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pela disponibilidade e colaboração na minha formação acadêmica e científica e também pela presteza nos serviços;
- Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, em nome do diretor Dr. Manoel Barral e de toda a equipe de servidores e funcionários terceirizados, pela estrutura física e pelos recursos que permitiram a realização deste trabalho;
- Ao Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Coordenador do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, e aos pesquisadores Dra. Theomira Azevedo e Dr. Luciano Kalabric, pela disponibilidade de compartilharmos equipamentos, espaço físico, recursos e todo apoio que possibilitaram a concretização deste estudo;
- Ao Dr. Edson Duarte Moreira pelas contribuições na minha formação enquanto discente deste Curso de Pós Graduação, pelas considerações realizadas na Qualificação do Doutorado e por compartilhar com nossa equipe de pesquisa do espaço físico do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Bioestatística;
- À equipe da Biblioteca do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, em especial à Sra. Ana Fiscina, pela presteza dos serviços e colaboração de sempre;
- À toda equipe de profissionais e colaboradores da unidade CRIE, pela colaboração durante a execução do projeto, em especial à Dra. Jacy Amaral Freire Andrade, à Dra. Maria Cristina Barbosa e aos enfermeiros Lívio Matheus de Oliveira Silva, Leda Nice Silva Medeiros, Ana Cerqueira Lisboa e toda a equipe de auxiliares técnicos e administrativos, especialmente Maria Aparecida Brasileiro, Maria de Fátima Mota, Nilza Pereira de Oliveira, Alice Moreira Nunes e Lizete Martins de Almeida pela grande parceria e disponibilidade em todos os momentos;

- À toda equipe de profissionais, técnicos, auxiliares e colaboradores do Posto de Saúde do 16º Distrito da Liberdade, em especial à Tânia, Eilane e Mônica pela inestimável colaboração durante a execução do projeto;
- Às amigas Dra. Soraia Cordeiro, Dra. Ana Paula Oliveira Menezes e à mestre Mariela Leite pela compreensão, colaboração profissional, parceria e companheirismo, mostrando-se sempre por perto mesmo quando estávamos distantes;
- À mestranda Maíra Santos, à mestre Camila Souza e ao doutorando Jailton Azevedo Junior pela inestimável colaboração durante as etapas de coleta do estudo e amizade ao longo destes anos;
- Às estudantes de iniciação científica Alana Campos, Raiana Moraes e Vanessa Lima, que colaboraram com a fase inicial do projeto na execução da coleta de amostras e processamento de material laboratorial;
- À Professora Dra. Tânia Barros e aos amigos do Laboratório de Microbiologia em Pesquisa Clínica da Faculdade de Farmácia que compartilharam o espaço físico do Laboratório da Universidade Federal da Bahia, onde vivenciamos momentos de muito trabalho e dedicação, e a Robson servidor administrativo, pela sua colaboração e disponibilidade de nos acompanhar em muitas visitas em domicílio, meus sinceros agradecimentos;
- À toda equipe de profissionais do Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas do Instituto Adolfo Lutz, especialmente à Dra. Maria Cristina de Cunto Brandileone, à Dra. Ana Paula S. Lemos, à doutoranda Samantha Almeida e à mestranda Maria Luiza Leopoldo e Silva Guerra que me receberam e auxiliaram na execução dos experimentos de sorotipagem em São Paulo;
- Às amigas Joceara Reis e Itatiana Rodart por gentilmente me receberem quando estive em São Paulo realizando parte experimental do estudo no Instituto Adolfo Lutz;
- Ao Dr. Geraldo Marcelo Cunha, da Escola Nacional de Saúde Pública-FIOCRUZ, pelo grande auxílio nas análises estatísticas;
- À Professora Dra. Elisângela Adorno, coordenadora do Laboratório Pesquisa em Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFBA por autorizar a utilização do fotodocumentador para registro de nossos experimentos;

- Ao Dr Bernard Beall coordenador do Streptococcus Laboratory, National Centers for Infectious Disease (CDC–Atlanta, EUA) e Dra. Maria da Glória Carvalho (CDC – Atlanta, EUA) por receberem parte das amostras deste estudo para execução de sorotipagem;
- À Dra Maria da Conceição Chagas de Almeida pelas relevantes observações no exame de qualificação que auxiliaram para construção da versão desta tese;
- À MsC Silvana Paz, responsável pela Plataforma de Sequenciamento na FIOCRUZ, pela inestimável cooperação na execução do seqüenciamento genômico, além da amizade ao longo destes anos.
- Aos pacientes, que sem dúvida, sem esta cooperação, este estudo não poderia ser concretizado;
- À minha família e amigos queridos, especialmente aos meus pais e irmãos, mestres da paciência e da vida.

“Somente por meio da fé é possível compreender as descobertas, a tecnologia, a ciência em si. Separar a fé da ciência é decretar o fim das descobertas científicas, as quais se baseiam na fé de alguém que formulou hipóteses acreditando primeiro, para então sair em busca de evidências”

Madre Teresa de Calcutá

SANTOS, Milena Soares. Efeito da vacina pneumocócica 10-valente em eventos de colonização nasofaríngea em crianças na cidade de Salvador-Bahia. 102 f. il. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria patogênica que afeta crianças e idosos em todo o mundo, sendo responsável por elevada morbidade e mortalidade, especialmente nos países em desenvolvimento onde o acesso às vacinas pneumocócicas conjugadas (PCVs) é limitado. A colonização da nasofaringe precede o desenvolvimento de infecções e as crianças são o principal reservatório deste patógeno na comunidade. As vacinas pneumocócicas conjugadas reduzem a taxa de colonização e de doenças causadas por sorotipos vacinais, entretanto, pouco se sabe sobre seu efeito em eventos na substituição de sorotipos. Os objetivos deste estudo foram determinar o efeito da vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV10) na colonização nasofaríngea por pneumococos em crianças menores que um ano, saudáveis que apresentaram doença crônica ou desordem imunológica nos períodos pré- e pós esquema vacinal primário entre maio de 2011 a janeiro de 2014 e determinar a influência desta vacina na distribuição de sorotipos, da susceptibilidade antimicrobiana e do perfil genotípico dos pneumococos. Foram investigadas 168 crianças, sendo 63 do grupo de portadores de doenças clínicas (Grupo I) e 105 do grupo de crianças saudáveis (Grupo II). O isolamento, a identificação e a avaliação da resistência antimicrobiana do pneumococo foram realizados através de técnicas microbiológicas convencionais. A determinação dos sorotipos capsulares foi realizada através das técnicas de reação de polimerase em cadeia multiplex e reação de *Quellung*. A taxa de colonização pneumocócica total foi de 24%, sendo 17% (11/63) e 28% (29/105) para os grupos I e II, respectivamente. Convívio com crianças menores que 6 anos no mesmo domicílio mostrou associação com colonização para o grupo I [OR= 8,36 (IC95%= 1,69-44,70); p=0.004] enquanto que renda foi associada a risco para crianças do grupo II [(OR=3,22; IC95%= 1,22-8,64; p=0,01]. Os sorogrupos/tipos identificados com maior frequência foram: 23F (10%), 19F e 15B/15C (7,5%) e cepas não tipáveis (15%). Após a 3^a dose da vacina houve uma redução de 7% para 5% na taxa de colonização por sorotipos vacinais e um aumento de três vezes na probabilidade de colonização por sorotipos não vacinais (7% para 21%). Identificamos 17% de não susceptibilidade à penicilina. Os sorotipos PCV10 associados com um ST foram os sorotipos 19F (ST177) e 23F (ST338) e os não associados a PCV10 foram os seguintes: 11A/11D (ST62 e ST408), 15A/15F (ST73),

15B/15C (ST766), 23A (ST42) e 23B (ST727). Os resultados demonstram que três doses da PCV10 reduzem ou estabilizam a colonização por sorotipos vacinais, a despeito da colonização pelos sorogrupos/tipos vacinais 6A/6B, 14 e 23F e destaca-se a colonização por sorotipos não vacinais (6C<7C<13<23A<23B<15A/15F<15B/15C<11A/11D) e cepas não tipáveis, independente do grupo de crianças avaliadas. Embora não tenha sido avaliado o efeito da PCV10 após a 4ª dose da vacina neste estudo, ressaltamos a importância da manutenção da dose de reforço no calendário vacinal do programa nacional de imunizações para que a proteção contra os sorotipos oferecida pela vacina seja alcançada. Estudos epidemiológicos devem continuar para monitorar a taxa de colonização de pneumococos circulantes no período pós-vacinal, bem como as taxas de não susceptibilidade aos antimicrobianos que são essenciais para o direcionamento das estratégias de saúde pública no manejo clínico e prevenção das doenças pneumocócicas.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*; Vacinas Pneumocócicas; Colonização Pneumocócica; Epidemiologia molecular.

SANTOS, Milena Soares. Effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal nasopharyngeal carriage in children in Salvador, Bahia. 102 f. il. Tese (Doutorado). Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a pathogenic bacterium that affects children and elderly throughout the world, accounting for high morbidity and mortality, especially in developing countries where access to pneumococcal conjugate vaccines (PCVs) is limited. Nasopharyngeal colonization precedes the development of infections and children are the main reservoir of this pathogen in the community. The pneumococcal conjugate vaccine has been effective in reducing colonization and disease by vaccine serotypes, however, little is known about its effect on the overall rate of colonization due to serotypes replacement events. The study aims to evaluate the effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage in children younger than one year old, healthy, suffering from chronic diseases or immune disorders during vaccine primary immunization with PCV-10 between May 2011 and January 2014 and the influence of this vaccine in the distribution of serotypes, antimicrobial susceptibility and genotypic profile of pneumococcus. A total of 168 children were enrolled, 63 with chronic diseases (Group I) and 105 of the group of healthy children (Group II). The isolation, identification and evaluation of antimicrobial resistance of pneumococci were made using conventional microbiological techniques. The determination of capsular serotypes was performed using the multiplex-PCR and/or Quellung reaction. Overall, the pneumococcal colonization rate was 24%, being 17% (11/63) and 28% (29/105) to group I and II, respectively. Living with children aged up to six years in the same household was associated with colonization in group I [OR= 8,36 (CI95%= 1,69-44,70); p=0.004] and income was associated with risk for children in group II [(OR=3,22; IC95%= 1,22-8,64; p=0,01]. The most frequently serotypes identified were: 23F (10%), 15B/15C (7,5%) and nontypeable strains (15%). A total of 28% (11/40) of serotypes identified in both groups are represented in PCV10. After the 3rd dose of vaccine was reduced from 7% to 5% in vaccine serotypes colonization rate and a three-fold increase in the probability of colonization by serotypes not represented in the PCV-10 (7% to 21%). Penicillin nonsusceptibility was identified in 17% of the isolates. PCV10 serotypes associated with a ST serotypes were 19F (ST177) and 23F (ST338) and not associated with PCV10 were 11A/11D (ST62 and ST408), 15A/15F (ST73), 15B/15C (ST766), 23A (ST42) and 23B (ST727). The results demonstrate that three doses of

PCV10 stabilizes or reduces colonization by the vaccine serotypes, regardless of colonization by vaccine types 6A/6B, 14 and 23F and highlights the rates of colonization by non-vaccine serotypes (6C/7C/13/23A/23B/15A/15F/15B/15C/11A/11D) and nontypeable pneumococcal, independent of the study group. Although this study was not evaluated the effect of PCV10 after the 4th dose of the vaccine, we emphasize the importance of booster dose of maintenance in the immunization schedule of the national immunization program for the protection offered by the vaccine serotypes is achieved. Epidemiological studies should continue to monitor the rate of colonization of pneumococci circulating in the post-vaccine period and antimicrobial non-susceptibility rates that are essential for the targeting of public health strategies in the clinical management and prevention of pneumococcal diseases.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; pneumococcal vaccines; Pneumococcal carriage; molecular epidemiology.

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Esquema da Vacina Pneumocócica 10-valente (conjugada)

26

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1A.** *Streptococcus pneumoniae* em ágar sangue exibindo α -hemólise (Arquivo pessoal). 21
- Figura 1B.** Morfologia de *Streptococcus pneumoniae* após coloração de Gram de secreção respiratória, exibindo Cocos Gram positivos aos pares e em cadeias e leucócitos polimorfonucleares (http://www.msefans.com/cnsinfections/s-pneumoniae.jpg). 21
- Figura 2.** Dendrograma (Relação genética) e padrão de PFGE de pneumococos isolados de nasofaringe de crianças nos períodos pré- e pós- esquema vacinal primário (n=48). 65
- Figura 3.** Estrutura populacional de 15 STs de *Streptococcus pneumoniae* revelada por meio da análise do eBURST 66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CIM	Concentração Inibitória Mínima
CRIE	Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucléico
DNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> - Desoxibonucleotídeo trifosfatado
GSK	Glaxo Smith Kline
HCM	Hospital Couto Maia
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IPD	<i>Invasive Pneumococcal Disease</i> – Doença Invasiva pneumocócica
IVAS	Infecção das Vias Aéreas Superiores
MLST	<i>Multi Locus Sequence Typing</i> - Tipagem por seqüenciamento de genes em múltiplos <i>locus</i>
ND	Não definido
NT	Não tipável
OMA	Otite Média Aguda
PCR - RT	<i>Polymerase Chain Reaction – Real Time</i> -Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real
PCV-10	<i>Decavalent Pneumococcal Conjugate Vaccine</i> – Vacina pneumocócica Conjugada decavalente
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> – Eletroforese em Gel de Campo Pulsátil
PMEN	<i>Pneumococcal Molecular Epidemiology Network</i> – Rede de Epidemiologia Molecular de Pneumococo
PNSP	<i>Pneumococcal Non Susceptible Penicillin</i> - Pneumococo não susceptível à penicilina
SIREVA	Sistema Regional de Vacinas
ST	<i>Sequence Type</i> – Tipo de Sequência

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> : O MICRO-ORGANISMO E A SAÚDE PÚBLICA	18
1.2 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS	20
1.3 COLONIZAÇÃO PNEUMOCÓCICA E MANIFESTAÇÃO DA DOENÇA	21
1.4 EPIDEMIOLOGIA DA COLONIZAÇÃO PNEUMOCÓCICA	22
1.5 VACINAS PNEUMOCÓCICAS	23
1.6 O ESTUDO MOLECULAR E O PERFIL DE CEPAS DE COLONIZAÇÃO	27
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 DESENHO, PERÍODO E LOCAL DO ESTUDO	31
4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO	32
4.3 COLETA DE DADOS E MATERIAL BIOLÓGICO	33
4.3.1 Dados clínicos e demográficos	33
4.3.2 Amostras biológicas	34
4.4 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	34
4.4.1 Isolamento e identificação das amostras de <i>S. pneumoniae</i>	34
4.4.2 Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (PCR Real Time)	35
4.4.2.1 Extração de Ácido Desoxirribonucleico (DNA)	35
4.4.2.2 Condições de Termociclagem	35
4.4.2.3 Interpretação da PCR – Real Time	36
4.4.3 Dedução de Sorogrupos/tipos Capsulares - Multiplex PCR	36
4.4.3.1 Extração de DNA obtido a partir da cultura positiva	36
4.4.3.2 Condições de Termociclagem	37
4.4.3.3 Condições de Eletroforese e interpretação dos resultados	37
4.4.4 Reação de <i>Quellung</i>	37
4.4.5 Teste de susceptibilidade antimicrobiana	38
4.4.6 Tipagem Molecular	39

4.4.7 Análise de dados	42
4.4.8 Aspectos éticos	43
4.5 ARTIGO	44
5 RESULTADOS ADICIONAIS	62
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	78

LISTA DE ANEXOS

A. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGAR SANTOS	78
B. APROVAÇÃO DO ADENDO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGAR SANTOS	81
C. APROVAÇÃO DA SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE SALVADOR	82
D. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	83
E. QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	85
F. QUESTIONÁRIO DO INDIVÍDUO	87
G. CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE PARA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA <i>S.pneumoniae</i> . CLSI, 2012.	88
H. VALORES ACEITÁVEIS PARA DISCO DIFUSÃO NO TESTE DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE PARA <i>S.pneumoniae</i> . CLSI, 2012.	92
I. LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS EM MULTIPLEX PCR CONVENCIONAL	94
J. TAMANHO DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE DEDUÇÃO DE SOROTIPOS CAPSULARES	97
L. ALGORITMO PARA IDENTIFICAÇÃO DE SOROTIPOS DE <i>S.pneumoniae</i> – Key to <i>S.pneumoniae</i> types and pneumococcal diagnostic antisera	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*: O MICRO-ORGANISMO E A SAÚDE PÚBLICA

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é considerado um patógeno comensal da mucosa da nasofaringe, restrito aos humanos. A colonização prévia é um pré-requisito para o desenvolvimento da doença pneumocócica, sendo que a idade inicial de aquisição varia de quatro dias a 18 meses, com média de seis meses. A colonização assintomática é mais comum do que a doença e admite-se que a maioria dos indivíduos adquire este agente em algum momento da vida, sem manifestação clínica. Em uma minoria de pessoas portadoras, as bactérias podem se mover da nasofaringe para os seios nasais e cavidade do ouvido médio ou para os pulmões, causando infecções do trato respiratório ou invadir a corrente sanguínea causando infecções sistêmicas (BOGAERT et al., 2004; O'BRIEN et al., 2009; SIMELL et al., 2012).

O pneumococo tem uma cápsula polissacarídica, principal fator de virulência, com antigenicidade distinta que o classifica em 94 sorotipos e constitui as vacinas pneumocócicas atualmente disponíveis (WHITNEY et al., 2003; LEXAU et al., 2005; BRACKER et al., 2010).

A imunização com vacina pneumocócica conjugada (PCV) é uma intervenção de saúde pública estratégica para prevenir as doenças pneumocócicas. Há evidências de que esta vacina diminui o número de portadores do pneumococo na nasofaringe dos vacinados, evitando a transmissão para indivíduos suscetíveis e não vacinados, base da proteção de rebanho, responsável pelo grande impacto da utilização das vacinas conjugadas em geral. (BRASIL, 2014).

A PCV tem sido usada desde 2000, quando a vacina 7-valente (PCV7) foi licenciada nos Estados Unidos para uso na rotina em crianças. Foi aprovada para uso no Brasil em 2001, disponível apenas para uma pequena parcela da população, quase restrita a clínicas privadas e para indivíduos considerados de alto risco para a doença pneumocócica invasiva (IPD) atendidos nos CRIES (Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais). Em maio de 2010 no Brasil, a PCV7 foi substituída pela vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV10) licenciada e implementada no calendário nacional do programa de imunização e nos CRIES (BRASIL, 2010; BRASIL, 2014). Esta vacina inclui os mesmos sorotipos da PCV7 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F), além de mais 3 (1, 5 e 7F). Na maioria dos países onde a

PCV7 foi implementada, houve a substituição pela vacina 13-valente (PCV13) que contempla ainda os sorotipos 3, 6A e 19A (WHO, 2012; VICTORA et al., 2011).

Logo após a implementação da PCV10 no Brasil, em outubro 2011, a cobertura média vacinal atingiu 80% do público alvo, para uma série primária completa em crianças menores que 12 meses de idade, em mais de 5.000 municípios (AFONSO et al., 2013).

A vacinação de rotina em países na Europa e nos Estados Unidos reduziu a carga das doenças pneumocócicas invasivas, principalmente aquelas causadas por cepas não susceptíveis aos antimicrobianos de sorotipos incluídos na vacina heptavalente. A epidemiologia das infecções pneumocócicas sofreu alterações, passando a apresentar sorotipos não vacinais 1, 7F, 3, 6A e, especialmente o sorotipo 19 A, como principais nas infecções invasivas (ISAACMAN et al., 2010; REINERT et al., 2010).

A implementação de vacinas contra o pneumococo é comprovada clinicamente e é considerada estratégia econômica, sendo potencialmente mais favoráveis PCVs que incorporam o maior número de sorotipos em sua constituição (WEIL-OLIVIER et al., 2012).

Uma cobertura vacinal de pelo menos 80% da população alvo de doenças pneumocócicas invasivas (IPD) fornece efeito de rebanho suficiente para proteção obtendo-se benefícios econômicos. O aumento em IPD causada por sorotipos não vacinais reduz os efeitos globais diretos de vacinação e as compensações dos potenciais benefícios em indivíduos não vacinados (MANTOVANI et al., 2010; LEE et al., 2014).

Estudos têm avaliado as relações entre linhagens genéticas do pneumococo e o seu potencial para causar doença avaliando o tipo de sequência genética ou sorotipo capsular e seu potencial invasivo (SLEEMAN et al., 2006). De acordo com Brueggmann e cols. (2004), a propriedade invasiva do pneumococo é independente de fatores temporais ou geográficos, sugerindo uma estabilidade de sorotipos capsulares do pneumococo em condições naturais. Esta abordagem é particularmente relevante para avaliar as alterações no potencial de certos sorotipos capsulares causarem doença invasiva e de emergirem após a pressão seletiva imunológica causada pela ampla utilização das vacinas pneumocócicas conjugadas (SLEEMAN et al., 2006).

Embora haja avanços na compreensão da epidemiologia e na patogênese das infecções pneumocócicas, fatores genéticos que predisõem a permanência de clones em doença invasiva e colonização ainda são pouco explorados. Naturalmente transformável, a diversidade genética e a plasticidade dos pneumococos são evidenciadas pela presença de sorotipos capsulares distintos e a uma série de outros fatores de virulência (BRATCHER et al., 2010; SILVA et al., 2006). Outro fator importante é a co-colonização por múltiplos

sorotipos de pneumococo na nasofaringe que afetam a substituição de sorotipos vacinais, a detecção da colonização e o diagnóstico das doenças pneumocócicas (SHAK et al., 2013). A determinação exata de co-colonização e o seu papel na patogênese são difíceis de estabelecer usando o método convencional de sorotipagem devido à sua baixa sensibilidade e limitações laboratoriais. Desta forma, métodos moleculares altamente sensíveis e específicos são necessários para detectar vários sorotipos com precisão e eficiência, contribuindo para uma melhor compreensão da epidemiologia da doença e de eventos de colonização em uma população alvo de estratégias de prevenção (HARE et al., 2008; HUEBNER et al., 2000).

1.2 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

Esta bactéria, frequentemente referida como pneumococo, foi descoberta, quase que simultaneamente, por dois pesquisadores: George M. Sternberg, em setembro de 1880 nos Estados Unidos e Louis Pasteur, em dezembro do mesmo ano, na França através do isolamento do micro-organismo em ratos inoculados com saliva humana. Foi inicialmente nomeado como "*Micrococcus Pasteuri*, Sternberg". Após alguns anos, passou a ser chamado de *Streptococcus pneumoniae*, "*Streptococcus*" por apresentar pelo método do Gram a mesma estrutura dos estreptococos e "*pneumoniae*" por ser considerado agente etiológico da pneumonia. Foi relacionado com pneumonia, por Carl Friedländer em 1882 quando examinava cortes histológicos de pulmões de oito pacientes e logo depois outros pesquisadores relacionaram esse patógeno com outras patologias como meningite, artrite, bacteremia e sinusite (AUSTRIAN, 1985).

Streptococcus pneumoniae é uma espécie constituída por cocos Gram positivos encapsulados com um diâmetro de 0,5-1,25 μm , que se dispõem aos pares ou em cadeias curtas. Quando se apresentam aos pares, as bordas adjacentes são achatadas e as externas lanceoladas, em formato de chama de vela (MURRAY et al., 2007; BRAIDO et al., 2008). Como as demais espécies do gênero *Streptococcus*, pneumococos são anaeróbios facultativos, não produzem catalase, crescem bem em ágar sangue com produção de uma hemólise parcial, denominada de α -hemólise (MURRAY et al., 2007; BRAIDO et al., 2008).

A estrutura dos pneumococos é caracterizada por uma membrana celular com dupla camada lipídica coberta por uma parede bacteriana constituída de peptidoglicano associado ao polissacarídeo C; este polissacarídeo é idêntico em todos os sorotipos da bactéria, induz

anticorpos não-protetores e foi originalmente utilizado para identificar a proteína C-reativa no soro humano (TRABULSI et al., 2008).

São revestidos por uma cápsula polissacarídica que protege a bactéria contra a fagocitose e tem um importante papel como fator de virulência deste patógeno (BRAIDO et al., 2008). Esta cápsula é um polímero de alto peso molecular, composto de subunidades oligossacarídicas repetitivas, cada uma contendo de duas a oito moléculas. Apresenta diversidade antigênica estrutural, o que permite ser explorada como principal alvo nas reações sorológicas para a identificação e diferenciação dos sorotipos por meio de reações com anti-soros específicos. O polissacarídeo capsular de pneumococos é altamente imunogênico e é utilizado no preparo de vacinas, pois induz o desenvolvimento de anticorpos, que conferem proteção contra as infecções pneumocócicas invasivas (PLETZ et al., 2008).



Figura 1A. *Streptococcus pneumoniae* em ágar sangue exibindo α -hemólise
Fonte: Arquivo pessoal

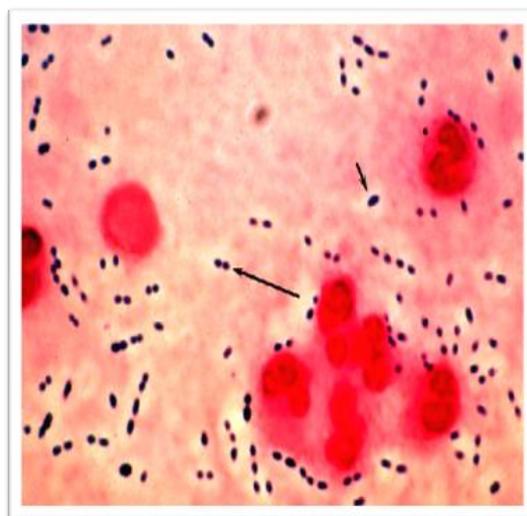


Figura 1B. Morfologia de *Streptococcus pneumoniae* após coloração de Gram de secreção respiratória, exibindo Cocos Gram positivos aos pares e em cadeias e leucócitos polimorfonucleares.
Fonte: <http://www.msevens.com/cnsinfections/s-pneumoniae.jpg>

Pneumococos não-encapsulados são considerados não-patogênicos (PLETZ et al., 2008). Desde o reconhecimento de um novo subtipo do sorogrupo 6, o sorotipo 6D, foram identificados até o momento, 48 sorogrupos compreendendo 93 diferentes tipos de polissacarídeos capsulares (BRATCHER et al., 2010).

1.2 COLONIZAÇÃO PNEUMOCÓCICA E MANIFESTAÇÃO DA DOENÇA

Pneumococos residem na mucosa do trato respiratório e podem ser facilmente cultivado da nasofaringe de humanos. A transmissão deste agente ocorre através do contato direto com as secreções ou dispersão de aerossóis por pessoas infectadas. Na maioria dos casos, uma vez adquirido o patógeno, o contágio leva à colonização nasofaríngea que pode durar de semanas a meses (KADIOGLU et al., 2008).

Embora a colonização possa ser assintomática, se o micro-organismo obtém acesso aossítios normalmente estéreis das vias aéreas, pode evoluir para infecção. A maioria das manifestações da doença pneumocócica inclui otite média aguda, que envolve infecção do ouvido médio e pneumonia que afeta as vias aéreas terminais. A bacteremia, associada com elevada morbidade e mortalidade, tipicamente ocorre como complicação de pneumonia ou menos freqüentemente, se o micro-organismo se desloca diretamente do seu nicho na faringe (KADIOGLU et al., 2008; BRAIDO et al., 2008).

A prevalência de um sorotipo colonizando a nasofaringe é inversamente correlacionada com a capacidade invasiva deste sorotipo, tais como os sorotipos 6A, 6B, 19F, 23F que tendem a colonizar mais frequentemente e manter o estado de portador por mais tempo; enquanto sorotipos mais invasivos, como 1, 4, 5, 7F tendem a colonizar com menos freqüência e manter a colonização por menor tempo (BRUEGGEMAN et al., 2004; ABDULLAHI et al., 2012; TIGOI et al., 2012).

1.4 EPIDEMIOLOGIA DA COLONIZAÇÃO PNEUMOCÓCICA

A taxa de colonização pneumocócica varia de acordo com as diferentes populações. Estudos conduzidos na Inglaterra, Austrália e no Alasca revelam que pneumococos podem ser encontrados no trato respiratório superior em proporções entre 45 e 60% de crianças menores que cinco anos (HARE et al., 2013; HUSSAIN et al., 2005; WENGER et al., 2010). Uma recente meta-análise descreveu prevalência de 64,8% de colonização em crianças saudáveis menores que 5 anos de idade para países de baixa renda (Bangladesh, Quênia, Tanzânia e Gâmbia) e de 47,8% para seis populações de países de renda média-baixa (Fiji, Faixa de Gaza, Ghana, Vietnã, Indonésia e Índia) (ADEGBOLA et al., 2014). No Brasil, os resultados de estudos entre crianças que frequentam creches diferem nas regiões geográficas, variando de 49% na região sudeste (NEVES et al., 2013), 55% na região Nordeste (REY et al., 2002) e 36% na região centro-oeste (LAVAL et al., 2006). Estudo prévio realizado em uma

comunidade na cidade de Salvador, Bahia, mostrou prevalência de colonização de 15% em adultos saudáveis e entre crianças sadias, mais de 65% são colonizadas (REIS et al., 2008).

Poucos estudos reportam a prevalência decolonização entre portadores de doenças crônicas ou desordens imunológicas. Estudos realizados no Quênia, em uma população de pacientes imunocomprometidos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) mostrou que a prevalência de colonização pneumocócica diminui com a idade (76% -88% em crianças, de 5 anos de idade vs. 11,4% a 18% em adultos) (ABDULLAHI et al., 2012a). Outro estudo, no mesmo país,relata que a taxa de colonização por pneumococos em crianças infectadas pelo HIV, com idade entre três e 59 meses, foi maior do que entre não infectados 76% (IC= 95%, 66% -84%) vs. 65,8% (IC= 95%, 64,0%-67,5%; p = 0,04) (ABDULLAHI et al., 2012b)

Além da colonização por sorotipos específicos, outros fatores influenciam diretamente o padrão epidemiológico das infecções pneumocócicas, como as desordens imunológicas e genéticas que podem ser congênitas ou adquiridas incluindo HIV, neoplasia, asplenia, imunodepressão, terapias antiproliferativas e anemia falciforme. Patologias crônico-degenerativas, tais como, *diabetes mellitus*, insuficiência renal crônica, síndrome nefrótica, doença pulmonar obstrutiva crônica, e outras patologias pulmonares e cardiovasculares, hepatopatias crônicas e todas as condições que causem danos à integridade da anatomia do trato respiratório, com redução da habilidade para remover secreções e agentes inalados e pacientes em extremos de idade (GARCIA et al., 2006). Fatores como sazonalidade, hábito de freqüentar creche, convívio em ambientes aglomerados, histórico de alcoolismo e uso de drogas, infecções prévias do trato respiratório superior associadas ou não com desnutrição e o perfil socioeconômico influenciam a prevalência da colonização pneumocócica na população (BOGAERT et al., 2004; DONKOR et al., 2013a; BRAIDO et al., 2008).

1.5 VACINAS PNEUMOCÓCICAS

As vacinas anti-pneumocócicas disponíveis são baseadas em polissacarídeos capsulares livres ou conjugadas a uma ou mais proteínas carreadoras. A primeira vacina anti-pneumocócica polivalente para uso comercial foi licenciada em 1977, composta por 14 polissacarídeos capsulares (Merk Sharp & Dohme) era composta pelos sorotipos 2, 3, 4, 6A, 7F, 8, 9N, 12F, 14, 18C, 19F, 23F e 25 (CDC, 1978). Estudos anteriores demonstraram que esta vacina, apesar de ser pouco reatogênica e razoavelmente eficaz, diminuiu a mortalidade por pneumonia em 44% e reduziu as infecções por pneumococos em 84% e produzia uma

resposta sorotipo específica, havendo pequena proteção cruzada para sorotipos não presentes na vacina administrada (CDC, 1978; BRICKS, 1994).

Posteriormente, em 1983, esta vacina foi substituída por outra formulação contendo 23 polissacarídeos capsulares (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F), a qual está disponível até os dias atuais, sob a denominação de Pneumo23 (PPV-23 ou Pneumovax, Merck & Company Inc). Esta vacina tem uma eficácia de mais de 80% na redução de doença pneumocócica invasiva em adultos jovens, entretanto apresenta baixa eficácia em crianças menores de dois anos, pois a resposta a antígenos polissacarídicos, por ser T-independente, de curta duração, não induz memória imunológica e, portanto não é indicada para crianças nesta faixa etária (PLETZ et al., 2008; WHO, 2008; BRASIL, 2014).

Neste contexto, o desenvolvimento de vacinas anti-pneumocócicas baseadas nas técnicas de conjugação trouxe outra perspectiva para o controle das infecções pneumocócicas. A primeira vacina pneumocócica conjugada, a heptavalente (PCV7, Prevnar, Wyeth, EUA) composta por sete sorotipos comumente associados com doença invasiva em crianças jovens foi licenciada para uso nos Estados Unidos em 2000, e posteriormente em vários outros países. Diversos estudos demonstraram que nos países onde a PCV7 foi implementada, houve uma mudança na prevalência de sorotipos associados com IPD, ocorrendo a substituição e emergência de outros sorotipos patogênicos e não vacinais, a exemplo o sorotipo 19A nos EUA, Reino Unido, China e Itália (REINERT, 2010; ANDREWS et al., 2011; YAO et al., 2011; CAMILLI et al., 2013).

Além disto, a PCV7 apresentou baixa cobertura em várias regiões onde foi implementada, como na Ásia (46-72%) (JAUNEIKAITÉ et al., 2012), África (2-36%) (DONKOR et al., 2013b) e entre as Américas, no Brasil (70%) (REIS et al., 2002). Outras formulações vacinais com mais sorotipos foram desenvolvidas como a PCV10 e PCV13. A PCV10 (Synflorix, GlaxoSmithKline –GSK, Belgium) possui 3 sorotipos a mais que a vacina 7-valente (1, 5, 7F) e, além disto, elas diferem nas proteínas utilizadas para a conjugação. A PCV10 possui 8 dos 10 polissacarídeos conjugados a uma proteína da membrana externa (proteína D) da bactéria *Haemophilus influenzae*, e os outros dois polissacarídeos (sorotipos 18C e 19F) são conjugados a um toxóide tetânico e um toxóide diftérico modificado, respectivamente) (BRASIL, 2010; GSK, s.d.). A vacina pneumocócica conjugada 13-valente (PCV13, Prevnar13, Wyeth, EUA), contém os mesmos 7 sorogrupos/tipos contidos na PCV7 acrescentada dos seguintes 1, 3, 5, 6A, 7F e 19A. Cada 0,5 mL de dose intramuscular é formulada para conter 2,2 µg de sacarídeo por sorogrupo/tipo,

sendo 4,4 µg de sacarídeo para o sorotipo 6B e aproximadamente 32 µg de proteína CRM₁₉₇ e 0,125 mg de alumínio como adjuvante. Esta vacina é fabricada com base na mesma tecnologia de conjugação usando a mesma proteína transportadora CRM₁₉₇ e pode ser utilizada em crianças a partir dos 2 meses de idade, faixa etária onde a morbimortalidade da doença pneumocócica é muito elevada. Crianças que tenham iniciado a imunização com a PCV7 podem completar a imunização trocando para a vacina PCV13 em qualquer ponto no esquema vacinal. Estudos clínicos demonstram que os perfis de imunogenicidade e segurança foram comparáveis (WYETH, 2010; BRASIL, 2014).

O uso de vacinas conjugadas contra pneumococo (7 e 13 valente) no adulto tem sido pesquisado e há evidências de boa resposta imune a essas vacinas, com maior persistência de anticorpos e melhor resposta em indivíduos geneticamente não respondedores à vacina polissacarídica. Porém, as vacinas conjugadas tem menor número de sorotipos e maior custo que a vacina polissacarídica. Além disso, como acontece com a vacina polissacarídica, a resposta de anticorpos com as vacinas conjugadas no adulto também é menor em pessoas com maior risco de doenças invasivas pelo pneumococo. A proteção oferecida pelas vacinas pneumocócicas depende da epidemiologia entre os sorotipos mais prevalentes na região e os sorotipos contidos nas vacinas (BRASIL, 2014).

O governo brasileiro, através do Ministério da Saúde aprovou a introdução da vacina pneumocócica 10-valente (PCV10) no programa nacional de imunizações, no primeiro semestre de 2010 (BRASIL, MS, SVS, 2010) depois de firmado acordo de transferência de tecnologia para a produção desta vacina entre a GSK e Bio-Manguinhos/Fiocruz (BRASIL, 2013). O esquema de vacinação primária consiste em três doses de 0,5mL com intervalo de pelo menos um mês entre as doses, contudo o Programa Nacional de Imunização adota o intervalo de dois meses entre as doses. Desta forma, a primeira dose é iniciada a partir dos dois meses de idade seguindo esquema vacinal de dois, quatro e seis meses. Uma dose de reforço é recomendada pelo menos seis meses após a última dose do esquema primário, sendo este preferencialmente entre os 12 e 15 meses de idade. Para as crianças com idade entre 12 e menores que 24 meses de idade é recomendada dose única, no primeiro ano de vida, sem a necessidade de reforço (Tabela 1).

Tabela 1. Esquema da Vacina Pneumocócica 10-valente (conjugada)

Idade – meses	Número de doses	Reforço
2-4-6 ou 3-5-7 ou 4-6-8 ou 5-7-9 ou 6-8-10	3 doses intervalo de 2 meses	1 dose preferencialmente entre 12 e 15 meses
7- 9 ou 8-10 ou 9-11 ou	2 doses intervalo de 2 meses	1 dose preferencialmente entre 12 e 15 meses
10-12 ou 11-13	2 doses intervalo de 2 meses	Nesta faixa etária, ao receber a 2ª dose, não há necessidade de reforço.
12 a <24	Dose única	-

Fonte: BRASIL, 2010.

Estudo de avaliação da eficácia da PCV10 contra doença pneumocócica invasiva evidenciou equivalência de resposta imunológica específica aos sorotipos comuns incluídos na vacina PCV10 comparando crianças vacinadas com a PCV7 (VESIKARI et al., 2009). Foi demonstrado em ensaio clínico de comparação direta com a vacina PCV7, a não inferioridade da resposta imune a vacina PCV10, medida por Elisa para todos os sorotipos, exceto 6B e 23F. No mesmo ensaio clínico, a vacina PCV10 demonstrou gerar anticorpos funcionais, OPA (opsonofagocitose) contra todos os sorotipos da vacina. A administração da dose de reforço, no segundo ano de vida demonstrou resposta anamnésica para os dez sorotipos incluídos na vacina (BRASIL, 2014; VESIKARI et al., 2009).

Outro aspecto relevante é a baixa imunidade cruzada para os sorotipos relacionados 6A e 19A, especificamente o sorotipo 19A, o qual emergiu nos Estados Unidos da América e outros países com causa de IPD. Por este motivo, países que haviam implementado a PCV7 optaram por substituir a vacina pela PCV13 (MOORE et al., 2008; DAGAN et al., 2009).

A implementação das vacinas pneumocócicas conjugadas (PCVs) para crianças conseguiu reduzir a carga da doença pneumocócica invasiva em diversos contextos epidemiológicos e os declínios na incidência de IPD global são o resultado líquido de grandes

reduções na incidência de doenças causadas por sorotipos vacinais e aumentos menores na incidência de sorotipos não incluídos na vacina (WEINBERGER et al., 2011; PILISHVILI et al., 2010).

Após a implantação da vacina heptavalente nos Estados Unidos, houve redução no número de casos de doenças invasivas em vacinados e não-vacinados. De 1998 para 2002, as taxas de incidência de IPD reduziram de 24,3 casos para 17,3 por 100.000 habitantes sendo a maior redução em crianças com menos de dois anos de idade (BLACK et al., 2001; WHITNEY et al., 2003).

Estudo prévio, conduzido no Alasca (Estados Unidos), avaliou os efeitos da PCV7, onde foi observado que a introdução da vacina infantil de rotina em uma comunidade com uma alta prevalência de pneumococos resistentes aos antimicrobianos reduziu a transmissão dos sorotipos vacinais em 43% independente do *status* vacinal da criança (MOORE et al., 2004). Entre 2000 e 2004, estudo realizado por Park e colaboradores (2008), encontrou redução significativa entre os portadores de *S. pneumoniae*, onde foi observado queda na taxa de colonização por sorotipos vacinais (de 54% para 10%, $p < 0,01$). No Brasil, estudo realizado em Goiás, em crianças saudáveis menores que cinco anos em 62 creches, encontrou uma prevalência de colonização de 36,9%, sendo mais frequentes os sorotipos vacinais: 14(42,3%), 6A (7,9%), 23F (7,1%), 6A/6B (4,7%) e 19F(3,5%) (PIMENTA et al., 2011).

Estudo recente realizado no Brasil avaliou a efetividade da vacina PCV10 em cinco cidades brasileiras a partir dos dados do Sistema Nacional de Informações sobre Hospitalização em crianças. Foram reportados declínios significativos nas internações causadas por pneumonia e outras causas não respiratórias pediátricas em três das cinco capitais avaliadas, sendo identificadas em: Belo Horizonte, Curitiba e Recife (28,7; 23,3% e 27,4% respectivamente; $p < 0,001$). Nas capitais São Paulo e Porto Alegre, houve uma menor cobertura vacinal comparada às outras três cidades e embora tenham sido identificadas reduções de 1,8% e 2,3%, respectivamente, nas taxas de internação, de modo geral foram evidenciadas reduções nas taxas globais de hospitalizações de crianças por pneumonia após 1 ano de implementação vacinal (AFONSO et al., 2013).

1.6 O ESTUDO MOLECULAR E O PERFIL DE CEPAS DE COLONIZAÇÃO

O conhecimento sobre as características moleculares das cepas circulantes bem como a sua frequência, diversidade e eventual substituição são fundamentais para o monitoramento das doenças pneumocócicas. As informações geradas através dos estudos de epidemiologia

molecular de *S.pneumoniae* são importantes, uma vez que permitem conhecer os tipos e subtipos circulantes, bem como identificar a presença de clones em uma determinada região em um período de tempo (BRANDILEONE et al., 1998; CAIERÃO et al., 2014).

Estudos prévios reportaram a disseminação internacional de vários clones deste patógeno com elevado perfil de resistência à penicilina e a outros antimicrobianos (SCHRAG et al., 2004; KAWAGUCHIYA et al., 2014). A aplicação de técnicas de caracterização molecular teve grande relevância na elucidação e compreensão deste fenômeno. O uso de técnicas de biologia molecular possibilita elucidar diferentes aspectos da epidemiologia molecular dos pneumococos, com particular ênfase na disseminação de isolados resistentes aos agentes antimicrobianos empregados na prática clínica na comunidade e no ambiente hospitalar. Outro aspecto relevante que tem sido evidenciado pela aplicação de métodos moleculares, é a substituição de sorotipos vacinais por sorotipos não vacinais com perfil genético similar ao de sorotipo vacinal. Nos EUA, por exemplo, o sorotipo 19A tornou-se causa predominante da doença invasiva em crianças, exibindo um perfil genético anteriormente associado ao sorotipo 4 (BRUEGGMANN et al., 2007).

Portanto, a aplicação de métodos de tipagem molecular em estudos de vigilância de IPD e de colonização nasofaríngea pode auxiliar na identificação de eventuais casos de substituição de sorotipos, bem como, da disseminação de clones com grau de patogenicidade diferenciado.

2 JUSTIFICATIVA

A colonização nasofaríngea por *Streptococcus pneumoniae* é um fator chave para o desenvolvimento da doença invasiva, sendo considerado também um reservatório para dispersão de cepas resistentes aos antimicrobianos na comunidade (BOGAERT et al., 2004).

Este patógeno é responsável por elevadas taxas de doença invasiva (70 – 80%), especialmente em países populosos e em áreas em desenvolvimento econômico como: Índia, Ásia, África e América Latina além de elevada taxa de morbi-mortalidade infantil, onde mais de 1 milhão de crianças menores de 5 anos, evoluem a óbito anualmente (WHO, 2007).

A meningite é uma das formas mais graves da doença pneumocócica e frequentemente resulta da disseminação deste agente através da corrente sanguínea (WHITNEY et al., 2003). Nos países onde as vacinas conjugadas foram implementadas, houve redução de 73% no número de casos da doença ($p < 0,001$), correspondendo a um declínio na taxa de incidência para a população total de 0,66 para 0,18 por 100.000 habitantes, com quedas que variaram de 92,8% para as crianças menores de 2 anos de idade para 61,6% entre pessoas de 40 a 64 anos de idade (TAN, T.Q., 2012).

Avaliar a dinâmica de sorotipos capsulares e clones de pneumococos circulantes na comunidade é de relevância para a saúde pública, pois há evidências de que o uso das vacinas pneumocócicas está relacionado com mudanças significativas na epidemiologia das doenças pneumocócicas causadas pelos sorotipos vacinais e aumento na prevalência de infecções por sorotipos não vacinais (GHERARDI et al, 2007; O'BRIEN, et al, 2004; DHOUBHADEL et al., 2014).

As estratégias de prevenção direcionadas à população pediátrica disponíveis são as vacinas pneumocócicas conjugadas. A vacina PCV10 já teve sua segurança, eficácia e imunogenicidade comprovadas em crianças saudáveis, porém pouco se sabe sobre o impacto desta vacina nos eventos de colonização nasofaríngea em crianças menores que dois anos e com risco aumentado para condições imunológicas e doenças de base, a exemplo de crianças com anemia falciforme e imunodeficiência humana adquirida.

Através deste trabalho, nós propomos descrever a epidemiologia de *S.pneumoniae* em eventos de colonização nasofaríngea entre crianças elegíveis para receberem as doses da vacina PCV10, seguindo as etapas propostas pelo Ministério da Saúde para o esquema de vacinação primário e caracterizar fenotipicamente e genotipicamente os isolados de pneumococos obtidos destes indivíduos.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Determinar o efeito da PCV10 em eventos de colonização nasofaríngea por pneumococos em crianças menores que um ano, saudáveis e que apresentaram doença crônica ou desordem imunológica no período do esquema vacinal primário da vacina conjugada pneumocócica 10-valente.

3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar fatores de risco associados à colonização pneumocócica em crianças menores de 2 anos;
- Identificar os principais sorotipos envolvidos em eventos de colonização durante as etapas do esquema vacinal primário;
- Investigar co-colonização por sorotipos de pneumococos em crianças seguindo o esquema vacinal primário;
- Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados identificados;
- Caracterizar o perfil clonal dos isolados de *S.pneumoniae*;
- Investigar a presença de clones de dispersão internacional entre os pneumococos isolados de nasofaringe.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO, PERÍODO E LOCAL DO ESTUDO

O estudo de coorte dinâmico foi conduzido entre maio de 2011 e janeiro de 2014 em Salvador, município do estado da Bahia, que integra a região Metropolitana de Salvador (RMS) ao lado de mais 12 cidades, cuja população estimada é de 2.883.672 habitantes, sendo a cidade mais populosa do Nordeste e a terceira mais populosa do Brasil (IBGE, 2013; BAHIA, 2014). A organização atual político-administrativa de Salvador compreende 10 Regiões Administrativas, denominadas Prefeituras Bairros e 12 Distritos Sanitários que realizam procedimentos (atendimentos) de média e alta complexidade ambulatorial e hospitalar (BAHIA, 2014).

Para execução da pesquisa foram selecionados dois centros de saúde, o Centro de Referência de Imunológicos Especiais (CRIE) da unidade da Universidade Federal da Bahia, localizado no bairro do Canela e o Posto de Saúde do 16º Distrito Sanitário da Liberdade, situado no bairro do Pau Miúdo.

O CRIE é um órgão vinculado à Secretaria Estadual de Saúde e regido pela norma da Secretária de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde Portaria nº 48, de 28 de julho de 2004 que conta com equipe técnica mínima de médicos, enfermeiros e auxiliares/técnicos de enfermagem, capacitados para atuar na área de imunização. Este centro de referência atende ao público que necessita de imunobiológicos especiais de alta tecnologia e alto custo, de forma personalizada, onde os indivíduos são encaminhados para vacinação por indicação médica ou por demanda espontânea. No Brasil existem 38 CRIES distribuídos em todos os estados, sendo que na Bahia existem dois, um na Universidade Federal da Bahia (UFBA) e outro no Hospital Couto Maia (HCMaia) (SBI, 2015).

Nos CRIES, quando a vacina PCV7 era disponível alguns pré-requisitos eram exigidos para administração da vacina em relação à condição de risco à saúde, tais como: crianças portadoras de HIV/AIDS ou filhos (as) de mãe portadora; asplenia anatômica ou funcional e doenças relacionadas; pneumopatias crônicas, exceto asma; asma grave em uso de corticóide em dose imunossupressora; cardiopatias crônicas; nefropatias crônicas/hemodiálise/síndrome nefrótica; transplantados de órgãos sólidos ou medula óssea; imunodeficiência devido a câncer ou imunossupressão terapêutica; diabetes mellitus; fistula liquórica; fibrose cística (mucoviscidose); doenças neurológicas crônicas incapacitantes; implante de cóclea; trissomias; imunodeficiências congênitas e doenças de depósito. Após a substituição da PCV7

a partir da implementação da PCV10 no calendário vacinal nacional, esta também foi incluída nos CRIES(BRASIL,2014).

A escolha do Posto de Saúde do 16º Distrito Sanitário da Liberdade situado na Unidade Básica de Saúde (UBS) Maria Conceição Santiago Imbassahy como local de estudo, foi motivada por se tratar de uma unidade situada no distrito sanitário mais populoso de Salvador, cuja densidade demográfica é de 25.817 habitantes/km²e por ser um estabelecimento que presta atividade ambulatorial em nível de atenção básica e média complexidade, incluindo os serviços de Saúde da Criança que contemplam pediatria, triagem neonatal, puericultura e a sala de vacinas. A unidade é bem estruturada que facilitou a coleta da secreção de nasofaringe (BAHIA, 2014).

Os procedimentos microbiológicos de identificação, sorotipagem, testes de susceptibilidade antimicrobiana e tipagem molecular, criação e manutenção de banco de dados utilizado para as análises foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) da Faculdade de Farmácia e no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz foram realizadas as etapas de extração de DNA e PCR em Tempo Real.

4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO

Critérios de inclusão e exclusão

Crianças com idade entre seis semanas e menores que 12 meses elegíveis para receberem pelo menos duas doses da PCV10 foram selecionadas para participar do estudo de colonização seguindo o esquema vacinal primário proposto pelo Ministério da Saúde. Crianças com idade entre 12 e 24 meses não foram selecionadas para o estudo, pois receberiam apenas dose única e não seriam seguidas após esquema primário de vacinação e as maiores que 24 meses não foram incluídas por não serem indicadas para receberem as doses da vacina PCV10.

Dados de estudos prévios serviram de base para o cálculo amostral. Estudo realizado em comunidade em Salvador, Bahia por Reis et al. (2008) encontrou prevalência de colonização pneumocócica de 66% entre crianças saudáveis não vacinadas, enquanto que em estudo realizado em crianças portadoras de anemia falciforme por Kateete et al. (2012) encontrou uma taxa de 33% de indivíduos colonizados pelo pneumococo quando vacinados. Para cálculo amostral foi utilizado o programa gratuito OpenEpi v.3.03 (www.openepi.com) disponível *online*, que indicou ser necessário incluir 80 crianças para um poder de estudo de

80% (Fleiss, Statistical Methods for rates and Proportions). Considerando as possíveis perdas de elementos da amostra, aumentamos este número e incluímos 168 indivíduos no estudo. Para minimizar as perdas do seguimento, foram realizadas tentativas de localização por telefone de todos os pacientes que não foram encontrados no dia previsto para receberem as doses seguintes da PCV10 para agendamento de coleta de dados e material biológico através de visita em domicílio.

4.3 COLETA DE DADOS E MATERIAL BIOLÓGICO

4.3.1 Dados clínicos e demográficos

As informações clínicas e demográficas dos indivíduos foram obtidas na data de vacinação através de entrevista realizada pela equipe do estudo com os responsáveis legais a partir das informações registradas nas fichas de triagem do CRIE ou nos registros cadastrais do posto de saúde do 16º distrito sanitário da Liberdade conforme questionário epidemiológico e do indivíduo (Anexos V e VI).

As variáveis dependentes avaliadas foram: sexo, idade, cor da pele, procedência, renda, convívio com crianças com idade igual ou superior a seis anos, frequência a creche, convívio com mais de cinco pessoas no domicílio, convívio com fumantes, convívio com idosos, número de camas/habitante no domicílio, presença de comorbidades, doença prévia à data de vacinação, presença de infecção das vias aéreas e uso de antibióticos. Estas variáveis foram categorizadas da seguinte forma: auto-definição em relação à cor da pele em branco e não branco, sendo que não brancos foram considerados pretos, pardos ou mulatos; convívio foi considerado como residir no mesmo domicílio independente do tempo de exposição; número de cama/habitante menor que um foi considerado para as famílias que tinham mais que três pessoas no domicílio; comorbidades foram consideradas de acordo com as seguintes condições clínicas ou desordens imunológicas: prematuridade, bebê baixo peso extremo, má-formação congênita, asplenia anatômica e funcional, diabetes melitus, doença cardiovascular, doença neurológica incapacitante, doenças de depósito, doença pulmonar crônica (incluindo asma), hepatopatia crônica, imunodeficiência congênita, imunodeficiência adquirida (HIV, uso corticóide, uso de quimioterápicos, outros), hemoglobinopatias, renal crônico, bebê exposto ao HIV; Infecções das vias aéreas foram consideradas das vias superiores e inferiores incluindo: coriza, otite, gripe, resfriado, pneumonia e bronquite; uso de antibióticos foi considerado se houve uso nos 15 dias prévios à data de vacinação.

4.3.2 Amostras biológicas

Swabs de secreção de nasofaringe foram coletados dos indivíduos em cada visita para vacinação com a PCV10, antes da administração da primeira dose da vacina (coleta 1) e nos meses de administração das doses subseqüentes do esquema vacinal primário (coletas 2, 3 e 4).

Para coleta do material da nasofaringe foram utilizando *swabs* descartáveis de alginato de cálcio (*Calgiswab* tipo 1, Spectrum, USA), estéreis, finos e flexíveis, que foram inseridos na cavidade nasal da criança até a nasofaringe posterior. Os *swabs* foram inoculados em meio de transporte (STGG - Skim Milk, TSB, glicerol e glicose), conforme protocolo estabelecido pelo *Streptococcus* Laboratory Protocols (CDC, Atlanta, EUA) e transportado até o LPMC onde foram congelados a -70°C até o processamento microbiológico.

4.4 MÉTODOS MICROBIÓDICOS

4.4.1 Isolamento e identificação das amostras de *S. pneumoniae*

Para o cultivo de *S. pneumoniae* uma alíquota de 200µL do caldo STGG foi inoculada em 5 mL de caldo Todd-Hewitt contendo 0,5% de extrato de levedura e 1mL de soro de coelho e incubado em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 6h, conforme protocolo estabelecido pelo CDC (*Streptococcus* Laboratory Protocols - CDC, Atlanta, EUA). Após período de incubação, uma alíquota de 10µL foi semeada em placas de ágar sangue, contendo “Tryptic Soy Agar” acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado e 5 µg/ml de gentamicina e incubadas a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, por um período de cerca de 18-24 horas. Uma colônia apresentando alfa-hemólise e morfologia característica de *S. pneumoniae* foi submetida aos testes de identificação convencionais: susceptibilidade à optoquina e bile solubilidade (WHO, 2003). Quando mais de uma colônia com característica sugestiva de pneumococo foi observada, esta também foi submetida aos testes de identificação. As amostras identificadas foram criopreservadas em caldo “Tryptic Soy Broth” (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) acrescido de 10% de glicerol para posterior análise de sensibilidade antimicrobiana, determinação de sorotipo e caracterização clonal.

4.4.2 Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (PCR Real Time)

Os casos em que não houve crescimento de pneumococos em cultura foram analisados pela metodologia de detecção pelo PCR em Tempo Real. A detecção de *S. pneumoniae* foi realizada a partir dos extratos de DNA obtidos diretamente do material coletado da nasofaringe e transportados em caldo Skim Milk® enriquecido com meio de cultura Tryptic Soy Broth, glicerol e glicose (STGG) conforme protocolo estabelecido por Carvalho e cols. (2007). O sistema de detecção utilizado foi o TaqMan com primers F373 - acgcaatctagcagatgaagca, R424 - tcgtgcgttttaattccagct e sonda Pb400 - tgccgaaaacgcttgatacaggagdirecionados para o gene espécie-específico *lytA* foram utilizados para detecção da presença de *S. pneumoniae* na amostra de nasofaringe. Para as reações de controle foram utilizados os seguintes primers R-RNaseP - tgttggtgctgatgaactataaaagg e F-RNaseP - ccaagtgtgagggtgaaaag e a sonda Pb-RNaseP - cccagctctctgctcagcaactcccttc.

4.4.2.1 Extração de Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

Para extração de DNA, foi utilizada uma alíquota de 100µL do caldo STGG contendo a secreção de nasofaringe, com a utilização do kit de extração Qiagen® - QIAamp DNA Mini kit seguindo instruções do fabricante. O DNA obtido por este método foi utilizado para detecção por PCR em Tempo Real e para dedução do sorotipo capsular, quando o PCR foi positivo. Um controle de reação com o gene humano *RNaseP* foi realizado no mínimo em uma amostra de cada experimento para detectar a presença de possíveis inibidores durante a etapa de extração.

4.4.2.2 Condições de Termociclagem

As condições de termociclagem da reação de PCR em tempo real foi pré-programado no equipamento Applied Biosystems (ABI - Modelo: 7500 Real Time PCR system) com os seguintes parâmetros: 50°C, 2 min. x 1; 95°C, 10 min. x 1; 95°C, 15 seg 60°C, 60 sec. x 50 ciclos.

4.4.2.3 Interpretação da PCR – Real Time

O ponto denominado *Cycle threshold* - *Ct* detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial e é este ponto que permite a quantificação baseada na fluorescência emitida. Uma amostra foi interpretada como positiva quando o valor do *Ct* foi menor que 35. Resultados de *Ct* entre 35 e 40 foram interpretados como inconclusivos sendo então realizadas diluições nas proporções de 1:5 e 1:10 e submetido a uma nova reação. Valores de *Ct* maiores que 35 foram considerados como negativos conforme proposto por Corless e cols. (2001). Controles positivos e negativos foram incluídos em todas as reações. (CDC. Streptococcus Lab Protocols. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/files/pcr-realtime-target.pdf>).

4.4.3 Dedução de Sorogrupos/tipos Capsulares -Multiplex PCR

A técnica de *PCR multiplex* foi realizada para identificação dos sorogrupos/tipos a partir de culturas de *S. pneumoniae* obtidas a partir do caldo STGG inoculado com o *swab* de nasofaringe e a partir do DNA extraído diretamente do caldo que positivou na reação de PCR em Tempo Real. Foram utilizados 41 pares de oligonucleotídeos (anexo IX) conforme técnica estabelecida por da Gloria Carvalho et al., (2010) de acordo com as recomendações do Center for Disease Control and Prevention (CDC, EUA) (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm> e <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/files/pcr-identification-serotyping-pneumococci.pdf>).

Esta metodologia foi também utilizada para investigação de co-colonização por diferentes sorogrupos/tipos entre os isolados de pneumococos.

4.4.3.1 Extração de DNA obtido a partir da cultura positiva

Para obtenção do DNA através da cultura positiva, foi preparada uma suspensão em microtubo do crescimento bacteriano *overnight* de uma placa de ágar sangue de carneiro a 5% em 300 µL de solução salina a 0,85% e aquecida a 70°C por 30 minutos. Esta suspensão foi centrifugada em microcentrífuga por 2 minutos e o sobrenadante foi removido. Foi então adicionado 50 µL de Tampão TE e acrescentado as enzimas 10 µL mutanolisina (3000U/µL - Sigma®, EUA) e 8 µL de hialuronidase (30mg/mL - Sigma®, EUA) e mantidas em banho-

mariaa 37°C por 1h e 30min. Após este período, para inativação das enzimas, a suspensão bacteriana foi mantida a 100°C por 10 minutos. O microtubo contendo a amostra foi centrifugado por 4 minutos a 13200 rpm e o sobrenadante contendo o DNA foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.4.3.2 Condições de Termociclagem

As condições de termociclagem da reação de PCR Multiplex foram pré-programadas no equipamento Applied Biosystems. As condições de ciclagem foram as seguintes: 95°C, 15 min. x 1; 94°C, 30 seg x 1; 54°C, 90 seg 72°C, 60 sec. x 35 ciclos; 72°C, 10min x 1. Os produtos de PCR foram armazenados a -20°C até a realização da eletroforese.

4.4.3.3 Condições de Eletroforese e interpretação dos resultados

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose NuSieve® a 2% em TBE 0,5X em campo elétrico de 100V, por 1h e 30 minutos. O gel foi tratado posteriormente com solução de brometo de etídio 10 µg/mL por 30 minutos. A imagem do gel foi capturada sob luz ultravioleta através do transluminador Gel Doc XR System (Bio Rad Laboratories, Inc.). Como padrão de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado “50 bp DNA ladder” (Promega®). O tamanho esperado do produto de cada um dos genes pesquisados está descrito no ANEXO X.

4.4.4 Reação de *Quellung*

A Reação de *Quellung* ou Neufeld é uma metodologia altamente sensível e específica para identificação dos sorotipos de pneumococos, baseada na reação antigênica de 91 dos 93 sorotipos capsulares pneumocócicos conhecidos. Os isolados cujo sorotipo não foi determinado pela reação de polimerase em cadeia – PCR Multiplex, foram submetidos a esta técnica no Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas/ Centro de Bacteriologia/ Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, Brasil.

A técnica consiste na reação de intumescimento capsular, na qual em uma lâmina de microscopia coloca-se uma gota de suspensão salina contendo a bactéria em fase log do crescimento e anti-soros específicos para as diferentes cápsulas do pneumococo. Como existem muitos sorotipos, são feitos pools de anti-soros para uma triagem inicial, onde são

utilizados soros adicionais específicos até identificação do sorotipo. Para o preparo do inóculo inicial, uma alça de um μL de células bacterianas cultivadas em placas de ágar sangue de carneiro a 5%, foi inoculada em tubo contendo 100 μL de caldo Todd-Hewitt suplementado ou não com extrato de levedo a 0,5% e com soro de cavalo a 1% (líquido em tubo) e incubada em banho-maria, a 35°-37°C por 4 a 8h ou em meio sólido por 14-18h, em estufa a 35°-37°C com 5% de CO₂. Após este período, foi preparada uma suspensão bacteriana sobre uma lâmina de vidro identificada com o número da amostra e distribuídas duas a três gotas (cerca de 4 μL) separadas entre si por cerca de dois cm. As gotas secas foram armazenadas a temperatura ambiente para posterior teste. Sobre as células bacterianas na lâmina foi adicionada uma alça de um μL de um antissoro de pneumococo. Antes de secar, foi adicionada uma alça de solução de azul de metileno a 0,3% e coberto com lamínula. A reação foi visualizada em microscópio ótico, com óleo de imersão e aumento de 1000X.

Quando os anticorpos homólogos contidos no antissoro se ligam ao polissacarídeo capsular das bactérias da preparação, ocorre uma imunoprecipitação *in situ*, que altera a refração da cápsula proporcionando a observação do intumescimento capsular. A célula bacteriana cora-se em azul escuro e fica envolta por um halo demarcado, que representa a borda externa da cápsula. A visualização desta reação é considerada como reação positiva. Foram utilizados os antissoros produzidos pelo Statens Serum Institute, Copenhague, Dinamarca e o algoritmo de sorotipagem disponibilizado pelo fabricante para interpretação dos resultados (SÃO PAULO, 2010; www.ssi.dk/ssidiagnostica) (ANEXO XI).

4.4.5 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

As amostras de *S. pneumoniae* foram submetidas aos testes de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de disco-difusão, seguindo os critérios de interpretação do CLSI (CLSI, 2012), para os seguintes antimicrobianos: oxacilina, cefotaxima, eritromicina, tetraciclina, levofloxacina e sulfametoxazol/trimetoprim (OXOID, Hampshire, Reino Unido). A partir de uma amostra bacteriana crescida em ágar sangue de carneiro a 35°-37°C com 5% de CO₂ por 18-24h, suspensões bacterianas foram preparadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL) em solução salina estéril. Posteriormente, essas suspensões foram semeadas em placas contendo meio de Mueller-Hinton (Difco), acrescido de 5% sangue de carneiro com o auxílio de *swabs* estéreis. Em seguida, os discos de papel filtro impregnados com os antimicrobianos a serem testados (OXOID, Hampshire, Reino Unido) foram aplicados sobre o meio de cultura. As culturas foram então incubadas a temperatura de 35°C, atmosfera

de 5% de CO₂ por um período de 18 a 24 horas. Após este período, foi realizada a leitura do diâmetro do halo de inibição em mm com auxílio de uma régua e os resultados foram interpretados conforme critérios definidos pelo CLSI, 2012. As cepas cujos halos tiveram diâmetro maior ou igual a 20 mm para o disco contendo oxacilina foram consideradas susceptíveis à penicilina e as que tiveram halos menores que 20 mm foram definidas como susceptibilidade diminuída à penicilina, sendo em seguida submetidas ao teste de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando fitas de E-test® de penicilina (2- 32 µg/mL) e cefotaxima (2 – 32 µg/mL) seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente para o método de disco-difusão. Após incubação, quando houve crescimento visível, o valor de CIM foi determinado como o ponto imediatamente acima da intersecção entre o halo de crescimento bacteriano e a fita de E-test®. A interpretação dos perfis de não-susceptibilidade à penicilina e cefotaxima foi baseada nos critérios definidos pelo CLSI, sendo considerados como não susceptíveis isolados que apresentaram valor de CIM de penicilina $\geq 0,125$ µg/mL e cefotaxima CIM ≥ 1 µg/mL (CLSI, 2012) (Anexos VII e VIII).

4.4.6 Tipagem Molecular

Todos os isolados confirmados como *Streptococcus pneumoniae* obtidos através de cultura foram caracterizados genotipicamente por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), onde fragmentos de DNA cromossômicos, gerados após digestão com a enzima *Sma*I (NewEngland, Biolabs®, EUA), foram preparados e analisados conforme descrito por Tenover e cols. (1995). Para realização da eletroforese, foi empregado o equipamento CHEF DR II System (Bio Rad Laboratories, Califórnia, EUA). As amostras de *S. pneumoniae* mantidas a -70° C passaram por dois cultivos consecutivos, o primeiro em ágar sangue a 35°C, por 18 horas em atmosfera de 5% de CO₂ e em seguida, com o auxílio de uma alça bacteriológica, em seguida uma alça de 1µL deste crescimento bacteriano foi inoculado em 5 mL de caldo TSB acrescido de 40% de soro de cavalo estéril acrescido de 40% de soro de cavalo e 5 gotas de solução de dextrose a 20%, por até três horas e trinta minutos em estufa com *shaker* a 37°C em aerobiose. A turvação foi medida em densitômetro e a densidade óptica ideal foi obtida entre 0,9-1. Um mL deste crescimento bacteriano foi coletado em microtubo de 1,5mL e centrifugado por 2min a 12000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e foi acrescentado o mesmo volume de solução PIV (NaCl 1M em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,6). O microtubo foi centrifugado a 12000 rpm por 2 min e o sobrenadante foi desprezado.

Este processo de lavagem e centrifugação foi repetido e iniciado o preparo dos plugs a partir do pellet bacteriano.

Em seguida, foram adicionados 300 μ L de agarose Low melting point (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA) a 2,0%, preparada em tampão PIV e mantida a 65°C. Após cuidadosa agitação, a suspensão foi dispensada nos moldes de blocos. Os blocos foram então incubados com 2 mL solução de lise (tampão EC) contendo 4 μ L mg/mL de lisozima (25mg/mL) e 5U/mL de mutanolisina a 37°C por 2 horas; e depois de duas lavagens consecutivas com TE (Tris 1M, pH 8,0; EDTA 0,5M pH 8,0) por trinta minutos, novamente incubadas em outra solução de lise (tampão ES) acrescido de 40 μ L de proteinase K (Sigma Aldrich, Germany) a 25 mg/mL a 56°C por 18 horas. Após a lise do DNA, os blocos foram incubados à temperatura ambiente sob leve homogeneização com 15 mL de tampão TE por duas horas para lavagem. As lavagens foram repetidas por mais oito vezes e depois mantidos a 4 °C até a digestão enzimática.

A digestão do DNA total foi realizada a partir de um bloco de agarose transferido para um tubo de polipropileno, contendo 304 μ L de uma solução preparada com 30 μ L de tampão 4 da enzima *Sma*I concentrado 10X, 3 μ L de BSA (soro albumina bovina) a 100 μ g/mL, 1 μ L de enzima *Sma*I (20U) e água DNase e RNase free, e mantido a 25°C por 18 horas. A seguir, a solução tampão/enzima foi removida e o bloco de agarose foi colocado na cavidade do gel de agarose a 1,2% em TBE. Os fragmentos de restrição foram separados num sistema de eletroforese em campo pulsado (CHEF DR II System; Bio Rad Laboratories), em TBE 0,5 Xa 14°C utilizando um tempo de pulso crescente de 1 a 20 segundos, por 19 horas a 6 volts/cm. Em cada gel foi utilizado um marcador externo de pares de bases de 50-1.000 Kb (Pulse Marker - Sigma), aplicado nas extremidades. Após eletroforese os géis foram corados com brometo de etídio (10mg/mL) e as imagens foram digitalizadas pelo sistema de captura de imagem Gel Doc XR System (Bio Rad Laboratories, Inc.) e arquivadas como imagens em arquivos do tipo TIFF.

A interpretação dos isolados geneticamente relacionados foi realizada com o auxílio do programa Gel Compar II (Applied Maths), empregando o coeficiente de Dice com tolerância de 1,5%. Uma amostragem de cada clone identificado pelo PFGE foi submetida à técnica de sequenciamento genético por *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) (ENRIGHT et al., 1998). Foram analisadas as sequências dos genes *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* e *ddl*, segundo protocolo disponível no site (<http://www.mlst.net>) com adaptações recomendadas pelo CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (<http://www.cdc.gov/streplab/alt-MLST-primers.html>).

A extração de DNA foi realizada com cultura de *S. pneumoniae* obtida após dois cultivos consecutivos em ágar sangue a 35°C, por 18 horas cada um, em atmosfera de 5% de CO₂. A partir deste crescimento, com o auxílio de uma alça bacteriológica, foi preparada uma suspensão de aproximadamente 10 colônias em 100µL de água estéril em microtubo de 200µL, a suspensão foi então mantida a 90°C por 10 minutos.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µL utilizando 12,5µL do kit *Taq* PCR Master Mix Kit (Qiagen, EUA), contendo tampão de *Taq* DNA polimerase, água ultrapura, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) e MgCl₂; foram adicionados 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciadora 70pmol (CDC, Atlanta, EUA) e 3,5 µL do DNA molde. As misturas de reação foram submetidas à amplificação que consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, seguido de 10 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos e seguidos novamente por nova desnaturação a 94 °C por 1 minuto seguido de 20 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos com 10 segundos de autoextensão e, posteriormente, um ciclo final de extensão a 72 °C por 10 minutos.

A visualização do produto amplificado foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE1X e após corrida eletroforética a 100 volts por aproximadamente 30 minutos, o gel foi corado com brometo de etídio para visualização do produto. A amplificação dos genes foi confirmada pela detecção dos fragmentos com os seguintes pesos moleculares: *aroE* – 405pb; *gdh* – 459pb; *gki* – 483pb; *recP* – 448pb; *spi* – 472; *xpt* – 486pb e *ddl* – 441pb. Os produtos de PCR foram purificados com a utilização do ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, EUA). Após purificação do produto de PCR, o DNA obtido foi quantificado por densidade ótica em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Wilmington, EUA). O sequenciamento de ambas as fitas de DNA foi realizado na Plataforma de Sequenciamento do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz, com a utilização do kit ABI PRISM Dye Terminator (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e do sequenciador automático modelo 3500xl (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram editadas e analisadas com o auxílio dos *softwares* disponíveis no *site* da web para pneumococos (<http://www.mlst.net>) e o programa BioEdit. As seqüências finais dos genes foram então submetidas à página “<http://spneumoniae.mlst.net/Databases>” para definição dos “sequence types” (STs), que foram obtidos automaticamente para alelos já conhecidos. As seqüências de novos alelos encontrados foram submetidas ao curador do banco de dados do MLST para designação de

um novo ST. Os STs obtidos foram comparados com aqueles depositados no banco de dados para identificação clonal com grupos que se disseminaram de outras áreas geográficas. Os clones foram estratificados e analisados conjuntamente com dados clínicos e epidemiológicos para identificar fatores relacionados à clonalidade das cepas. O banco de dados da rede internacional PMEN - Pneumococcal Molecular Epidemiology Network - criado em 1997, foi consultado para comparar os perfis clonais identificados no estudo com isolados resistentes dispersos globalmente. (<http://web1.sph.emory.edu/PMEN/index.html>). Para estimar as relações filogenéticas entre os isolados, o programa goeBURST Versão 1.2.1 foi usado (<http://goeburst.phyloviz.net>). goeBURST é uma aplicação java das regras propostas pelo algoritmo eBURST desenvolvido por Feil et al.(2004), que usa uma abordagem de matriz gráfica para estabelecer as relações entre os STs.

4.4.7 Análise de dados

As variáveis categóricas foram comparadas utilizando o teste exato de Fisher bicaudal. A avaliação de associação entre as variáveis selecionadas foi determinada pela medida do *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança (IC) de 95% considerando um nível de significância de $p < 0,05$. Análises univariadas e bivariadas foram utilizadas para definir os fatores de risco em relação à colonização por pneumococos, considerando o intervalo de confiança de 95%. O programa *Epi Info Windows* versão 3.5.3 (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, EUA) foi utilizado para criação e análise do banco de dados. O teste de McNemar foi utilizado para mensurar a exposição à vacina nas alterações na taxa de colonização antes e após o esquema vacinal primário. Para análise da probabilidade de colonização entre os dois grupos estudados foi utilizado o *software* R versão 3.1.2 (R Foundation for Statistical Computing), que estima a chance do indivíduo ser colonizado por sorotipo vacinal ou não vacinal nos períodos pré-vacinal (1ª coleta) e após a terceira dose da vacina decavalente (4ª coleta). A probabilidade de um indivíduo ser colonizado por sorotipo vacinal ou não vacinal nestes períodos foi demonstrada por meio de gráficos, separando a *priori* o grupo de indivíduos entre aqueles que no período pré-vacinal tinham menos ou mais de três meses.

4.4.8 Aspectos éticos

A pesquisa foi conduzida de acordo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 466 de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde do Brasil, por se tratar de um estudo envolvendo seres humanos mediante a aprovação do comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (CEP-HUPES) e de anuência da Secretaria Municipal de Saúde, Salvador-Bahia (Anexos I, II e III). Todos os pais ou responsáveis legais pelas crianças que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo IV). As informações obtidas foram utilizadas com fins científicos, sendo assegurados a confidencialidade e sigilo dos dados. As medidas necessárias para preservar o sigilo e segurança dos dados coletados foram adotadas pelos pesquisadores responsáveis pelo estudo.

4.5 ARTIGO

Este artigo contempla os objetivos da tese que foram determinar o efeito da vacina conjugada pneumocócica 10-valente na colonização nasofaríngea por pneumococos em crianças menores que um ano, saudáveis e que apresentaram doença crônica ou desordem imunológica antes e após receberem as doses do esquema vacinal primário. Neste trabalho identificamos os principais sorotipos envolvidos em eventos de colonização durante as etapas do esquema vacinal primário, investigamos co-colonização por sorotipos de pneumococos, determinamos o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados identificados e investigamos a presença de clones de dispersão internacional entre os pneumococos isolados de nasofaringe. A evidência do declínio dos sorotipos vacinais e emergência dos sorotipos não vacinais identificados no estudo são importantes para avaliação da efetividade da vacina no Brasil.

SANTOS, M.S.^a; BRANDILEONE, MCC^b; ANDRADE, J^c; MENEZES, A.P.O^d; REIS, J.N.^{e,*} and Pneumococcal study group¹

Effect of pneumococcal conjugate vaccine 10-valent on nasopharyngeal carriage in Brazilian children.

.

Effect of pneumococcal conjugate vaccine 10-valent on nasopharyngeal carriage in Brazilian children.

Running title: Pneumococcal carriage after PCV10

Santos, M.S.^a; Brandileone, MCC^b; Andrade, J^c; Menezes, A.P.O^d; Reis, J.N.^{e,*} and
Pneumococcal study group¹

^aInstituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, 45029-094, Brazil.

^bAdolfo Lutz Institute, Secretary of Health for the State of São Paulo, São Paulo, Brazil;

^cFaculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 40110-902, Brazil.

^dUniversidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, Bahia, 45206-190, Brazil.

^eFaculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 40170-115, Brazil.

*Correspondent author: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas,

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170115 Salvador, BA, Brazil.

Tel.: +55 71 32836934.

¹Pneumococcal study group include: Moraes, RA^e; Lima, VS^e; Azevedo J^f; Silva MS^f; Reis, MG^f

^fCentro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz/ Ministério da Saúde. Salvador, Bahia, 40296-710, Brazil.

Email addresses:

MSS: milenasoaes25@hotmail.com

MCCB: brandi@ial.sp.gov.br

JA: jacy@ufba.br

APOM: apomenezes2@hotmail.com

JNR: joice@ufba.br

RAM: rai.pharma@hotmail.com

VSL: vs-lima@hotmail.com

JA: jailtinho@yahoo.com.br

MSS: maira.s.s@hotmail.com

MGR: miter@bahia.fiocruz.br

ABSTRACT

Changes in nasopharyngeal colonization with pneumococcal serotypes were studied in young children with and without chronic illnesses during vaccination with three doses of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV10). A total of 97 children were enrolled, 40 with chronic diseases (Group I) and 57 of the group of healthy children (Group II). Overall the pneumococcal colonization rate ranged 6% to 27%. Penicillin nonsusceptibility was identified in 19% of the isolates. The most frequently serotypes identified were: 11A/11D (14%), 6A/6B (11%), 23F and 15B/15C (7%; each) and nontypeable strains (29%). Risk factors for pneumococcal carriage were not significant considering all children in the study (Groups I and II). After third dose of PCV-10 carriage of VT remained unchanged (4% vs. 6%), whereas carriage of NVT increased slightly (2% vs. 21%). The findings highlight the emergence of nontypeable strains following PCV10 use.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; pneumococcal vaccines; pneumococcal carriage.

BACKGROUND

Streptococcus pneumoniae is a commensal pathogen the nasopharyngeal mucosa and the colonization is a requisite for the development of pneumococcal disease [1]. This pathogen is responsible for high rates of invasive disease (70-80%), especially in populous countries and areas in economic development as well as high rates of infant morbidity and mortality, where over 1 million children under five years, evolving to death each year [2].

Immunization with pneumococcal conjugate vaccine (PCV) is a public health strategy for prevention of pneumococcal diseases designed to prevent colonization with vaccine types and protect against the serotypes that causes the majority of IPD in reducing mortality and morbidity [6]. PCVs are based on polysaccharide capsule, with distinct antigenicity that ranks 94 serotypes [3,4]. The PCVs have been used since 2000, when the 7-valent vaccine (PCV7) was licensed in the United States for routine use in children [5]. The PCV7 was replaced by pneumococcal conjugate vaccine 13-valent (PCV13) in several countries [6]. Ho et al. (2015) observed the changes in pneumococcal carriage and serotype distribution of nasopharyngeal isolates that overall carriage declined and was due mainly to a loss of PCV7 serotypes and at the same time, there was replacement with non-vaccine serotypes as an increase in several PCV13-nonPCV7 (6A and 19A) and nonPCV13 serogroup/serotypes among children and the incidences of 6A, 19A and 6C have declined or stabilized following a switch to PCV13 for routine use [30]. Brazil introduced the pneumococcal conjugate vaccine 7-valent (PCV7) among children with chronic diseases or immune disorder since 2006, changed from PCV7 to PCV10 10-valent (PCV10), implemented into the childhood immunization program to children less than 2 years old since March 2010 by the Brazilian Ministry of Health [7]. This vaccine includes the serotypes (1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F) conjugated to protein D from *Haemophilus influenzae* for eight of its serotypes and carriers of diphtheria toxoid and tetanus toxoid used for two serotypes while the vaccine PCV13 includes more three

serotypes (3, 6A and 19A) [6]. Soon after the implementation of PCV10 in Brazil in October 2011, the average vaccination coverage reached 80% for a complete primary series in children younger than 12 months old, in more than 5,000 municipalities [8].

Few studies report the prevalence of pneumococcal carriage among patients with chronic diseases or immune disorders. Through this work, we propose to determine the effect of PCV10 in nasopharyngeal pneumococcal carriage in children less than one year, healthy and who had chronic disease or immune disorder in the primary vaccination schedule of pneumococcal conjugate vaccine 10-valent and characterize the isolates obtained from these individuals.

MATERIAL AND METHODS

A dynamic cohort conducted between May 2011 and January 2014 in Salvador, Brazil with an estimated population of 2,883,672 inhabitants [9]. Reference center for special immunobiologicals (CRIE), which provides government-financed vaccines indicated for children with chronic medical conditions, unit of the Federal University of Bahia and the Office of Health of the 16th Health District were selected as study local. Children aged six weeks and less than 12 months eligible to receive at least two doses of PCV10 were invited for the colonization of study following the primary vaccination schedule proposed by the BMoH. Children aged 12 and 24 months were not selected for study, as only receive a single dose and would not be followed after a primary immunization schedule. Clinical and demographic information of individuals were obtained at the time of vaccination through interviews conducted by the study team with guardians from the information recorded in CRIE medical records or the registries of health facility 16 health district of Liberty as epidemiological questionnaires.

Nasopharyngeal secretions were collected with thin and flexible swabs (Calgiswab type 1, Spectrum, USA) from subjects at each visit to receive PCV10 vaccine being collected four swabs before the first dose of the vaccine and the months of administration of subsequent doses of the primary vaccination schedule consists of a standard three-dose primary series (at 2, 4 and 6 months of age) and a booster dose at age 12–15 months (collections 2, 3 and 4). The swabs were inoculated in transport (STGG - Skim Milk, TSB, glycerol and glucose; BD™) according to the protocol established by the Streptococcus Laboratory Protocols (CDC, Atlanta, USA)[10]. Pneumococcal strains were identified by standard methods. The disk diffusion and E-test methods was performed according to Clinical and Laboratory Standard Institute (2012) recommendations to determine the susceptibility of the isolates to penicillin, cefotaxime, erythromycin, levofloxacin, tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole (Oxoid™, UK). All isolates with MIC value ≥ 0.12 $\mu\text{g/mL}$ were defined as pneumococcal nonsusceptible to penicillin. The capsular serotypes were deduced using multiplex-PCR as described elsewhere[11] and according to the recommendations of the CDC (CDC, USA). Negative isolates or equivocal multiplex PCR results were subjected to Quellung reaction testing for capsular type definition at the Adolfo Lutz Institute, Brazil using antiserum Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark. Negative cultures were submitted to detection by Real Time PCR targeting *lytA* gene according to Carvalho et al. [12].

Categorical variables were compared using the Fisher exact test two-tailed. The assessment of association between selected variables was determined by measuring the odds ratio (OR) and confidence intervals (CI 95%) considering a significance level of $p < 0.05$. Univariate and bivariate analyzes were used to define the risk factors to carriage pneumococci. The Epi Info Windows software version 3.5.3 (CDC, Atlanta, Georgia, USA) was used for the creation and analysis of the database.

The study was approved by the ethics committee in research of the University Hospital Professor Edgar Santos (CEP-HUPES) and approval of the Municipal Health Department, Salvador-Bahia. All legal guardians enrolled in the study according to informed consent written prior to enrolling in the study.

RESULTS

A total of 168 children were involved in this study. Of these, 97 children complete the vaccination schedule with fourth session and were available to after the last shot, 95/97 (98%) were aged between 2 and 6 months and 2/97 (2%) were aged between 7 and 11 months. According demographic characteristics, 49% (48/97) were male; 80% (78/97) were identified as African ancestry and 97% (94/97) were residents in the city of Salvador, Bahia or the metropolitan area. Children were stratified into two groups: Group I (n = 40) when comorbidities children were included (underlying disease or immune disorder) and Group II (n = 57), in which the healthy children were included. Children in group I were carriers of the following underlying diseases or immune status: exposure to HIV (60%; 24/40), disabling neurological disease (15%; 6/40), cardiovascular disease (5%; 2/40), hemoglobinopathies (2%; 1/40), prematurity and low birth weight (2%; 1/40), gastroschisis (2%; 1/40) obstruction of the urinary tract (2%; 1/40), bilateral hydro-nephrosis (2%; 1/40) and hydrocephalus (2%; 1/40). No child attended day care center (Data not shown). The proportion of children colonized by pneumococci at baseline was 6% (6/97). If considered only children with underlying diseases or immune disorders, the carriage rate was 7% (3/40) and for healthy ones was 5% (3/57). The overall rate of pneumococcal carriage after each dose of PCV10 was 19% (10/53) [OR = 0.28; CI95% (0.08 to 0.92); p = 0.02], 24% (10/42) [OR=0.21; CI95% 0.06 to 0.70; p=0.02] and 27% (26/97) [OR=0.25; CI95% 0.09 to 0.67; p=0.001], comparing unvaccinated and after the 1st, 2nd and 3rd dose of PCV10 vaccine,

respectively. After the 3rd dose of PCV10, the rate of children colonized with non-vaccine serotypes (NVT) were higher than those colonized by vaccine serotype (VT) while these were stable after third dose (Table 1). Risk factors for pneumococcal carriage were not identified considering all children in the study (Groups I and II). The serotypes from non-vaccine children were non-typeable (NT) strains, 6A/6B, 14, 19F, 23A and 23F (17% each; 1/6) (Figure 1). After the 3rd dose of vaccine, 26 children (27%; 26/97) were colonized by pneumococci, seven were colonized by the VT: 6A/B (n = 3), 19F (n = 1), 23F (n = 2) and 14 (n = 1); one of these children were co-colonized by NVT: NT and 14 (n = 1) in children with comorbidity. Colonization by NVT or NT was identified in 19 children: 11A / 11D (n = 4), 15B / 15C (n = 2); 23B (n = 1); 15A / 15F (n = 1); 6C (n = 1); 7C (n = 1); 16F (n = 1); 13 (n = 1); 23A (n = 1) and NT (n = 8). In this time, one child was colonized by two non-vaccine serotypes simultaneously being 23A and 15A/15F (n = 1) in a child with comorbidity. After the third dose of PCV10, 27% (7/26) of children remained colonized with serotypes 14, 6A/6B, 19F and 23F. Other serotypes identified in post-primary vaccination schedule were: 6C, 7C, 11A/11D, 13, 15B/15C, 23B, 16F, 15A/15F (69%, 18/26) and NT strain (31%, 8/26). Serotypes 6C, 11A / 11D, 15A/15F, 16F and 23B were identified only after the primary vaccination schedule (data not shown).

We obtained 32 strains available (from unvaccinated and after 3rd dose of vaccine) to antimicrobial susceptibility. We identified total antimicrobial susceptibility to levofloxacin and cefotaxime. Non-susceptibility to penicillin (PNSP) was 19% (6/32), to tetracycline and erythromycin were 9% (3/32; each) and to trimethoprim/sulfamethoxazole was 41% (13/32). PNSP was identified in VT: 23F (2/32), NVT: NT (4/32) (Data not shown).

DISCUSSION

This study reflects the effect of vaccination program strategically implemented in Salvador, Brazil. Although the rate of carriage in this population has been stable (24% vs. 26%), the introduction of PCV10 in the immunization schedule modified the pneumococcal serotype carriage in children at Salvador, Bahia. Colonization rates in healthy children less than 5 years of age ranged from 20% to 93% in low income countries and were generally higher than reported in lower-middle income countries [13]. In children with hemoglobinopathies or exposure to HIV, this rate may be lower due to the recommended chemoprophylaxis with penicillin and sulfamethoxazole/trimethoprim, respectively [14]. Alexander et al. [15] demonstrated the effect of PCV7 in pneumococcal carriage that reduced from 21% to 9% among children less than two years having hemoglobinopathies. In this study, children with comorbidities the overall carriage rate was 28% and 33% with hemoglobinopathies, as high as the rate found in Uganda (33%) [16] and greater than those reported in the study with healthy children not vaccinated in England (21%), Turkey (22.5%) and São Paulo, Brazil (13.3%) [16, 17, 18]. Although it was found important proportion of HIV-exposed, it has been published in the literature very high rates ranging from 56% - 76% among children aged 6 weeks to 6 months exposed to HIV [19] and 81% among children and adolescents of 1-14 years [20].

After the 3rd dose of vaccine, there was a slight increase in the rate of colonization by VT (4% to 6%), increase of colonization rate by NVT (2% to 21%) and highlighted to emergency of NT strains. Pneumococcus is known to be able to change of capsular polysaccharide capsule by gene recombination between clones. This is likely to be one of the mechanisms by which identification of serotypes is not typified, and require the use of more robust and expensive techniques [15]. The chemoprophylaxis used by children in the group I may have favored the emergence of these resistant strains [21,22].

The most common characteristics related with pneumococcal colonization in this study (living with children aged \leq six years, where cohabit with other young children) were also found in published studies in Taiwan [23] and the USA [24] reinforcing our findings. Other factors such as low socioeconomic status of the study population and overcrowding may have contributed to the prevalence rate in this work. Another study conducted in Brazil also reported similar results [25].

In this study there was no significant association between the previous use of antimicrobials, living with smoking, living in crowded and the colonization rate, independent of the study group. Many studies conducted in kindergartens, are not comparable to this, considering that no child attended day care or school during the study period. Probably the sample size has harmed some statistical inferences because many studies show an association between these risk factors and pneumococcal colonization [18, 25, 26, 27].

Antimicrobial resistance among *S. pneumoniae* strains is an increasing problem throughout the world. Recommendations for antimicrobial prophylaxis may influence the susceptibility profile of this pathogen and its spread in the community and nosocomial environment.

Our results are similar to results found in children in Turkey where 6.8% of the isolates were highly resistant and 8.4% were moderately resistant to penicillin [19], but differ from the study results conducted in Italy, a year after implementation of PCV13 identified no high susceptibility to penicillin (30.9%) and erythromycin (42.3%) being even higher among isolates of non-vaccine serotypes (75.4% penicillin and 70, 8% erythromycin) [27]. Studies carried out in Brazil reported high rates of non-susceptibility to penicillin and ceftriaxone, 42.8% and 18.6%, respectively, of isolates from patients with IPD [28] and in children was pre-PCV10, 27.3% susceptibility to penicillin and clindamycin, levofloxacin, rifampin and vancomycin and the largest non-susceptibility rate was observed to trimethoprim-sulfamethoxazole (51.2%), which is similar to data from this study [25].

Despite the strong association of PNSP with VT, especially serotype 23F, not susceptible to penicillin was also found between serotypes 15B/15C and between NT strains. This association of non-susceptibility to penicillin and other non typable strains have been found in other serotypes, such as 3, 6C, 18C and 10A [25, 29].

Study limitations

Many children included in the study could not be followed because the steps were lost during follow-up because was great difficulty in contacting them due to inconsistencies of the information transferred at the time of the interview, as non-existent phone number and outdated addresses and the complexity of access to many households it was impossible to locate children, as they were in neighborhoods most at risk of violence and little public security structure. Thus, the analysis of the fluctuation of colonization rate during vaccination steps was impaired and the small sample did not favor to us to find statistically significant associations. For this reason, the burden of pneumococcal nasopharyngeal colonization may have been underestimated, mainly in the group without comorbidities.

CONCLUSIONS

Our findings evidence that the effects of PCV10 in children with and without comorbidities were similar in both groups. Although this study was not evaluated the effect of PCV10 after the 4th dose of the vaccine, we emphasize the importance of booster immunization schedule maintenance in the national program of immunizations for the protection offered by the vaccine serotypes is achieved. Epidemiological studies on the effect of PCV10 should continue to monitor the rate of colonization by pneumococcal serotypes circulating in the post-vaccine period, as well as non-antimicrobial susceptibility rates, which are essential for

targeting public health strategies for managing clinical and prevention of pneumococcal diseases.

Acknowledgments

We thank the children, their families and the Reference Special Immunobiological Center (CRIE) and Municipal Health Center staffs. We especially thank Maria Aparecida Brasileiro, Maria de Fátima Mota, Nilza Pereira de Oliveira, Alice Moreira Nunes e Lizete Martins de Almeida for their help during nasopharyngeal swabs collected. Camila Souza, Mariela Leite and Alana Campos thanks for the nasopharyngeal swabs collection and for their participation in data collection and processing. We also thank Soraia Machado Cordeiro and Silvana Paz for advice during laboratory analysis. We thank all the legal community members in Salvador who participated in the study.

This work was supported by grants from the Brazilian National Research Council (482755/2010-5), the Bahia State Foundation for the support of research (PP-SUS0001/2009).

Authors Contributions

Conceived and designed the experiments: JNR, MSS. Performed the experiments: MSS, APOM. Collect the samples: MSS, APOM, JA, JNR. Analyzed the data: MSS, APOM, MCCB, JA. Contributed reagents/materials/analysis tools: JNR, MCCB, JA. Wrote the paper: MSS, JNR, APOM, MCCB, JA. Reviewed and revised the final version of the manuscript: All authors.

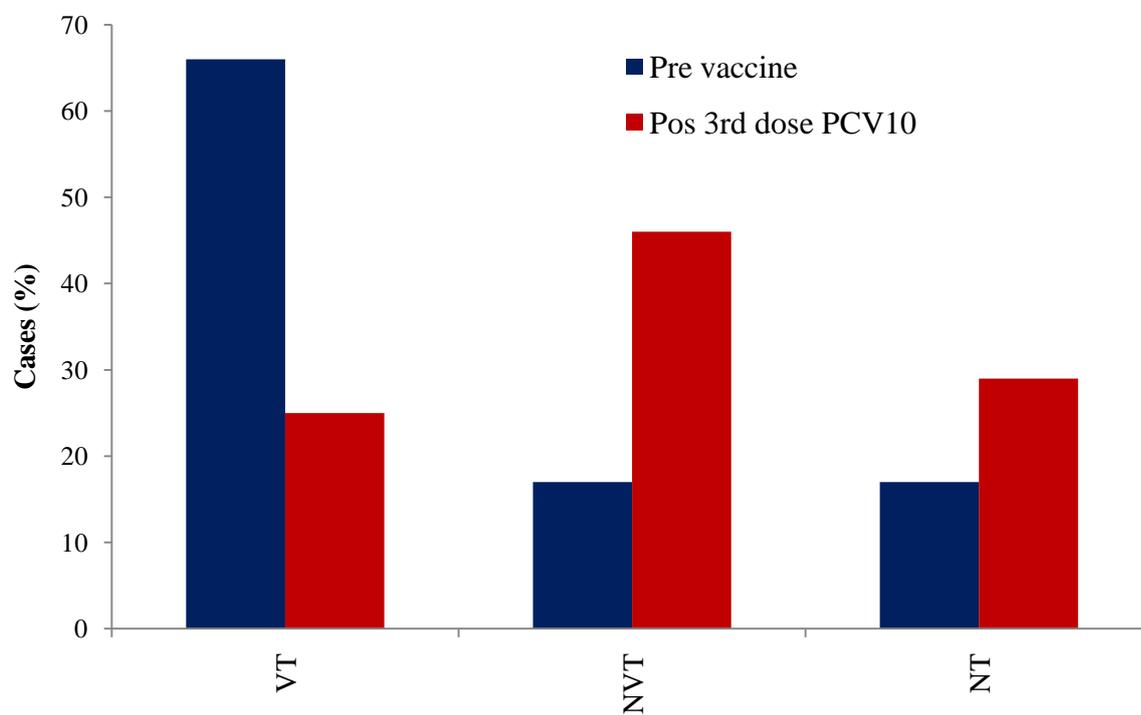
Conflict of interest statement: The authors do not have any commercial or other association that might pose a conflict of interest.

Table 1 Pneumococci nasopharyngeal colonization rate in children during the primary vaccination course

PCV10 Dose Groups	Zero N(%)			1st Dose N(%)			2nd Dose N(%)			3rd Dose N(%)		
	I	II	I + II	I	II	I + II	I	II	I + II	I	II	I + II
Carriage	3 (7)	3 (5)	6 (6)	2 (8)	8 (27)	10 (19)	4 (26)	6(22)	10 (24)	11 (27)	15 (26)	26 (27)
VT	2 (5)	2 (3)	4 (4)	1 (4)	0 (0)	1 (2)	2 (13)	2 (7)	4 (9)	3(7)	3 (5)	6 (6)
NVT	1 (2)	1 (2)	2 (2)	1 (4)	8 (27)	9 (17)	2 (13)	4 (15)	6 (15)	8 (20)	12 (21)	20 (21)
Not carriage	37 (93)	54 (95)	91 (94)	21 (92)	22 (73)	43 (81)	11 (74)	21(78)	32 (76)	29 (73)	42 (74)	71 (73)
Total	40	57	97	23	30	53	15	27	42	40	57	97

Note: Groups I- children with underlying diseases or immune disorders; Group II- healthy children; VT - PCV10 vaccine type; NVT- non PCV10 vaccine type. Serotypes nontypeable were included in NVT group. Serotype 6A/6B and serogroup 18 were included as VT group.

Figure 1 Distribution of serotypes among pneumococcal carriage isolates before PCV10 vaccination and after third dose of PCV10 (n = 32 patients).



Note: VT -Vaccine types include serotypes 6A/6B, 14, 19F and 23F; NVT - Nonvaccine type include serotypes 6C, 7C, 11A/11D, 13, 15A/15F, 15B/15C, 16F, 23A and 23B; NT = Non typable strain

REFERENCES

- 1 Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, et al. Colonization by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet*. 2004; 363:1871-1872.
- 2 WHO. World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization. *Weekly epidemiological record*. 2007; 12 (82): 93-104 Available at: <http://www.who.int/wer>. Accessed Feb 11, 2016.
- 3 Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med*. 2003; 348:1737-46.
- 4 Bratcher PE, Kim KH, Kang JH, et al. Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6D by genetic, biochemical and serological characterization. *Microbiology*. 2010; 156: 555-60.
- 5 Reinert R, Jacobs MR, Kaplan SL. Pneumococcal disease caused by serotype 19A: Review of the literature and implications for future vaccine development. *Vaccine*. 2010; 28 4249–4259.
- 6 Jefferies JM, Macdonald E, Faust SN, et al. 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13). *Hum Vaccin*. 2011; 7(10):1012-8.
- 7 BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais. Brasília. 2014; 4ª edição.
- 8 Afonso ET, Minamisava R, Bierrenbach AL, et al. Effect of 10-valent pneumococcal vaccine on pneumonia among children, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19(4):589-97.
- 9 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Population Census. 2010. Available at: <http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>. Accessed Feb 11, 2016.
- 10 Center Diseases Control and Prevention (CDC). Streptococcus laboratory Procedures. PCR Deduction of Pneumococcal Serotypes. Available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm> and <http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html> Accessed Feb 11, 2016.
- 11 Carvalho M da G, Pimenta FC, Jackson D, et al. Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. *J Clin Microbiol* 2010; 48(5):1611-1618.
- 12 Carvalho M da G, Pimenta FC, Gertz RE, et al. PCR-based quantitation and clonal diversity of the current prevalent invasive serogroup 6 pneumococcal serotype, 6C, in the United States in 1999 and 2006 to 2007. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(3):554-559.

- 13 Adegbola RA, De Antonio R, Hill PC, et al. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and Other Respiratory Bacterial Pathogens in Low and Lower-Middle Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One*. 2014; 9 (8).
- 14 Gill CJ, Mwanakasale V, Fox MP, et al. Effect of presumptive co-trimoxazole prophylaxis on pneumococcal colonization rates, seroepidemiology and antibiotic resistance in Zambian infants: a longitudinal cohort study. *Bulletin of the World Health Organization*. 2008; 86 (12), 929–938.
- 15 Alexander E, Telfer P, Rashid H, et al. Nasopharyngeal carriage rate of *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease before and after the introduction of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Journal of Infection and Public Health*. 2008; 1, 40-44.
- 16 Kateete DP, Kajumbula H, Kaddu-Mulindwa DH, et al. Nasopharyngeal carriage rate of *Streptococcus pneumoniae* in Ugandan children with sickle cell disease. *BMC Research Notes*. 2012; 5:28.
- 17 Fonseca PB, Braga JA, Machado AM, et al. Nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease receiving prophylactic penicillin. *J Pediatr*. 2005; 81(2):149-54.
- 18 Ozdemir B, Beyazova U, Camurdan AD, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy Turkish infants. *Journal of Infection*. 2008; 56:332-339.
- 19 Kinabo GD, van der Ven A, Msuya L J, et al. Dynamics of nasopharyngeal bacterial colonization in HIV-exposed young infants in Tanzania. *Tropical Medicine and International Health*. 2013; 18 (3):286–295.
- 20 Anthony L, Meehan A, Amos B, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*: prevalence and risk factors in HIV-positive children in Tanzania. *Int J Infect Dis*. 2012; 16(10): e753-7. 2012.
- 21 Pai VB, Heyneman CA, Erramouspe J. Conjugated heptavalent pneumococcal vaccine. *Ann Pharmacother*. 2002; 36:1403-13.
- 22 Martens P, Worm SW, Lundgren B, et al. Serotype-specific mortality from invasive *Streptococcus pneumoniae* disease revisited. *BMC Infect Dis*. 2004; 4:21.
- 23 Hsieh YC, Chiu CH, Chang KY, et al. The impact of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on risk factors for *Streptococcus pneumoniae* carriage in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2012; 31:e163-e168.
- 24 Wroe PC, Lee GM, Finkelstein JA, et al. Pneumococcal carriage and antibiotic resistance in young children before 13-valent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2012; 31:249-254.
- 25 Neves FP, Pinto TC, Corrêa MA, et al. Nasopharyngeal carriage, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children from Brazil before the introduction of the 10-valent conjugate vaccine. *BMC Infect Dis*. 2013; 13:13:318.

- 26 Reis JN, Palma T, Ribeiro GS, et al. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an urban slum community. *J Infect.* 2008; 57:204-13.
- 27 Camilli R, Daprai L, Cavrini F, et al. Pneumococcal Carriage in Young Children One Year after Introduction of the 13-Valent Conjugate Vaccine in Italy. 2013; 8(10):e7630. 2013.
- 28 Caierão J, Hawkins P, Sant'anna FH, et al. Serotypes and Genotypes of Invasive *Streptococcus pneumoniae* Before and After PCV10 Implementation in Southern Brazil. *PloSOne.* 2014; 9 (10). e111129
- 29 Sá-Leão R, Nunes S, Brito-Avô A, et al. Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15(11):1002-7.
- 30 Ho PL, Chiu SS, Lawa PY, et al. Increase in the nasopharyngeal carriage of non-vaccine serogroup 15 *Streptococcus pneumoniae* after introduction of children pneumococcal conjugate vaccination in Hong Kong. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2015; 81: 145–148.

5 RESULTADOS ADICIONAIS

Perfil genotípico dos isolados

Um total de 48 isolados foi disponível para genotipificação referentes à 1^a (n=23) e 4^a (n=25) coletas. Estes foram caracterizados em 39 perfis eletroforéticos através da análise por PFGE. Foram classificados 26 isolados em nove grupos com dois ou mais isolados, e os outros 24 isolados foram classificados em perfis eletroforéticos únicos, sendo isolados não clonais. Cinco dos grupos clonais mais prevalentes foram: o clone B (B1,B3) representado pelo sorotipo 19F (3/48; 6%), os clones L (L1,L2) (2/48; 4%) e M (M1,M2) (2/48; 4%) ambos sorotipo 23F, o clone C (C1, C2), sorotipo 15B/15C (3/48; 6%) e clone AC1, sorotipo 23B (2/48; 4%) (Figura 2).

Dezoito isolados, representando os nove grupos clonais identificados por PFGE, foram selecionados para análise pela técnica de MLST. Foram identificados os seguintes ST's: ST177 Clone B - sorotipo 19F (4/48; 8%), ST338, Clone M - sorotipo 23F (4/48; 8%), ST766, clone C - sorotipo 15B/15C (3/48; 6%), ST SLV727, Clone AC -sorotipo 23B (2/48; 4%), ST62 sorotipo 11A/11D (2/48; 4%), ST408 sorotipo 11A/11D (1/48; 2%), ST SLV42 sorotipo 23A (1/48; 2%) e ST73 sorotipo 15A/15F (1/48; 2%). O ST SLV42 esteve presente apenas no período pré-vacinal, os ST's 177, 766 e 338 estiveram presentes em ambos os períodos pré e pós-esquema vacinal primário, enquanto que os ST's 62, 73, 408 e 727 foram identificados somente no período pós-vacinal. (Figura 2).

Caracterização genotípica (Comparação com Clones Internacionais)

Os isolados caracterizados em padrões clonais por MLST (n=17/48; 35,4%) foram agrupados quanto ao parentesco filogenético e relacionados com os dados dos 43 clones relacionados com alto nível de resistência antimicrobiana da rede internacional PMEN. Os Tipos de Sequências (ST's) foram analisados e classificados em quatro grupos principais, considerando critério de relação de até três *locus* de similaridade (TLV- *Triple Locus Variant*).

Quatro sub-grupos foram formados por 13 ST's e dois ST's ficaram isolados. Oito ST's foram dos isolados do estudo e sete ST's foram inseridos na análise como clones da rede PMEN. A análise filogenética dos isolados revelou que houve ligação entre os ST's fundadores de dispersão internacional ST67 -Tennessee¹⁴ -18 com o ST do estudo ST73; o ST173 - Polônia 23F-¹⁶ e o ST268 - Hungria^{19A}-6 com os ST's encontrados no estudo: ST338 - Colômbia^{23F}-26 e o ST75- S. África^{19A}-7; o ST62 foi relacionado com o ST408, o ST53-

Holanda⁸-33 e o ST63 - Suíça^{15A}-25; o ST727 foi relacionado com os clones ST37-Tennessee^{23F}-4 e ST42.

Os três grupos mais prevalentes foram: ST338- Colômbia^{23F}-26 (4/48; 8%), o ST177-Portugal^{19F}-21(3/48; 6%) ambos os clones de dispersão mundial e o ST766 (3/48; 6%) estes dois últimos não apresentaram relação filogenética entre os isolados deste estudo nem entre os clones da rede PMEN (Figura 3).

Este estudo é um dos primeiros a caracterizar isolados de colonização nasofaríngea pneumocócica no Brasil após implementação da PCV10 por sorotipo, PFGE e ST. Embora o número de isolados obtidos tenha sido relativamente pequeno (n=48), todos foram caracterizados por PFGE e isolados representativos foram selecionados para MLST (n=17). Desta forma, podemos demonstrar a presença de ST anteriormente não declarados como circulando na entre indivíduos sadios e portadores de comorbidades em Salvador, Bahia.

Foram definidos grupos e sub-grupos a partir dos perfis caracterizados por PFGE e quinze ST's foram identificados, sendo mapeados nos principais grandes complexos clonais quando analisado por eBURSTo que demonstrou que os clones prevalentes no mundo também estão representados em nosso conjunto de dados.

Os ST's identificados (ST42, ST62, ST78, ST177, ST338, ST408, ST727 e ST766) representaram diversidade genética, semelhante a alguns trabalhos publicados (CAIERÃO et al., 2014; MUÑOZ-ALMAGRO et al., 2011). Os sorotipos PCV10 associados com um ST foram os sorotipos 19F (ST177) e 23F (ST338) e os não associados a PCV10 foram os seguintes: 11A/11D (ST62 e ST408), 15A/15F (ST73), 15B/15C (ST766), 23A (ST42) e 23B (ST727).

Identificamos similaridade entre os clones de dispersão internacional ST67 -Tennessee¹⁴-18 com o ST do estudo ST73; o ST173 - Polônia^{23F}-16 e o ST268 - Hungria^{19A}- 6 com os ST's encontrados no estudo: ST338 - Colômbia^{23F}-26 e o ST75- S.Africa^{19A}-7 que são clones caracterizados de isolados invasivos. O ST62 foi relacionado com o ST408 e os clones ST53- Holanda⁸-33 e ST63 - Suíça^{15A}- 25. Os dois grupos mais prevalentes foram: ST338 - Colômbia^{23F}-26 (4/50; 8%) relacionado com os ST268 - Hungria^{19A}- 6 e o ST177 - Portugal^{19F}- 21 (4/50; 8%) ambos clones de dispersão mundial

Os ST's mais prevalentes tem ampla dispersão mundial. O ST177 corresponde ao clone Portugal 19F²¹ que foi primeiramente identificado em 1996 isolado de líquido cefalorraquidiano. Estudos prospectivos mostram que foi isolado também de outros fluidos biológicos como escarro, sangue e nasofaringe demonstrando ser um perfil genotípico que circula tanto em estado de portador quanto causando doença invasiva (PubMLST, s.d.). Já o

ST338 corresponde ao clone Colômbia 23F²⁶, foi primeiro isolado neste país em 1995, de sangue, caracterizado por não susceptibilidade à penicilina, de grande dispersão mundial. Depois, circulou em vários países como Noruega, Portugal, França, Estados Unidos e Brasil. Identificamos em nosso estudo quatro isolados com este perfil genotípico, que embora não tenham sido cepas não susceptíveis, carregam material de mesma origem genética. Este ST tem sido caracterizado em muitos estudos por apresentar mais de um sorotipo capsular além do sorotipo 23F, como os sorotipos 23A, 19A e 6C (PubMLST, s.d.). Outro perfil encontrado foi o clone ST37 –Tennessee^{23F}-4, de dispersão mundial e altamente relacionado com resistência antimicrobiana (SCHRAG et al., 2001) que nos chama atenção para a importância da associação deste perfil com o ST 727 encontrado nos isolados dos portadores na comunidade.

O ST766 (3/50; 6%) embora esteja entre os mais prevalentes não apresenta relação filogenética entre os isolados deste estudo ou entre os clones da rede PMEN. Este ST foi reportado em 1998 no Rio de Janeiro, região sudeste do Brasil, e posteriormente no ano de 2006, na Bahia, região nordeste. Em ambos os casos, foi identificado como sorotipo 15B de indivíduos que adquiriram o patógeno na comunidade (PUBMLST, s.d.). Este ST, assim como o ST's 727, também tem registro no banco de dados do pubmlst, foi isolado de indivíduo da comunidade, porém associado a outros sorotipos, 23B e cepa NT. Embora não tenham sido encontradas publicações na literatura que relatem a circulação deste ST associado à doença invasiva, podemos observar que estes clones circulam em nosso meio.

Os dados de PFGE comparados com os da análise genotípica dos períodos pré- e pós-esquema primário vacinal mostram que após 3 doses da vacina PCV10 alguns clones permanecem (ST766 e ST338) ou surgem (ST62, ST408, ST73 e ST727) colonizando a nasofaringe de crianças menores que dois anos, independente da sua condição clínica.

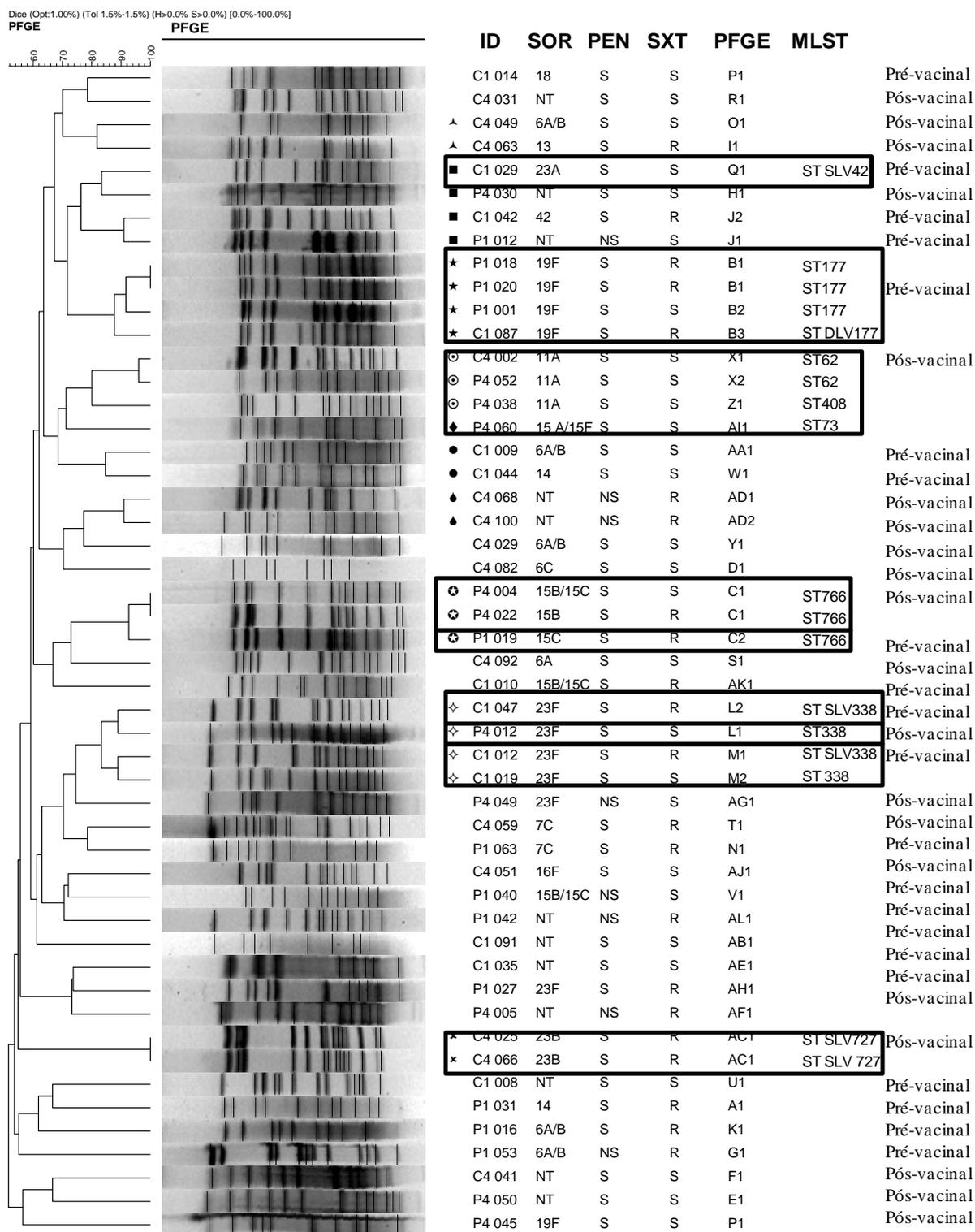


Figura 2. Dendrograma (Relação genética) e padrão de PFGE de pneumococos isolados de nasofaringe de crianças nos períodos pré- e pós- esquema primário vacinal (n=48). Grupos estão marcados com símbolos de acordo com grau de similaridade a partir do coeficiente de Dice. ID=Identificação do isolado; SOR=sorotipo do isolado; PEN= Penicilina;

SXT= Sulfametoxazol/trimetoprim;S=Susceptível;NS=Não susceptível;R=Resistente; PFGE= Pulsed Field Gel Electrophoresis; MLST=Multi Locus Sequence Typing; NT= não tipável; ST=Tipo de sequência.

Fonte: A autora.

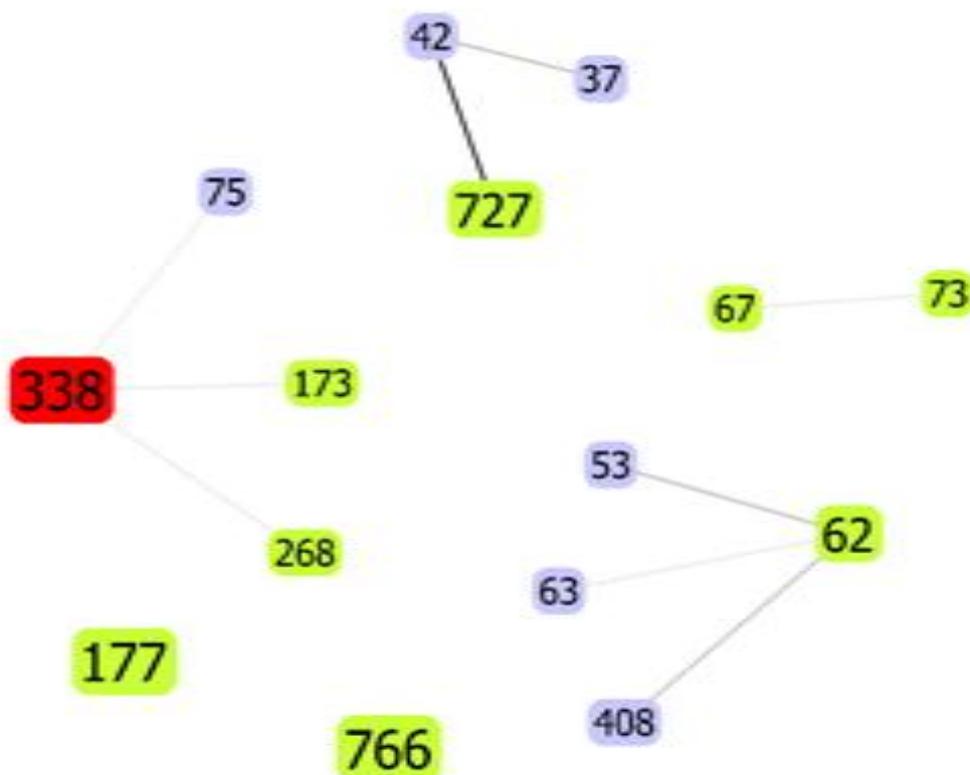


Figura 3. Estrutura populacional de 15 STs de *Streptococcus pneumoniae* revelada por meio da análise do eBURST.

A figura representa 17 amostras do estudo e sete *Streptococcus pneumoniae* do MLST Database. O tamanho dos nódulos dos grupos é proporcional ao número de cepas de cada tipo de sequência (ST). O nódulo em verde claro representa o grupo fundador (origem); o nódulo em azul claro representa origem em comum; o nódulo em vermelho representa o ST mais freqüente comparado ao banco de dados do PMEN. Linhas de ligação (links): azul representa um *single locus variant* (SLV); cinza claro representa um *triple locus variant* (TLV). Nódulo sem linha de ligação: ST isolado.

Fonte: A autora.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora neste estudo não tenha sido avaliado o efeito da PCV10 após a 4^a dose da vacina, ressaltamos a importância da manutenção da dose de reforço no calendário vacinal do programa nacional de imunizações para que a proteção contra os sorotipos oferecida pela vacina seja alcançada. Os estudos epidemiológicos sobre o efeito da PCV10 devem continuar para monitorar a taxa de colonização por sorotipos de pneumococos circulantes no período pós-vacinal, bem como as taxas de não susceptibilidade aos antimicrobianos, que são essenciais para o direcionamento das estratégias de saúde pública no manejo clínico e prevenção das doenças pneumocócicas.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, O.; et al. Rates of acquisition and clearance of pneumococcal serotypes in the nasopharynxes of children in Kilifi District, Kenya. **J. Infect. Dis.**, v. 206, p. 1020–1029, 2012a.
- ABDULLAHI, O.; et al. The prevalence and risk factors for pneumococcal colonization of the nasopharynx among children in Kilifi District, Kenya. **PLoS One**, v. 7, p. e30787, 2012b.
- ADEGBOLA, R.A., et al. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and Other Respiratory Bacterial Pathogens in Low and Lower-Middle Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PloS One**, v.9, n. 8, p. e103293, 2014.
- AFONSO, E.T.; et al. Effect of 10-valent pneumococcal vaccine on pneumonia among children, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 19, n. 4, p. 589-597, 2013. Disponível em: doi: 10.3201/eid1904.121198.
- ANDRADE, A.L.; et al. Direct Effect of 10-Valent Conjugate Pneumococcal Vaccination on Pneumococcal Carriage in Children Brazil. **PLoS One**, v.9, n. 6, p. e98128, 2014
- ANTHONY, L.; et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*: prevalence and risk factors in HIV-positive children in Tanzania. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 16, n. 10, p. e753-757, 2012. Disponível em: doi: 10.1016/j.ijid.2012.05.1037.
- ALEXANDER, E.; et al. Nasopharyngeal carriage rate of *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease before and after the introduction of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. **J. Infect. Publ. Hlth.**, v. 1, p. 40-44, 2008.
- ANDREWS, N.; et al. Using the indirect cohort design to estimate the effectiveness of the seven valent pneumococcal conjugate vaccine in England and Wales. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28435, 2011. Disponível em: doi: 10.1371/journal.pone.0028435. Acesso em 2 dez. 2011.
- AUSTRIAN, R. **Life With the Pneumococcus**. Philadelphia: University of Pennsylvania Press., 1985.
- BAHIA. Plano municipal de saúde 2014-2017. **Aspectos demográficos, Salvador**. IBGE;SMS/DGRCA/SUIS(2014). Disponível em: http://www.saude.salvador.ba.gov.br/arquivos/astec/pms_2014_2017_-versaofinal.pdf. Acesso 21 abr. 2015.
- BEALL, B. W.; et al. Shifting genetic structure of invasive serotype 19A pneumococci in the United States. **J. Infect. Dis.**, 203(10): 1360-1368. 2011.
- BLACK, S.B.; et al. Post licensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 20:1105-7. 2001.
- BOGAERT, D.; et al. Colonization by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. **Lancet**. 363:1871-1872. 2004.

BRAIDO, F., et al. The role of Pneumococcal vaccine. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, 2008. doi:10.1016/j.pupt.2008.04.001

BRANDILEONE M.C.C., et al. Geografic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. **Microb. Drug. Resis.**, 4:209-217, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Recomendações para Terapia Antirretroviral em Crianças e Adolescentes Infectados pelo HIV: manual de bolso**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe técnico da vacina pneumocócica 10-valente conjugada**. Brasília, fevereiro de 2010.

BRASIL.Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Bio-Manguinhos. **Vacina pneumocócica 10-valente**. 2013. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/vacinas/bacterianas/pneumococica>. Acesso em 20 de fev. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais**. 4ª edição. Brasília. 2014.

BRATCHER, P.E.; et al. Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6D by genetic, biochemical and serological characterization. **Microbiology**, 156: 555-60, 2010.

BRICKS, L.F. Vacina Anti-Pneumocócica: eficácia em diferentes grupos de risco e recentes avanços no desenvolvimento de uma vacina mais imunogênica – Atualização. **Jornal de Pediatria**, 70 (2):75-81.1994

BRICKS, L.F.; BEREZIN, E. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases. **Jornal de Pediatria**, 82(3):67-74, 2006.

BRUEGGEMANN, A.B.; et al. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive diseasepotential of *Streptococcus pneumoniae* in children. **J. Infect. Dis.**, 190: 1203–1211. 2004.

BRUEGGEMANN, A.B.; et al. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. **PLoS Pathog.**, Nov; 3(11): e168. 2007.

CAIERÃO J., et al.Serotypes and Genotypes of Invasive *Streptococcus pneumoniae* Before and After PCV10 Implementation inSouthern Brazil. **PLoS One**, Volume 9 (10), 2014.

CARDOSO, V.C.; et al. Nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* in children infected with human immunodeficiency virus. **J. Pediatr.**, 82 (1):51-7. 2006.

CAMILI, R.; et al. Pneumococcal Carriage in Young Children One Year after Introduction of the 13-Valent Conjugate Vaccine in Italy. **Plos One**, Oct 4; 8(10):e7630, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0076309.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Recommendation of the Public Health Service Advisory Committee on Immunization Practice. Pneumococcal polysaccharide vaccine. **MMWR**, 27: 25-31, 1978.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Pneumonia hospitalizations among young children before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine - United States, 1997-2006. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, 58:1-4, 2009.

CENTER DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Streptococcus laboratory Procedures. **PCR Deduction of Pneumococcal Serotypes**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm> Acesso em 23 fev. 2013.

COLES, C.L.; et al. Pneumococcal nasopharyngeal colonization in young south Indian infants. **Pediatr. Infect. Dis. J.** 20(3):289-95, 2001.

CORLESS, C.E.; et al. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.** 39 (4), 1553-1558, 2001.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twenty Informational Supplement. Vol. 27. Wayne, PA: Approved Standard M100-S19, 2012.

DA GLORIA CARVALHO M; et al. Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. **J. Clin. Microbiol.**, May; 48(5):1611-8, 2010. doi: 10.1128/JCM.02243-09. Epub 2010 Mar 1

DAGAN, R.; et al. Introduction and proliferation of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A clones that cause acute otitis media in an unvaccinated population. **J. Infect. Dis.**, 199:776-85, 2009.

DI NUZZO, D. V. P.; FONSECA, S.F. Anemia falciforme e infecções. Sick cell disease and infection. **Jornal de Pediatria**, 80 (5): 347-54, 2004.

DOMINGUES, C.M.A.S.; et al. Brazilian Pneumococcal Conjugate Vaccine Effectiveness Study Group. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. **Lancet Respir. Med.**, Jun; 2(6):464-71, 2014. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70060-8. Epub 2014 Apr 10.

DONKOR, E.S. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** Mar. V.(3), p. 1-5, 2013a

DONKOR, E.S.; DAYIE, N.T.; BADOE, E.V. Vaccination against pneumococcus in West Africa: perspectives and prospects. **Int. J. Gen. Med.** Sep 11;6:757-64, 2013b. doi: 10.2147/IJGM.S45842. eCollection 2013.

DIAS, C.A.; et al. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. **J. Med. Microbiol.**, 56:1185-8, 2007.

DHOUBHADEL, B.G.; et al. Bacterial Load of Pneumococcal Serotypes Correlates with Their Prevalence and Multiple Serotypes Is Associated with Acute Respiratory Infections among Children Less Than 5 Years of Age. **PLoS One**, Oct 31; 9(10):e110777, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0110777.

DUNAIS, B.; et al. Influence of child care on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 22(7):589e92, 2003

ENRIGHT, M.C.; SPRATT, B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. **Microbiology**, 144:3049-3060, 1998.

ESPOSITO, S.; et al. Antibiotic therapy for pediatric community-acquired pneumonia: do we know when, what and for how long to treat? **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 31:e78e85, 2012.

FELDMAN, C.; KLUGMAN, K.P. Pneumococcal infections. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, 10:109-115, 1997.

FONSECA, P.B.; et al. Nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease receiving prophylactic penicillin. **J. Pediatr.**, 81(2):149-54, 2005.

FRANCO, C.M.; et al. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 29:77-9, 2010.

GARCIA S., et al. Pneumococcal disease and vaccination in the Americas: an agenda for accelerated vaccine introduction. **Pan. Am. J. Public Health**, 19(5): 340-348, 2006.

GILL, C.J.; et al. Effect of presumptive co-trimoxazole prophylaxis on pneumococcal colonization rates, seroepidemiology and antibiotic resistance in Zambian infants: a longitudinal cohort study. **Bulletin of the World Health Organization**, 86(12), 929-938, 2008.

GHERARDI, G.; et al. Antibiotic-Resistant Invasive Pneumococcal Clones in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, 45(2): 306-312, 2007.

GSK. GLAXO SMITH KLINE. **Bula da vacina pneumocócica conjugada 10 valente (PCV10)**. Glaxo Smith Kline Indústria Farmacêutica. Disponível: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=8623372013&pIdAnexo=1823717. Acesso 23 fev. 2015.

HARE, K.M.; et al. Longitudinal Nasopharyngeal Carriage and Antibiotic Resistance of Respiratory Bacteria in Indigenous Australian and Alaska Native Children with Bronchiectasis. **PLoS One.**, 8(8): e70478, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0070478

HILL, P.C.; et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian villagers. **Clin. Infect. Dis.**, 43:673e9, 2006.

HIROSE, T.E.; MALUF, E.M.; RODRIGUE, C.O. Pneumococcal meningitis: epidemiological profile pre- and post-introduction of the pneumococcal 10-valent conjugate vaccine. **J. Pediatr.**, Rio J, Oct 16. pii: S0021-7557(14)00144-2, 2014.
doi: 10.1016/j.jpmed.2014.07.002.

HSIEH, Y.C.; et al. The impact of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on risk factors for *Streptococcus pneumoniae* carriage in children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 31:e163-e168, 2012

HUSSAIN, M.; et al. A longitudinal household study of *S. pneumoniae* nasopharyngeal carriage in a UK setting. **Epidemiol. Infect.**, v.133, n. 5 p.891-898, 2005.

HUEBNER, R.E.; et al. Lack of utility of serotyping multiple colonies for detection of simultaneous nasopharyngeal carriage of different pneumococcal serotypes. **Pediatr. Infect. Dis. J.**,19: 1017–1020, 2000.

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.**, Mar;14(3):e197-209, 2010.
doi: 10.1016/j.ijid.2009.05.010. Epub 2009 Aug 22.

JAUNEIKAITE,E.; et al. Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive and noninvasive disease in South East Asia: a review. **Vaccine**. May 21; 30(24):3503-14, 2012. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.03.066.

KADIOGLU, A. et al. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, n. 4, p. 288-301, Apr 2008.

KATEETE, D.P.; et al. Nasopharyngeal carriage rate of *Streptococcus pneumoniae* in Ugandan children with sickle cell disease. **BMC Research Notes**, 5:28, 2012.
doi:10.1186/1756-0500-5-28.

KATSAROLIS, I.; et al. Risk factors for nasopharyngeal carriage of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from a nation-wide surveillance study in Greece. **BMC Infectious Diseases**, 9:120, 2009. doi:10.1186/1471-2334-9-120

KAWAGUCHIYA, M.; et al. Serotype Distribution and Susceptibility to Penicillin and Erythromycin Among Noninvasive or Colonization Isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Northern Japan: A Cross-Sectional Study in the Pre-PCV7 Routine Immunization Period. **Microbial Drug Resistance**, Volume 00, Number 00, 2014. doi: 10.1089/mdr.2013.0196.

KINABO, G. D.; et al. Dynamics of nasopharyngeal bacterial colonization in HIV-exposed young infants in Tanzania. **Tropical Medicine and International Health**, 18 (3):286–295, 2013.

- LAVAL, C.B.; et al. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI**; 12(1): 50–55, 2006.
- LAKSHMAN, R.; et al. Pneumococcal nasopharyngeal carriage in children following heptavalent pneumococcal conjugate vaccination in infancy. **Arch. Dis. Child.**, 88:211–214, 2003.
- LEE, H.; CHOI, E.H.; LEE, H.J. Efficacy and effectiveness of extended-valency pneumococcal conjugate vaccines. **Korean J. Pediatr.**, February; 57(2): 55–66, 2014. doi: 10.3345/kjp.2014.57.2.55
- LEINO, T.; et al. Pneumococcal carriage in children during their first two years: important role of family exposure. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 20(11):1022e7, 2001.
- LEXAU, C.A.; et al. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease among older adults in the era of pediatric pneumococcal conjugate vaccine. **JAMA**, 294: 2043-2051, 2005. doi:10.1001/jama.294.16.2043. PubMed: 16249418.
- KOSKELA, M. Serum antibodies to pneumococcal C polysaccharide in children: response to acute pneumococcal otitis media or to vaccination. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 6:519-26, 1987.
- MANTOVANI, L.G.; et al. Valutazione economica del vaccino coniugato 13-valente. **Italian J. Public Health**, 7(Suppl1):S36–S45, 2010.
- MARTENS, P.; et al. Serotype-specific mortality from invasive *Streptococcus pneumoniae* disease revisited. **BMC Infect. Dis.**, 4:21, 2004.
- MCELLISTREM, M.C.; et al. Acute otitis media due to penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* before and after the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. **Clin. Infect. Dis.**, 40:1738-44, 2005.
- MOORE, M.R.; et al. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States. **J. Infect. Dis.**, 197:1016-27, 2008.
- MOORE, M.R.; et al. Impact of a conjugate vaccine on community-wide carriage of nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in Alaska. **J. Infect. Dis.**, Dec 1:190 (11):2031-82004, 2004. Epub Oct 27.
- MUNÓZ-ALMAGRO C., et al. Serotypes and clones causing invasive pneumococcal disease before the use of new conjugate vaccines in Catalonia, Spain. **J. Infect.**, 63: 151–162. 2011.
- MURRAY, P.R.; et al. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, p. 538-549, 2009.
- NEVES, F.P.; et al. Nasopharyngeal carriage, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children from Brazil before the introduction of the 10-valent conjugate vaccine. **BMC Infect. Dis.**, Jul 13;13:318, 2013. doi: 10.1186/1471-2334-13-318.

NICOLETTI, C.; et al. Prevalence, serotypes, and risk factors for pneumococcal carriage among HIV-infected adults. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 57: 259–265, 2007.

O'Brien, L.L.; et al. Epidemiology of Invasive *Streptococcus pneumoniae* among Navajo Children in the Era before Use of Conjugate Pneumococcal vaccines, 1989-1996. **American Journal of Epidemiology**, 160(3): 270-278, 2004.

O'BRIEN, K.; et al. for the Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **The Lancet**, Vol 374, 2009.

OZDEMIR, B.; BEYAZOVA et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy Turkish infants. **Journal of Infection**, 56:332-339, 2008.

PAI, V.B.; HEYNEMAN, C.A.; ERRAMOUSPE, J. Conjugated heptavalent pneumococcal vaccine. **Ann. Pharmacother.**, 36:1403-13, 2002.

PALMU, A.A.; et al. Effectiveness of the ten-valent pneumococcal Haemophilus influenzae protein D conjugate vaccine (PHiD-CV10) against invasive pneumococcal disease: a cluster randomised trial. **Lancet**, Jan 19; 381(9862): 214-22. 381:214–22, 2013. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61854-6.

PARK, S.Y.; et al. Impact of conjugate vaccine on transmission of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* among Alaskan children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 27(4):335–340, 2008. doi: 10.1097/INF.0b013e318161434d.

PEARSON, H.A. Prevention of pneumococcal disease in sickle cell anemia. **J. Pediatr.**, 129:788-9, 1996

PILISHVILI, T.; et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. **J. Infect. Dis.**, 201(1):32–41, 2010.

PIMENTA, F.C.; et al. Serotype and genotype distributions of pneumococcal carriage isolates recovered from Brazilian children attending day-care centers. **Journal of Medical Microbiology**, 60:1455-1459, 2011.

PLETZ M.W.; et al. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaptation of the species. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Sep 32(3):199-206, 2008. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.01.021.2008.

PUBMLST. **Public databases for molecular typing and microbial genome diversity.** The Wellcome Trust. The Department of Zoology University of Oxford, UK. Disponível em: http://pubmlst.org/perl/bigdb/bigdb.pl?page=info&db=pubmlst_spneumoniae_isolates&id=3794; http://pubmlst.org/perl/bigdb/bigdb.pl?page=info&db=pubmlst_spneumoniae_isolates&id=1419. Acesso em 22 de fev. 2015

REINERT, R.; JACOBS, M.R.; KAPLAN, S.L. Pneumococcal disease caused by serotype 19A: Review of the literature and implications for future vaccine development. **Vaccine**, 28 4249–4259, 2010.

REIS, J.N.; et al. Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, 40:275-7, 2002.

REIS, J.N.; et al. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an urban slum community. **J. Infect.**, 57:204-13, 2008.

REY, L.C.; et al. Antimicrobial susceptibility and serotypes of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* in children with pneumonia and in children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 20: 86–92, 2002.

RIBEIRO, G.S.; et al. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of Hib immunization in Brazil. **J. Infect. Dis.**;187:109-16, 2003.

ROCA, A.; et al. Effects of community-wide vaccination with PCV-7 on pneumococcal nasopharyngeal carriage in the Gambia: a cluster-randomized trial. **PLoS Med.**, Oct 8(10):e1001107, 2011.

SÁ-LEÃO, R.; et al. Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. **Clin. Microbiol. Infect.**, Nov 15(11):1002-7, 2009. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02775.x. Epub 2009 Apr 23.

SBI-SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA. **Centros de Referências de Imunobiológicos especiais**. 2015. Disponível em: <http://www.infectologia.org.br/centros-de-referencia-de-imunobiologicos-especiais-cries/> Acesso 22 abr 2015.

SCHRAG, S.J.; et al. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* with Very-High-Level Resistance to Penicillin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. 3016–3023, Vol. 48 (8), 2004. doi: 10.1128/AAC.48.8.3016–3023.2004.

SHAK, J.R.; VIDAL, J.E.; KLUGMAN, K.P. Influence of bacterial interactions on pneumococcal colonization of the nasopharynx. **Trends Microbiol.**, 21: 129–135. 10, 2013.

SÃO PAULO. Secretaria do Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Instituto Adolfo Lutz. **Sorotipagem de *Streptococcus pneumoniae* pela reação de Quellung**. Cópia não controlada. PME-NMPI-033, 2010

SILVA, N.A.; et al. Genomic Diversity between Strains of Same Serotype and Multilocus Sequence Type among Pneumococcal clinical Isolates. **Infection and Immunity**, 74(6): 3513-3518, 2006.

SIMELL, B.; et al. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. **Expert Rev. Vaccines**, Jul; 11(7):841-55, 2012. 11: 841-855. doi:10.1586/erv.12.53.

SLEEMAN, K.L.; et al. Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. **J. Infect. Dis.**, Sep 1;194(5):682-8, 2006. Epub 2006 Jul 25.

SOEWIGNJO, S.; et al. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage prevalence patterns among children on Lombok Island, Indonesia. **Clin. Infect. Dis.**, 32: 2001.1039e43.2001.

TENOVER, F. C., et al. Persing and B. Swaminathan. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**; 33(9): 2233-2239, 1995.

TIGOI, C.C.; et al. Rates of acquisition of pneumococcal colonization and transmission, by probabilities serotype, among newborn infants in Kilifi District, Kenya. **Clin. Infect. Dis.**, 55:180–188, 2012.

TAN, T.Q. Pediatric Invasive Pneumococcal Disease in the United States in the Era of Pneumococcal Conjugate Vaccines. **Clin. Microbiol. Rev.**, 25(3): 409–419, 2012. doi: 10.1128/CMR.00018-12

TOCHEVA, A.S.; et al. Declining serotype coverage of new pneumococcal conjugate vaccines relating to the carriage of *Streptococcus pneumoniae* in young children. **Vaccine**, 10; 29(26):4400-4, 2011 doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.004. Epub 2011 Apr 17.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2008. p. 679-684.

VICTORA, C.G.; et al. Health conditions and health-policy innovations in Brazil: the way forward. **Lancet**, 377:2042–53, 2011. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60055-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60055-X) Acesso em 23 fev. 2015.

VESIKARI, T.; et al. Immunogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) compared to the licensed 7vCRM vaccine. **Pediatr Infect Dis J**, 28:S66-76, 2009.

WEIL-OLIVIER, C.; et al. Prevention of pneumococcal diseases in the post-seven valent vaccine era: A European perspective. **BMC Infectious Diseases**, 12:207, 2012. doi:10.1186/1471-2334-12-207.

WEINBERGER, D.M.; MALLEY, R.; LIPSITCH, M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. **Lancet**, 378 (9807):1962–1973, 2011.

WENGER, J.D.; et al. Invasive pneumococcal disease in Alaskan children: impact of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and the role of water supply. **Pediatr. Infect. Dis. J.**; 29:251-6, 2010.

WHITNEY, C.G.; et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. **N. Engl. J. Med.**, 348:1737-46, 2003.

WHITNEY, C.G.; GOLDBLATT, D.; O'BRIEN, K.L. Dosing schedules for pneumococcal conjugate vaccine: considerations for policy makers. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, Jan 33 Suppl 2:S172-81, 2014. doi: 10.1097/INF.0000000000000076.

WHO. World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization. **Weekly Epidemiological Record**, 12(82): 93-104, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/wer>. Acesso em 23 fev. 2015.

WHO. World Health Organization. Worldwide progress in introducing pneumococcal conjugate vaccine, 2000-2008. **Weekly Epidemiological Record**, 43: 388-92, 2008.

WHO. World Health Organization. **Immunization, vaccines and biologicals global immunization vision and strategy**. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/givs/en/>. Acesso em 23 fev. 2015.

WHO. World Health Organization. **Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World**. 2003, 186 pp.

WHO. World Health Organization. Pneumococcal vaccines WHO position paper 2012 recommendations. **Vaccine**, 30:4717-8, 2012.

WROE, P.C.; et al. Pneumococcal carriage and antibiotic resistance in young children before 13-valent conjugate vaccine. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 31:249-254, 2012.

WYETH. **Bula vacina pneumocócica conjugada 13 valente (PCV13)**. Wyeth Indústria farmacêutica. 2010. Disponível:

http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=10025292013&pIdAnexo=1881834

Acesso em 23 fev. 2015.

YAO, K.H.; et al. Pneumococcal serotype distribution and antimicrobial resistance in Chinese children hospitalized for pneumonia. **Vaccine**; 29 March (12): 2296-301, 2011.

ANEXOS

A. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROFESSOR EDGAR SANTOS

Parecer Consubstanciado de Projeto	
Título do Projeto: Impacto da vacina pneumocócica 10-valente nas infecções invasivas e eventos de colonização nasofaríngea em crianças na cidade de Salvador-Bahia.	
Pesquisador Responsável Joice Neves Reis Pedreira .	
Data da Versão 15/12/2010	Cadastro 04/11
Data do Parecer 19/05/2011	
Grupo e Área Temática I.8 Cooperação estrangeira	
Objetivos do Projeto Estimar o impacto da vacina conjugada PCV10 em infecções invasivas na cidade de Salvador e avaliar o impacto da mesma em eventos de colonização nasofaríngea pelo pneumococo em dois grupos de crianças, sendo um vacinado e outro contactante dos vacinados.	
Sumário do Projeto Apresenta boa fundamentação teórica sobre vacinas pneumocócicas e infecções pneumocócicas em crianças. Justifica adequadamente a realização do projeto considerando-se que o amplo uso da PCV7 em outros países alterou a epidemiologia da colonização e da doença invasiva pneumocócica, aumentando a doença por sorotipos não-vacinais. No Brasil, muito provavelmente, o benefício em longo prazo da vacina conjugada (PCV10) está comprometido pela substituição dos sorotipos vacinais por não-vacinais. Assim, manter e ampliar os sistemas de vigilância para doença pneumocócica invasiva na era de implantação da vacina é essencial para compreender a dinâmica da transição nos eventos de colonização e o impacto da mesma na doença invasiva. O desenho para o estudo de colonização caracteriza-se como de coorte prospectiva a ser realizado no CRIE (Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais) da UFBA. Serão selecionadas crianças com idade entre 6 semanas e menores que 2 anos (grupo dos expostos) e menores ou igual a 6 anos (grupo comparação). Os procedimentos de coleta e processamento do material e amostras para estudo estão bem detalhados no método. Será desenvolvido paralelamente uma vigilância epidemiológica para identificar as culturas positivas de fluido cérebro-espinhal para <i>S. pneumoniae</i> no Hospital Couto Maia. Os critérios de inclusão e de exclusão estão descritos, orçamento, referências bibliográficas e local de realização do estudo, bem como as avaliações finais. As análises estatísticas estão descritas.	
Aspectos relevantes para avaliação	Situação
Título	Adequado
Relação dos Pesquisadores	Adequada
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Local de Realização	Outro (citar no comentário)
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas
Introdução	Adequada
Objetivos	Adequados
Método	
Tipo de projeto	Pesquisa em Seres Humanos
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total Na Instituição
Cálculo do tamanho da amostra	Não informado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Menores de 18 anos
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crítérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza

Página 1-3
Versão 01/2004

Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Ausente
Armazenamento de material biológico	Adequado
Instrumentos de coleta de dados	Adequados
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim
Cronograma	Comentário
Data de início prevista	não informada
Data de término prevista	não inform
Orçamento	Adequado
Solicita recursos à instituição	Não
Fonte de financiamento externa	Agência de fomento
Referências Bibliográficas	Adequadas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Projeto Aprovado.

Sugestões corrigidas pelo pesquisador. O Projeto em questão atende aos requisitos definidos pelos princípios bioéticos para pesquisa em seres humanos, exigidos pelas resoluções do CNS.

- Análise do TCLE

A análise do TCLE teve como referência a Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde - CNS. O documento identifica o pesquisador responsável e respeita os quatro referenciais básicos da bioética. Assegura a autonomia do sujeito da pesquisa de participar voluntariamente ou retirar-se da pesquisa a qualquer momento. Caso rejeite ou retire-se do estudo, não haverá prejuízo para o seu atendimento. O sigilo no tratamento das informações está garantido. Os riscos e benefícios provenientes da participação no estudo estão descritos no TCLE.

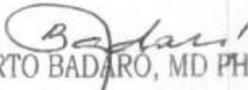
Informações ao pesquisador:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.



• O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em ____/____/____ e ao término do estudo.


ROBERTO BADARO, MD PHD
Coordenador CEP
CHUPES

B. APROVAÇÃO DO ADENDO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROFESSOR EDGAR SANTOS

Universidade Federal da Bahia
Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos
Diretoria Adjunta de Ensino, Pesquisa e Extensão (DAEPE)
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)
Rua Augusto Viana, s/n - Canela - Salvador - Bahia CEP: 40.110-060
Tel.: (71) 3283-8043 FAX: (71) 3283-8141
E-mail: cep.hupes@gmail.com

PARECER ADENDO CEP/HUPES

A Pesquisadora Joice Neves Reis Pedreira, encaminhou ao Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo-HUPES o adendo do projeto de pesquisa intitulado "Impacto da Vacina Pneumocócica 10- valente nas infecções invasivas e eventos de colonização nasofaríngeana em crianças na cidade de Salvador- Bahia.", projeto este que foi protocolado sob número 04/2011, avaliado e aprovado em parecer datado de 19 de maio de 2011.

O referido adendo solicita as seguintes modificações:

- Inclusão da Unidade de Saúde do 16º Centro para a execução da pesquisa;
- Alteração no Termo de Compromisso Livre e Esclarecido, item procedimento para melhor esclarecimento da coleta de swab.

Protocolo CEP/HUPES – 04/2011

O CEP/HUPES Avaliou e Aprovou a Solicitação do Adendo em 06 de outubro de 2011.


Prof. Dr. Roberto Bazaró, MD, PhD
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa/HUPES

C. APROVAÇÃO DA SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE SALVADOR



Secretaria Municipal da Saúde
Coordenadoria de Desenvolvimento de Recursos Humanos
Subcoordenação de Capacitação e Desenvolvimento de Pessoal

Salvador, 30 de junho de 2011.

PARECER

Análise do projeto de pesquisa da Dra. JOICE NEVES REIS, Professora Adjunta da Faculdade de Farmácia da UFBA, intitulada "**Impacto da Vacina Pneumocócica 10-valente nas infecções Invasivas e Eventos de Colonização Nasofaringeana em Crianças na Cidade de Salvador-Bahia**". Este estudo tem como objetivos estimar o impacto da vacina conjugada PC10 em infecções invasivas na cidade de Salvador, e avaliar o impacto da mesma em eventos de colonização nasofaringeana pelo pneumococo em dois grupos de crianças, sendo um vacinado e outro contactante dos vacinados.

Na análise do projeto conforme Resolução CNS nº 196/1996, percebemos:

- No TCLE que o item Procedimento não explicita de forma clara para os sujeitos da pesquisa a realização das coletas, conforme previsto no Capítulo IV.1, itens b); e e) da Res. CNS196/96.

Consideramos favorável disponibilizar o acesso a Unidade de Saúde 16º Centro, atentando para a observação do TCLE, e ressaltando que, deverá ser anexado o parecer do CEP/CHUPES/UFBA, autorizando um adendo ao projeto para incluir a unidade acima referida.

Por fim, sugerimos encaminhar este projeto para conhecimento da área técnica de imunização da COSAM.

Salvador, 30 de junho de 2011.


Almir Silva Ferreira

Téc. Capacitação/CDRH/SMS.

Almir Silva Ferreira
Matrícula - 104420
Técnico CADEP/CDRH/SMS

D. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Impacto da vacina pneumocócica 10-valente nas infecções invasivas e eventos de colonização nasofaríngea em crianças na cidade de Salvador-Bahia.

Paciente: _____ **No. de estudo:** _____

Para ser lido a todos responsáveis legais dos pacientes menores: As informações que se seguem descrevem o estudo de pesquisa e o seu papel como participante. O entrevistador responderá a quaisquer perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo de pesquisa. Por favor, ouça com atenção e não hesite em fazer qualquer pergunta sobre a informação que está sendo fornecida.

Objetivo do Estudo de Pesquisa:

Sua criança está sendo convidada a participar de um estudo de pesquisas que estamos realizando no Centro de Referência de Imunobiológicos especiais – CRIEs do Hospital das Clínicas sobre o impacto da vacina pneumocócica 10-valente nas infecções invasivas e eventos de colonização nasofaríngea em crianças na cidade de Salvador-Bahia. Nós convidamos você a participar deste estudo porque estamos monitorando os casos de colonização e doença invasiva pneumocócica em Salvador para saber se a infecção poderia ter sido prevenida pela vacina. Os resultados do estudo poderão trazer informações importantes para que os governos possam avaliar o impacto do uso de vacinas e controle da doença pneumocócica.

Procedimento:

Se você voluntariamente decidir que sua criança participe deste estudo de pesquisas após ter lido este formulário de consentimento, o investigador lhe fará perguntas relacionadas ao local onde você mora, sua ocupação e sua história médica. Pediremos para ver seu registro de vacinação e/ou o registro de vacinação da criança pela qual é responsável assim como documento de registro de nascimento. As perguntas levam aproximadamente 10 minutos. A coleta de espécime clínico consiste na obtenção de secreção nasofaríngea de crianças saudáveis admitidas no estudo onde iremos colher o material através do nariz da criança utilizando um swab (espécie de cotonete grande) e uma amostra de sangue (2 a 5 mL) para dosagem de concentração de IgG sérica específica contra os polissacarídeos de cada um dos dez sorotipos pneumocócicos por ensaio imunoenzimático (ELISA). Sendo os riscos mínimos, incluindo desconforto associado com a coleta do swab nasofaríngeo e dor na coleta sanguínea. Não há nenhum risco na participação desse estudo de pesquisas.

Sigilo:

As respostas obtidas durante a entrevista, as informações do seu cartão vacinal ou de seus exames serão confidenciais e apenas você e o investigador terão acesso a elas. Você não será identificado (a) em qualquer relatório ou publicação resultante deste estudo de pesquisas.

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo de pesquisas é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir de participar em qualquer momento do estudo de pesquisas se você quiser. Você não precisa responder a qualquer pergunta durante a entrevista. Sua recusa em participar no estudo de pesquisas ou em parte do mesmo, ou sua decisão de interromper sua participação, não afetará seu cuidado futuro de nenhuma forma, nem prejudicará suas relações com o CRIE

e sua criança poderá continuar sendo vacinada no presente ou no futuro. Você não será responsável por nenhuma despesa associada a este estudo de pesquisas, nem receberá compensação financeira. Você receberá uma cópia deste formulário.

Benefícios: Não haverá de imediato benefício para o paciente. Mas, indiretamente os participantes estarão contribuindo com informações muito importantes no estudo das colonização pneumocócica e desenvolvimento de doença invasiva que poderão melhorar o controle da doença e aumentar o conhecimento científico.

Com quem contatar:

Se você tiver qualquer pergunta futura sobre sua participação neste estudo, ou sobre seus direitos como participante desta pesquisa, por favor, entre em contato com a Dra. Joice Neves Reis Pedreira pelo telefone: (71) 3283-6946/ 6949; fax: (71) 3283-6921 ou no endereço: Universidade Federal da Bahia situada na Rua Barão de Jeremoabo, s/n, Campus de Ondina Faculdade de Farmácia CEP: 40170-115.

Consentimento:

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a participação de meu (minha) filho (a) neste projeto de pesquisa, pois fui informado, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos riscos, desconfortos e benefícios todos acima descritos.

_____	_____	_____
Assinatura do paciente	Data	Hora
		
	Impressão datiloscopia do paciente	

Eu ouvi e entendi este formulário de consentimento. Minhas dúvidas foram respondidas. Eu voluntariamente consinto que o paciente do qual eu sou pai ou mãe ou responsável legal participe deste estudo de pesquisas.

_____	_____	_____
Assinatura do pai ou mãe ou responsável legal	Data	hora
		
	Impressão datiloscopia do pai ou mãe ou guardião legal	

_____	_____	_____
Assinatura do Investigador	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura da testemunha	Data	Hora

E. QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO



QEPIP1- Questionário Epidemiológico Caso P1

Estudo do Impacto da Vacina Pneumocócica

Etiqueta	Codificado		1ª Digitação		2ª Digitação	
	CDIND	DCDIND	DGIND	DDGIND	DG2IND	DDG2IND
	Data da Entrevista:				DEINDP1	
	Iniciais do Entrevistador:				EINDP1	

I. IDENTIFICAÇÃO:

1.1	Nº de Identificação no estudo:	EIVP1
-----	--------------------------------	-------

II. HISTÓRIA EPIDEMIOLÓGICA

2.1	Qual a data de nascimento do indivíduo? Qual o sexo do indivíduo? (1=M; 2=F) Como o indivíduo, ou o responsável por ele, se define em relação à sua própria cor? (1-Branco; 2-Negro; 3-Mulato; 4-Indígena; 5-Pardo; 6-Outro) Qual a procedência? (1-RMS; 2-Interior; 3-Outro; 4-Não sabe) _____	DNASC SEXO COR PROC
-----	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------

III. DADOS DOMICILIARES

3.1	Quantas pessoas moram na casa? Quantas crianças moram na casa (<15 anos)? Quantas crianças moram na casa (≥ 6 anos)? Quantas crianças moram na casa (< 2 anos)? Quantos indivíduos tem idade ≥65 anos? Quantos cômodos tem na casa? Quantas camas tem na casa? Há fumantes na casa? (1-SIM; 2-NÃO) Qual a renda mensal da família? (1- até 1 salário mínimo; 2- mais que 1 a 3; 3- mais que 3 a 5; 4- mais que 5)	QPMC Q15 Q6 Q2 Q65 QCOM QCAMA FUMC RENDA
-----	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

IV. COMORBIDADES

4.1	O indivíduo apresenta alguma das doenças abaixo? (1-SIM; 2-NÃO; 8-NÃO SE APLICA; 9- NÃO SABE) Asplenia anatômica e funcional Diabetes mellitus Doença cardiovascular Doença neurológica incapacitante Doenças de depósito Doença pulmonar crônica (incluindo asma) Hepatopatia crônica Imunodeficiência congênita Imunodeficiência adquirida (HIV, uso corticoide, QT/RT, outros) Hemoglobinopatias Renal crônico Bebê exposto ao HIV Outro Qual? _____ Qual idade a criança tinha quando a doença foi detectada? (em meses)	COMORBP1 AAFP1 DMP1 DCVP1 DNIP1 DOP1 DPCP1 HECP1 ICP1 IAP1 HMGP1 RCP1 BBHVP1 QCOMORBP1 QIDADEP1
-----	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

V. FATORES DE RISCO PARA COLONIZAÇÃO NASOFARINGEANA

5.1	A criança esteve doente no último mês? Sim 1 Não 2 Não sabe 9	CDOENP1
-----	----------------------------------------------------------------------------	---------



UFBA

QEPIP1- Questionário Epidemiológico Caso P1

5.2	Caso sim, a criança teve alguma das doenças abaixo no último mês? <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 5%; text-align: center;">1</td> <td style="width: 35%;">Gripe</td> <td style="width: 5%; text-align: center;">5</td> <td style="width: 35%;">Pneumonia</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> <td>Bronquite</td> <td style="text-align: center;">6</td> <td>Outra</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">3</td> <td>Sinusite</td> <td style="text-align: center;">8</td> <td>Não se aplica</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4</td> <td>Otitis</td> <td style="text-align: center;">9</td> <td>Não sabe</td> </tr> </table> Se outra, qual? _____	1	Gripe	5	Pneumonia	2	Bronquite	6	Outra	3	Sinusite	8	Não se aplica	4	Otitis	9	Não sabe		DOENCAP1 QDOENCAP1
1	Gripe	5	Pneumonia																
2	Bronquite	6	Outra																
3	Sinusite	8	Não se aplica																
4	Otitis	9	Não sabe																
5.3	A criança ficou internada? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9 Caso sim, em que unidade de saúde? _____		INTERNP1 QINTERNP1																
5.4	A criança fez uso de algum antibiótico? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9 Caso sim, qual? _____		ANTIBP1 QANTIBP1																
5.5	O paciente vai para creche? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9		CREP1 <input type="checkbox"/>																
5.6	O paciente frequenta escola? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9		ESCP1																
VI. IMUNIZAÇÃO																			
6.1	Qual a data em que fez uso da vacina pneumocócica (1ª DOSE)?		DVACP _/ _/ _																
6.2	Qual o lote da vacina? _____		LOTVP1 																
6.3	Qual o tipo de vacina? PCV10 <input type="checkbox"/> 1 PCV13 <input type="checkbox"/> 2		TIPVAP1 <input type="checkbox"/>																
6.4	Fez uso da Vacina em que lugar: <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 5%; text-align: center;">1</td> <td style="width: 95%;">CRIE</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> <td>16º Posto de saúde do distrito da Liberdade</td> </tr> </table>	1	CRIE	2	16º Posto de saúde do distrito da Liberdade		LVACP1 <input type="checkbox"/>												
1	CRIE																		
2	16º Posto de saúde do distrito da Liberdade																		
6.5	Foi coletado o swab da nasofaringe da criança? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2		CNASOP1 <input type="checkbox"/>																
6.6	Foi coletado o sangue da criança? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2		CSANGUEP1 <input type="checkbox"/>																

F. QUESTIONÁRIO INDIVÍDUO



Questionário M01IND01

Projeto: Estudo do Impacto da Vacina Pneumocócica

Estudo do Impacto da Vacina Pneumocócica

Questionário de Dados Pessoais

Etiqueta	Codificado		1ª Digitação		2ª Digitação	
	CDIND	DCDIND	DGIND	DOGIND	DG2IND	DOG2IND

PARA PROTEGER A CONFIDENCIALIDADE DO PACIENTE, ESTE QUESTIONÁRIO DEVERÁ SER DESTACADO PELO GESTOR DO PROJETO OU INVESTIGADOR PRINCIPAL DEPOIS DA ENTREVISTA E ANTES QUE OS DADOS SEJAM DIGITADOS. TODOS OS QUESTIONÁRIOS DO MESMO PACIENTE DEVEM TER NÚMERO DO ESTUDO (NE).

Data da Entrevista:	DEIND1
Iniciais do Entrevistador:	EIND1

I. IDENTIFICAÇÃO:

1.1	Nº do estudo:	NEVP1
1.4	Termo de consentimento: Sim: <input type="checkbox"/> Não: <input type="checkbox"/>	CONS
2.1	Nome:	NOME
2.2	Apellido:	APE
2.6	Data de Nascimento:	NASC
2.7	Contactantes:	CONTACT

II. ENDEREÇO:

3.1	Rua / Nº:	ENDER
3.2	Telefone (nº e nome de contato):	TEL
3.3	Ponto de Referência:	REF
3.4	Bairro:	BAI
3.5	Cidade:	CID

G. CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE PARA *S.pneumoniae*. CLSI, 2012

Table 2G
Streptococcus pneumoniae
M02 and M07

Table 2G. Zone Diameter and MIC Interpretive Standards for *Streptococcus pneumoniae*

Testing Conditions	
Medium:	Disk diffusion: MHA with 5% sheep's blood Broth dilution: CAMHB with LHB (2.5% to 5% v/v) (see M07-A9 for instructions for preparation of LHB) Agar dilution: MHA with sheep blood (5% v/v); recent studies using the agar dilution method have not been performed and reviewed by the subcommittee.
Inoculum:	Direct colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard, prepared using colonies from an overnight (18- to 20-hour) sheep blood agar plate
Incubation:	35 ± 2°C Disk diffusion: 5% CO ₂ ; 20 to 24 hours Dilution methods: ambient air; 20 to 24 hours (CO ₂ if necessary for growth with agar dilution).

Minimal QC Recommendations (See Tables 3B and 4B for acceptable QC ranges.)

Streptococcus pneumoniae ATCC® 49619

General Comments

- (1) For disk diffusion, test a maximum of 9 disks on a 150-mm plate and 4 disks on a 100-mm plate. Measure the diameter of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye), including the diameter of the disk. The zone margin should be considered the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Do not measure the zone of inhibition of hemolysis. Measure the zones from the upper surface of the agar illuminated with reflected light, with the cover removed. Ignore faint growth of tiny colonies that can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth. With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, disregard slight growth (20% or less of the lawn of growth) and measure the more obvious margin to determine the zone diameter.
- (2) Amoxicillin, ampicillin, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone, cefuroxime, ertapenem, imipenem, and meropenem may be used to treat pneumococcal infections; however, reliable disk diffusion susceptibility tests with these agents do not yet exist. Their *in vitro* activity is best determined using a MIC method.
- (3) Penicillin and cefotaxime, ceftriaxone, or meropenem should be tested by a reliable MIC method (such as that described in CLSI document M07-A9), and reported routinely with CSF isolates of *S. pneumoniae*. Such isolates should also be tested against vancomycin using the MIC or disk method.
- (4) For some organism/antimicrobial agent combinations, the absence or rare occurrence of resistant strains precludes defining any results categories other than "susceptible." For strains yielding results suggestive of a "nonsusceptible" category, organism identification and antimicrobial susceptibility test results should be confirmed. (See Appendix A.)

NOTE: Information in boldface type is new or modified since the previous edition.

Table 2G. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria ($\mu\text{g/mL}$)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS									
(5) For nonmeningitis isolates, the penicillin MIC can predict susceptibility to other β -lactams as follows: Penicillin MICs ≤ 0.06 $\mu\text{g/mL}$ (or oxacillin zones ≥ 20 mm) indicate susceptibility to penicillin (oral or parenteral), ampicillin (oral or parenteral), ampicillin-sulbactam, cefaclor, cefdinir, cefditoren, cefpodoxime, cefprozil, ceftiofime, cefuroxime, imipenem, loracarbef, and meropenem.									
Penicillin MICs ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ indicate susceptibility to parenteral penicillin, amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, ceftiofime, cefotaxime, ceftazidime, and ertapenem.									
See comment (3).									
A	Penicillin	1 μg oxacillin	≥ 20	-	-	-	-	-	(6) Isolates of pneumococci with oxacillin zone sizes of ≥ 20 mm are susceptible (MIC ≤ 0.06 $\mu\text{g/mL}$) to penicillin. Penicillin and cefotaxime, ceftazidime, or meropenem MICs should be determined for those isolates with oxacillin zone diameters of ≤ 19 mm, because zones of ≤ 19 mm occur with penicillin-resistant, intermediate, or certain susceptible strains. For isolates with oxacillin zones ≤ 19 mm, do not report penicillin as resistant without performing a penicillin MIC test.
A	Penicillin parenteral (nonmeningitis)	-	-	-	-	≤ 2	4	≥ 8	(7) Rx: Doses of intravenous penicillin of at least 2 million units every four hours in adults with normal renal function (12 million units per day) can be used to treat nonmeningeal pneumococcal infections due to strains with penicillin MICs ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$. Strains with an intermediate MIC of 4 $\mu\text{g/mL}$ may require penicillin doses of 18 to 24 million units per day. (8) For all isolates other than those from CSF, report interpretations for both meningitis and nonmeningitis.
A	Penicillin parenteral (meningitis)	-	-	-	-	≤ 0.06	-	≥ 0.12	(9) Rx: Use of penicillin in meningitis requires therapy with maximum doses of intravenous penicillin (eg, at least 3 million units every four hours in adults with normal renal function). (10) For CSF isolates, report only meningitis interpretations.
A	Penicillin (oral penicillin V)	-	-	-	-	≤ 0.06	0.12-1	≥ 2	
C	Amoxicillin (nonmeningitis)	-	-	-	-	≤ 2	4	≥ 8	
C	Amoxicillin-clavulanic acid (nonmeningitis)	-	-	-	-	$\leq 2/1$	4/2	$\geq 8/4$	

Table 2G
Streptococcus pneumoniae
M02 and M07

Table 2G
Streptococcus pneumoniae
 M02 and M07

Table 2G. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
O	Cefepime (meningitis)	-	-	-	-	≤0.5	1	≥2	(11) For CSF isolates, report only meningitis interpretations. There is not an FDA-approved indication for the use of cefepime for meningitis. (12) In the United States, only report interpretations for nonmeningitis and include the nonmeningitis notation on the report.
B	Cefepime (nonmeningitis)	-	-	-	-	≤1	2	≥4	
B	Cefotaxime (meningitis)	-	-	-	-	≤0.5	1	≥2	(13) For CSF isolates, report only meningitis interpretations. (14) Rx: Use of cefotaxime or ceftriaxone in meningitis requires therapy with maximum doses. See comment (3).
B	Ceftriaxone (meningitis)	-	-	-	-	≤0.5	1	≥2	
B	Cefotaxime (nonmeningitis)	-	-	-	-	≤1	2	≥4	(15) For all isolates other than those from CSF, report interpretations for both meningitis and nonmeningitis.
B	Ceftriaxone (nonmeningitis)	-	-	-	-	≤1	2	≥4	
C	Cefuroxime (parenteral)	-	-	-	-	≤0.5	1	≥2	
CEPHEMS (ORAL)									
See comment (5)									
C	Cefuroxime (oral)	-	-	-	-	≤1	2	≥4	
O	Cefaclor	-	-	-	-	≤1	2	≥4	
O	Cefdinir	-	-	-	-	≤0.5	1	≥2	
O	Cefpodoxime	-	-	-	-	≤0.5	1	≥2	
O	Cefprozil	-	-	-	-	≤2	4	≥8	
O	Loracarbef	-	-	-	-	≤2	4	≥8	
CARBAPENEMS									
See comment (5)									
B	Meropenem	-	-	-	-	≤0.25	0.5	≥1	See comments (3) and (6).
C	Ertapenem	-	-	-	-	≤1	2	≥4	
C	Imipenem	-	-	-	-	≤0.12	0.25-0.5	≥1	
O	Doripenem	-	-	-	-	≤1	-	-	See comment (4).
GLYCOPEPTIDES									
B	Vancomycin	30 µg	≥17	-	-	≤1	-	-	See comments (3) and (4).
MACROLIDES									
(16) Susceptibility and resistance to azithromycin, clarithromycin, and dirithromycin can be predicted by using erythromycin.									
(17) Not routinely reported for organisms isolated from the urinary tract.									
A	Erythromycin	15 µg	≥21	16-20	≤15	≤0.25	0.5	≥1	
B	Tellithromycin	15 µg	≥19	16-18	≤15	≤1	2	≥4	
O	Azithromycin	15 µg	≥18	14-17	≤13	≤0.5	1	≥2	
O	Clarithromycin	15 µg	≥21	17-20	≤16	≤0.25	0.5	≥1	
O	Dirithromycin	15 µg	≥18	14-17	≤13	≤0.5	1	≥2	

January 2012

Vol. 32 No. 3

H. VALORES ACEITÁVEIS PARA DISCO DIFUSÃO NO TESTE DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE PARA *S.pneumoniae*. CLSI, 2012.

January 2012

Vol. 32 No. 3

Table 3B
Fastidious Quality Control
M02

Table 3B. Disk Diffusion: Quality Control Ranges for Fastidious Organisms

Antimicrobial Agent	Disk Content	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC [®] 49247	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC [®] 49786	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC [®] 49226	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC [®] 49619 ^a
Ampicillin-clavulanic acid ^b	20/10 µg	15-23	-	-	-
Ampicillin	10 µg	13-21	-	-	30-38
Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	14-22	-	-	-
Azithromycin	15 µg	13-21	-	-	19-25
Aztreonam	30 µg	30-38	-	-	-
Cefaclor	30 µg	-	25-31	-	24-32
Cefdinir	5 µg	-	24-31	40-49	28-31
Cefditoren	5 µg	25-34	-	-	27-35
Cefepime	30 µg	25-31	-	37-48	28-35
Cefepimet	10 µg	23-28	-	35-43	-
Cefixime	5 µg	25-33	-	37-45	18-23
Cefmetazole	30 µg	18-21	-	31-38	-
Cefonicid	30 µg	-	30-38	-	-
Cefotaxime	30 µg	31-39	-	38-48	31-39
Cefotetan	30 µg	-	-	30-38	-
Cefoxitin	30 µg	-	-	33-41	-
Cefpodoxime	10 µg	25-31	-	35-43	28-34
Cefprozil	30 µg	-	20-27	-	25-32
Ceftaroline	30 µg	29-39	-	-	31-41
Ceftaroline-avibactam	30/15 µg	30-38	-	-	-
Ceftazidime	30 µg	27-35	-	35-43	-
Ceftazidime-avibactam	30/20 µg	28-31	-	-	-
Ceftibuten	30 µg	29-38	-	-	-
Ceftioxcime	30 µg	29-39	-	42-51	28-34
Ceftioxcime ^c	30 µg	28-38	30-38	-	33-39
Ceftioxcime	30 µg	31-39	-	30-51	30-35
Cefuroxime	30 µg	-	28-38	33-41	-
Cephalexin	30 µg	-	-	-	28-32
Chloramphenicol	30 µg	31-40	-	-	23-27
Ciprofloxacin	5 µg	34-42	-	48-58	-
Clarithromycin	15 µg	11-17	-	-	25-31
Clinfloxacin	5 µg	34-43	-	-	27-34
Clindamycin	2 µg	-	-	-	19-25
Doxycycline	15 µg	-	-	-	18-25
Doripenem	10 µg	21-31	-	-	30-38
Doxycycline	30 µg	-	-	-	28-34
Enoxacin	10 µg	-	-	43-51	-
Ertapenem	10 µg	20-28	27-33	-	28-35
Erythromycin	15 µg	-	-	-	25-30
Fleropenem	5 µg	15-22	-	-	27-35
Fleroxacin	5 µg	30-38	-	43-51	-
Fusidic acid	10 µg	-	-	-	9-18
Garenoxacin	5 µg	33-41	-	-	28-33
Gatifloxacin	5 µg	33-41	-	45-58	24-31
Gemifloxacin	5 µg	30-37	-	-	28-34
Grepivofloxacin	5 µg	32-39	-	44-52	21-28
Idaprim	5 µg	24-33	-	-	21-29
Imipenem	10 µg	21-29	-	-	-
Levofloxacin	5 µg	32-40	-	-	20-25
Linezolid	30 µg	-	-	-	24-34
Linoplatin-flopiatin	10 µg	25-31	-	-	22-28
Lomefloxacin	10 µg	33-41	-	45-54	-
Loracarbef	30 µg	-	28-32	-	22-28
Meropenem	10 µg	20-28	-	-	28-35
Moxifloxacin	5 µg	31-39	-	-	25-31
Nitrofurantoin	300 µg	-	-	-	23-29
Norfloxacin	10 µg	-	-	-	15-21
Ofloxacin	5 µg	31-40	-	43-51	18-21
Omadacycline	30 µg	21-29	-	-	24-32
Oxacillin	1 µg	-	-	-	≤12 ^d
Penicillin	10 units	-	-	28-34	24-30
Piperacillin-bazobactam	100/10 µg	33-38	-	-	-
Quinsipristin-dalfopristin	15 µg	15-21	-	-	19-24
Rabupenem	10 µg	24-30	-	-	20-38
Rifampin	5 µg	22-30	-	-	25-30

For Use With M02-A11—Disk Diffusion

M100-S22

Table 3B. (Continued)

Antimicrobial Agent	Disk Content	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC [®] 49247	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC [®] 49766	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC [®] 49226	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC [®] 49619 [*]
Solidthromycin	15 µg	16–23	–	–	25–33
Sparfloxacin	5 µg	32–40	–	43–51	21–27
Spectinomycin	100 µg	–	–	23–29	–
Telavandin	30 µg	–	–	–	17–24
Tellithromycin	15 µg	17–23	–	–	27–33
Tetracycline	30 µg	14–22	–	30–42	27–31
Tigecycline	15 µg	23–31	–	30–40	23–29
Tedizolid	20 µg	–	–	–	24–30
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	24–32	–	–	20–28
Trospectomycin	30 µg	22–29	–	28–35	–
Trovafloxacin	10 µg	32–39	–	42–55	25–32
Vancomycin	30 µg	–	–	–	20–27

Disk Diffusion Testing Conditions for Clinical Isolates and Performance of QC

Organism	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococci and Neisseria meningitidis</i>
Medium	HTM	GC agar base and 1% defined growth supplement. The use of a cysteine-free growth supplement is not required for disk diffusion testing.	MHA supplemented with 5% defibrinated sheep's blood
Inoculum	Direct colony suspension	Direct colony suspension	Direct colony suspension
Inoculation characteristics	5% CO ₂ ; 18–18 hours; 35°C	5% CO ₂ ; 20–24 hours; 35°C	5% CO ₂ ; 20–24 hours; 35°C

Abbreviations: HTM, *Haemophilus* Test Medium; MHA, Mueller-Hinton agar.

NOTE: Information in boldface type is new or modified since the previous edition.

Footnotes

- Despite the lack of reliable disk diffusion interpretive criteria for *S. pneumoniae* with certain β-lactams, *Streptococcus pneumoniae* ATCC[®] 49619 is the strain designated for QC of all disk diffusion tests with all *Streptococcus* spp.
- When testing *Haemophilus* on HTM, the acceptable limits for QC strain *E. coli* ATCC[®] 35218 are 17 to 22 mm for amoxicillin-clavulanic acid when incubated in ambient air.
- Either *H. influenzae* ATCC[®] 49247 or 49766 may be used for routine QC testing.
- Deterioration in oxacillin disk content is best assessed with QC organism *S. aureus* ATCC[®] 25923, with an acceptable zone diameter of 18 to 24 mm.

Table 3B
Fastidious Quality Control

I. LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS EM MULTIPLEX PCR CONVENCIONAL

Table 1: List of oligonucleotide primers used in 41 conventional multiplex* PCR assays for pneumococcal serotype deduction of 70 serotypes

Primers**	GenBank accession no.	Primer sequence (5'-3')	Gene	Nucleotide position	Product size (bp)	Reference
1-f	CR331632	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA	wsp	9935	290	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
1-r		CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C		10181		
2-f	CR331633	TAT CCC AGT TCA ATA TTT CTC CAC TAC ACC	wsp	10271	290	Da Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
2-r		ACA CAA AAT ATA GGC AGA GAG AGA CTA CT		10531		
3-f	CR331634	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G	gafU	9020	371	
3-r		CTT CTC CAA TGG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G		9360		
4-f	CR331635	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G	wsp	9596	430	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
4-r		GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G		9995		
5-f	CR331637	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG	wsp	6123	362	
5-r		GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG		6450		
6A6B6C6D-f	CR331639	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG	wci F	8656	250	
6A6B6C6D-r		TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA		8877		
6C6D-f	EU714777.1	CAT TTT AGT GAA GTT GGC GGT GGA GTT	wci Nbeta	1441	727	Carvalho <i>et al.</i> 2009, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 47: 557-559
6C6D-r		AGC TTC GAA GCC CAT ACT CTT CAA TTA		2141		
7C7B4B-f	CR331642	CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC GGG A	wsp L	9438	290	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
7C7B4B-r		GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC		9665		
7F7A-f	CR331643	TCC AAA CTA TTA CAG TGG GAA TTA CGG	wsp	14683	599	Da Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
7F7A-r		ATA GGA ATT GAG ATT GCC AAA GCG AC		15256		
8-f	CR331644	GAA GAA ACG AAA CTG TCA GAG CAT TTA CAT	wsp	11193	201	
8-r		CTA TAG ATA CTA GTA GAG CTG TTC TAG TCT		11364		
9N9L-f	CR331647	GAA CTG AAT AAG TCA GAT TTA ATC AGC	wsp	11948	516	Diao <i>et al.</i> , 2007, <i>J. Med. Microbiol.</i> 56: 1185-1189
9N9L-r		ACC AAG ATC TGA CGG GCT AAT CAA T		12439		
9V9A-f	CR331648	GGG TTC AAA G TC AGA CAG TG A ATC TTA A	wsp	9966	816	Da Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
9V9A-r		CCA TGA ATG A AA TCA ACA TT G TCA GTA GC		10753		
10A-f	CR331649	GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC	wsp G	12423	628	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
10A-r		GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C		13020		

10F10C33C-f	CR331652	GGA GTT TAT OGG TAG TGC TCA TTT TAG CA	wpr	12403	240	Du Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
10F10C33C-r		CTA ACA AAT TCG CAA CAC GAG GCA ACA		12624		
11A11D-f	CR331653	GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G	wpr	11640	463	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
11A11D-r		GAT TAT GAG TGT AAT TTA TTC CAA CTT CTC CC		12071		
12F12A/12B/44/96-f	CR331660	GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G	wpr	14407	376	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
12F12A/12B/44/96-r		CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC		14753		
13-f	CR331661	TAC TAA GGT AAT CTC TGG AAA TCG AAA GG	wpr	14005	655	Du Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
13-r		CTC ATG CAT TTT ATT AAC CG C TTT TTG TTC		14630		
14-f	CR331662	GAA ATG TTA CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT	wpr	7959	109	Dias <i>et al.</i> , 2007, <i>J. Med. Microbiol.</i> 56: 1185-1189
14-r		GCC AAT ACT TCT TAG TCT CTC AGA TGA AT		8119		
15A/15F-f	CR331663	ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C	wpr	7894	434	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
15A/15F-r		GAT CTA GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC		8212		
15B/15C-f	CR331665	TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA	wpr	7314	496	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
15B/15C-r		CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C		7779		
16F-f	CR331668	GAA TTT TTC AGG CGT GGG TGT TAA AAG	wpr	11679	717	Du Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
16F-r		CAG CAT ATA GCA CCG CTA AGC AAA TA		12371		
17F-f	CR331670	TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG	wci P	10484	693	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
17F-r		GAT GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC		11145		
18C18F/18B/18A-f	CR331673	CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC	wpr	12687	573	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
18C18F/18B/18A-r		TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC		13230		
19A-f	CR331675	GAG AGA TTC ATA ATC TTG CAC TTA GCC A	wpr	9683	566	Pimenta <i>et al.</i> , 2009, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 47: 2353-2354
19A-r		CAT AAT AGC TAC AAA TGA CTC ATC GCC		10142		
19F-f	CR331678	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C	wpr	11135	394	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
19F-r		GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG		11407		
19Fvar-f	KC990152	GAC AAT TCT GGT TGA CTT GTT GAT TTT G	wpr	306	585	Monoux <i>et al.</i> 2013, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 51(7):2470-1.
19Fvar-r		CTA CCA AAT ACC TCA CCA GCT TCC		890		
20-f	CR331679	GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G	wci L	9567	514	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
20-r		CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC		10648		

Fonte: <http://www.cdc.gov/streplab/downloads/pcr-oligonucleotide-primers.pdf>

21-f	CR331680	CTA TGG TTA TTT CAA CTC AAT CGT CAC C	wgr	13247	192	Da Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
21-r		GGC AAA CTC AGA CAT AGT ATA GCA TAG		13412		
22F/22A-f	CR331682	GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA TTG TC	wcr V	11655	643	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
22F/22A-r		CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC		11666		
23A-f	CR331683	TAT TCT AGC AAG TGA CGA AGA TGC G	wgr	7739	722	Da Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
23A-r		CCA ACA TGC TTA AAA ACG CTG CTT TAC		8434		
23B-f	CR331684	CCA CAA TTA G CG CTA TAT TCA TTC AAT CG	wgr	13227	199	Da Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
23B-r		GTC CAC GCT GAA TAA AAT GAA GCT CCG		13399		
23F-f	CR331685	GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC	wgr	8758	354	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
23F-r		CAC AAC ACC TAA CAC TCG ATG GCT ATA TGA TTC		9119		
24F/24A/24B-f	CR331688	GCT CCC TGC TAT TGT AAT CTT TAA AGA G	wgr	11701	99	Da Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
24F/24A/24B-r		GTG TCT TTT ATT GAC TTT ATC ATA GGT CGG		11770		
31-f	CR331695	OGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGT GC	wgr	9144	701	Da Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
31-r		COG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC		9815		
33F/33A/37-f	CR331702	GAA GGC AAT CAA TGT GAT TGT GTC GCG	wgr	11129	338	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
33F/33A/37-r		CTT CAA AAT GAA GAT TAT AGT ACC CTT CTA C		11436		
34-f	CR331703	GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC	wgr	7350	408	Da Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
34-r		CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC		7725		
35A/35C/42-f	CR331704	ATT ACG ACT CCT TAT GTG ACG CGC ATA	wgr	14394	280	Da Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
35A/35C/42-r		CCA ATC CCA AGA TAT ATG CAA CTA GGT T		14646		
35B-f	CR331705	GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG	wcr II	10556	677	Da Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
35B-r		CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G		11199		
35F/7F-f	CR331707	GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A	wgr	7374	517	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
35F/7F-r		GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC		7858		
38/25F/25A-f	CR331710	CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG	wgr	13848	574	Da Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
38/25F/25A-r		ATG TTT GAA TTA AAG CTA ACG TAA CAA TCC		14392		
39-f	CR331711	TCA TTG TAT TAA CCC TAT GCT TTA TTG GTG	wgr	12289	98	Da Gloria Carvalho <i>et al.</i> 2010, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
39-r		GAG TAT CTC CAT TGT ATT GAA ATC TAC CAA		12357		
qpr A-f	CR331662	GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC	wgr	1473	160	Pal <i>et al.</i> , 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
qpr A-r		GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC		1607		

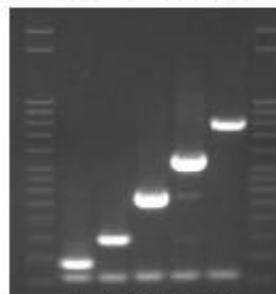
* All individual assay used in the multiplex PCR hold equal or better efficiency when used in monoplex fashion

**All serotypes that are co-detected are listed

J. TAMANHO DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE DEDUÇÃO DE SOROTIPOS CAPSULARES

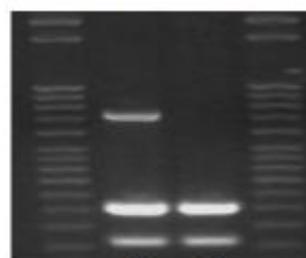
Sorotipos	Tamanho de pares de bases (bp)
14	189
6B	250
23F	384
19 A	566
9V	816
6C/6D	727
19F	304
3	371
15B	496
18	573
17F	693
1	280
5	362
9N	516
7F	599
16F	717
8	201
2	290
4	430
20	514
22F	643
7C	260
12F	376
11 A	463
10 A	628
23 A	722
21	192
33F	338
15 A	434
35F	517
13	655
39	98
23B	199
35 A	280
38	574
35B	677
24	99
10F	248
34	408
19Fv	585
31	701

Latin America Reaction 1



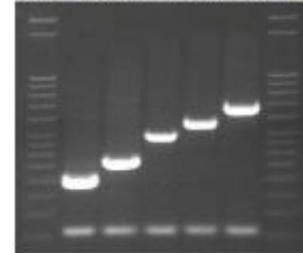
14 6B 23F 19A 9V

6C Reaction



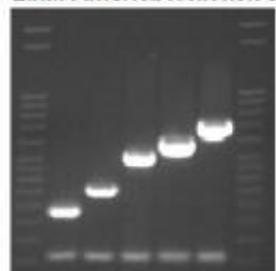
6C 6A

Latin America Reaction 2



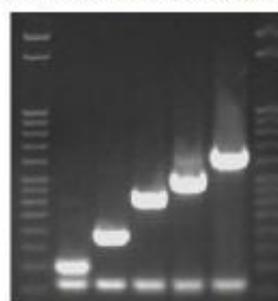
19F 3 15B 18 17F

Latin America Reaction 3



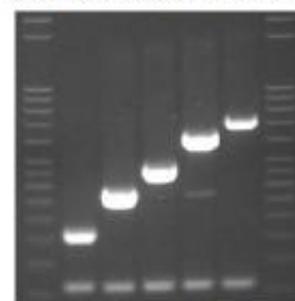
1 5 9N 7F 16F

Latin America Reaction 4



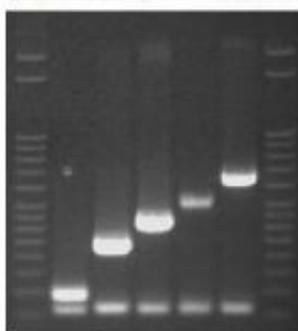
8 2 4 20 22F

Latin America Reaction 5



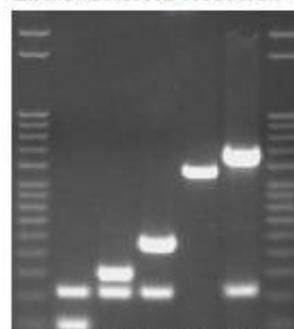
7C 12F 11A 10A 23A

Latin America Reaction 6



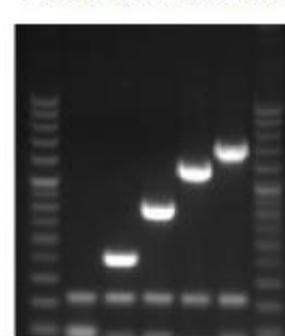
21 33F 15A 35F 13

Latin America Reaction 7



39 23B 35A 38 35B

Latin America Reaction 8



24 10F 34 19Fv 31

Fonte: Adaptado de Protocol for Multiplex PCR - *S. pneumoniae* SEROTYPING - clinical specimens-Latin America set(da Gloria Carvalho et al., 2010).

L. ALGORITMO PARA IDENTIFICAÇÃO DE SOROTIPOS DE *S.pneumoniae* – Key to *S.pneumoniae* types and pneumococcal diagnostic antisera

PNEUMOCOCCUS



Key to *S. pneumoniae* types and pneumococcal diagnostic antisera

Streptococcus pneumoniae	Streptococcus pneumoniae type	Positiv reaction in:				Antiserum/antisera recommended for identification of type
		Pool serum	Type serum	Group serum	Factor serum	
Type 1	1	A, P	1			Type serum 1
Type 2	2	A, T	2			Type serum 2
Type 3	3	B, R	3			Type serum 3
Type 4	4	A, R	4			Type serum 4
Type 5	5	A, S	5			Type serum 5
Group 6	6A	B, Q		6	6b	Factor serum 6b
	6B	B, Q		6	6c	Factor serum 6c
	6C	B, Q		6	6d	Factor serum 6d
	6D	B, Q		6	6c, 6d	Factor serum 6c, 6d
Group 7	7F	C, P		7	7b	Factor sera 7b + 7c
	7A	C, P		7	7b, 7c	Factor serum 7c
	7B	C, P		7	7e	Factor serum 7e
	7C	C, P		7	7f	Factor serum 7f
Type 8	8	B, S	8			Type serum 8
Group 9	9A	D, R		9	9d	Factor sera 9d + 9g
	9L	D, R		9	9b	Factor sera 9b + 9e
	9N	D, R		9	9b, 9e	Factor serum 9e
	9V	D, R		9	9d, 9g	Factor serum 9g
Group 10	10F	E, S		10	10b	Factor sera 10b + 10d + 10f
	10A	E, S		10	10d	Factor sera 10d + 10b
	10B	E, S		10	10b, 10d	Factor sera 10b + 10d
	10C	E, S		10	10b, 10f	Factor serum 10f
Group 11	11F	D, T		11	11b, 11g	Factor sera 11g + 11f
	11A	D, T		11	11c	Factor sera 11c + 11b
	11B	D, T		11	11b, 11f, 11g	Factor sera 11f + 11g
	11C	D, T		11	11b, 11c, 11f	Factor sera 11c + 11f
Group 12	12F	E, R		12	12b	Factor sera 12b + 12c
	12A	E, R		12	12c	Factor sera 12c + 12b
	12B	E, R		12	12b, 12c, 12e	Factor serum 12e
	Type 13	13	H	13		Type serum 13
Type 14	14	H, P	14		Type serum 14	
Group 15	15F	H, S		15	15b, 15c	Factor sera 15b + 15c
	15A	H, S		15	15c	Factor sera 15c + 15b
	15B	H, S		15	15b, 15e, 15h	Factor serum 15h
	15C	H, S		15	15e	Factor sera 15e + 15h
Group 16	16F	D		16	16b	Factor serum 16b
	16A	D		16	16c	Factor serum 16c
Group 17	17F	F, S		17	17b	Factor serum 17b
	17A	F, S		17	17c	Factor serum 17c
Group 18	18F	A, Q		18	18c, 18e, 18f	Factor serum 18f
	18A	A, Q		18	18d	Factor serum 18d
	18B	A, Q		18	18e	Factor sera 18e + 18c
	18C	A, Q		18	18c, 18e	Factor sera 18c + 18f
Group 19	19F	B, P		19	19b	Factor serum 19b
	19A	B, P		19	19c	Factor serum 19c
	19B	B, P		19	7h	Factor sera 7h + 19f
	19C	B, P		19	19f, 7h	Factor serum 19f
Type 20	20	C, T	20		Type serum 20	
Type 21	21	E	21		Type serum 21	
Group 22	22F	F, T		22	22b	Factor serum 22b
	22A	F, T		22	22c	Factor serum 22c
Group 23	23F	H, Q		23	23b	Factor serum 23b
	23A	H, Q		23	23c	Factor serum 23c
	23B	H, Q		23	23d	Factor serum 23d

Fonte: <http://www.ssi.dk/~media/Admin/Diagnostica%20Downloads/Downloads%20UK/Brochures/BrochurePneumococcus%20keys%2018057.ashx>

Key to *S. pneumoniae* types and pneumococcal diagnostic antisera (continued)

Streptococcus pneumoniae	Streptococcus pneumoniae type	Positly reaction in:				Antiserum/antisera recommended for identification of type
		Pool serum	Type serum	Group serum	Factor serum	
Group 24	24F	C		24	24d	Factor serum 24d + 24c
	24A	C		24	24c, 24d	Factor serum 24c
	24B	C		24	24a	Factor serum 24a
Group 25	25F	I		25	25b	Factor serum 25b
	25A	I		25	25c	Factor serum 25c
Type 27	27	F	27			Type serum 27
Group 28	28F	H		28	28b	Factor serum 28b
	28A	H		28	28c	Factor serum 28c
Type 29	29	G	29			Type serum 29
Type 31	31	C	31			Type serum 31
Group 32	32F	F		32	32a	Factor sera 32a + 32b
	32A	F		32	32a, 32b	Factor sera 32b
Group 33	33F	E, T		33	33b	Factor sera 33b + 20b
	33A	E, T		33	33b, 20b	Factor serum 20b
	33B	E, T		33	33f	Factor sera 33f + 33a + 6a
	33C	E, T		33	33a, (33f)	Factor serum 33a
	33D	E, T		33	33f, 6a	Factor serum 6a
Type 34	34	G	34			Type serum 34
Group 35*	35F	G		35	35a, 35b	Factor sera 35b
	35A	G		35	35a, 35c	Factor sera 35a + 35c, 29b + 42a
	35B	G		35	35a, 35c, 29b	Factor sera 35a + 29b
	35C	G		35	35a, 35c, 42a	Factor sera 35a + 42a
Type 36	36	D	36			Type serum 36
Type 37	37	D	37			Type serum 37
Type 38	38	I	38			Type serum 38
Type 39	39	E	39			Type serum 39
Type 40	40	C	40			Type serum 40
Group 41	41F	F		41	41a, 41b	Factor serum 41b
	41A	F		41	41a	Factor sera 41a + 41b
Type 42	42	G	42			Type serum 42
Type 43	43	I	43			Type serum 43
Type 44	44	I	44			Type serum 44
Type 45	45	I	45			Type serum 45
Type 46	46	I	46			Type serum 46
Group 47	47F	G		47	47a	Factor sera 47a + 43b
	47A	G		47	47a, 43b	Factor serum 43b
Type 48	48	I	48			Type serum 48

4th Edition, October 2013 18057

*All types within *S. pneumoniae* group 35 have to be identified by means of Factor serum 35a, because of cross-reactions to *S. pneumoniae* types 29 and 42 in Group serum 35. Group serum 35 and factor 35a cross-react with *S. pneumoniae* type 47F. Use group serum 47 to exclude types within group 35.

S. pneumoniae types included in the 23-valent vaccine are indicated by **boldface**.

All types of *S. pneumoniae* will give a positive reaction in Omni-serum and Anti C-polysaccharide serum.

Fonte:<http://www.ssi.dk/~media/Admin/Diagnostica%20Downloads/Downloads%20UK/Brochures/BrochurePneumococcus%20keys%2018057.ash>