

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO  
ALEGRE – UFCSPA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Mariana Preussler Mott**

**Portadores de *Streptococcus pneumoniae* entre idosos e crianças:  
avaliação do efeito da vacina conjugada 10-valente**

**UFCSPA**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre**

**Porto Alegre  
2021**

Mariana Preussler Mott

**Portadores de *Streptococcus pneumoniae* entre idosos e  
crianças: avaliação do efeito da vacina conjugada 10-valente**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Cícero Armídio Gomes Dias

**Porto Alegre  
2021**

### Catálogo na Publicação

Mott, Mariana

Portadores de *Streptococcus pneumoniae* entre idosos e crianças: avaliação do efeito da vacina conjugada 10-valente / Mariana Mott. -- 2021.

141 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2021.

Orientador(a): Prof. Dr. Cícero Dias.

1. Doença Pneumocócica. 2. Colonização. 3. Sorotipo 19A. 4. Resistência aos antimicrobianos. 5. CC320. I. Título.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Cícero Dias, primeiramente pela oportunidade e por todo o apoio e disponibilidade.

Ao CDC, em especial a Maria da Glória Carvalho, Jennifer Milucky, que não mediram esforços para virem até o Brasil. Pelo treinamento de coleta, análise laboratorial e construção dos questionários. Além da Glória e Jennifer, a Fabiana Pimenta e Fernanda Lessa, que também me ajudaram na elaboração deste trabalho, pois devido a pandemia, como não consegui ir até os EUA, elas não só me auxiliavam de longe como também executaram os experimentos, e pelos ensinamentos repassados.

Ao pessoal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial ao Prof. Emílio Moriguchi pela oportunidade da parceria. A Neide Maria Bruscato, que facilitou a coleta das amostras na cidade de Veranópolis, muito obrigada por toda a ajuda, disponibilidade aos finais de semana. A comunidade de Veranópolis por toda a contribuição.

Aos meus colegas do laboratório da UFCSPA, que me ajudaram nos finais de semana cansativos, que tínhamos que realizar as coletas em Veranópolis.

Aos meus colegas que viraram amigos, em especial aos meus amigos Cezar, Janira e Rebeca que sempre estiveram junto comigo durante essa jornada. Dividimos as angústias, os medos, aflições, mas também todas as nossas conquistas.

Ao Pedro Pedrotti Vieira, meu IC, que foi meu braço direito e esquerdo. Muito obrigada pela paciência e por estar sempre disponível para me ajudar.

Aos meus colegas do Hospital Ernesto Dornelles, que sempre foram compreensivos quando eu tive que me ausentar, muito obrigada também por toda a ajuda (Gabriela e Jéssica), em especial as minhas amigas Gislaine e Juliana.

A minha família que são o meu alicerce, que nunca pediram esforços para eu realizar todos os meus sonhos. Esta conquista também é para vocês (pai, mãe, vó e aos meus irmãos).

E ao meu namorado, Pedro Libório, por ter sido tão compreensivo e companheiro nestes dias bem estressantes e cansativos.

## RESUMO

O *Streptococcus pneumoniae* coloniza o trato respiratório, especialmente a nasofaringe, servindo como um reservatório e fonte para a transmissão entre os indivíduos. A colonização é a primeira etapa para o desenvolvimento da doença pneumocócica, que pode se apresentar de duas formas clínicas: 1) a proliferação para locais próximos da nasofaringe, causando otite média aguda e sinusite; ou 2) a Doença Pneumocócica Invasiva (DPI), caracterizada pela invasão do pneumococo em sítios normalmente estéreis. A doença pneumocócica está associada a altas taxas de mortalidade e morbidade, principalmente, entre crianças e idosos. Para controlar a doença, foram desenvolvidas as vacinas pneumocócicas. No Brasil, desde 2010, a vacina PCV10 (Vacina Pneumocócica Conjugada 10-valente) faz parte do Calendário de Vacinação Infantil. Apesar das vacinas terem diminuído a taxa de DPI, internação e mortalidade por doença pneumocócica, após a sua implementação foi observado aumento da doença causada por sorotipos não vacinais. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram (1) avaliar o impacto da vacinação na distribuição dos sorotipos de pneumococo em casos de doença pneumocócica invasiva, principalmente entre adultos (19-64 anos de idade) e (2) verificar os sorotipos que estão circulando entre as crianças (< 5 anos de idade) e idosos ( $\geq 65$  anos de idade) saudáveis. Entre os casos de DPI verificou-se um aumento do sorotipo 19A, que não está incluído na PCV10. A prevalência aumentou de 3,5% (6/173) em 2008-2010 para 8,1% (32/395) em 2011-2014 ( $p=0,04$ ). A não suscetibilidade aos antimicrobianos aumentou no período após PCV10, devido a predominância do CC 320 (*Complexo Clonal*) (63,9%; 23/36), especialmente a ST320, que apresenta como característica a resistência a antimicrobianos. Como a colonização é um pré-requisito para o desenvolvimento de DPI, é importante conhecer os sorotipos que estão causando a colonização. A prevalência de colonização entre as crianças foi de 63,7% (146/229), e entre os idosos foi de 3% (19/627) utilizando o método cultural. Sexo masculino, presença de congestão nasal ou coriza e frequentar creche ou escola foram variáveis associadas com colonização entre crianças; entre idosos, asma foi uma condição associada. Quando associado à técnica de qPCR, com pesquisa direta do pneumococo em amostras nasofaringe, a taxa de colonização total entre os idosos aumentou para 4,3% (27/627). Considerando a prevalência total entre os colonizados, o sorotipo 19A foi o mais prevalente (19,8%; 33/167). Todos os 33 isolados de pneumococos do sorotipo 19A identificados entre os colonizados (crianças e idosos) foram resistentes a penicilina parenteral (*breakpoints* para meningite e administração oral), cefuroxima (*breakpoints* para administração parenteral e oral),

azitromicina, eritromicina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim. A taxa de resistência a meropenem foi de 93,9%, para clindamicina foi de 90,9% e para cefepime e ceftriaxona foi de 87,9% (*breakpoints* para meningite). A pressão seletiva causada pela vacinação e a resistência aos antimicrobianos, podem ter contribuído para que o sorotipo 19A ocupasse o nicho dos sorotipos vacinais tanto em portadores como em casos de DPI. Mesmo com a vacinação, a doença pneumocócica permanece como um importante motivo de preocupação, seja pela emergência de sorotipos não vacinais, seja pela resistência a antimicrobianos.

Palavras-Chave: Doença Pneumocócica, Colonização, Sorotipo 19A, Resistência aos Antimicrobianos, CC 320.

## ABSTRACT

*Streptococcus pneumoniae* colonizes the respiratory tract, especially the nasopharynx, serving as a reservoir and source for transmission between individuals. Colonization is the first step in the development of pneumococcal disease, which can present in two clinical forms: 1) proliferation to sites near the nasopharynx, causing acute otitis media and sinusitis; or 2) Invasive Pneumococcal Disease (IPD), characterized by the invasion of pneumococcus into normally sterile sites. Pneumococcal disease is associated with high rates of mortality and morbidity, particularly among children and the elderly. To control the disease, pneumococcal vaccines were developed. In Brazil, since 2010, the PCV10 vaccine (Pneumococcal Conjugate Vaccine 10-valent) is part of the Children's Vaccination Calendar. Although the vaccines have decreased the rate of IPD, hospitalization, and mortality from pneumococcal disease, after their implementation an increase in disease caused by non-vaccine serotypes has been observed. Therefore, the aims of this study were to evaluate the impact of vaccination on the distribution of serotypes in (1) pneumococcal disease cases, mainly among adults (19-64 years of age), and (2) among colonized children (< 5 years old) and elderly ( $\geq 65$  years old). Among cases of IPD, there was an increase in serotype 19A, which is not included in PCV10. The prevalence increased from 3.5% (6/173) in 2008-2010 to 8.1% (32/395) in 2011-2014 ( $p=0.04$ ). Non-susceptibility to antimicrobials increased in the period after PCV10, due to the predominance of CC 320 (Clonal Complex) (63.9%; 23/36), especially ST320, which features antimicrobial resistance. Since colonization is a prerequisite for the development of IPD, it is important to know the serotypes that are involved with carriage. The prevalence of colonization among children was 63.7% (146/229), and among the elderly was 3% (19/627) using the cultural method. Male sex, presence of nasal congestion or runny nose and attending daycare or school were variables associated with colonization; among the elderly, asthma was an associated condition. When associated with the qPCR technique with direct pneumococcal detection in nasopharyngeal samples, the total colonization rate among the elderly increased to 4.3% (27/627). Considering the total prevalence (children and elderly) serotype 19A was the most prevalent (19.8%; 33/167). All 33 pneumococcal isolates identified among the colonized were resistant to parenteral penicillin (breakpoints for meningitis and oral administration), cefuroxime (breakpoints for parenteral and oral administration), azithromycin, erythromycin, tetracycline, and sulfamethoxazole-trimethoprim. The resistance rate for meropenem was 93.9%, for clindamycin was 90.9%, and for cefepime and ceftriaxone was 87.9% (breakpoints for meningitis). The selective pressure caused by vaccination and antimicrobial resistance may

have contributed to serotype 19A occupying the vaccine serotypes' niche in both carriers and IPD cases. Even with vaccination, pneumococcal disease remains a major cause for concern, either through the emergence of non-vaccine serotypes or through resistance to antimicrobials.

Keywords: Pneumococcal Disease, Colonization, Serotype 19A, Antimicrobial Resistance, CC 320.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### 1 REVISÃO DA LITERATURA

**Figura 1:** Colonização do pneumococo e evolução para Doença Pneumocócica ..... 16

**Figura 2:** Fatores de Virulência do *S. pneumoniae* envolvidos no processo de colonização no hospedeiro.....20

### 5.2 MANUSCRITO II

**Figura 1:** Children 18 to 59 months of age flow diagram ..... 87

**Figura 2:** Serotype distribution of pneumococcal carriage isolates between children (< 5 years old) and elderly ( $\geq 65$  years old) ..... 89

**Figura 3:** Elderly ( $\geq 65$  years old) flow diagram.....93

## LISTA DE TABELAS

### 5.2 MANUSCRITO II

<b>Table 1:</b> Pneumococcal serotypes detected in children (n=148 isolates) and elderly (n=19 isolates).....	88
<b>Table 2:</b> Characteristics among 229 children (18-59 months of age) investigated for carriage in the South of Brazil.....	90
<b>Table 3:</b> Characteristics among 627 adults ( $\geq 65$ years of age) investigated for pneumococcal carriage in the South of Brazil.....	94
<b>Table 4:</b> Antimicrobial susceptibility profile of 166* <i>S. pneumoniae</i> detected by culture method, 33 isolates serotype 19A and 133 isolates other serotypes.....	96
<b>Table 5:</b> Serotype capsular, non-susceptibility b-lactams and other antibiotics.....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Adr	Atenuador de Resistência de Drogas
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<i>atpA</i>	gene da subunidade A da ATPase
<i>atpC</i>	gene da subunidade C da ATPase
BgaA	$\beta$ -galactosidade
CbpA	Proteína A de ligação a Colina
CbpE	Fosforilcolina esterase
CC	<i>Complexo Clonal</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
ChoP	Fosforilcolina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<i>cps</i>	gene da cápsula polissacarídica
CPS	Cápsula Polissacarídica
C-PS	Antígeno polissacarídeo C pneumocócico
CRIE	Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais
CRM <sub>197</sub>	Variante não tóxica diftérica
DHPS	Enzima Diidropteroato Sintase
DLV	<i>Doble Locus Variant</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPI	Doença Pneumocócica Invasiva
Eno	Enolase
<i>erm(B)</i>	<i>Macrolide resistance gene</i>
EUA	Estados Unidos da América
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hyl	Hialuronato liase
iC3b	Componente do Sistema Complemento
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano

IgA	Imunoglobulina da classe A
IgG	Imunoglobulina da classe G
<i>lytA</i>	gene da autolisina
LytA	Autolisina
<i>mef(A)</i>	<i>Macrolide efflux gene</i>
MLST	<i>Multi-Locus Sequence Typing</i>
MDR	Multirresistentes
NanA	Neuraminidase A
OMS	Organização Mundial da Saúde
PABA	ácido para-aminobenzóico
PAC	Pneumonia Adquirida na Comunidade
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PAFR	Receptor do Fator Ativador de Plaquetas
PavA	Proteína A de Virulência
PBP	Proteínas de Ligação à Penicilina
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PCV	Vacina Pneumocócica Conjugada
PCV7	Vacina Pneumocócica Conjugada 7-valente
PCV10	Vacina Pneumocócica Conjugada 10-valente
PCV13	Vacina Pneumocócica Conjugada 13-valente
PepO	Endopeptidase
PgdA	Peptideoglicano- N-acetilglucosamina Desacetilase
Pht	Proteína de Superfície
PI-1	Pilus do tipo 1
PI-2	Pilus do tipo 2
PIGR	Receptor de Imunoglobulina Polimérica
<i>ply</i>	gene da pneumolisina
Ply	Pneumolisina
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PNSP	Pneumococo não suscetível a penicilina

PPV-23	Vacina Pneumocócica Polissacarídica 23-valente
PsaA	Adesina A de Superfície Pneumocócica
PspA	Proteína A de Superfície Pneumocócica
<i>pspC</i>	gene de proteína de superfície pneumocócica
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa
QRDR	Região Determinante de Resistência a Quinolonas
RFLP-PCR	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento
RNA	Ácido Ribonucleico
RrgA	Subunidade auxiliar do pilus
rRNA	RNA ribossômico
ST	Sequência Tipo
StrH	$\beta$ -N-acetilglucosaminidase
SUS	Sistema Único de Saúde
<i>Tet(M)</i>	<i>Tetracycline Resistance gene</i>
<i>Tet(O)</i>	<i>Tetracycline Resistance gene</i>
tRNA	RNA transportador
TRS	Trato Respiratório Superior
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
ZmpA	Metaloprotease de zinco

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	13
1.2 Colonização do <i>Streptococcus pneumoniae</i> no Trato Respiratório Superior .....	15
1.3 Fatores de Virulência do <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	18
1.3.1 Cápsula Polissacarídica .....	20
1.4 Vacinas para prevenção de doença pneumocócica .....	21
1.5 Epidemiologia da Doença Pneumocócica.....	24
1.6 Impacto da Vacinação na Colonização entre as Crianças.....	27
1.7 Colonização entre os Idosos .....	30
1.8 Dificuldade de Determinar a Colonização entre os Idosos.....	32
1.9 Impacto da Vacinação na Doença Pneumocócica Invasiva.....	33
1.10 Aumento do sorotipo 19A após a vacinação .....	36
1.11 Genótipo do Sorotipo 19A - ST320.....	38
1.12 Resistência aos Antimicrobianos .....	39
<b>2 REFERÊNCIAS</b> .....	43
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	53
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	54
4.1 Objetivo Geral.....	54
4.1.1 Objetivos Específicos .....	54
<b>5 ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	55
5.1 MANUSCRITO I.....	55
5.2 MANUSCRITO II .....	63
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	98
<b>7 ANEXOS</b> .....	101
7.1 Aprovação do comitê de ética em pesquisa da UFCSPA .....	101
7.2 Aprovação do comitê de ética em pesquisa do HCPA. ....	106
7.3 Questionário – Crianças.....	112
7.4 Questionário – Adultos .....	116
7.5 Regras para publicação - <i>Vaccine</i> .....	122

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 *Streptococcus pneumoniae*

As bactérias pertencentes à família *Streptococcaceae* e ao gênero *Streptococcus* possuem como característica serem cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não produtores de catalase e de citocromo-oxidase. Pela coloração de Gram, é possível visualizar diplococos Gram-positivos com extremidades lanceoladas e um halo ao redor da célula bacteriana devido à presença da cápsula polissacarídica em sua superfície da parede celular (Spellerberg & Brandt, 2011). Dependendo do tipo de reação hemolítica que apresentam em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro, essas bactérias ainda podem ser classificadas como *Streptococcus* spp. alfa-hemolíticos, beta-hemolíticos ou gama-hemolíticos. A espécie *Streptococcus pneumoniae*, também conhecida como pneumococo, é alfa-hemolítica, produz hemólise parcial das hemácias, e suas colônias ficam circundadas por uma zona cinza-esverdeada durante o crescimento em placas de ágar sangue (ANVISA, 2008).

Usualmente utilizam-se os testes de suscetibilidade à optoquina e de bile solubilidade para identificar o pneumococo. O teste de suscetibilidade à optoquina (cloridrato de etil-hidrocupreína, um derivado de quinina), baseia-se na ocorrência da alteração que a optoquina, em baixas concentrações (5µg/mL), provoca seletivamente na membrana celular do *S. pneumoniae*, impedindo o seu desenvolvimento; quando adaptado ao formato de teste de difusão em ágar, ocorre a formação de um halo. Se esse halo apresentar um diâmetro  $\geq 14$  mm, considera-se suscetível à optoquina, podendo-se suspeitar de pneumococo. Já o teste de bile solubilidade está baseado na capacidade que o desoxicolato de sódio a 10% tem de promover a aceleração da atividade lítica das autolisinas do pneumococo para degradar o peptideoglicano presente na sua parede celular, ocorrendo destruição das células (Spellerberg & Brandt, 2011).

Os testes convencionais sempre foram a base da identificação do pneumococo, permitindo a sua diferenciação em relação às outras espécies de estreptococos alfa-hemolítico, como o *Streptococcus* do grupo *viridans* (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. cristatus*, *S. infantis*, *S. peroris* e *S. pseudopneumoniae*). Porém, nos últimos anos, há relatos de pneumococos resistentes à optoquina e de *S. mitis* suscetíveis à optoquina (Lessa et al., 2018; Sadowy et al., 2020). A resistência é devido a substituições de nucleotídeos no gene que codifica uma ATPase do pneumococo. O gene *atpC* (subunidade C da ATPase), alvo molecular da optoquina, é o local no qual é descrito o maior número de mutações. Contudo, apesar de raros, há relatos de mutações no gene *atpA* (subunidade A da ATPase) (Souza et al., 2021). Também são descritos

pneumococos que podem apresentar insolubilidade ao desoxicolato de sódio devido a modificações nos mecanismos regulatórios das autolisinas ou na sua estrutura molecular (Díaz, López & García, 1992; Obregón et al., 2002).

A reação de *Quellung*, descrita por Neufeld em 1902, é uma reação sorológica que utiliza antissoros específicos. Utilizando-se microscopia, é possível observar o intumescimento capsular provocado pela interação das bactérias encapsuladas com anticorpos anticapsulares específicos, ocorrendo a diferenciação dos variados sorotipos capsulares. Pneumococo do mesmo sorotipo é definido como uma cepa bacteriana que produz uma cápsula polissacarídica com propriedades sorológicas/imunológicas e estrutura química única, e um sorogrupo é definido como um grupo de sorotipos que compartilham propriedades sorológicas (Geno et al., 2015). Entretanto, esta técnica é trabalhosa e está disponível somente em laboratórios de referência, necessitando de pessoal capacitado (Austrian, 1979).

Em alguns laboratórios ou centros de pesquisa, é possível realizar a identificação molecular do pneumococo a partir de métodos baseados em análise de DNA (Ácido Desoxirribonucleico), incluindo *microarray*, sequenciamento e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) convencional ou qPCR (PCR quantitativa). Particularmente, a técnica de PCR é a mais difundida, destaca-se como sua principal vantagem a possibilidade de realizar a identificação do agente, deduzindo-se o sorotipo a partir do próprio material clínico, sem necessidade de crescimento bacteriano (Arguedas et al., 2020), além de apresentar sensibilidade superior ao método cultural. Estudo realizado por Nahantumbo e colaboradores (2017), com 744 amostras de líquido cefalorraquidiano com suspeita de meningite, evidenciou que, de acordo com os resultados de cultura, o pneumococo estava envolvido como agente em apenas 25 amostras (3,36%; 25/744); contudo, quando as amostras foram submetidas a PCR diretamente do líquido, houve aumento na detecção para 135 amostras (13,5%; 135/744). Entretanto, quando a amostra for de trato respiratório, os resultados devem ser interpretados com cautela. Isolados de outras espécies intimamente relacionadas, como *Streptococcus pseudopneumoniae*, *S. mitis* e *S. oralis*, apresentam alta similaridade genética – cerca de 99% de seu material genético é idêntico ao pneumococo. Ainda, essas espécies podem expressar os sorotipos capsulares 1 e 5, o que limitaria a utilização de técnicas que buscam material genético procedente de locais com microbiota normal (Lessa et al., 2018; Pimenta et al., 2019; Sadowy et al., 2020).

Para propósitos de identificação, são empregados como alvo determinantes de virulência como o gene *cps*, que codifica a cápsula polissacarídica, porém deve-se ressaltar que existem cepas que não produzem a cápsula ou possuem mutação nesse gene (Hilty et al., 2014).

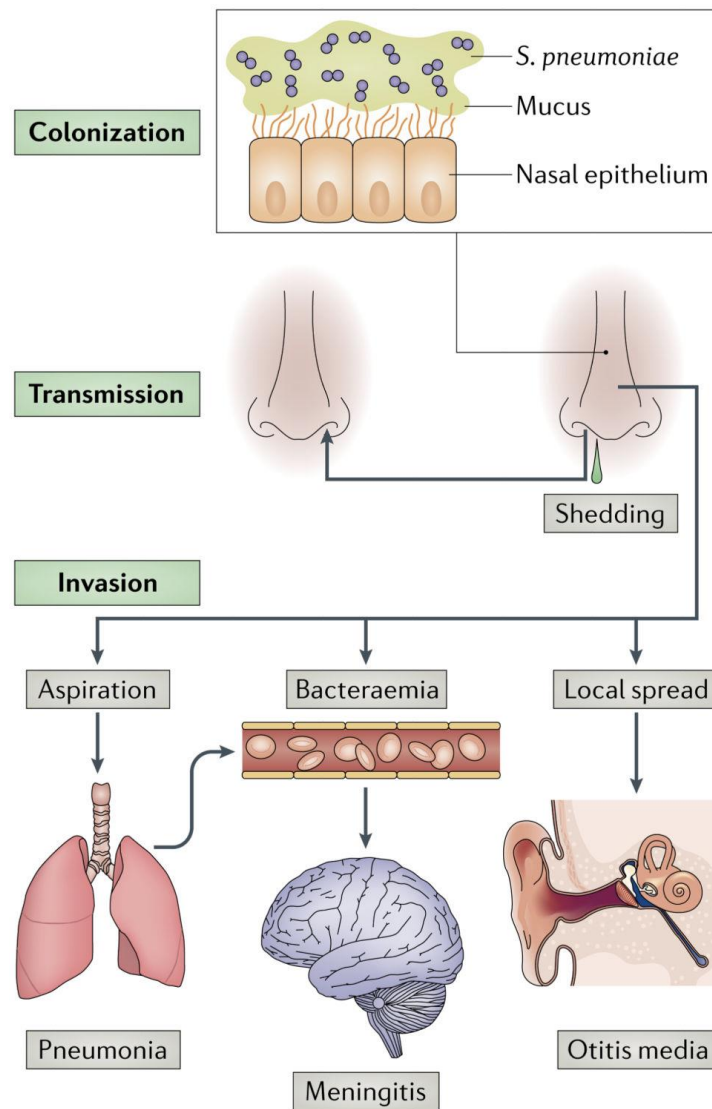


Há outros determinantes de virulência, como: o gene *pspC*, que codifica uma adesina; *lytA*, que codifica a principal autolisina de pneumococo; ou o gene *ply*, responsável por codificar a pneumolisina (Carvalho et al., 2007; Gholamhosseini-Moghaddam et al., 2015). Estudos recentes mostram que as técnicas mais específicas para identificação do pneumococo empregam a técnica de PCR e suas variações, como RFLP-PCR (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento) e qPCR. Estas identificam sequências específicas dos genes *lytA* em combinação com o gene 16S rRNA e sequenciamento de genoma completo (Arguedas et al., 2020; Sadowy et al., 2020). Outra possibilidade é a pesquisa do antígeno polissacarídeo C pneumocócico (C-PS) em amostra de urina. Esse teste imunocromatográfico tem demonstrado alta sensibilidade e especificidade para detectar Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC) apenas na população adulta, além de detectar meningite pneumocócica a partir do líquido cefalorraquidiano (Pride et al., 2012).

## **1.2 Colonização do *Streptococcus pneumoniae* no Trato Respiratório Superior**

O *S. pneumoniae* é um patógeno associado a altas taxas de mortalidade e morbidade, acometendo principalmente os extremos das idades, como crianças e idosos, sendo mais prevalente em países de baixa renda, os quais possuem pouco acesso a diagnóstico e tratamento. Essa bactéria coloniza o Trato Respiratório Superior (TRS) dos humanos, mais especificamente a nasofaringe, servindo como um reservatório e uma fonte para a transmissão entre os indivíduos (Simmel et al., 2012; Weiser, Ferreira & Paton, 2018).

A colonização é um pré-requisito para que ocorra a doença pneumocócica, que pode se apresentar de duas formas clínicas: 1) a proliferação para locais próximos da nasofaringe, causando otite média aguda e sinusite; ou 2) a Doença Pneumocócica Invasiva (DPI), caracterizada pela invasão do pneumococo em sítios normalmente estéreis, causando bacteremia, meningite ou pneumonia (Figura 1) (Simmel et al., 2012; Goldblatt & O'Brien, 2018; Weiser, Ferreira & Paton, 2018).



**Figura 1:** Colonização do pneumococo e evolução para Doença Pneumocócica

Fonte: Adaptado Weiser, Ferreira & Paton, 2018.

Entretanto, estar colonizado não significa que obrigatoriamente o indivíduo irá desenvolver a doença pneumocócica. Vários são os fatores que influenciam no desenvolvimento da doença, tanto ligados ao hospedeiro quanto ao patógeno. A doença se desenvolve com mais frequência quando existe uma condição predisponente, como a presença de comorbidades e a baixa imunidade do hospedeiro. Além disso, a idade também desempenha papel determinante se o indivíduo irá ou não desenvolver a doença após a colonização, sendo mais frequente nos extremos das idades (Simmel et al., 2012; Brooks & Mias, 2018).

A taxa de colonização pode variar de 5% a 90% entre os indivíduos saudáveis, sendo que essa ampla faixa de variação depende da população estudada. Um dos principais fatores que determinam a taxa de colonização é a idade: em crianças menores de 5 anos de idade, a

taxa de colonização varia de 20% a 60%, representando o reservatório mais bem estabelecido do *S. pneumoniae* (CDC, 2020). O pneumococo pode ser facilmente cultivado a partir de objetos, como os brinquedos macios recentemente manuseados por crianças colonizadas. Nesse sentido, a troca de brinquedos é muito comum durante as atividades escolares nas creches, propiciando a transmissão da bactéria entre as crianças (Marks, Reddinger & Hakanson, 2014).

A proporção de colonizados decresce com a idade. Em adultos de idade entre 18 e 60 anos, que não possuem contato com crianças, a taxa de colonização é mais baixa, variando de 5% a 10%. A prevalência de colonização em idosos com mais de 65 anos varia de 0% a 6% (Almeida et al., 2014; Arguedas et al., 2020; CDC, 2020; Thomas, 2021).

O tempo que um indivíduo saudável fica colonizado varia muito. Em crianças, o tempo de colonização é mais longo do que nos adultos. Isso pode influenciar a maior prevalência encontrada entre as crianças, pois, como elas ficam mais tempo colonizadas, há maior chance de detecção. Além disso, um indivíduo pode ser colonizado várias vezes ao longo da vida, por sorotipos capsulares diferentes, proporcionando o desenvolvimento de imunidade sorotipo específica, resultando em episódios de colonização mais curtos (Regev-Yochay et al., 2004; Krone et al., 2014). Outro fator importante que deve ser considerado é o ambiente em que o indivíduo está inserido e a quantidade de pessoas que convivem no mesmo local. Entre pessoas que vivem aglomeradas, como em presídios ou em instalações militares, a taxa de colonização varia de 50% a 60% (Simmel et al., 2012; CDC, 2020).

A estação do ano e a presença de infecções respiratória por outros agentes também impactam na transmissão do pneumococo entre os indivíduos. Durante o inverno e o início da primavera, há maior prevalência, já que é quando as doenças respiratórias são mais frequentes, havendo maior produção de secreção respiratória, sendo este também o período em que os indivíduos ficam mais tempo em lugares fechados e aglomerados (CDC, 2020). A inflamação causada por vírus respiratórios favorece a colonização por pneumococos, uma vez que a infecção viral modula a expressão de quimiocinas pró-inflamatórias, regula os receptores epiteliais utilizados para a aderência do pneumococo na nasofaringe. Assim, facilita-se a sua adesão por meio de moléculas de superfície como Adesina A de Superfície Pneumocócica (PsaA), Proteína A de Superfície Pneumocócica (PspA), Proteína A de ligação a Colina (CbpA), Proteína C de Superfície Pneumocócica (PspC), Hialuronato liase (Hyl) e por meio da secreção de enzimas pneumocócicas como a Pneumolisina (Ply) e as Neuraminidases (Thomas, 2021), comprometendo a integridade do epitélio, o que acaba por fornecer um meio inflamatório rico em nutrientes (Nakamura, Davis & Weiser, 2011; Weiser, Ferreira & Paton, 2018).

### 1.3 Fatores de Virulência do *Streptococcus pneumoniae*

Além das adesinas anteriormente relacionadas, há diversos fatores de virulência produzidos pelo pneumococo que influenciam no sucesso da colonização, na sua permanência e, conseqüentemente, na capacidade de invadir tecido (Figura 2). Deve-se considerar também não só a presença, mas o nível de expressão que os vários fatores de virulência apresentam. Para obter sucesso na colonização, primeiramente o pneumococo deve estabelecer contato com as células do epitélio através de suas adesinas, que são moléculas de superfície: ZmpA (Metaloprotease de zinco), uma protease de Imunoglobulina da classe A (IgA) que degrada os anticorpos de superfície do epitélio do hospedeiro, incapacitando a atividade aglutinante dessa imunoglobulina, que está presente em grande quantidade no trato respiratório do hospedeiro; ChoP (Fosforilcolina), que se liga ao PAFR (Receptor do Fator Ativador de Plaquetas) presente na superfície das células epiteliais e endoteliais e facilita a aderência e a invasão; CbpA, que facilita a adesão e a invasão do epitélio respiratório e da barreira hematoencefálica, interage também com o Fator H (regula a ativação do sistema complemento), para facilitar a aderência e a subsequente internalização via glicosaminoglicanos. A CbpE (Fosforilcolina esterase) que prejudica o recrutamento de neutrófilos ao degradar o Fator Ativador de Plaquetas (PAF) das células do hospedeiro (Weiser, Ferreira & Paton, 2018).

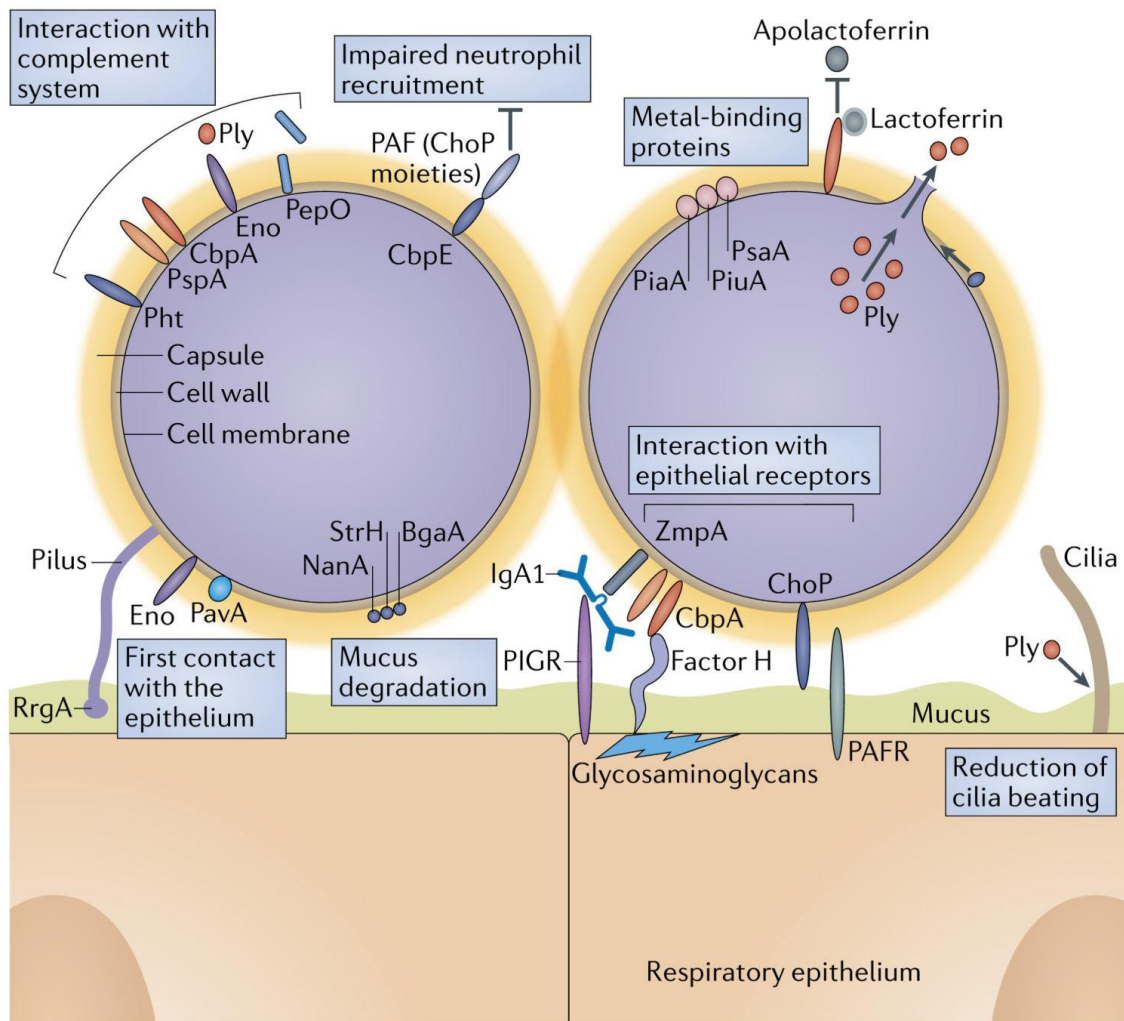
A bactéria deve, ainda, interagir com outros receptores epiteliais, as cepas que expressam o pilus, através da subunidade auxiliar RrgA, atua como uma adesina de ponta (componente estrutural do pilus), ligando-se ao PIGR (Receptor de Imunoglobulina Polimérica) nas células; Eno (Enolase), que facilita a invasão; e PavA (Proteína A de Virulência), que promove a adesão à superfície do hospedeiro. A bactéria inibe a fagocitose ao interagir com o sistema complemento do hospedeiro. Nesse sentido, a cápsula polissacarídica (CPS) é o mais importante fator de virulência (ver adiante), além das moléculas adesinas de superfície Pht (Proteínas de Superfície), PspA, CbpA, Eno, PepO (Endopeptidase) e Ply, as quais bloqueiam direta e indiretamente a deposição do componente do sistema complemento (iC3b) do hospedeiro. PspA atua também ligando-se à lactoferrina para adquirir ferro e bloquear o efeito antimicrobiano (Mitchell & Mitchell, 2010; Simell et al., 2012; Weiser, Ferreira & Paton, 2018).

Um dos principais obstáculos que o pneumococo encontra na nasofaringe é o aprisionamento no muco. O glicocálice que recobre o epitélio do TRS é composto de glicoproteínas mucinas, que são semelhantes a um gel que contém peptídeos antimicrobianos e imunoglobulinas (Rose & Voynow, 2006). As enzimas Nan A (Neuraminidase A), BgaA ( $\beta$ -

galactosidade) e StrH ( $\beta$ -N-acetilglucosaminidase) degradam o muco e, portanto, inibem a depuração mucociliar, diminuindo a sua viscosidade (Bogaert, De Groot & Hermans, 2004). Além disso, a cápsula também evita o aprisionamento do muco durante o processo de colonização (Weiser, Ferreira & Paton, 2018).

A autolisina (LytA) degrada o peptídeoglicano presente na parede celular, assim ocorre a lise da célula e a liberação da Ply. A liberação da toxina Ply para o exterior da célula, facilitada por LytA, danifica o epitélio e reduz o batimento dos cílios, desestabilizando as células do epitélio respiratório do hospedeiro. Embora a camada de muco mantenha as bactérias longe da superfície celular subjacente, a aderência aos glicanos de mucina ajuda a bactéria a permanecer na nasofaringe, fornecendo um nicho e nutrientes favoráveis (Simell et al., 2012; Weiser, Ferreira & Paton, 2018). O *S. pneumoniae*, bem como outros colonizadores da nasofaringe são encontrados predominantemente nessa camada de muco (Feldman et al., 1992).

Além do muco, o TRS do hospedeiro produz a lisozima. Assim, o *S. pneumoniae* expressa duas enzimas, PgdA (Peptídeoglicano- N-acetilglucosamina Desacetilase) e Adr (Atenuador de Resistência de Drogas), que modificam seu peptídeoglicano para se tornarem resistentes aos efeitos líticos da lisozima (Davis et al., 2008).



**Figura 2:** Fatores de Virulência do *S. pneumoniae* envolvidos no processo de colonização no hospedeiro

Fonte: Adaptado Weiser, Ferreira & Paton, 2018.

### 1.3.1 Cápsula Polissacarídica

Apesar destes fatores de virulência desempenharem importante papel na instalação do processo infeccioso, na permanência no hospedeiro e na manutenção do processo de patogênese, o principal fator de virulência do pneumococo, sem dúvida, é a cápsula polissacarídica, por ser ela a defesa mais importante contra o sistema imunológico do hospedeiro. Tem como principal função atuar como uma barreira física ao inibir a fagocitose, evitando a interação de iC3b e do fragmento Fc da Imunoglobulina IgG com a célula bacteriana (Mitchell & Mitchell, 2010; Geno et al., 2015; Weiser, Ferreira & Paton, 2018). Geralmente, é carregada negativamente, o que repele os mucopolissacarídeos ricos em ácido siálico do muco

presente na mucosa da nasofaringe (Nelson et al., 2007). Além disso, os fagócitos são repelidos por repulsão eletrostática (Geno et al., 2015). Ao evitar o aprisionamento no muco, o pneumococo pode acessar e se prender à superfície das células epiteliais da nasofaringe, com a ajuda de adesinas localizadas na superfície da célula bacteriana (Weiser, Ferreira & Paton, 2018).

Conforme exposto, a relação do pneumococo com o hospedeiro é um processo que envolve múltiplos fatores. Contudo, é essencial reconhecer o papel protagonista da cápsula neste processo. Devido às diferenças de composição na sua estrutura química e às características imunogênicas, a cápsula apresenta grande variabilidade em sua composição, sendo descritos 100 diferentes sorotipos capsulares atualmente (Ganaie et al., 2020). Por desempenhar papel fundamental na patogênese do pneumococo, ela é o principal alvo no desenvolvimento de imunoprofilaxia, porém apenas alguns desses sorotipos estão incluídos nas diferentes formulações das vacinas desenvolvidas até o momento (Simell et al., 2012; Weiser, Ferreira & Paton, 2018; CDC, 2020). Assim, as formulações são baseadas em estudos de prevalência e distribuição de sorotipos causadores de doença invasiva, pois um grupo limitado de sorotipos causam a maior proporção dos casos (Cherian, 2007).

#### **1.4 Vacinas para prevenção de doença pneumocócica**

A descoberta da cápsula na superfície do pneumococo foi especulada por Pasteur em 1881; desde então, tem sido foco direto e indireto de investigação. Inicialmente, já se sabia que o hospedeiro produzia anticorpos contra tipos específicos de cepas de *S. pneumoniae*. Este fato fez-se pensar que a cápsula era de natureza proteica, porém em 1925 foi demonstrado que a cápsula pneumocócica consistia de polissacarídeo, sendo o primeiro antígeno não proteico a ser reconhecido (Paton & Trappetti, 2018). Atualmente, existem dois tipos de vacinas: as vacinas polissacarídicas; e as vacinas conjugadas, constituídas de polissacarídeo juntamente com carreador proteico (Geno et al., 2015).

Em 1977, nos Estados Unidos da América (EUA), foi licenciada a primeira vacina polissacarídica, que continha, em sua formulação, 14 sorotipos mais prevalentes causadores de doença pneumocócica. Em 1983, essa vacina foi substituída pela vacina polissacarídica 23-valente (PPV-23), a qual fornece proteção específica contra 23 sorotipos de pneumococo mais prevalentes na época (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F) (Ministério da Saúde, 2019).

A vacina PPV-23 é classificada como T-independente (sem a participação das células T). Em crianças menores de 2 anos de idade, essa vacina não apresenta impacto positivo em diminuir a doença pneumocócica. Nessa faixa etária, as células B são imaturas, e os polissacarídeos capsulares estimulam justamente a produção dessas células B sem cooperação das células T *helper*, gerando resposta imunológica baixa, sem a produção de anticorpos de memória. Devido a essas características, a vacina PPV-23 deve ser administrada em indivíduos que se enquadrem nos seguintes requisitos: a partir de 2 anos de idade e que tenham fatores de risco para o desenvolvimento da doença pneumocócica; a partir de 60 anos de idade conforme orientação médica; ou quando hospitalizados; ou residentes em instituições fechadas; e grupos vulneráveis, como a população indígena (Ministério da Saúde, 2019).

Para aumentar a imunogenicidade, esses antígenos polissacarídeos foram conjugados com proteínas carreadoras. Dependendo da formulação da vacina, pode ser conjugada com a proteína D de *Haemophilus influenzae*, um toxóide tetânico e/ou com uma variante não tóxica da toxina diftérica (CRM<sub>197</sub>), os quais são capazes de induzir resposta imunológica T-dependente, memória imunológica e proteção de longa duração. As Vacinas Pneumocócicas Conjugadas (*Pneumococcal Conjugate Vaccine – PCV*) não interferem apenas na diminuição da DPI, mas também influenciam no estado de portador na nasofaringe, o que não é observado com a vacina polissacarídica PPV-23. Devido à grande quantidade de conjugado necessário para estimular resposta imunológica, e como existem vários sorotipos de pneumococo descritos, apenas um pequeno número de sorotipos pode ser incluído na formulação dessas vacinas conjugadas (Paton & Trappetti, 2018; Ministério da Saúde, 2019).

Os sorotipos incluídos na primeira formulação da vacina conjugada PCV7 (Vacina Pneumocócica Conjugada 7-valente): 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F são conjugados com a proteína carreadora CRM<sub>197</sub>. Esses eram os sete sorotipos mais frequentes entre as crianças estadunidenses, estando envolvidos em  $\geq 70\%$  da DPI antes da introdução da vacina conjugada no calendário de vacinação infantil (Johnson et al., 2010). Em outras regiões, foi demonstrado que a PCV7 apresentava, na época, proteção de 40% dos casos de DPI na Ásia, 60% na África e na América Latina e  $> 80\%$  na Oceania (Cherin, 2007). Para aumentar a cobertura dos sorotipos contidos na vacina, outras formulações da vacina foram desenvolvidas: PCV10 (Vacina Pneumocócica Conjugada 10-valente) e PCV13 (Vacina Pneumocócica Conjugada 13-valente) (Johnson et al., 2010).

A PCV7 foi introduzida no Brasil em 2001 em clínicas particulares e em postos de saúde. Nos postos de saúde, a PCV7 não era disponibilizada para toda a população, ficando restrita para indivíduos que apresentavam algum fator de risco para desenvolver a DPI



(Ministério da Saúde, 2010). Como consequência, apenas uma pequena parcela da população teve acesso à PCV7 (Neves et al., 2017).

Em 2007, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou que todos os países incluíssem em seu calendário de vacinação a PCV10 ou a PCV13 como rotina de imunização (WHO, 2007). No Brasil, em março de 2010, a PCV10 começou a integrar o Calendário Nacional de Imunização Infantil. Essa vacina possui, em sua formulação, os sete sorotipos contidos na PCV7 mais três sorotipos adicionais (1, 5 e 7F). Oito sorotipos são conjugados com a proteína D de *H. influenzae*, o sorotipo 18C com o carreador de toxóide tetânico e o sorotipo 19F com o toxóide diftérico (CRM<sub>197</sub>). A PCV10 está disponível, de forma gratuita, na rede pública de saúde do Brasil para todas as crianças menores de 2 anos de idade. A vacina foi administrada inicialmente no esquema de 3 doses primárias (aos 2, 4 e 6 meses de idade), mais uma dose de reforço (12 meses de idade) (Ministério da Saúde, 2010). Em 2016, houve alteração na quantidade de doses administradas, de 3 doses para 2 doses primárias (aos 2 meses e 4 meses), mais um reforço (12 meses) (Ministério da Saúde, 2017). Para as crianças entre 1 e 4 anos de idade sem comprovação vacinal, é administrada dose única. Na rede privada, a PCV7 foi substituída pela PCV13, que contém os dez sorotipos contidos na PCV10 mais três sorotipos adicionais (3, 6A e 19A), todos são conjugados com a proteína diftérica CRM<sub>197</sub> (Neves et al., 2017; Perdrizet et al., 2020).

Recentemente, em 2019, a PCV13 foi aprovada no Brasil para ser administrada exclusivamente em indivíduos a partir dos 5 anos de idade que apresentam fatores de risco elevados para doença pneumocócica (Ministério da Saúde, 2019; Perdrizet et al., 2020). Ela deve ser administrada sequencialmente com a vacina polissacarídica PPV-23 (Ministério da Saúde, 2019).

O Programa Nacional de Imunizações (PNI) definiu a presença das seguintes comorbidades para considerar um indivíduo de alto risco para doenças pneumocócicas, de acordo com o manual do CRIE (Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais): pacientes vivendo com HIV/AIDS; asplenia anatômica ou funcional e doenças relacionadas; pneumopatias crônicas, exceto asma intermitente ou persistente leve; asma persistente moderada ou grave; cardiopatias crônicas; nefropatias crônicas/hemodiálise/síndrome nefrótica; transplantados de órgãos sólidos ou de células-tronco hematopoiéticas (medula óssea); imunodeficiência devido ao câncer ou à imunodepressão terapêutica; diabetes mellitus; fístula líquórica; fibrose cística; doenças neurológicas crônicas incapacitantes; implante de cóclea; trissomias; imunodeficiências congênitas; hepatopatias crônicas; e doenças de depósito (Ministério da Saúde, 2017).

A Sociedade Brasileira de Pediatria recomendou a vacina PCV13 como rotina na vacinação infantil; porém, até o momento, a PCV13 está disponível apenas em clínicas privadas ou na rede pública, com a utilização restrita para grupos especiais (Berezin et al., 2019). Estudo realizado por Perdrizet e colaboradores (2020) sugere a substituição da PCV10 pela PCV13 devido ao aumento progressivo de doença pneumocócica causada pelos sorotipos 3, 6A e 19A, os quais são cobertos pela PCV13. Se a PCV13 for incluída no calendário de vacinação, a projeção em 5 anos de vacinação é que serão evitados aproximadamente 12.342 casos de bacteremia, 15.330 casos de meningite, 170.191 casos de hospitalização por pneumonia e 25.872 casos de otite média, evitando cerca de 13.709 mortes devido à doença pneumocócica.

O uso das vacinas PCVs resultou na substituição dos sorotipos tanto em casos de colonização como de doença pneumocócica. O desenvolvimento de novos alvos de vacina, por exemplo, PspA e antígenos do pilus (PI-1 e PI-2), não relacionados à cápsula são necessários (Knupp-Pereira et al., 2020). Entretanto, um dos grandes desafios encontrados na formulação de novas vacinas é que as vacinas conjugadas são extremamente eficazes, sendo difícil a realização de um ensaio clínico devido a questões éticas e ao tamanho da amostra que seria necessária para testar as novas vacinas. A avaliação atual de novos produtos para licenciamento é predominantemente com base na demonstração de segurança e na não inferioridade da imunogenicidade em comparação com a PCV. As novas vacinas também devem atuar na colonização e nas doenças não invasivas, e não apenas na DPI, além de produzir efeito indireto na população não imunizada (Simell et al., 2012).

### **1.5 Epidemiologia da Doença Pneumocócica**

Conforme mencionado anteriormente, devido a fatores ligados ao hospedeiro e ao patógeno, ocasionalmente em um indivíduo colonizado, o *S. pneumoniae* pode propagar-se para o tecido próximo à nasofaringe, como seios nasais e cavidade do ouvido médio, causando sinusite e otite média aguda, respectivamente, ou pode alcançar sítios estéreis e causar a DPI (Simmel et al., 2012; Goldblatt & O'Brien, 2018; Weiser, Ferreira & Paton, 2018).

As condições que aumentam o risco de doença invasiva são, de modo geral, a diminuição da função do sistema imunológico, seja por alguma doença de base, seja desencadeada pelo uso de medicamentos imunossupressores. A associação entre DPI e algumas condições é bem conhecida: doenças como asplenia funcional ou anatômica, doença crônica do

coração, pulmão, fígado ou rins, consumo de cigarros e bebidas alcóolicas, vazamento de líquido, implante coclear e doença falciforme aumentam o risco de DPI (CDC, 2020).

Para que seja possível entender a importância da doença pneumocócica, estudos que medem a incidência da doença são importantes. A pneumonia pneumocócica é a condição clínica mais comum de DPI; segundo a OMS, apesar da diminuição no número de mortes em 2019, as infecções respiratórias inferiores são a quarta causa de morte entre as doenças transmissíveis (WHO, 2021). Estimativas mundiais sobre o número de casos de pneumonia entre crianças menores de 5 anos de idade mostram diminuição 22% número de episódios, diminuindo de 178 milhões de casos, em 2000, para 138 milhões de casos, em 2015 (McAllister, et al., 2019). A redução pode ser atribuída a vários fatores, como aumento do desenvolvimento econômico e intervenções preventivas, como a inclusão de vacinas contra pneumococo e *Haemophilus influenzae* tipo b nos programas de imunização infantil (McAllister, et al., 2019; Global Burden of Disease, 2020).

Entretanto, os países que mais contribuíram para o número de casos globais de pneumonia, com mais de 54% dos casos, foram Índia, Nigéria, Indonésia, Paquistão e China. O maior número de mortes por pneumonia, em 2015, com 49% dos casos, ocorreu em países mais pobres, como Índia, Nigéria, Paquistão, República Democrática do Congo e Etiópia. Nesses locais, ainda há um contexto socioeconômico que contribui para as altas taxas de pneumonia infantil, como amamentação precária (não exclusiva), moradias superlotadas, desnutrição, poluição do ar, maior prevalência de crianças com HIV e menor cobertura vacinal. Entretanto, a taxa global de mortalidade por pneumonia entre crianças menores de 5 anos diminuiu 51% em 15 anos (2000-2015) (McAllister et al., 2019). Apesar dessa redução, em 2017, as infecções respiratórias causaram 808.920 óbitos em todo o mundo entre as crianças, tornando evidente a desigualdade entre os países (Global Burden of Disease, 2020).

Entre os adultos, a incidência de hospitalização por PAC diminuiu com a administração da vacina contra o pneumococo nas crianças, devido à proteção indireta (Pilishvili et al., 2010; Griffin et al., 2013). Nos EUA, a pneumonia é a principal causa de hospitalização na população adulta; entre janeiro de 2010 e junho de 2012, a incidência anual de hospitalização por pneumonia foi de 24,8 casos por 10.000 adultos. Em indivíduos entre 50-64 anos de idade, 65-79 anos de idade e  $\geq 80$  anos de idade, a incidência foi de 4, 9 e 25 vezes maior, respectivamente, que a incidência entre a população mais jovem (18-49 anos de idade). Entre os agentes causadores, o pneumococo é a bactéria que mais causa infecção respiratória. O pneumococo foi detectado em 14% dos participantes, com incidência cinco vezes maior na população idosa ( $\geq 65$  anos de idade) (Jain et al., 2015). Segundo dados do *Centers for Disease Control and*

*Prevention* (CDC) estima-se que 150.000 hospitalizações ocorrem anualmente nos EUA devido a complicações de pneumonia pneumocócica. (CDC, 2020).

No Brasil, em 2018, a incidência de DPI entre crianças de 0-2 anos de idade foi de 21/100.000 habitantes; de 2-4 anos foi de 9,9/100.000; de 5-17 anos foi de 5,6/100.000; 18-34 anos foi de 6,2/100.000; de 35-49 anos foi de 7,6/100.000; de 50-64 anos foi de 13/100.000; e  $\geq 65$  anos de idade foi de 41,8/100.000. Fica evidente que os extremos das idades, crianças pequenas e idosos, são os mais suscetíveis à doença pneumocócica (Perdrizet et al., 2020). Estudo realizado de 2005 a 2015, para avaliar as hospitalizações pelo Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil, evidenciou-se que 9,9% (7.829.895) das hospitalizações foram devido a pneumonia; destas, 26,2% ocorreram em crianças menores de 24 meses de idade e 24,3% em idosos com idade  $\geq 65$  anos. O diagnóstico de pneumonia pneumocócica estava presente em 0,5% (42.146) das hospitalizações. A taxa anual de hospitalização por pneumonia em 2015 foi alta nos extremos das idades: aproximadamente 3,433/100.000 habitantes para crianças menores de 12 meses de idade; 2,175/100.000 habitantes para crianças de 12-23 meses de idade; e 1,323/100.000 habitantes para idosos  $\geq 65$  anos (Andrade et al., 2017).

Apesar de as taxas de hospitalização por pneumonia serem altas na população infantil, estudo retrospectivo observacional, realizado entre 1980 e 2010, em crianças de 3 meses a 5 anos de idade, evidenciou que a mortalidade por pneumonia diminuiu de 150/100.000 para 15/100.000, observando-se um declínio de 10% na mortalidade nacional por pneumonia infantil. Nesse mesmo período, o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do Brasil aumentou, mostrando que melhores condições de alimentação, higiene, educação e saúde da população também impactaram na redução da mortalidade por pneumonia (Schuck-Paim et al., 2019). Na região Sul do Brasil, recente estudo mostrou que a pneumonia pneumocócica continua sendo uma importante causa de morbimortalidade; entre a população adulta jovem (18 a 64 anos de idade) e idosa ( $\geq 65$  anos de idade), a taxa de mortalidade foi de 18,1% e 23,7%, respectivamente (Michelin et al., 2019).

Nas cidades de São Paulo e Uberlândia, foi evidenciado que, após a introdução da vacina PCV10 entre as crianças menores de 17 anos de idade, ocorreu diminuição da hospitalização de 20/10.000 internações para 5/10.000 internações ( $p < 0,0001$ ), e na taxa de letalidade de 6,6/10.000 para 2/10.000 internações ( $p < 0,0001$ ) devido à DPI. A pneumonia continua sendo a condição clínica mais frequente, com 58% dos casos. Destes, 49,6% tiveram derrame pleural, seguido por meningite, com 22%, e bacteremia, com 15,9% (Berezin et al., 2019).

Com a diminuição da doença invasiva causada pelo *Haemophilus influenzae* tipo b, devido à vacinação para esse agente, o pneumococo se tornou a principal causa de meningite

bacteriana entre crianças menores de 5 anos de idade nos EUA. Antes da utilização da vacinação contra o pneumococo, as taxas de letalidade entre crianças menores de 1 ano de idade eram bem altas, com aproximadamente 10/100.000 habitantes (CDC, 2020). No Brasil, o pneumococo é a segunda maior causa de meningite bacteriana; entre 2003 e 2018, foram notificados 18.278 casos confirmados com taxa de letalidade de 30% (Ministério da Saúde, 2019).

Segundo dados do Ministério da Saúde sobre a DPI (pneumonia, meningite e bacteremia/seps), obtidos a partir de vigilância de base laboratorial, crianças de até 5 anos de idade tiveram prevalência de infecção pneumocócica de 16,6% (59/355); no grupo etário que compreende indivíduos de 5 a 49 anos, a prevalência foi de 39,4% (140/355); e no grupo de adultos com 50 a  $\geq$  60 anos de idade, a prevalência foi de 43,9% (156/355). Em relação à condição clínica de doença pneumocócica, dos 355 casos totais, independentemente da idade, 58,6% (208/355) foram de bacteremia/seps, seguidos por meningite pneumocócica, com 28,7% (102/355) dos casos e, por último, pneumonia pneumocócica, com 10,7% (38/355) dos casos (Ministério da Saúde, 2020). Vale ressaltar que a única doença pneumocócica que deve ser notificada no Brasil é a meningite, o que faz com que sua vigilância seja de alta qualidade; entretanto, as outras condições clínicas provavelmente estão subnotificadas (Brandileone et al., 2018).

A Otite Média Aguda causada por pneumococo é frequente até o primeiro ano de vida, quando aproximadamente 60% das crianças apresentam pelo menos um episódio de otite, resultando em mais de 18 milhões de consultas anuais, sendo a causa mais comum de administração de antimicrobianos (CDC, 2020). No Brasil, a incidência de otite média permaneceu estável entre 2014 e 2018, quando a incidência anual foi de 1,573/100.000 habitantes. Acredita-se que 20% de todas as causas de otite média ambulatorial tenham o *S. pneumoniae* como agente causador (Perdrizet et al., 2020). Convém considerar que, em geral, a investigação etiológica em otite não é realizada, o que torna os dados inconsistentes.

## **1.6 Impacto da Vacinação na Colonização entre as Crianças**

Com a introdução das vacinas conjugadas no calendário de vacinação infantil em várias regiões do mundo, foi observado um benefício inesperado: a alta produção de IgG específica para um sorotipo reduziu a aquisição desse sorotipo na colonização. Conseqüentemente, as taxas gerais de transmissão reduziram, protegendo, assim, a população não imunizada (proteção indireta). Como considerado anteriormente, crianças, pela elevada prevalência de colonização,

são transmissoras do microrganismo. Como as vacinas conjugadas eliminam o carregamento de pneumococos de sorotipos vacinados, a cadeia de transmissão é bloqueada (CDC, 2005; O'Brien et al., 2007).

Entretanto, devido a uma pressão seletiva causada pela PCV, os sorotipos não vacinais começaram a ocupar o nicho dos sorotipos vacinais. Essa substituição de sorotipos, conhecida como “*replacement*”, permitiu que sorotipos não vacinais – que antes da vacinação eram transportados na população, porém em menor frequência – aumentassem a sua frequência entre os colonizados. Como consequência, houve aumento na probabilidade de transmissão entre as pessoas e na progressão para a DPI por sorotipos não vacinais. Ou seja, devido ao impacto da vacinação, houve diminuição da colonização e da DPI causada por sorotipos vacinais, junto a um aumento relativo na frequência de sorotipos não vacinais. Inevitavelmente, a vacinação provoca a redistribuição dos sorotipos mais frequentes, causando colonização e, conseqüentemente, a DPI (Paton & Trappetti, 2018).

Outro evento que ocorre é o “*Switching*” capsular. Os pneumococos de sorotipos vacinais podem adquirir os genes que codificam a síntese da cápsula de um sorotipo não vacinal; assim, ocorre a troca de cápsula que é expressa na superfície da célula bacteriana (Paton & Trappetti, 2018). Os genes que codificam um tipo capsular, por transformação e recombinação, são trocados por genes que codificam outro tipo capsular. Esse mecanismo de troca permite que clones geralmente associados a sorotipos vacinais persistam após a vacinação, mantendo seu *background* genético, porém expressando outro sorotipo em sua superfície, burlando os efeitos da vacinação (Brueggemann et al., 2007).

Nos EUA, no ano de 2000, foi introduzida a vacina PCV7 no calendário de vacinação infantil. Drasticamente, a taxa anual de DPI diminuiu entre as crianças menores de 5 anos, de 95,2/100.000 habitantes em 1998-1999 para 22,6/100.000 habitantes em 2004. A redução também foi observada em outros grupos da população. Paralelamente a esse evento, o sorotipo 19A, que não faz parte da PCV7, após a vacinação, tornou-se o sorotipo mais frequente entre crianças < 5 anos de idade e o segundo mais frequente entre idosos. Entre crianças menores de 5 anos de idade, a incidência do sorotipo 19A aumentou de 2,5/100.000 habitantes em 1998-1999 para 7,8/100.000 em 2004 ( $p < 0,01$ ) (Hicks et al., 2007).

Como a colonização é a primeira etapa para o desenvolvimento da doença pneumocócica, estudo com portadores são importantes para entender essa relação. Antes da introdução da PCV7, o sorotipo 19A era um sorotipo não vacinal isolado entre crianças colonizadas, porém não era o mais frequente. Com a pressão seletiva causada pela vacinação e a resistência aos antimicrobianos, ambos os fatores podem ter contribuído para que o sorotipo

19A ocupasse o nicho dos sorotipos vacinais na nasofaringe (Brueggemann et al., 2003). Aumento significativo desse sorotipo entre portadores foi consistente com o seu aumento em DPI no período pós-PCV7; o sorotipo 19A contribuiu quase que predominantemente nessas duas situações (Htar et al., 2019). A emergência do sorotipo 19A não ficou restrita aos EUA; em várias regiões, após a introdução da PCV7 ou PCV10, o sorotipo 19A foi identificado como o sorotipo mais prevalente associado à DPI, causando aproximadamente 20% de todos os casos nas Américas, na Europa e em países da região do Pacífico (Balsells et al., 2017).

Para contornar essa situação, no ano de 2010, nos EUA, a PCV7 foi substituída pela PCV13, a qual contém o sorotipo 19A em sua formulação, além dos sorotipos 1, 3, 5, 6A e 7F. Estudo realizado com crianças do estado da Geórgia (EUA), comparando período anterior e posterior à PCV13, evidenciou que em 2010, 29% (36/124) da colonização era causada por sorotipos vacinais, diminuindo para 3% (3/99) em 2013 ( $p < 0,0001$ ), seguida da introdução da PCV13. Entretanto, apesar do impacto positivo da vacinação, que levou à diminuição da circulação de sorotipos vacinais, a ocorrência de mecanismos de escape (sobretudo *replacement*) do pneumococo foi observada. Devido a esse fenômeno, a colonização geral permaneceu estável entre crianças nos EUA, aproximadamente de 30%, ocorrendo apenas uma mudança na distribuição dos sorotipos: após a PCV13, os sorotipos não vacinais (não PCV13) aumentaram de 68,4% (78/114) para 97% (95/98) ( $p < 0,0001$ ), com aumento significativo do sorotipo 35B (Desai et al., 2015).

Estudo transversal conduzido em dois períodos diferentes, 2010 (501 crianças) e 2013 (1167 crianças), com crianças de 12-23 meses de idade, recrutadas em centros de saúde durante campanha de vacinação no Brasil, detectou o pneumococo na nasofaringe em 40,3% das crianças coletadas em 2010 e 48,8% em 2013. Os sorotipos vacinais foram encontrados em 19,8% (2010) e 1,8% (2013), mostrando a influência da vacinação na população-alvo da PCV10 em diminuir em 90,9% os sorotipos vacinais entre crianças. Entretanto, foi verificado aumento do sorotipo não vacinal 6C, de 1,8% (2010) para 11,2% (2013) ( $p < 0,001$ ). Nesse estudo, não foi possível observar aumento dos sorotipos 6A e 19A em apenas 3 anos após a introdução da PCV10 (Brandileone et al., 2016).

Contudo, em 2017, foi possível evidenciar o aumento do sorotipo 19A. Estudo realizado por Brandileone e colaboradores (2019), com 531 crianças entre 12 meses e < 24 meses recrutadas de uma unidade pública de saúde, detectou prevalência total de pneumococo isolado da nasofaringe de 62,3%. A colonização aumentou 40,3% (estudo de *baseline* – 2010 e 2013) para 59,7% em 2017 ( $p < 0,001$ ). Frequentar a creche estava associado a maior frequência de isolamento do pneumococo na nasofaringe ( $p < 0,001$ ). A colonização por sorotipos vacinais

diminui significativamente no período após a PCV10. Entretanto, houve aumento significativo dos sorotipos não vacinais, com maior prevalência do sorotipo 6C (27%), 15B (9,8%), 19A (9,2%), 15A (6%) e 16F (5,7%).

Estudo realizado em Moçambique antes da introdução da PCV10 mostra uma taxa de colonização entre crianças com e sem HIV mais alta do que a encontrada no Brasil. Evidencia-se que a colonização muda conforme a região estudada, sendo maior em países mais pobres, com prevalência total de 80,5%, sendo de 81,5% e 79,1% para crianças infectadas pelo HIV e não infectadas pelo HIV, respectivamente. Os sorotipos mais prevalentes foram 19F, 23F, 6A, 6B e 19A. Nesse estudo, não foi identificado nenhum fator de risco associado à colonização, porém, devido à pouca quantidade de crianças não colonizadas, ficou difícil de fazer essa comparação (Verani et al., 2018).

Estudo realizado em Niterói, no Rio de Janeiro, entre crianças menores de 6 anos de idade, identificou taxa de colonização de 22,6%, menor do que a encontrada por outros estudos brasileiros. Entre os fatores associados à colonização, frequentar creches, apresentar alguma doença respiratória aguda ou crônica e residir em moradias precárias e superlotadas (favelas) podem facilitar o aumento da frequência de transmissão entre as crianças. Nesse estudo, foi observado aumento do sorotipo 6C associado a um perfil de resistência aos antimicrobianos (Neves et al., 2017).

Estudo realizado no Brasil com crianças < 6 anos de idade vacinadas com a PCV13 detectou taxa de colonização por pneumococo de 25% (9/36). Nesse estudo, os fatores associados à colonização foram: apresentar sintomas respiratórios como tosse/expectoração; e frequentar a creche. Predominantemente, os sorotipos encontrados foram não cobertos pela PCV13 (15B/C, 6C, 11A/D, 16F, 23A e 23F, além de cepas não tipáveis). Os autores relatam que a vacinação com a PCV13 pode contribuir para diminuir a frequência dos principais sorotipos que estão circulando entre as crianças e que estão atualmente associados à DPI, por exemplo, o sorotipo 19A. Contudo, deve-se considerar que o estudo utilizou um número pequeno de amostras, o que limita a extrapolação dos resultados (Neves et al., 2019).

### **1.7 Colonização entre os Idosos**

A maioria dos estudos sobre colonização é conduzido em crianças, mostrando altas taxas de prevalência em relação aos idosos. Um dos grandes desafios é entender por que a taxa de colonização é substancialmente menor entre os idosos quando comparada com a das crianças,



apesar de as duas populações serem as mais acometidas pela DPI. Na revisão realizada por Arguedas e colaboradores (2020), foi identificada uma taxa de colonização que variou de 0% a 6% entre os idosos, estando de acordo com o único estudo realizado até o momento no Brasil (Zanella et al., 2019). Foi realizado um estudo de coorte com indivíduos de  $\geq 60$  anos de idade, atendidos na Divisão de Geriatria de um Hospital de São Paulo; como resultado, a taxa de colonização foi de 2,2% (17/776) na primeira visita e de 2,6% (15/584) na visita de acompanhamento. Entre os fatores de associação para a colonização, ser do sexo masculino e não ter diabetes se mostraram estar mais presentes em indivíduos colonizados. A vacina PPV-23, única disponível para esta faixa etária, foi administrada em 26,16% (203/776) dos indivíduos coletados na primeira visita e 30,82% na visita de acompanhamento (180/584). A maioria dos sorotipos encontrados não pertenciam a PCVs, exceto os sorotipos 7F, 3 e 19A (Zanella et al., 2019).

Em 2014, a PCV13 foi licenciada nos EUA para idosos de  $\geq 65$  anos de idade. O objetivo seria controlar a doença pneumocócica nesse grupo da população, pois, apesar dos benefícios da imunidade de rebanho com a vacinação na população infantil, ainda era alta a incidência da doença entre os idosos. Devido à importância de compreender a dinâmica do pneumococo em indivíduos adultos colonizados e avaliar o efeito da vacinação, estudo realizado naquele país, em 2015-2016, evidenciou taxa de colonização de 1,8% para idosos não institucionalizados. A prevalência de sorotipos vacinais entre a população vacinada e não vacinada foi similar, o que foi atribuído ao pouco tempo de vacinação entre os idosos. Não foi possível determinar se a baixa prevalência foi influenciada pelo efeito direto ou indireto da PCV13. Entre os fatores associados à colonização, apenas sintomas respiratórios apresentaram razão de chances de 2,1 para a colonização (Milucky et al., 2019).

Na revisão sistemática realizada por Smith e colaboradores (2020), verificou-se que alguns sorotipos vacinais, apesar de não serem frequentes entre as crianças colonizadas, são identificados em adultos colonizados, mostrando a persistência na circulação desses sorotipos, como 3, 8 e 19A. Nesse estudo, demonstrou-se que os fatores associados à colonização entre os idosos são: fumar; ter contato com crianças; e residir em casas de repouso para idosos. A fumaça do cigarro modifica a microbiota oral, aumentando a proporção de microrganismo associados a infecção respiratória. Além disso, há maior suscetibilidade do hospedeiro à infecção por vírus respiratórios devido à atividade prejudicada do fluxo mucociliar, o que aumenta a permeabilidade do epitélio respiratório. O contato com crianças é um fator que comprova que as crianças são o reservatório de pneumococo. Além disso, a transmissão também pode ocorrer

entre adultos; portanto, viver em asilos é um fator de risco devido a condições de aglomeração, proporcionando a ocorrência de surtos de infecções.

### **1.8 Dificuldade de Determinar a Colonização entre os Idosos**

A menor taxa de colonização entre idosos em relação a crianças pode ser devido a fatores associados ao hospedeiro ou a problemas técnicos – por falta de padronização na coleta, no processamento da amostra e na técnica para determinar a frequência de colonização (Arguedas et al., 2020).

Em relação aos fatores associados ao hospedeiro: maturidade do sistema imunológico, que aumenta com a idade; desenvolvimento de imunidade sorotipo-específica, devido às múltiplas exposições que ocorrem ao longo da vida do indivíduo. Estudos mostram também que há diminuição de receptores de pneumococo na nasofaringe em adultos (Regev-Yochay et al., 2004; Krone et al., 2014).

A OMS recomenda a coleta de *swab* único de nasofaringe para as crianças, com a realização do exame cultural para *screening* de portadores, e metodologia de *Quellung* para detectar os sorotipos capsulares. Em 2013, a OMS recomendou a coleta de amostras de nasofaringe e orofaringe entre os adultos (Satzke et al., 2014). Entretanto, a comunidade científica acredita que, nos últimos anos, a prevalência de portador em adultos está subestimada. Isso porque a definição do melhor material respiratório para coletar e identificar pneumococo em portadores adultos ainda não é padronizado, diferentemente das crianças (Arguedas et al., 2020).

Devido a essa falta de padronização, os estudos não realizam a mesma metodologia para coletar as amostras entre adultos. Alguns pesquisadores determinam a prevalência de colonização a partir de vários sítios anatômicos, por exemplo, nasofaringe e/ou orofaringe e/ou amostras de saliva (Krone et al., 2015; Branche et al., 2018). Estudo realizado por Trzcinski e colaboradores (2013), que coletou as três amostras de cada participante, demonstrou que amostras de orofaringe e saliva são superiores a amostras de nasofaringe. A frequência de colonização foi de 19% utilizando amostras da nasofaringe, e de 35% com amostras orais (orofaringe e saliva). Outro problema enfrentado é que alguns estudos realizam uma etapa adicional antes da cultura de *screening*, utilização de um caldo de enriquecimento para aumentar a chance de detecção do pneumococo (Grant et al., 2018).

É preciso aqui focar estudos em que os *swabs* de nasofaringe e orofaringe tenham sido testados diretamente com PCR em tempo real, sem a realização do método cultural. A maior vantagem é a possibilidade de detectar a colonização por múltiplos sorotipos, pois, no método cultural, apenas colônias visualmente diferentes serão detectadas. A técnica de PCR aumenta a taxa de detecção em relação ao método de cultura. Em estudo de vigilância, realizado com idosos de  $\geq 65$  anos de idade, em que foram coletados *swabs* de nasofaringe e orofaringe no inverno de 2015 e, após isso, foram coletados mensalmente por 12 meses, foi verificada incidência cumulativa de 41% por PCR e 14% por cultura. A prevalência mensal variou de 0 a 17% por PCR e de 1 a 4% por cultura método cultural. Entretanto, os resultados devem ser analisados com cautela devido à possibilidade de resultados falso-positivos em razão da presença de outras espécies de *Streptococcus* spp. geneticamente relacionados com o pneumococo, principalmente em amostra de orofaringe e saliva (Branche et al., 2018). Para diminuir a chance de resultados errôneos, a técnica mais promissora é PCR em tempo real utilizando dois alvos específicos, o gene *lytA* e *piaB* para diminuir os resultados falso-positivos (Arguedas et al., 2020).

### **1.9 Impacto da Vacinação na Doença Pneumocócica Invasiva**

Apesar de o pneumococo possuir mecanismos que permitam o escape a imunoprofilaxia (*Replacement* e *Switching* capsular), são indiscutíveis os efeitos positivos que as vacinas proporcionam, diminuindo as taxas de incidência de DPI e mortalidade tanto na população-alvo da vacina quanto nos indivíduos que não são vacinados. Nos EUA, após a introdução da vacina conjugada PCV7 em 2000, foi possível observar redução significativa na incidência de doença invasiva entre crianças menores de 5 anos de idade, devido aos sorotipos vacinais, reduzindo de 78,9/100.000 habitantes em 1998-1999 para 2,7/100.000 habitantes em 2004. Além disso, houve redução na taxa de hospitalização entre as crianças, diminuindo de 27,2/100.000 admissões em 1998-1999 para 10,1/100.000 admissões em 2004 (Hicks et al., 2007). A PCV7 foi associada a redução de 5% a 40% de todas as causas de pneumonia para os diferentes grupos de idades entre crianças, além de diminuir significativamente a hospitalização por pneumonia entre essa população (Wiese, Griffin & Grijalva, 2019).

Entretanto, como já apresentado, nos anos seguintes à introdução da PCV7, observou-se aumento de sorotipos não vacinais, principalmente o sorotipo 19A. Esse fato foi motivador para que a PCV7 fosse substituída pela PCV13, nos EUA, em 2010. A utilização da PCV13 foi

associada a declínios adicionais: em 2012, foi observado redução na taxa de hospitalização por pneumonia de 21% entre as crianças < 2 anos de idade e 17% entre as crianças com 2-4 anos de idade (Simonsen et al., 2014).

Destacam-se aqui dois estudos que avaliaram o impacto da PCV10 em países da África. Estudo realizado no Quênia, que introduziu a PCV10 no seu calendário de vacinação em 2011, evidenciou que, entre crianças menores de 5 anos, a incidência anual de DPI causada por sorotipos vacinais diminuiu. Houve redução de 92% nos casos, com diminuição de 60,8/100.000 indivíduos no período anterior à PCV10 para 3,2/100.000 indivíduos após a PCV10. A redução da incidência foi observada para todos os sorotipos da PCV10; porém, a redução mais significativa foi para os sorotipos 1 e 14, os quais eram os sorotipos mais comuns no período pré-vacinal. A PCV10 praticamente eliminou o sorotipo 1 em casos de DPI (Hammit et al., 2019). Foi possível verificar o efeito indireto da vacinação infantil na população adulta do Quênia com alta prevalência de HIV, reduzindo a incidência bruta e ajustada de pneumonia pneumocócica de 3,14/100 e 5,30/100 indivíduos, respectivamente, em 2008 e 2010 para 0,53/100 em 2012 e para 0,13/100 em 2016 (Bigogo et al., 2019).

Em Moçambique, que também utiliza a PCV10 em seu calendário de vacinação desde 2013, houve redução do número de casos de meningite de 33,6% (124/369) em 2013 para 1,9% (3/160) em 2015 ( $p < 0,001$ ) entre crianças menores de 5 anos de idade. A frequência dos sorotipos vacinais diminuiu de 84,2% para 0% em 2015 ( $p = 0,006$ ), apenas sorotipos não vacinais foram detectados em 2015 (Nhantumbo et al., 2017).

Dentre os países que adotaram massivamente a PCV10 em crianças, o Brasil é um dos maiores e mais populosos. Desse modo, vale destacar estudos realizados no Brasil com a intenção de avaliar a efetividade dessa vacina. Estudos realizados logo após a introdução da PCV10 já evidenciaram seu impacto positivo na redução da DPI, principalmente na população-alvo da vacinação. Em um estudo caso-controle, realizado de março de 2010 a dezembro de 2012 em 10 estados brasileiros, foi possível evidenciar o impacto positivo da vacinação entre as crianças. A eficácia da vacina foi de 83,8% contra sorotipos vacinais causando DPI, sendo que metade das condições era de meningite, 77,9% para sorotipos relacionados e 37,5% de efetividade para sorotipos não vacinais. Os sorotipos mais prevalentes foram 14 (22%), seguido de 6B (10%), 19A (9%), 3 (9%), 6A (7%) e 23F (6%) (Domingues et al., 2014). Estudo realizado em São Paulo evidenciou, entre crianças menores de 2 anos de idade, redução significativa na incidência total de DPI, diminuindo de 20,3/1000 indivíduos no período pré-vacinação para 3,97/1000 indivíduos após a introdução da vacina ( $p < 0,0012$ ). Em relação aos sorotipos vacinais contidos na PCV10, houve redução também de seu envolvimento na DPI

entre crianças menores de 2 anos de idade, de 16,47/1000 indivíduos para 0,44/1000 ( $p = 0,0002$ ), mostrando o efeito direto da vacinação nas taxas de DPI (Santos et al., 2013).

Em Salvador, a incidência anual de casos de meningite diminuiu de 1,65/100.000 habitantes em 1996 para 0,2/100.000 habitantes em 2012 (Santos et al., 2015). Em relação ao Rio Grande do Sul, as taxas de incidência de meningite diminuíram de 3,80/100.000 em 2007 para 1,80/100.000 habitantes em 2012 (Grando et al., 2015).

A vacinação não apenas diminui a incidência de DPI, mas também impacta na redução dos custos de saúde, pois há redução no número de internações e complicações devido a doença pneumocócica. Quando comparado o período anterior à PCV10 (2002-2009) e posterior à PCV10 (2011-2012), houve redução de 12,65% nas hospitalizações por pneumonia de crianças de 0 a 4 anos de idade (Scotta et al., 2014). Mais recentemente, no estado de Santa Catarina, houve redução nas taxas de hospitalização por pneumonia de 23,3% entre as crianças menores de 1 ano de idade, as quais são alvo da vacinação, e de 8,4% entre crianças de 1 a 4 anos de idade (Vieira & Kupek, 2018).

Ao ser avaliada a taxa de mortalidade em casos de meningite por pneumococo, verificou-se redução nas taxas entre crianças menores de 2 anos de idade de 1,30/100.000 para 0,40/100.000 habitantes. A PCV-10 reduziu em 50% a taxa de incidência e em 69% a taxa de mortalidade por meningite pneumocócica, comparando os anos de 2007 e 2012 (Grando et al., 2015).

Estudo baseado em série histórica retrospectiva, conduzido por Berezin e colaboradores (2019) com crianças hospitalizadas com diagnóstico laboratorial de DPI, avaliou as mudanças na taxa de letalidade e na necessidade de internação da Unidade de Terapia Intensiva (UTI), comparando o período anterior à PCV10 (2005-2009) e posterior à PCV10 (2011-2015). Observou-se que houve redução tanto nas taxas de hospitalizações, de 20 casos para 5 casos por 10.000 admissões pediátricas ( $p < 0,0001$ ), quanto nas taxas de letalidade, diminuindo de 6,6 para 2 casos por 10.000 admissões ( $p < 0,0001$ ), e no número de admissões na UTI.

Ao comparar os casos de meningite e não meningite cinco anos após a introdução da PCV10, foi evidenciado que, na população-alvo da vacina, houve redução de 83,4% de casos de meningite causada por sorotipos vacinais e 87,4% de redução para casos de não meningite. Já para os idosos com idade  $\geq 65$  anos, constatou-se redução de casos de meningite e não meningite causada por sorotipos vacinais de 47,4% e 53,4%, respectivamente, mostrando os benefícios da vacinação mesmo na população que não é alvo, evidenciando a imunidade de rebanho para DPI causada por sorotipos da PCV10. Foi demonstrado redução  $> 50\%$  nos casos

absolutos de DPI, assim como redução em casos fatais e no número de admissões na UTI (Brandileone et al., 2018).

Mesmo após a vacinação, a pneumonia entre as crianças hospitalizadas continua sendo a condição clínica mais prevalente de DPI, com 58% (143/245) dos casos, seguida de meningite (22%; 54/245) e bacteremia (15,9%; 39/245). Analisando-se os sorotipos mais frequentes, houve diminuição dos sorotipos da PCV10, sendo essa redução associada principalmente ao sorotipo 14, o qual era o mais prevalente no período pré-vacinal. Os sorotipos adicionais da PCV13 aumentaram de 7% para 21% após a vacinação com a PCV10, e os sorotipos não vacinais (não fazem parte da formulação da PCV10 nem da PCV13) de 11% para 29% (Berezin et al., 2019). Em estudo de série temporal, mostrou-se diminuição de 41,3% dos sorotipos vacinais causando DPI em crianças de 2 a 23 meses de idade, enquanto os sorotipos adicionais da PCV13 aumentaram 62,8% entre crianças menores de 5 anos de idade, mostrando o efeito que as PCVs possuem em redistribuir a frequência dos sorotipos envolvidos na DPI (Andrade et al., 2016).

### **1.10 Aumento do sorotipo 19A após a vacinação**

Apesar dos impactos positivos das PCVs até mesmo na população não alvo, o uso dessas vacinas mudou a distribuição dos sorotipos mais prevalentes como causa de doença pneumocócica, havendo diminuição dos sorotipos vacinais e aumento dos sorotipos não vacinais. Destaca-se o aumento do sorotipo 19A em países que incluíram a vacina PCV7 ou a PCV10 em seus calendários de vacinação (Isturiz et al., 2017; Cassiolato et al., 2018). Vale ressaltar que a epidemiologia do pneumococo está constantemente mudando; essa mudança é favorecida pela própria flutuação na prevalência dos sorotipos, que ocorre naturalmente, mesmo na ausência de pressão causada pela vacinação ou pelo uso de antimicrobianos (Hulten et al., 2013).

O sorotipo 19A começou a ganhar destaque quando emergiu como o sorotipo mais prevalente nos EUA após a utilização da PCV7. Isso chamou a atenção da comunidade científica devido à sua principal característica: é um sorotipo que contém variantes relacionadas à resistência a múltiplas drogas. De 1999-2000 para 2008-2009, a proporção dos sorotipos vacinais entre isolados clínicos nos EUA diminuiu de 55% para 5%, e a proporção do sorotipo 19A aumentou de 2% para 22% (Richter et al., 2013). A incidência de DPI causada por sorotipos 19A em crianças < 5 anos de idade aumentou de 0,8/100.000 para 2,7/100.000

indivíduos após 7 anos da introdução da PCV7 (Pilishvili et al., 2010). A PAC permaneceu estável, mesmo após a introdução das PCV7 devido à circulação de alguns sorotipos. Em 2006-2009, 65-70% dos casos de pneumonia pneumocócica foram causados pelos sorotipos 19A, 3 e 7F, sendo que 30-50% foram consequência do sorotipo 19A, contribuindo para a substituição da PCV7 pela PCV13 (Wunderink et al., 2018; Wiese, Griffin & Grijalva, 2019). Após introdução da PCV13, houve redução significativa na incidência de DPI, principalmente na prevalência do sorotipo 19A (Moore et al., 2015).

No Brasil, a partir da utilização massiva da PCV10, havia expectativa em relação à potencial emergência de sorotipos não integrantes da vacina, do sorotipo 19A em particular. Cabe, portanto, destacar estudos que investigaram a distribuição dos sorotipos causadores de infecção após o uso da PCV10 no Brasil.

Após dois anos da introdução da PCV10, ainda não se tinha observado aumento significativo na proporção de isolados pertencentes ao sorotipo 19A, aumentando de 2,5% antes da PCV10 para aproximadamente 5% em 2012 (Caierão et al., 2014). Inicialmente, acreditava-se que a PCV10 poderia induzir proteção cruzada entre o sorotipo vacinal 19F e não vacinal 19A (Domingues et al., 2014; Verani et al., 2015); entretanto, devido ao aumento do sorotipo 19A evidenciado em outros estudos, essa ideia não é mais suportada (Brandileone et al., 2018; Cassiolato et al., 2018; Brandileone et al., 2019; Hammitt et al., 2019).

Estudo de vigilância, realizado por Brandileone e colaboradores (2018), verificou que, nos casos de meningite para todas as idades, os sorotipos vacinais que representavam 55,7% dos casos no período anterior à vacina (2005-2009) diminuíram para 18,8% no período pós-vacina (2014-2015). Já os sorotipos não vacinais aumentaram de 44,4% nos anos pré-vacina (2005-2009) para 81,2% após a vacina (2014-2015). Os sorotipos não vacinais que mais ganharam destaque foram os sorotipos 6C (10%), 3 (9,8%) e 19A (9,2%). São sorotipos que não estão incluídos na PCV10, mas fazem parte da PCV13. Já para os casos de não meningite, os sorotipos mais prevalentes pós-vacinação foram 19A (13,4%), 3 (10,6%), 12F (5,7%), 8 (5,5%) e 6C (4,8%). Nesse estudo, os investigadores mostraram que, 5 anos após a introdução da vacina PCV10 no calendário de vacinação infantil do Brasil, foi possível verificar diminuição considerável de DPI causada por sorotipos vacinais, mudando o perfil dos sorotipos mais prevalentes causadores da doença pneumocócica.

O aumento do sorotipo 19A foi evidenciado entre 2014-2015, quando se tornou o sorotipo mais prevalente em casos de não meningite, com 13,4% dos casos (Brandileone et al., 2018). Cassiolato e colaboradores (2018) observaram aumento do sorotipo 19A de 2,8% em 2005-2009, 7% em 2011-2015, para 16,4% em 2016-2017. Esse aumento foi observado

principalmente entre crianças menores de 5 anos de idade. Dados recentes do Ministério da Saúde de vigilância com base laboratorial mostram que o sorotipo 19A é o mais prevalente em todas as idades em DPI no Brasil (Ministério da Saúde, 2020).

### 1.11 Genótipo do Sorotipo 19A - ST320

Com as técnicas de genotipagem, é possível estabelecer relações genéticas entre os isolados de pneumococo. Atualmente, a técnica de MLST (*Multilocus Sequence Typing*) é a mais difundida. Ela foi desenvolvida por Enright e Spratt (1998) e baseia-se na amplificação e no posterior sequenciamento de sete genes constitutivos (*housekeeping*) (genes *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* e *ddl*), considerados estáveis e menos propensos a eventos de recombinação que o restante do genoma. Assim, propicia-se o estudo de possíveis mudanças que ocorrem na população ao longo do tempo. Cada sequência obtida a partir dos sete genes gera uma sequência tipo (*Sequence Type* ou ST), que será comparada com um banco de dados internacional.<sup>1</sup> Para que um isolado seja considerado como pertencente ao mesmo Complexo Clonal (CC), esse isolado deve ter no mínimo 5 alelos iguais entre os sete analisados (Rayner et al., 2015).

Após a introdução da PCV7 nos EUA, o CC320, mais especificamente a ST320, foi o clone mais importante que emergiu relacionado ao sorotipo 19A. Essa ST é uma *Doble Locus Variant* (DLV) da ST236 (clone Taiwan<sup>19F</sup>-14), ou seja, elas compartilham cinco alelos dos sete analisados pelo MLST (Hsieh et al., 2013). Primeiramente detectado como sendo do tipo capsular vacinal 19F, foi identificado em um hospital taiwanês em 1997, espalhou-se globalmente antes da introdução da PCV7, com características de resistência a antibióticos. Esse clone pertence à ST236, que sofreu um evento de *switching* capsular entre o sorotipo 19F e o sorotipo não vacinal 19A, resultando na ST320 (Croucher et al., 2014).

A evolução genética do clone ST236 para ST320, em que a ST320 melhor se adaptou à colonização da nasofaringe, não reflete apenas na mudança do sorotipo capsular (*switch*), mas também nas mudanças de outros *loci*, como a transferência de genes relacionados à resistência à penicilina. Em países onde a PCV7 era ausente ou a cobertura vacinal muito baixa, verificou-se também aumento da ST320, mostrando que a pressão seletiva causada pelo uso de antimicrobiano pode também influenciar na emergência do sorotipo 19A pertencente à ST320.

---

<sup>1</sup> Disponível em: [www.pubmlst.org/spneumoniae/](http://www.pubmlst.org/spneumoniae/). Acesso em: 6 set. 2021.



Além disso, o sorotipo 19A pertencente à ST320 é mais virulenta que seu ancestral, a ST236 (Hsieh et al., 2013).

No Brasil, nos últimos anos, foi observado, após a vacinação com a PCV10, o aumento do sorotipo 19A associado à expansão clonal do CC320 e, conseqüentemente, ao aumento da resistência antimicrobiana em doença pneumocócica entre crianças e adultos  $\geq 50$  anos de idade (Cassiolato et al., 2018; Christophe et al., 2018). A presença do CC320 entre portadores de pneumococo na nasofaringe é preocupante devido a maior chance de propagação dessa cepa, que possui como característica perfil de resistência mais elevado (Brandileone et al., 2019). A ST320 foi a mais representativa, com 86,9% dos isolados, sendo responsável pela expansão do CC320 após a vacinação infantil, mostrando que a combinação de fatores como a vacinação e a pressão seletiva devido ao uso de antimicrobianos contribuíram para o seu aumento (Cassiolato et al., 2018). Na região sul do país, houve aumento da ST320 entre adultos com DPI maiores de 50 anos de idade, com 77% dos isolados do sorotipo 19A (Christophe et al., 2018).

### **1.12 Resistência aos Antimicrobianos**

O sucesso da evolução clínica da DPI, entre diversos fatores, é influenciado pela escolha do tratamento adequado e rápido. Especialmente em casos de meningite, o tratamento é extremamente importante para evitar sequelas neurológicas e mortalidade entre os pacientes (Ruckinger et al., 2009). Em casos de pneumonia, devido a maiores de taxas de complicação com tratamento tardio, é recomendado o tratamento com antimicrobianos de forma empírica devido às limitações da cultura, de escarro especialmente, e do tempo necessário para avaliação da resistência por intermédio dos testes de suscetibilidade. Assim, apenas com o diagnóstico de pneumonia obtido com exames clínicos e radiológicos é possível iniciar o tratamento de infecção respiratória devido à epidemiologia da doença, sendo o pneumococo o agente etiológico mais prevalente (Corrêa et al., 2018).

A penicilina era o antimicrobiano de escolha no tratamento de infecções pneumocócicas. Devido à emergência de pneumococo não suscetível à penicilina (PNSP) ou multirresistentes (MDR), classificados como isolados apresentando resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e a mais outras duas outras classes de antimicrobianos, o tratamento dessas infecções tornou-se um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo (Lee et al., 2010; Tsai et al., 2012). O pneumococo faz parte da lista dos microrganismos classificados como “ameaça séria” de resistência aos antimicrobianos pelo CDC (CDC, 2020). Em 2018, a OMS

publicou uma lista de patógenos prioritários para o desenvolvimento de novos antimicrobianos com o objetivo de estimular a formulação de novas drogas para reduzir a mortalidade mundial devido a infecções causadas por microrganismos resistentes, e o PNSP faz parte do nível de prioridade médio (WHO, 2018).

Segundo a diretriz da Sociedade Brasileira de Pneumologia, o tratamento empírico recomendado para pacientes com pneumonia adquirida na comunidade, sem comorbidades e sem uso recente de antimicrobiano, e para os quais está previsto tratamento ambulatorial, é o uso de monoterapia com  $\beta$ -lactâmicos (amoxicilina ou amoxicilina em combinação com ácido clavulânico) ou macrolídeos (azitromicina ou claritromicina). Para os pacientes com comorbidades, é recomendado prescrever um antimicrobiano  $\beta$ -lactâmicos e um macrolídeo. Para aqueles pacientes com alergia, recomenda-se utilizar uma quinolona (moxifloxacino, levofloxacino ou gemifloxacino). Já para pacientes internados em ambiente hospitalar, deve-se utilizar uma cefalosporina de terceira geração (ceftriaxona ou cefotaxima) ou ampicilina/sulbactam e um macrolídeo ou amoxicilina/ácido clavulânico. Ressalta-se aqui que essa diretriz usa abordagem sindrômica para o manejo das PAC (Corrêa et al., 2018).

Os  $\beta$ -lactâmicos se ligam às Proteínas de Ligação à Penicilina (PBP) que catalisam o estágio terminal da síntese do peptidoglicano, principal constituinte da parede celular bacteriana, tendo efeito bactericida, provocando a lise celular. O primeiro relato de resistência à penicilina por pneumococos ocorreu na década de 1960; porém, esse fato só ganhou importância em 1977, quando foi relatada uma epidemia de infecções por pneumococo na África do Sul (Appelbaum et al., 1977).

Existem três classes de proteínas, totalizando seis diferentes tipos de PBPs. Classe A (PBP1a, PBP1b e PBP2a), classe B (PBP2x e PBP2b) e PBP3. A diminuição da afinidade das PBPs à penicilina pode envolver alteração em PBP única ou em diferentes PBPs ao mesmo tempo, conferindo diferentes perfis de suscetibilidade. Mutações em PBP2x e PBP2b estão fortemente relacionadas à resistência à penicilina. Mutações em PBP1a juntamente a PBP2b e PBP2x aumentam a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da penicilina. Alterações em PBP2a apresentam CIMs mais baixos (Cornick & Bentley, 2012). As cefalosporinas de terceira e quarta geração (ceftriaxona, cefotaxima e cefepima), e carbapenêmicos são menos afetados por essas alterações na PBP; contudo, na medida em que as mutações se acumulam, a afinidade entre o sítio de ligação e o antimicrobiano diminui, com o correspondente aumento da CIM (Cherazard et al., 2017).

Eritromicina, azitromicina e claritromicina são antimicrobianos da classe dos macrolídeos e atuam se ligando reversivelmente a 23S rRNA – um componente da subunidade

50S do ribossomo da bactéria –, inibindo a síntese de proteína dependente de RNA (Zhanel et al., 2001). Existem dois mecanismos de resistência: devido a bombas de efluxo expulsando o antimicrobiano para fora da célula bacteriana codificada pelo gene *mef(A)*, com característica de apresentar menores resultados de CIM; ou devido a alteração na molécula alvo (ribossomo). Essa última é codificada pelo gene *erm(B)*, apresentando maiores níveis de resistência (Niederman, 2015).

Clindamicina é uma droga sintética derivada da lincosamida, que foi isolada inicialmente de *Streptomyces lincolnensis*. Seu mecanismo de ação funciona a partir da inibição da síntese proteica, ao se ligar à subunidade 50S, provocando dissociação da peptidil-tRNA do ribossomo. Apesar de ser estruturalmente diferente dos macrolídeos, a clindamicina apresenta mecanismo semelhante de resistência, através da aquisição do gene *erm(B)* (Cherazard et al., 2017).

As quinolonas (levofloxacina, moxifloxacina e gemifloxacina) são as mais recomendadas, juntamente a  $\beta$ -lactâmicos e macrolídeos, na terapia empírica de infecções respiratórias. Seu mecanismo de ação consiste em se ligar a DNA girase e topoisomerase, inibindo a replicação do material genético do pneumococo, levando à morte celular (Hopper & Jacoby, 2016). A resistência as quinolonas podem ocorrer devido a bombas de efluxo ou devido a mutações cumulativas no genoma bacteriano, na Região Determinante de Resistência a Quinolonas (QRDR), em GyrA e GyrB (DNA girase) e em ParC e ParE (topoisomerase). A maioria das mutações ocorre nas regiões de GyrA e/ou ParC, apresentando CIMs elevados. Já mutações em GyrB e ParE são menos frequentes e geralmente conferem níveis de resistência mais baixos (Smith et al., 2002).

A tetraciclina atua se ligando à subunidade ribossomal 30S, inibindo a síntese proteica. A resistência a esse antimicrobiano ocorre devido à presença dos genes *Tet(M)* e *Tet(O)*, ou menos frequente devido a bombas de efluxo (Fluit et al., 2005).

A sulfametoxazol-trimetoprim inibe competitivamente a síntese da enzima dihidropteroato sintase (DHPS), necessária para formar ácido para-aminobenzóico (PABA), essencial na síntese de folato. A resistência é devido a mutações nos genes *folA* e *folP* (Cherazard et al., 2017).

A resistência do pneumococo aos antimicrobianos é global (Balsells et al., 2017). Contudo, em função de múltiplos fatores, como o padrão de prescrição de antimicrobianos na comunidade e a capacidade de adaptação e disseminação de variantes resistentes, a prevalência de resistência varia entre as populações estudadas. Destacaremos, a seguir, estudos mais recentes com esse enfoque realizados no Brasil.

Levantamento de dados com base laboratorial, realizado em várias regiões do Brasil, após a implementação da vacina PCV10, evidenciou que, para casos de meningite, a resistência a penicilina foi mais prevalente entre as crianças até 59 meses de idade, com 66,7% (8/12) dos isolados, seguido pelo grupo etário de indivíduos com idade a partir dos 50 anos, com 36,7% (11/30) dos isolados com resistência. Levando em consideração os pontos de corte para casos de não meningite, segundo os pontos de corte do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2020 ( $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ , 4  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ , para sensível, intermediário e resistente, respectivamente), nenhum dos isolados apresentou resistência a penicilina, apresentando sensibilidade de 81,8% (198/242) e 18,2% (44/242) de isolados intermediários. Ao analisar o perfil de suscetibilidade a penicilina para casos de meningite por sorotipo para crianças menores de 5 anos de idade, todos os isolados dos sorotipos 19A, 6C e 35B apresentaram resistência. Para casos de não meningite, 76,5% (13/17) dos isolados do sorotipo 19A foram intermediários a penicilina; isolados dos outros sorotipos foram suscetíveis (Ministério da Saúde, 2020).

Nos últimos anos, já na era da PCV10, evidenciou-se aumento de isolados de pneumococo com sensibilidade reduzida a penicilina e MDR no Brasil. Esse aumento está relacionado a maior frequência do sorotipo 19A circulando na população, tanto em indivíduos colonizados quanto nos casos de doença pneumocócica. Mais especificamente, esse aumento está relacionado à expansão clonal do CC320, principalmente a ST320. No Brasil, estudo de Cassiolato e colaboradores (2018) demonstrou aumento de resistência a penicilina (CIM de 2-4  $\mu\text{g/mL}$ ), eritromicina e MDR entre isolados de DPI após a PCV10, principalmente entre isolados de crianças menores de 5 anos de idade em 2016-2017, devido ao sorotipo 19A. Em outro estudo, realizado entre adultos maiores de 50 anos de idade, a resistência aos antimicrobianos também estava associada ao sorotipo 19A, principalmente a ST320. Considerando os pontos de corte para meningite, 31,6% dos isolados eram resistentes a penicilina, 7,1% eram resistentes a ceftriaxona. Para tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim, a resistência foi de 6,1% para ambos os antimicrobianos; para eritromicina, foi de 16,5% (Christophe et al., 2018).

Entre os colonizados, evidencia-se também a emergência do sorotipo 19A, aumentando consequentemente os níveis de resistência a penicilina e cefotaxima. Entre as amostras que pertenciam ao CC320, 97,7% apresentavam CIM para penicilina  $\geq 2$   $\text{mg/L}$  e 74% tinham CIM para cefotaxima  $\geq 1$   $\text{mg/L}$  (Brandileone et al., 2019). De acordo com Neves e colaboradores (2017), 39% dos isolados apresentavam não suscetibilidade a penicilina, 28% eram resistentes a eritromicina e 22% apresentavam perfil MDR. O aumento da resistência a antimicrobianos

estava associada à emergência de isolados do sorotipo 6C; nesses isolados, mais de 20% eram não suscetíveis a clindamicina, eritromicina, penicilina e tetraciclina.

A pressão seletiva causada pela vacinação promoveu uma redistribuição nos sorotipos causando doença pneumocócica entre indivíduos colonizados. Verifica-se a emergência de sorotipos não vacinais, principalmente do sorotipo 19A, que está relacionado a maior resistência a antimicrobianos. Estudos de vigilância epidemiologia são extremamente importantes para acompanhar a mudança no perfil das infecções pneumocócicas entre crianças e idosos, os dois grupos da população mais acometidos pela DPI. Como a colonização é o primeiro passo para a doença pneumocócica, também é preciso avaliar os sorotipos que estão circulando nessas duas populações entre indivíduos colonizados, para melhor entender a influência das vacinas e a dinâmica das infecções pneumocócicas.

## 2 REFERÊNCIAS

**Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).** 2008 Módulo 4 – Gram-positivos, tópico III – *Streptococcus* spp. Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo4/intr\\_stre.htm#:~:text=Os%20estreptococos%2C%20da%20fam%C3%ADlia%20Streptococcaceae,final%20da%20fermenta%C3%A7%C3%A3o%20da%20glicose](https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_stre.htm#:~:text=Os%20estreptococos%2C%20da%20fam%C3%ADlia%20Streptococcaceae,final%20da%20fermenta%C3%A7%C3%A3o%20da%20glicose).

Acesso em: 01/06/2021.

ALMEIDA S, et al. Low prevalence of Pneumococcal carriage and high serotype and genotype diversity among adults over 60 years of age living in Portugal. **PLOS ONE.** 9(3): e90974, 2014.

ANDRADE AL, et al. Evaluating the impact of PCV-10 on invasive pneumococcal disease in Brazil: A time-series analysis. **Hum Vaccines Immunother.** 12: 285 – 292, 2016.

\_\_\_\_\_, et al. Direct and indirect impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine introduction on pneumonia hospitalizations and economic burden in all age-groups in Brazil: A timeseries analysis. **PLoS ONE.** 12(9): e0184204, 2017.

APPELBAUM PC, et al. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. **The Lancet.** 2:995-997, 1977.

ARGUEDAS A, et al. Upper Respiratory Tract Colonization with *Streptococcus pneumoniae* in Adults. **Expert Review of Vaccines.** 19(4):353-366, 2020.

AUSTRIAN R. The *Quellung* reaction, a neglected microbiologic technique. **Mount Sinai Journal of Medicine.** 43: 699-709, 1979.

BALSELLS E, et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**. 12(5): e0177113, 2017.

BEREZIN EN, et al. Invasive pneumococcal disease among hospitalized children in Brazil before and after the introduction of a pneumococcal conjugate vaccine. **Vaccine**. 38(7): 1740 – 1745, 2019.

BIGOGO GM, et al. Indirect effects of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine against adult pneumococcal pneumonia in rural Western Kenya. **Clin Infect Dis**.69(12): 2177-2184, 2019.

BOGAERT D, DE GROOT R, HERMANS PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **The Lancet Infectious Diseases**. 4:144–154, 2004.

BRANCHE AR, et al. Effect of prior vaccination on carriage rates of *Streptococcus pneumoniae* in older adults: A longitudinal surveillance study. **Vaccine**. 36:4304-4310, 2018.

BRANDILEONE MCC, et al. Effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among children in São Paulo, Brazil. **Vaccine**. 34(46): 5604-5611, 2016.

\_\_\_\_\_, et al. Distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes before and 5 years after the introduction of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. **Vaccine**. 36(19): 2559-2566, 2018.

\_\_\_\_\_, et al. Long-term effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in children in Brazil. **Vaccine**. 37: 5357-5363, 2019.

BROOKS LRK, MIAS GL. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: aging, diagnostics and prevention. **Front Immunol**. 9: 1366, 2018.

BRUEGGEMANN AB, et al. Clonal relationships between Invasive and Carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype – and clone- specific differences in invasive disease potential. **Journal of Infectious Diseases**. 187:1424-1432, 2003.

\_\_\_\_\_, et al. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. **PLOS Pathogens**. 3(11): 1628-36, 2007.

CAIERÃO J, et al. Serotypes and Genotypes of Invasive *Streptococcus pneumoniae* Before and After PCV10 Implementation in Southern Brazil. **PLOS ONE**. 9(10):e111129, 2014.

CARVALHO MGS, et al. Evaluation and Improvement of Real-Time PCR Assays Targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* Genes for Detection of Pneumococcal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**. 45(8): 2460-2466, 2007.

CASSIOLATO AP, et al. Expansion of the multidrug-resistant clonal complex 320 among invasive *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A after the introduction of a ten-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. **PLoS ONE**. 13(11):e0208211, 2018.

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2005.** Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate on incidence of invasive pneumococcal disease-United States, 1998-2003. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** 54: 893 – 897, 2005.

\_\_\_\_\_. **2020.** National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Division of Bacterial Diseases. Pneumococcal Disease. Disponível em: <https://www.cdc.gov/pneumococcal/clinicians/streptococcus-pneumoniae.html>. Acesso em: 01/06/2021.

\_\_\_\_\_. **2020.** Biggest Threats and Data CDC's *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019* (2019 AR Threats Report). <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html> Acesso em: 23.07.2021.

CHERAZARD R, et al. Antimicrobial Resistant *Streptococcus pneumoniae*: Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications. **American Journal of Therapeutics.** 24(3): e361-e369, 2017.

CHERIN T. WHO expert consultation on serotype composition of pneumococcal conjugate vaccines for use in resource-poor developing countries, 26-17 October 2006, Geneva. **Vaccine.** 25(36): 6557-6564, 2007.

CHRISTOPHE BL, et al. Characterisation of *Streptococcus pneumoniae* isolates from invasive disease in adults following the introduction of PCV10 in Brazil. **J Med Microb.** 67(5): 687-694, 2018.

CORNICK JE, BENTLEY SD. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. **Microbes and Infection.** 14:573-583, 2012.

CORRÊA RA, et al. Recomendações para o manejo da pneumonia adquirida na comunidade 2018. **J Bras Pneumol.** 44(5): 405-424, 2018.

CROUCHER N, et al. Evidence for Soft Selective Sweeps in the Evolution of Pneumococcal Multidrug Resistance and Vaccine Escape. **Genome Biology Evolution.** 6(7):1589–1602, 2014.

DESAI AP, et al. Decline in pneumococcal nasopharyngeal carriage of vaccine serotypes after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children in Atlanta, Georgia. **Pediatr Infect Dis J.** 34(11): 1168-1174, 2015.

DAVIS K, et al. Resistance to mucosal lysozyme compensates for the fitness deficit of peptidoglycan modifications by *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS Pathog.** 4: e10000241, 2008.

DÍAZ E, LÓPEZ R, GARCÍA JL. Role of the major pneumococcal autolysin in the atypical response of a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Bacteriology.** 174(17): 5508-5515, 1992.

DOMINGUES CMAS, et al. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. **Lancet Respir Med.** 2: 464 – 471, 2014.

ENRIGHT MC, SPRATT BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. **Microbiology.**144: 3049–3060, 1998.

FELDMAN C, et al. The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with intact human respiratory mucosa in vitro. **Eur Respir J.** 5: 576-583, 1992.

FLUIT AC, et al. Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. **Antimicrob Agents Chemother.** 49:1636–1638, 2005.

GANAIIE F, et al. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100<sup>th</sup> serotype and has a large *cps* fragment from an oral *Streptococcus*. **mBio.** 11(3): e00937-20, 2020.

GENO KA, et al. Pneumococcal capsules and their types: Past, Present, and Future. **Clin Microbiol Rev.** 28 (3): 871-899, 2015.

GHOLAMHOSSEINI-MOGHADDAM T, et al. Detection of *lytA*, *pspC*, and *rrgA* genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated from healthy children. **Iranian Journal of Microbiology.** 7(3):156-60, 2015.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE, Lower Respiratory Infections Collaborators. Quantifying risks and interventions that have affected the burden of lower respiratory infections among children younger than 5 years: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet Infect Dis.** 20(1): 60-79, 2020.

GOLDBLATT, D.; O'BRIEN, K.L. **Pneumococcal Infections.** Chapter 141 (pages 1–20). In Harrison's Principles of Internal Medicine, 20th ed.; Jameson, L.J., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Loscalzo, J., Eds.; McGraw-Hill Education: New York, NY, USA, 2018; p. 8.

GRANDO IM, et al. Impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis in children up to two years of age in Brazil. **Caderno de Saúde Pública.** 31(2):1-9, 2015.

GRANT L, et al. Nasopharyngeal pneumococcal carriage among American Indian children and adults during routine use of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) [abstract ISPDD-0774]. Presented at: **11th International symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases**; April 15-19, 2018; Melbourne, Australia.

GRIFFIN MR, et al. U.S. hospitalizations for pneumonia after a decade of pneumococcal vaccination. **N Engl J Med.** 369: 155-63, 2013.

HAMMITT L, et al. Effect of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease and nasopharyngeal carriage in Kenya: A longitudinal surveillance study. **Lancet.** 393:2146-2154, 2019.



- HICKS LA, et al. Incidence of Pneumococcal Disease Due to Non-Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV7) In the United States during the Era of Widespread PCV7 Vaccination, 1998-2004. **Journal of Infectious Diseases**. 196: 1346-1354, 2007.
- HILTY M, et al. Global Phylogenomic Analysis of Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* Reveals a Deep-Branching Classic Lineage That Is Distinct from Multiple Sporadic Lineages. **Genome Biol Evol**. 6 (12): 3281-3294, 2014.
- HOOPER DC, JACOBY GA. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harb Perspect Med**.6. pii:a025320, 2016.
- HSIEH YC, et al. Expansion and evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19a ST320 clone as compared to its ancestral clone, Taiwan <sup>19F</sup>-14 (ST236). **Journal of Infectious Diseases**. 15:203-210, 2013.
- HTAR MTT, et al. The impact of pneumococcal conjugate vaccines on serotype 19A nasopharyngeal carriage. **Expert Rev of Vaccines**. 18(12):1243-1270, 2019.
- HULTEN K, et al. Changes in *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A Invasive Infections in Children from 1993 to 2011. **Journal of Clinical Microbiology**. 51(4):1294–1297, 2013.
- ISTURIZ R, et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A: worldwide epidemiology. **Expert Review of Vaccines**. 16(10):1007-1027, 2017.
- JAIN S, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S Adults. **N Engl J Med**. 373(5): 415-427, 2015.
- JOHNSON HL, et al. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: The pneumococcal global serotype project. **PLoS Medicine**. 7:10, e1000348, 2010.
- KNUPP-PEREIRA PA, et al. Prevalence of PspA families and pilus islets among *Streptococcus pneumoniae* colonizing before and after universal use of pneumococcal conjugate vaccines in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. 51: 419-425, 2020.
- KRONE CL, et al. Immunosenescence and pneumococcal disease: an imbalance in host-pathogen interactions. **Lancet Respir Med**. 2: 141-153, 2014.
- LEE S, et al. Prevalence of Serotype and Multidrug-Resistance of *Streptococcus pneumoniae* Respiratory Tract Isolates in 265 Adults and 36 Children In Korea, 2002-2005. **Microbial Drug Resistance**. 16: 135-142, 2010.
- LESSA FC, et al. *Streptococcus mitis* expressing pneumococcal serotype 1 capsule. **Scientific Reports**. 8: 17959, 2018.
- MARKS LR, REDDINGER RM, HAKANSSON AP. Biofilm formation enhances fomite survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. **Infect Immun**. 82: 1141-1146, 2014.

McALLISTER DA, et al. Global, regional, and national estimates of pneumonia morbidity and mortality in children younger than 5 years between 2000 and 2015: a systematic analysis. **Lancet Glob Health**. 7: e47-57, 2019.

MICHELIN L, et al. Mortality and costs of pneumococcal pneumonia in adults: a cross-sectional study. **J Bras Pneumol**. 45(6): e20180374, 2019.

MILUCKY J, et al. *Streptococcus pneumoniae* colonization after introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for US adults 65 years of age and older, 2015-2016. **Vaccine**. 37(8): 1094-1100, 2019.

**Ministério da Saúde (MS)**. 2010. Informe técnico da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada). Secretaria de vigilância em saúde. Disponível em: [http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq\\_723\\_infotec.pdf](http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_723_infotec.pdf) Acesso: 13.06.2021.

\_\_\_\_\_. 2017. Calendário de Vacinação. Disponível em: <https://portalarquivos.saude.gov.br/campanhas/> Acesso em: 13.06.2021.

\_\_\_\_\_. 2019. Informe Técnico para Implantação da Vacina Pneumocócica conjugada 13-valente em pacientes de risco  $\geq$  de 5 anos de idade. Disponível em: <http://sbim.org.br/images/files/notas-tecnicas/informe-tecnico-pneumo13-pacientesderisco-menoresde5anos.pdf>. Acesso: 13.06.2021.

\_\_\_\_\_. 2020. Boletim Epidemiológico. Vigilância em Saúde no Brasil 2003-2019. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf>. Acesso em 08.06.2021.

\_\_\_\_\_. 2020. Informação da vigilância das pneumonias e meningites bacterianas. Núcleo de Meningites, Pneumonia e Infecções Pneumocócicas (NMPI). Centro de bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz. Laboratório de Referência Nacional. 2020.

MITCHELL AM, MITCHELL TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. **Clinical Microbiology Infection**. 16: 411–8, 2010.

MOORE MR, LINK-GELLES R, SCHAFFNER W, et al. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance. **The Lancet Infectious Diseases**. 15:301–309, 2015.

NAKAMURA S, DAVIS K, WEISER J. This study demonstrates a mechanism by which concurrent influenza virus infection leads to increased pneumococcal carriage. Synergistic stimulation of type I interferons during influenzae virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* e colonization in mice. **J Clin Invest**. 121:3657-3665, 2011.

NELSON AL, et al. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. **Infect Immun**. 75: 83-90, 2007.

NEVES FPG, et al. Pneumococcal carriage among children after four years of routine 10-valent pneumococcal conjugate vaccine use in Brazil: The emergence of multidrug resistant serotype 6C. **Vaccine**. 35(21): 2794-2800, 2017.

\_\_\_\_\_, et al. Direct effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine use on pneumococcal colonization among children in Brazil. **Vaccine**. 37(36): 5265-5269, 2019.

NHANTUMBO AA, et al. Surveillance of impact of PCV-10 vaccine on pneumococcal meningitis in Mozambique, 2013 – 2015. **PLoS ONE**. 12(6): e0177746, 2017.

NIEDERMAN MS. Macrolide-resistant pneumococcus in community –acquired pneumonia—is there still a role for macrolide therapy. **Am J Resp Crit Care Med**.191: 1216–1217, 2015.

OBREGÓN V, et al. Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. **Journal of Clinical Microbiology**. 40(7): 2545-54, 2002.

O'BRIEN KL, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization among immunized and unimmunized children in a community-randomized trial. **J Infect Dis**. 196: 1211 – 1220, 2007.

PATON JC, TRAPPETTI C. *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. **Microbiol Spectrum**. 7(2): GPP3 – 0019, 2018.

PERDRIZET J, et al. Cost-effectiveness analysis of replacing the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV10) with the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in Brazil Infants. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. 17(4): 1162-1172, 2020.

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, et al. *Streptococcus infantis*, *Streptococcus mitis*, and *Streptococcus oralis* Strains with highly similar *cps5* loci and antigenic relatedness to serotype 5 Pneumococci. **Front. Microbiol**. 9: 3199, 2019.

PRIDE MW, et al. Validation of an immunodiagnostic assay for detection of 13 *Streptococcus pneumoniae* serotype-specific polysaccharides in human urine. **Clin Vaccine Immunol**. 19:1131-1141, 2012.

RAYNER RE, et al. Modified MLVA for Genotyping Queensland Invasive *Streptococcus pneumoniae*. **PLOS ONE**. 10 (4): 1-15, 2015.

REGEV-YOCHAY G, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family setting. **Clin Infect Dis**. 38: 632-639, 2004.

RICHTER SS, et al. Pneumococcal serotype before and after introduction of conjugate vaccines, United States, 1999-2011. **Emerging Infectious Diseases**. 19:1074–1083, 2013.

- ROSE MC, VOYNOW JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. **Physiol Rev.** 86: 245-278, 2006.
- RUCKIGER S, et al. Association of serotype of *Streptococcus pneumoniae* with risk of severe and fatal outcome. **Pediatric Infectious Diseases Journal.** 28:118-122, 2009.
- SADOWY E, et al. Relationships among streptococci from the mitis group, misidentified as *Streptococcus pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.** 39: 1865-1878, 2020.
- SANTOS SR, et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. **Vaccine.** 31(51): 6150-4, 2013.
- SANTOS MS, et al. Temporal trends and clonal diversity of penicillin non-susceptible pneumococci from meningitis cases from 1996 to 2012, in Salvador, Brazil. **BioMed Center Infectious Diseases.**15(302)1-10, 2015.
- SATZKE C, et al. Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. **Vaccine.** 32:165-179, 2014.
- SCHUCK-PAIM C, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine introduction on childhood pneumonia mortality in Brazil: a retrospective observational study. **Lancet Glob Health.** 7:e249-256, 2019.
- SCOTTA MC, et al. Impact of 10-Valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) on childhood pneumonia hospitalizations in Brazil two years after introduction. **Vaccine.** 32: 4495:4499, 2014.
- SIMELL B, et al. Pneumococcal Carriage Group. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. **Expert Review of Vaccines.** 11:841-855, 2012.
- SIMONSEN L, et al. Effect of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on admissions to hospital 2 years after its introduction in the USA: a time series analysis. **Lancet Respir Med.** 2(5): 387-394, 2014.
- SMITH EL, et al. Upper airway colonization of *Streptococcus pneumoniae* in adults aged 60 years and older: A systematic review of prevalence and individual participant data meta-analysis of risk factors. **J Infect.** 81(4): 549-548, 2020.
- SMITH HJ, et al. Dual activity of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae*: the facts behind the claims. **J Antimicrob Chemother.** 49: 893–895, 2002.
- SOUZA ARV, et al. Description of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* due to an uncommon mutation in the *atpA* gene and comparison with previously identified *atpC* mutants from Brazil. **Scientific reports.** 11(1): 7936, 2021.

- SPELLERBERG B, BRANDT C. *Streptococcus*. In: Versalovic J, Carrole K, Funke G, Jorgensen J, Landry ML, Warnock D. **Manual of Clinical Microbiology**. 10<sup>th</sup> ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, p 331-349, 2011.
- THOMAS RE. Pneumococcal pneumonia and invasive pneumococcal disease in those 65 and older: Rates of detection, risk factors, vaccine effectiveness, hospitalization and mortality. **Geriatrics**. 6(1): 1-17, 2021.
- TRZCINSKI K, et al. Superiority of trans-oral over trans-nasal sampling in detecting *Streptococcus pneumoniae* colonization in adults. **PLoS One**. 8:e60520, 2013.
- TSAI HY, et al. Uptade antibiotic resistance and clinical spectrum of infections caused by *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan: emphasis on risk factors for penicillin non-susceptibilities. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. 46: 345-51, 2012.
- VERANI JR, et al.. Indirect cohort analysis of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine effectiveness against vaccine-type and vaccine-related invasive pneumococcal disease. **Vaccine**. 33:6145-6148, 2015.
- \_\_\_\_\_, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among HIV-infected and-uninfected children <5 years of age before introduction of pneumococcal conjugate vaccine in Mozambique. **PLoS ONE**. 13(2): e0191113, 2018.
- VIEIRA ILV, KUPEK E. The impact of pneumococcal vaccine in reducing pneumonia hospitalizations in children under 5 years old, in Santa Catarina, Brazil, 2006 -2014. **Epidemiol Serv Saúde**. 27(4):e2017378, 2018.
- WEISER JN, FERREIRA DM, PATON JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. **Nat Rev Microbiol**. 16(6):335-367, 2018.
- WIESE AD, GRIFFIN MR, GRIJALVA CG. Impact of pneumococcal conjugate vaccines on hospitalizations for pneumonia in the United States. **Expert Rev Vaccines**. 18(4): 327-341, 2019.
- World Health Organization (WHO)**. 2007. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec, v. 82, n. 12, p.93-104, 2007.
- \_\_\_\_\_. 2018. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>  
Acesso: 20.06.2021
- \_\_\_\_\_. 2021. The top 10 causes of death. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Acesso em: 08/07/2021.
- WUNDERINK RG, et al. Pneumococcal Community-Acquired Pneumonia Detected by Serotype-Specific Urinary Antigen Detection Assays. **Clin Infect Dis**. 66 (10): 1504-1510, 2018.

ZANELLA RC, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Staphylococcus aureus* in a Brazilian elderly cohort. **PLoS ONE**. 14(8): e0221525, 2019.

ZHANEL GG, et al. Review of macrolides and ketolides: focus on respiratory tract infections. **Drugs**. 61:443–498, 2001.

### 3 JUSTIFICATIVA

As infecções por *S. pneumoniae* são um problema de saúde pública em todo o mundo. Para contornar essa situação, foram desenvolvidas vacinas para a prevenção de infecções pneumocócicas. No Brasil, está disponível, no sistema público, a vacina PCV10, a qual faz parte do calendário de vacinação infantil desde 2010. A vacinação infantil com as vacinas PCVs é uma estratégia de intervenção em saúde pública extremamente importante, pois inúmeros trabalhos mostram seu impacto positivo em diminuir a incidência da DPI e as taxas de hospitalização e de mortalidade, principalmente na população-alvo da vacina. Entretanto, as infecções pneumocócicas, como a pneumonia, ainda são um problema, acometendo principalmente crianças e idosos.

Após a introdução da vacina, foi verificada uma redistribuição dos sorotipos mais prevalentes causando doença pneumocócica. Entretanto, a vacina não influencia apenas na DPI, mas também no estado de portador e nos sorotipos circulantes entre os indivíduos da comunidade. Assim, é preciso identificar e conhecer os sorotipos que estão circulando entre os indivíduos colonizados e os causadores de doenças pneumocócica. O conhecimento sobre os sorotipos circulantes permite avaliar o impacto da vacina na população-alvo da vacinação e o seu efeito indireto na população idosa. Além disso, destaca-se a importância de avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos sorotipos emergentes. A maioria dos estudos sobre colonização é realizada em crianças, havendo poucos que investigaram simultaneamente a colonização em crianças e idosos. Dados de estudos com essa abordagem contribuem para o avanço no conhecimento sobre infecções pneumocócicas e podem impactar nas decisões sobre políticas de vacinação.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da vacina conjugada 10-valente entre idosos e crianças portadores de *Streptococcus pneumoniae* sobre a prevalência de colonização, distribuição de sorotipos e resistência a antimicrobianos

#### 4.1.1 Objetivos Específicos

- Definir a prevalência de colonização por *Streptococcus pneumoniae* em crianças e idosos;
- Definir a distribuição de sorotipos entre isolados de *Streptococcus pneumoniae* obtidos de indivíduos colonizados;
- Definir a prevalência de resistência a antimicrobianos entre isolados de *Streptococcus pneumoniae* obtidos de indivíduos colonizados;
- Relacionar os sorotipos mais frequentes entre os colonizados com os obtidos de doença pneumocócica invasiva, especialmente em relação ao sorotipo 19A;
- Avaliar a clonalidade entre os isolados clínicos do sorotipo 19<sup>a</sup>;
- Identificar variáveis associadas à colonização;
- Comparar o desempenho de *swab* de orofaringe *versus* nasofaringe na detecção de portadores entre idosos.



## 5 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os materiais e métodos, assim como os resultados desta tese de doutorado, serão apresentados na forma de dois artigos científicos.

### 5.1 MANUSCRITO I

Título: Emergence of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* after PCV10 associated with a ST320 in adult population, in Porto Alegre, Brazil.

Publicado na revista: *Epidemiology & Infection*

Fator de Impacto: 2.451

## Original Paper

**Cite this article:** Mott MP, Caierão J, Cunha GR, Del Maschi MM, Pizzutti K, d'Azevedo P, Dias CAG (2019). Emergence of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* after PCV10 associated with a ST320 in adult population, in Porto Alegre, Brazil. *Epidemiology and Infection* **147**, e93, 1–7. <https://doi.org/10.1017/S0950268819000013>

Received: 24 July 2017

Revised: 10 October 2018

Accepted: 26 December 2018

**Key words:**

Brazil; serotype 19A; *Streptococcus pneumoniae*; ST320

**Author for correspondence:**

M.P. Mott,

E-mail: [mariana\\_mott510@hotmail.com](mailto:mariana_mott510@hotmail.com)

# Emergence of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* after PCV10 associated with a ST320 in adult population, in Porto Alegre, Brazil

M.P. Mott<sup>1</sup>, J. Caierão<sup>2</sup>, G.R. Cunha<sup>1</sup>, M.M. Del Maschi<sup>1</sup>, K. Pizzutti<sup>1</sup>, P. d'Azevedo<sup>1</sup> and C.A.G. Dias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Basic Health Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil and

<sup>2</sup>PROADI-SUS Project Department, Moinhos de Vento Hospital, Porto Alegre, Brazil

**Abstract**

Use of pneumococcal conjugate vaccines has caused emergence of non-vaccine serotypes. No Brazilian data specifically about serotype 19A are available. We aimed to evaluate the frequency of occurrence, susceptibility profile and molecular epidemiology of serotype 19A before and after vaccine introduction in Brazil. Pneumococcal identification was performed by the conventional method. Strain serotype was determined by multiplex polymerase chain reaction (PCR) and/or Quellung reaction. Resistance was determined by Etest® and PCR was performed to determine the presence of macrolide resistance genes, *ermB* and/or *mefA*. Pneumococci were typed by Multilocus Sequence Typing. Thirty-eight serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* were recovered, mostly from invasive diseases. Prevalence of serotype 19A increased following vaccination (from 3.5% before vaccination to 8.1% after,  $p = 0.04196$ ). Non-susceptibility increased to most antimicrobials after vaccine introduction and was associated with clonal complex (CC)320. MLST showed nine different STs, which were grouped in one main CC: CC320 (63.9%). During the post-vaccination era, the frequency of this serotype increased significantly from 1.2% in 2011 to 18.5% in 2014 ( $p = 0.00001$ ), with a concomitant decrease in the genetic variability: ST320 consistently predominated after vaccine-introduction (61.1%). Overall, our results showed a post-PCV10 increase in the frequency of serotype 19A. This was accompanied by a selection of CC320 and antimicrobial resistance.

**Introduction**

Infections caused by *Streptococcus pneumoniae* are a public health problem worldwide, notably in developing countries, where there are high rates of mortality and morbidity [1, 2]. In order to reduce the occurrence of pneumococcal diseases, as well as the dissemination of non-susceptible to penicillin and/or multidrug-resistant isolates, vaccination is a powerful tool [3, 4].

In the year 2000, a conjugate 7-valent polysaccharide formula (PCV7) was introduced, targeting the most frequent serotypes causing infectious diseases (4, 6B, 9 V, 14, 18C, 19F, and 23F). Thereafter an increased prevalence in non-PCV7 serotypes was observed in invasive pneumococcal disease (IPD) [4–9]. Serotype 19A and in particular genotype ST320 [9], has been associated with higher resistance rates, including penicillin non-susceptibility and multidrug-resistance [7–10].

In order to increase the protection and to control the worrisome emergence of this serotype, the 13-valent (PCV13) formula (adding serotypes 1, 3, 5, 6A, 7F and 19A) was implemented for use in the USA [11]. In Brazil, however, only the 10-valent vaccine (PCV10) is licensed for use in the public system and does not target serotype 19A. The positive impact of PCV10 has been clearly observed, with a decrease in the incidence of vaccine-targeted serotype-specific IPD, as well as child mortality rates and pneumonia hospitalisation [12–16]. On the other hand, the emergence of non-PCV10 serotypes – including 19A – has been recognised [6, 8, 9, 11, 14, 17].

To date, no studies focusing on serotype 19A after PCV10 introduction in Brazil have yet been published. Therefore, in the current study we analyse the frequency of occurrence, susceptibility profile and molecular epidemiology of serotype 19A *S. pneumoniae* from the pre- and post-vaccine periods in Porto Alegre, South Brazil.

**Methods**

*S. pneumoniae* serotype 19A obtained from patients with invasive and non-invasive diseases from 2008 to 2014 were included in this study. Isolates recovered from 2008 to 2010 were

© The Author(s) 2019. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

of the pre-vaccine period, while the ones recovered from 2011 to 2014 were the post-vaccine period isolates. These isolates were obtained from three hospitals in Porto Alegre (metropolitan area with more than 4 million inhabitants), South Brazil: Grupo Hospitalar Conceição (GHC), Hospital Mãe de Deus (HMD) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Each hospital's Research Ethics Committee approved the study. Identification of isolates was performed by conventional methods: Gram stain, optochin susceptibility and bile solubility [18].

The DNA extraction for subsequent experiments was performed following the Centres for Disease Control and Prevention (CDC) recommendations: one loop of a fresh growth of *S. pneumoniae* was suspended in 200 µl of 5% Chelex® resin solution (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) containing 200 µg/ml of Proteinase K (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) [19]. The suspension was incubated at 56 °C for 1 hour and at 95 °C for 10 min. The process was concluded by centrifugation at 12,000 rpm for 3 min and the supernatant was stored at -20 °C [19]. Isolates were serotyped using the sequential multiplex PCR developed by Dias *et al.*, [20], for the most common serotypes reported in Latin America and/or the Quellung reaction [21].

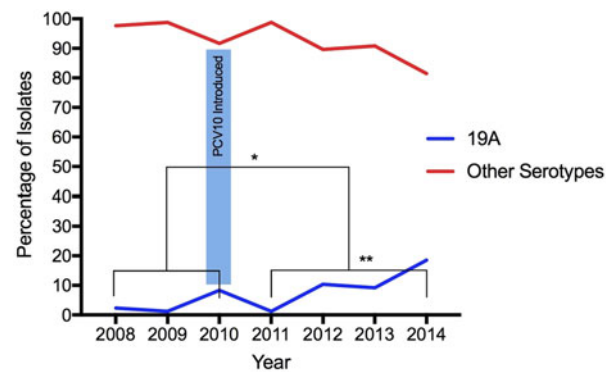
Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) to penicillin, ceftriaxone, meropenem, tetracycline, erythromycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, levofloxacin and vancomycin were determined using Etest® strips, following the manufacturer's instructions and interpreted according to breakpoints recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute [22]. The reference strain *S. pneumoniae* ATCC 49619 was included for quality control purposes. Isolates non-susceptible to erythromycin were submitted to duplex PCR reaction for the detection *ermB* and *mefA* genes [23].

Molecular typing of serotype 19A was performed using Multilocus Sequence Typing (MLST) [24]. Allele profiles and sequence types (ST) were obtained from the MLST database (<http://pubmlst.org/spneumoniae/>) [25]. Bionumerics software 6.6 (<http://www.applied-maths.com/knowledge-base/citing-applied-maths-products>) (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) was used to analyse from the MLST data and construct a Minimum Spanning Tree (MST). This method of clustering calculates a similarity matrix based on a categorical coefficient, since the allele numbers are arbitrary. All STs assigned to the same group must share all identical alleles (seven/seven). For clonal complexes (CCs), a cut-off point of at least five identical loci was used.

Statistical analysis was performed using SPSS 19 software by chi-square test and Fisher's exact test whenever necessary. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## Results

From 2008 to 2014, 568 *S. pneumoniae* isolates were serotyped, 30.5% (173/568) recovered during the pre-vaccine period and 69.5% (395/568) recovered during the post-vaccination period. According to age, 9% (51/568) of isolates were obtained from young children (under 5 years of age), 5.3% (30/568) from children (aged 5 to 18 years), 55.8% (317/568) from adults (aged 19–64 years) and 26% (148/568) from elderly (65 years old and above). The age of 22 individuals was not available. Isolates obtained from IPD were the most frequent origin of pneumococci, representing 74.3% (422/568), whereas 17 pneumococci were from unknown specimens. Overall, 6.7%, (38/568) were serotyped as 19A: 3.5% (6/173) before and 8.1% (32/395) after



**Fig. 1.** Increase of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A isolates after the introduction of PCV10. (\*) Statistically significant ( $p = 0.04196$ ) comparing pre- and post-vaccination; (\*\*) statistically significant ( $p = 0.00001$ ) comparing only post-vaccine period 2011 with 2014.

vaccine introduction, demonstrating a statistically significant increase in the frequency of this serotype ( $p = 0.04196$ ) (Fig. 1). The age of patients infected with serotype 19A pneumococci ranged from 1 to 80 years old (average: 46.5 years old; median: 54 years old). Only 13.1% patients were 5 years old or less (Table 1).

Considering the post-vaccine period, the proportion of serotype 19A increased year-by-year: in 2011 (1.2%, 2/161), 2012 (10.4%, 8/77), 2013 (9.2%, 7/76) and 2014 (18.5%, 15/81). Comparing 2011 with 2014, the frequency of this serotype increased significantly ( $p = 0.00001$ ) (Fig. 1).

Since two isolates were not viable, MLST was performed for 36 isolates belonging to serotype 19A, five pre- and 31 post-vaccine. Nine different STs were obtained and most of the isolates grouped into one main CC: CC320 (23/36, 63.9%), in which ST320 and ST8884 were identified. ST320 is double locus variant (DLV) of ST236, which is the ST of the PMEN clone Taiwan<sup>19F-14</sup>, whereas ST8884 is a single locus variant (SLV) of ST320. Another CC was observed including isolates belonging to ST2878 (4/36, 11.1%), ST2260 (1/36, 2.8%) and ST9678 (1/36, 2.8%). The remaining isolates represented singletons (Table 2 and Fig. 2).

While ST199 and ST2878 were recovered from both the pre- and post-vaccine period, ST8800 and ST4967 were found exclusively prior to vaccine introduction. On the other hand, isolates belonging to CC320, ST2260, ST733 and ST2260 were present only after vaccine implementation (Table 2 and Fig. 2).

According to the MLST database, most STs described among our isolates belong exclusively to serotype 19A (ST2878, ST9678, ST8800, ST2260 and ST8884). Interestingly, all but ST8800 had been previously recovered in Brazil. On the other hand, some STs are represented by more than one serotype, but 19A was the most frequent (Table 3).

Penicillin MICs were determined for 35 serotype 19A isolates (five pre- and 30 post-vaccine introduction and varied from  $\leq 0.03$  µg/ml to 4 µg/ml. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for all isolates of serotype 19A were 1.5 µg/ml and 4 µg/ml, respectively. However, by excluding CC320 isolates, MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> decreased to 0.094 µg/ml and 0.12 µg/ml, respectively. Ceftriaxone MICs for all isolates varied from  $\leq 0.03$  µg/ml to 2.0 µg/ml. MIC<sub>50</sub> was 1.0 µg/ml and MIC<sub>90</sub>, 2.0 µg/ml. Again, by excluding CC320 isolates, MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> decreased to 0.047 µg/ml and 0.064 µg/ml, respectively.

Table 4 shows the susceptibility profile of all serotype 19A isolates. All isolates were susceptible to vancomycin and levofloxacin.

**Table 1.** Characteristics 38 *S. pneumoniae* isolates of serotype 19A recovered during pre- and post-vaccine period

Period	Internal identification of the isolate	Specimen	Age of patients (years)	ST	PEN (µg/ml)	CRO (µg/ml)	MER (µg/ml)	TET (µg/ml)	SXT (µg/ml)	ERY (µg/ml)	<i>ermB</i>	<i>mefA</i>
Pre-Vaccination												
	042-09	B	37	4967	0.25	0.06	≤0.06	0.5	>4	≤0.03	-	-
	022-10	B	21	8800	≤0.03	≤0.03	≤0.06	≤0.25	0.25	≤0.03	-	-
	025-11	B	62	199	0.12	0.06	≤0.06	≤0.25	≤0.12	≤0.03	-	-
	015-08	PF	3	2878	0.12	≤0.03	≤0.06	≤0.25	1	0.06	-	-
	055-11	B	38	2878	0.12	≤0.03	≤0.06	≤0.25	0.5	≤0.03	-	-
	015-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Post-Vaccination												
	030-12	B	19	2878	0.12	0.06	≤0.06	≤0.25	0.5	0.06	-	-
	062-12	B	1	2878	0.094	0.06	≤0.06	≤0.25	0.25	≤0.03	-	-
	046-13	TA	-	199	≤0.03	≤0.03	≤0.06	≤0.25	0.064	0.047	-	-
	022-12	B	49	733	≤0.03	≤0.03	≤0.06	≤0.25	0.75	≤0.03	-	-
	001-14	B	33	733	0.016	≤0.03	≤0.06	≤0.25	3	≤0.03	-	-
	049-14	B	61	733	0.016	≤0.03	≤0.06	≤0.25	1.5	≤0.03	-	-
	060-14	B	69	2260	0.064	≤0.03	≤0.06	≤0.25	1.5	0.047	-	-
	014-14	B	72	9678	0.047	0.06	≤0.06	≤0.25	0.25	≤0.03	-	-
	130-12	CSF	79	8884	4	2	1	>8	>4	>32	pos	pos
	167-11	B	67	320	2	2	1	>8	>4	>32	pos	pos
	006-12	S	38	320	4	2	1	≤0.25	>4	4	neg	pos
	025-12	B	67	320	4	2	1	>8	>4	>32	pos	pos
	054-12	S	80	320	4	1	0.38	>8	3	>32	pos	pos
	010-13	PF	4	320	1.5	2	0.5	>8	>4	>32	pos	pos
	063-13	B	75	320	2	1.5	0.5	>8	>4	>32	pos	pos
	112-13	PF	2	320	4	1	0.25	4	>4	>32	pos	pos
	115-13	B	47	320	1.5	1.5	0.38	≤0.25	2	2	neg	pos
	016-14	B	50	320	0.75	1	0.25	≤0.25	3	3	neg	pos
	017-14	B	78	320	0.75	1	0.38	3	3	>32	pos	pos
	030-14	B	60	320	2	2	0.38	≤0.25	1.5	2	neg	pos
	037-14	B	57	320	3	2	0.25	≤0.25	1	0.75	neg	pos
	056-14	B	57	320	0.75	0.75	0.25	≤0.25	1.5	2	neg	pos

(Continued)

**Table 1.** (Continued.)

Period	Internal identification of the isolate	Specimen	Age of patients (years)	ST	PEN (µg/ml)	CRO (µg/ml)	MER (µg/ml)	TET (µg/ml)	SXT (µg/ml)	ERY (µg/ml)	ermB	mefA
057-14		CSF	57	320	0.75	0.75	0.25	≤0.25	1.5	2	neg	pos
065-14		B	1	320	2	2	0.38	1.5	1	>32	pos	pos
024-14		CSF	30	320	1.5	1.5	0.38	3	0.75	>32	pos	pos
025-14		B	30	320	1.5	2	0.38	1	0.38	>32	pos	pos
014-12		TA	59	320	4	2	1	>8	>4	>32	pos	pos
041-14		B	63	320	1.5	2	0.25	3	1.5	>32	Pos	pos
062-13		B	61	320	2	2	0.25	3	3	>32	pos	pos
092-14		B	41	320	0.125	0.38	≤0.06	6	1.5	>32	pos	pos
111-13		BAL	54	320	-	-	-	-	-	-	-	-
087-12		S	54	-	-	-	-	2	0.5	12	neg	pos

ST, sequence type; B, blood; BAL, broncho alveolar lavage; CSF, cerebrospinal fluid; PF, pleural fluid; TA, tracheal aspirate; S, sputum. PEN, penicillin; CRO, ceftriaxone; MER, meropenem; TET, tetracycline; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; ERY, erythromycin. Neg, negative; pos, positive.  
 MIC penicillin parenteral (nonmeningitis): ≤2.0-4.0 - ≥8.0 mcg/ml; MIC penicillin parenteral (meningitis): ≤0.06-≥0.12 mcg/ml; MIC ceftriaxone (nonmeningitis): ≤1.0-2.0 - ≥4.0 mcg/ml; MIC ceftriaxone (meningitis): ≤0.5-1/19-2/38 - ≥4/76 mcg/ml. MIC erythromycin: ≤0.25-0.50 - ≥1.0 mcg/ml; MIC meropenem: ≤0.25-0.50 - ≥1.0 mcg/ml; MIC tetracycline: ≤1.0-2.0 - ≥4.0 mcg/ml.

**Table 2.** Results from MLST analysis of 36 serotype 19A *S. pneumoniae* isolates.

ST	N (%)	Pre (%) / Post (%)
320	22 (61.1%)	0/22 (100%)
8884	1 (2.8%)	0/1 (100%)
2260	1 (2.8%)	0/1 (100%)
2878	4 (11.1%)	2 (50%)/2 (50%)
9678	1 (2.88%)	0/1 (100%)
733	3 (8.3%)	0/3 (100%)
199	2 (5.5%)	1 (50%)/ 1 (50%)
4967	1 (2.8%)	1 (100%)/0
8800	1 (2.8%)	1 (100%)/0

ST, sequence type; N, number of isolates; Pre, pre-vaccination period; Post, post-vaccination period.

Considering all other antimicrobials, an increased frequency of non-susceptibility was seen in the post-vaccine period, mostly associated with CC320 (ST320 and ST 8884) (Tables 1 and 4).

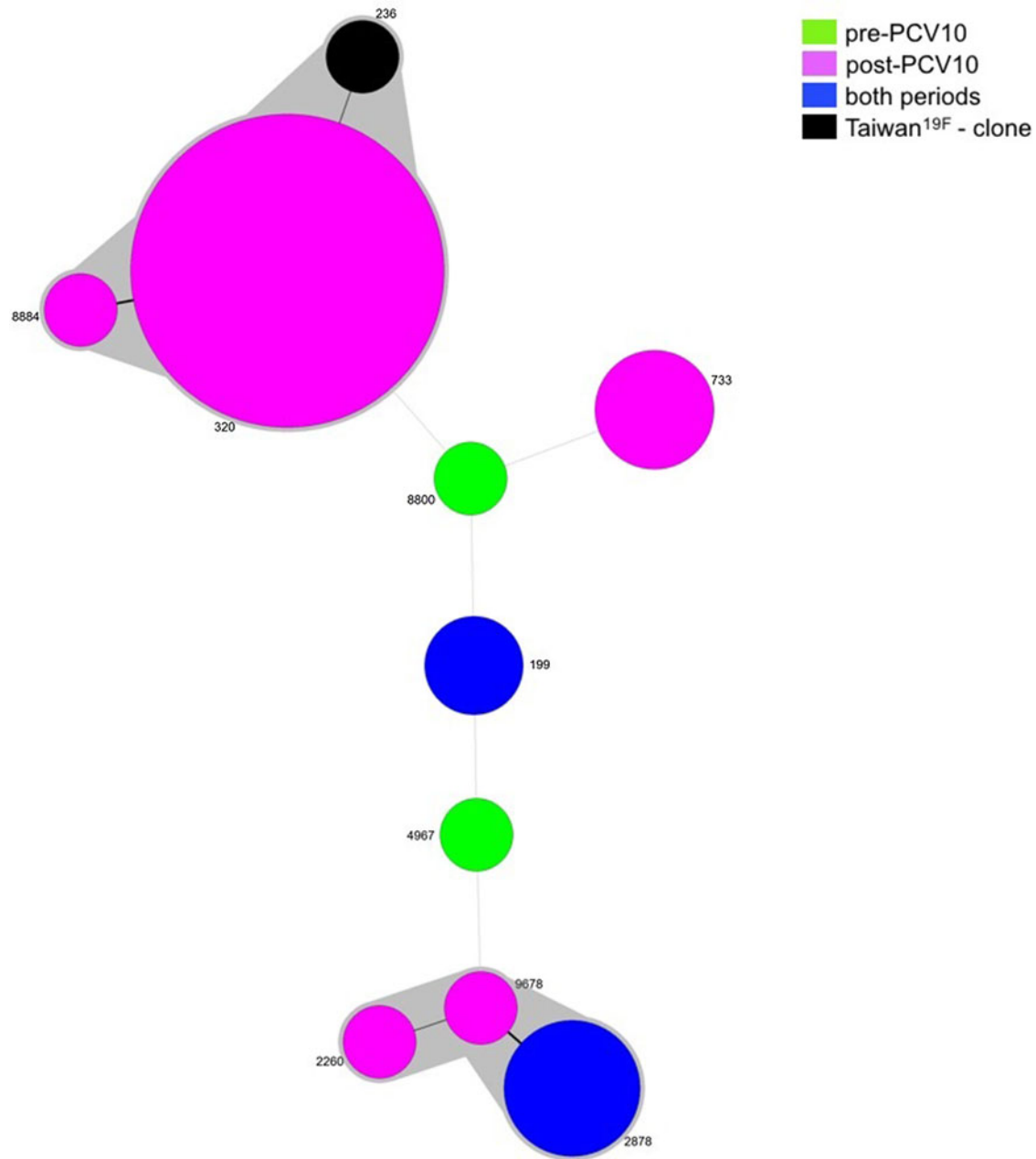
## Discussion

Serotype 19A has been a subject of concern in some regions since PCV7 implementation, due to an increase in prevalence and antibiotic resistance [7, 8-10, 26, 27]. This is the first Brazilian study to evaluate the frequency, susceptibility profile and molecular epidemiology of this serotype before and after vaccination with PCV10.

While data from Latin America and Caribbean showed that, from 1990 to 2010, the frequency of serotype 19A increased from 1.5 to 4.9% [28], a study conducted by Santos *et al.*, demonstrated a stable incidence of serotype 19A among Brazilian children, soon after PCV10 implementation [13]. Also, in a previous study, our group did not detect a significant increase in the frequency of serotype 19A among adults, comparing the pre- and post-vaccination periods [29]. Studies that investigated the effect of PCV10 introduction on nasopharyngeal colonisation among Brazilian children did not observe an increase in the proportion of children colonised with isolates belonging to serotype 19A [17, 30].

On the other hand, Domingues *et al.*, designed a case-control study to evaluate the effectiveness of PCV10 vaccine in Brazilian children and serotype 19A was the third most common in IPD. However, the study concluded that PCV10 might provide cross-protection against serotype 19A [14]. A study describing the epidemiology of IPD in Quebec, where PCV10 was used between 2009 and 2010, supports the idea that it can provide some protection against disease caused by serotype 19A [31]. Other countries that use PCV10, including Finland, New Zealand and Chile, also found a decrease in the numbers of cases of IPD caused by serotype 19A after the introduction of the vaccine [32].

Although, such cross-reactivity may not interfere in the carrier status of the children, thus providing conditions for transmission to adults. Apart from that, our data show that the increase of serotype 19A was consistent comparing the pre- and post-vaccine periods. It should be considered, however, that the increase in 19A is unlikely to be caused exclusively by vaccination [33, 34]. Other factors may be associated, such as, the temporal variations in the distribution of pneumococcal serotypes, independent of selective pressure by antibiotic use or



**Fig. 2.** Minimum spanning tree (MST) obtained from MLST results. Size of the circles is proportional to the number of isolates. The traces connecting the circles show the distance between every genotype in a number of loci. Every genotype contained in the same gray shadow is considered as a unique clonal complex (CC).

vaccination [33, 34]. We should also consider that following vaccine implementation the hierarchy of pneumococci in carriage and disease was disrupted and now that some time has passed, this is settling with a more stable order being created [35]. However, we should also consider dissemination of some specific clones due to antimicrobial pressure. This was seen globally, with the spread of multidrug-resistant ST320, belonging to serotype 19A, in absence of a vaccination program, related to antibiotic pressure [36–39].

The inherent characteristics of some specific clones of serotype 19A also clearly appeared in our study, i.e., antimicrobial resistance. Indeed, molecular epidemiology analysis demonstrated a selection, post-vaccine, of CC320, considerably decreasing the genetic variability in the serotype 19A population. The association

between this CC with penicillin non-susceptibility and/or multidrug-resistant isolates is well known [7–9] and our results are in accordance with this observation.

ST320 is a DLV of the worldwide-established Taiwan<sup>19F</sup>-14 (ST236) clone, primarily associated with serotype vaccine 19F [40]. This clone, due to a capsule switching event, exhibits serotype 19A [40]. The genetic evolution from ST236 to ST320 provided advantages associated with the transfer of penicillin-resistant genes [40]. ST320 was the most important clone that emerged after PCV7 introduction in several regions the world, mainly in the USA [7, 9, 40], becoming a subject of concern worldwide because of its consistent association with antibiotic resistance [36–38].

Interestingly, we observed some combinations of ST and serotype that may represent a capsular switching event. ST733, for example,

**Table 3.** Sequence types observed during the study period which include *Streptococcus pneumoniae* isolates serotypes other than 19A

ST	Period	MLST database	Region
320	Post	There are 424 records, the most prevalent serotype is 19A (372/424, 87.7%), followed by serotype 19F (47/424, 11.1%), serogroup 19 (3/424, 0.7%) and serotype 6B (2/424, 0.5%).	Around the world, including Brazil
199	Pre and Post	There are 708 records, the most prevalent serotype is 19A (443/708, 62.6%), followed by 15B/C (123/708, 17%), 15C, (58/708, 8%), 15B (57/708, 8%) and other with lower frequency (3, 6, 7C, serogroup 15, 15A, 15F, serogroup 19, 19B, 19F, 21.39, 23A, 23F and without serotype).	Around the world, including Brazil
733	Post	19F and 19A There are 22 records: 19A (21/22, 95.5%) and 19F (1/22, 4.5%).	Brazil and Germany
4967	Pre	There is one record, serotype 23F	Brazil

ST, sequence type; MLST database, available: <http://pubmlst.org/spneumoniae/>

**Table 4.** Antimicrobial susceptibility profile of 36 *S. pneumoniae* from serotype 19A pre- (five isolates) and post-vaccine period (31 isolates\*)

	Pre-vaccine			Post-vaccine		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
Penicilin (non-meningitis) <sup>a</sup>	5 (100)	0 (0)	0 (0)	23 (76.7)	7 (23.3)	0 (0)
Penicilin (meningitis) <sup>a</sup>	1 (20)	–	4 (80)	7 (23.3)	–	23 (76.7)
Ceftriaxone(non-meningitis) <sup>a</sup>	5 (100)	0 (0)	0 (0)	15 (50)	15 (50)	0 (0)
Ceftriaxone (meningitis) <sup>a</sup>	5 (100)	0 (0)	0 (0)	9 (30)	9 (30)	12 (40)
Meropenem <sup>a</sup>	5 (100)	0 (0)	0 (0)	16 (53.3)	9 (30)	5 (16.7)
Tetracycline	5 (100)	0 (0)	0 (0)	16 (51.6)	6 (19.4)	9 (29)
Erythromycin	5 (100)	0 (0)	0 (0)	8 (25.8)	1 (3.2)	22 (71)
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	3 (60)	1 (20)	1 (20)	6 (19.3)	17 (54.9)	8 (25.8)

S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

<sup>a</sup>In the post-vaccine period one isolate was not available for Penicillin, Ceftriaxone and Meropenem.

may be a 19F-19A switch, as the first described pneumococci (2001) in Brazil of this ST belonged to serotype 19F, in the absence of vaccination. All other 21 ST733 isolates (one from Germany and 20 from Brazil) were serotyped as 19A (MLST database) [25]. Also, ST4967 was described in Brazil as serotype 23F pneumococci [25]. Our results show that this ST was recovered as 19A in an isolate from the pre-vaccine period, indicating that capsular switch occurred independent of selective pressure by the vaccine.

Higher MICs for penicillin and ceftriaxone occurred only in CC320 (ST320 and ST8884), as well as the increased proportion of multidrug-resistance. The presence of *ermB* and *mefA* genes was observed only in ST320 and ST8884 isolates. The *ermB* gene was associated with higher MICs for erythromycin. It is important to mention that a study previously performed in Brazil showed that non-susceptibility to penicillin and ceftriaxone was low (0.6 and 1.3%, respectively), being detected especially among isolates belonging to serotypes 19A and 14 [41].

Our study has some limitations. Although Porto Alegre has more than 4 million inhabitants in its metropolitan area, isolates were obtained exclusively from patients of this city, limiting a wider interpretation of the results obtained. Ideally, the inclusion of isolates obtained in other regions of Brazil would increase the external validity of the investigation.

Overall, our results indicate an increase in the frequency of serotype 19A in invasive and non-invasive isolates of *S. pneumoniae* in the post PCV10 period. This was accompanied by a selection of CC320 and, consequently, antimicrobial non-susceptibility also increased. Surveillance studies must be performed systematically

to monitor the vaccine-induced changes and changes to serotype 19A and see if this trend continues.

**Author ORCIDs.**  M.P. Mott, 0000-0001-5130-9057

**Acknowledgements.** We thank the *Streptococcus* Laboratory of the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) for technical support in particular MLST and Quellung (especially Dr Lesley McGee). We also thank the Gram-Positive Cocci Laboratory and Molecular Microbiology to Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA) for technical support (especially Bernard Louizette Christophe, Janira Prichula and Rebeca Inhoque Pereira) and professor Afonso L. Barth for the use of Bionumerics software.

**Conflict of interest.** None.

**Financial support.** This work was supported by Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Ethical standards.** The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional committees on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008.

**Disclaimers.** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Nuorti JP and Whitney CG (2010) Prevention of pneumococcal disease among infants and children-use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. Recommendations of

- the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report* **59**, 1–18.
2. **Simell B et al.** (2012) Pneumococcal carriage group. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Review of Vaccines* **11**, 841–855.
  3. **Centers for Disease Control and Prevention** (2009) Pneumonia hospitalizations among young children before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine—United States, 1997–2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **58**, 1–4.
  4. **Whitney CG et al.** (2003) Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *The New England Journal of Medicine* **348**, 1737–1746.
  5. **Aguar SI et al.** (2010) Denmark<sup>14</sup>–230 clone as an increasing cause of pneumococcal infection in Portugal within a background of diverse serotype 19A lineages. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 101–108.
  6. **Ansaldi F et al.** (2011) Increasing incidence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A and emergence of two vaccine escape recombinant ST695 strains in Liguria, Italy, 7 years after implementation of the 7-valent conjugated vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology* **18**, 343–345.
  7. **Richter S et al.** (2013) Pneumococcal serotypes before and after introduction of conjugate vaccines, United States, 1999–2011. *Emerging Infectious Disease* **19**, 1074–1083.
  8. **van der Linden M et al.** (2013) Epidemiology of serotype 19A isolates from invasive pneumococcal disease in German children. *BioMed Central Infectious Diseases* **13**, 1–9.
  9. **Ardanuy C et al.** (2009) Emergence of a multidrug-resistant clone ST320 among invasive serotype 19A pneumococci in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **64**, 507–510.
  10. **Tan TQ** (2012) Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in the era of pneumococcal conjugate vaccines. *Clinical Microbiology Reviews* **25**, 409–419.
  11. **Centers for Disease Control and Prevention** (2010) Invasive pneumococcal disease in young children before licensure of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine – United States, 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **59**, 253–257.
  12. **Afonso E et al.** (2013) Effect of 10-valent pneumococcal vaccine on pneumonia among children, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* **19**, 589–597.
  13. **Santos S et al.** (2013) Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. *Vaccine* **31**, 6150–6154.
  14. **Domingues CM et al.** (2014) Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. *The Lancet Respiratory Medicine* **2**, 464–471.
  15. **Santos M et al.** (2015) Temporal trends and clonal diversity of penicillin non-susceptible pneumococci from meningitis cases from 1996 to 2012, in Salvador, Brazil. *BioMed Central Infectious Diseases* **15**, 1–10.
  16. **Grando IM et al.** (2015) Impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis in children up to two years of age in Brazil. *Caderno Saúde Pública* **31**, 1–9.
  17. **Brandileone MC et al.** (2016) Effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among children in São Paulo, Brazil. *Vaccine* **34**, 5604–5611.
  18. **Versalovic J et al.** (2011) *Streptococcus*. In Spellerberg B, Brandt C (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edn. Washington, DC: ASM Press, pp. 331–349.
  19. **Pinto T et al.** (2013) Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the *atpC* gene. *Journal of Clinical Microbiology* **51**, 3242–3249.
  20. **Dias CA et al.** (2007) Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *Journal of Medical Microbiology* **56**, 1185–1188.
  21. **Habib M, Porter BD and Satzke C** (2014) Capsular serotyping of *Streptococcus pneumoniae* using the Quellung reaction. *Journal of Visualized Experiments* **84**, 51208.
  22. **Clinical and Laboratory Standards Institute** (2015) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 25th Informational Supplement M100-S25*. Wayne, PA: CLSI.
  23. **Widdowson CA and Klugman KP** (1998) Emergence of the M phenotype of erythromycin-resistant pneumococci in South Africa. *Emerging Infectious Diseases* **4**, 277–281.
  24. **Enright MC and Spratt GA** (1998) Multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology (Reading, England)* **144**, 3049–3060.
  25. **Multi Locus Sequence Typing (MLST) database.** (<http://pubmlst.org/spneumoniae/>). Accessed 20 November 2017.
  26. **Kim SH et al.** (2012) Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asian countries: an Asian network for surveillance of resistant pathogens (ANSORP) study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**, 1418–1426.
  27. **Lee MR et al.** (2013) Capsular serotypes and antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive pneumococcal disease from 2009–2012 with an emphasis on serotype 19A in bacteraemic pneumonia and empyema and  $\beta$ -lactam resistance. *International Journal Antimicrobial Agents* **42**, 395–402.
  28. **Castañeda E et al.** (2012) *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis, 1990–2010. *BioMed Central Infectious Diseases* **12**, 1–13.
  29. **Caierão J et al.** (2014) Serotypes and genotypes of invasive *Streptococcus pneumoniae* before and after PCV10 Implementation in Southern Brazil. *Plos ONE* **9**, e111129.
  30. **Neves FPG et al.** (2017) Pneumococcal carriage among children after four years of routine 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in use in Brazil: the emergence of multidrug resistant serotype 6C. *Vaccine* **35**, 2794–2800.
  31. **De Wals P et al.** (2014) Impact of 2+1 pneumococcal conjugate vaccine program in the of Quebec, Canada. *Vaccine* **32**, 1501–1506.
  32. **Clarke CJP and Hausdorff WP** (2014) Further evidence for the effectiveness of PCV10 *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A. *The Lancet Respiratory Medicine* **2**, e7.
  33. **Hulten K et al.** (2013) Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A invasive infections in children from 1993 to 2011. *Journal of Clinical Microbiology* **51**, 1294–1297.
  34. **Andam CP and Hanage WP** (2015) Mechanisms of genome evolution of *Streptococcus*. *Infection, Genetics and Evolution* **33**: 334–342.
  35. **Hanage WP et al.** (2010) Evidence that pneumococcal serotype replacement in Massachusetts following conjugate vaccination is now complete. *Epidemics* **2**, 80–84.
  36. **Choi EH et al.** (2008) *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in children, South Korea. *Emerging Infectious Diseases* **14**, 275–281.
  37. **Croucher N et al.** (2014) Evidence for soft selective sweeps in the evolution of pneumococcal multidrug resistance and vaccine escape. *Genome Biology and Evolution* **6**, 1589–1602.
  38. **Dagan R et al.** (2009) Introduction and proliferation of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A clones that cause acute otitis media in an unvaccinated population. *Journal of Infectious Diseases* **199**, 776–785.
  39. **Ruckinger S et al.** (2008) Childhood invasive pneumococcal disease in Germany between 1997 and 2003: variability in incidence and serotype distribution in absence of general pneumococcal conjugate vaccination. *Vaccine* **26**, 3984–3986.
  40. **Hsieh YC et al.** (2013) Expansion and evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A ST320 clone as compared to its ancestral clone, Taiwan 19<sup>F</sup>-14 (ST236). *The Journal of Infectious Diseases* **15**, 203–210.
  41. **Mott M et al.** (2014) Susceptibility profiles and correlation with pneumococcal serotypes soon after implementation of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *International Journal of Infectious Diseases* **20**, 47–51.



## 5.2 MANUSCRITO II

Título: Pneumococcal carriage in children and the elderly in southern Brazil after eight years of PCV10 introduction: serotype distribution, associated variables, and antimicrobial resistance

A ser submetido na revista: *Vaccine*

Fator de Impacto: 3.641

1 **Pneumococcal carriage in children and the elderly in southern Brazil after eight**  
2 **years of PCV10 introduction: serotype distribution, associated variables, and**  
3 **antimicrobial resistance**

4  
5 Mariana P. Mott<sup>a,f\*</sup>, Pedro U.P.Vieira<sup>a</sup>, Emilio H. Moriguchi<sup>b,c</sup>, Neide M. Bruscato<sup>c,d</sup>, João  
6 Carlos B. Santana<sup>b</sup>, Roberta D. Corte<sup>b</sup>; Jennifer Milucky<sup>e</sup>, Maria da Glória Carvalho<sup>e</sup>,  
7 Fabiana Pimenta<sup>e</sup>, Fernanda Lessa<sup>e</sup>; Gabriela R. da Cunha<sup>f</sup>; Kauna Pizzutti<sup>a</sup>; Juliana  
8 Comerlato<sup>a</sup>, Jaqueline Verardo<sup>a</sup>, Tiago Fetzner<sup>a</sup>, Cícero A.G.Dias<sup>a</sup>.

9  
10 <sup>a</sup> Federal University of Health Science of Porto Alegre, Porto Alegre/RS, Brazil.

11 <sup>b</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre/RS, Brazil.

12 <sup>c</sup> Instituto Moriguchi, Veranópolis/RS, Brazil.

13 <sup>d</sup> Hospital Comunitário São Peregrino Lazziozi, Veranópolis/RS, Brazil.

14 <sup>e</sup> Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Immunization and  
15 Respiratory Diseases, Division of Bacterial Diseases, Atlanta/Georgia, US.

16 <sup>f</sup> Ernesto Dornelles Hospital, Porto Alegre/RS, Brazil.

17  
18 **\*Corresponding author:** Mariana Preussler Mott

19  
20 **\*Corresponding address:** Basic Health Department, Federal University of Health  
21 Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Sarmiento Leite Street, 245.

22 ZIP Code: 90050-170.

23 Phone: +55 (51) 3303-8740.

24 E-mail address: [mariana\\_mott510@hotmail.com](mailto:mariana_mott510@hotmail.com)

25

26 **Abstract**

27

28 Background: Pneumococcal conjugate vaccines (PCVs) were developed to control  
29 pneumococcal disease, associated with high mortality and morbidity rates, mainly in  
30 children and the elderly. However, after using PCVs, replacement of serotypes was  
31 reported in Invasive Pneumococcal Disease (IPD) and carriage. We evaluated PCV10  
32 impacts on the carriage, serotype distribution, colonization risk factors, and antimicrobial  
33 resistance profile among children and the elderly.

34 Methods: We conducted a cross-sectional study investigating pneumococcal carriage  
35 among 229 children aged <5 years and 629 elderly aged  $\geq 65$  years, between February  
36 2018 to October 2019. We collected nasopharyngeal (NP) specimens from children and  
37 NP and oropharyngeal (OP) specimens from the adults to evaluate pneumococcal  
38 carriage. We also analyzed factors associated with colonization and the antimicrobial  
39 susceptibility profile.

40 Results: Among 229 children, 146 (63.7%) were pneumococcal carriers. However,  
41 among 627 older adult participants, 19 were pneumococcal carriers by culture (3.0%) and  
42 qPCR (4.3%). Colonization by PCV10 serotype occurred in four children (all serotype  
43 6B). Serotype 6A (18.9%), 19A (18.2%) and 23A (16.2%) were most prevalent in  
44 children. Among the elderly, only non-vaccine serotypes were identified; the most  
45 common included serotype 19A (31.6%). In children, factors associated with colonization  
46 were: male sex, nasal congestion/coryza, and frequent daycare. In adults, asthma was  
47 associated with the carriage. Serotype 19A was the most resistant. All 33 isolates were  
48 resistant to penicillin parenteral (meningitis breakpoints), cefuroxime, azithromycin,  
49 erythromycin, and tetracycline. However, by excluding 19A isolates, a resistance rate  
50 decreased to 60.9% penicillin parenteral (meningitis breakpoints), 6.7% cefuroxime

51 (parenteral breakpoints), 50.3% azithromycin, 50.4% erythromycin, 40.6% tetracycline,  
52 and 16.5% trimethoprim-sulfamethoxazole. Resistance to other serotypes was associated  
53 with serogroup 6 and serotype 23A.

54 Conclusion: After eight years of vaccination introduction, we observed serotype  
55 replacement in pneumococcal colonization among children and the elderly. In total,  
56 serotype 19A (non-PCV10) was the most prevalent (19.7%; 33/167) and was associated  
57 with increased resistance to antimicrobials.

58

59 **Keywords:** Pneumococcal carriage, Brazil, serotype 19A.

60

## 61 **Introduction**

62

63 *Streptococcus pneumoniae* is a pathogen associated with high mortality and  
64 morbidity rates, affecting primarily children (<5 years of age) and the elderly (> 65 years  
65 of age) [1,2]. According to the World Health Organization (WHO), in 2019, 2.6 million  
66 deaths were reported due to respiratory infection, making it the 4<sup>th</sup> cause of death in the  
67 world. In 2017, respiratory infections caused 808,920 deaths among children worldwide  
68 [3,4]. In the United States (US), pneumonia is the leading cause of hospitalization in the  
69 adult population, with the highest rates among older adults, 65 to 79 years of age (63.0  
70 cases per 10,000 adults); and those 80 years of age or older (164.3 cases per 10,000  
71 adults). *S.pneumoniae* was the most commonly detected bacteria, in 14% of participants,  
72 with a five times higher incident rate in the elderly population [5]. In Brazil, in 2018, the  
73 incidence of IPD among children aged 0-2 years was 21.0/100,000 inhabitants; 2-4 years  
74 was 9.9/100,000; 5-17 years was 6.2/100,000; 35-49 years it was 7.6/100,000; 50-64  
75 years old was 13.0/100,00 and  $\geq$  65 years old was 41.8/100,000 [6]. In 2015, the annual  
76 pneumonia hospitalization rate was high in Brazil, particularly among children in their  
77 first year of life (approximately 3,433/100,000) and the elderly (1,323/100,000) [7].

78 Carriage of the agent, i.e., colonization of the mucosa of the upper respiratory tract  
79 in healthy individuals, permits the spread in the community and remains a prerequisite  
80 for pneumococcal disease development [1,2,8]. The main factor that determines the  
81 colonization rate is age. Among children with < 5 years of age, the colonization rate varies  
82 from 20% to 60%, representing a crucial reservoir of pneumococci. However, the  
83 proportion of carriage decreases with age [9]. The prevalence of carriage varies from 0%  
84 to 6% among the elderly [10,11,12]. Other factors, such as immune response, underlying  
85 medical conditions, and crowding, also contribute to colonization [13].

86           PCVs are a highly effective control measure against pneumococcal disease. These  
87 vaccines are composed of polysaccharide antigens from the most common serotypes  
88 causing invasive pneumococcal disease, conjugated with proteins to enhance  
89 immunogenicity. Also, PCVs interferes in the carriage and consequent dissemination of  
90 the agent and carriage [14, 15, 16, 17, 18]. In Brazil, the 10-valent pneumococcal  
91 conjugate vaccine (PCV10) was introduced into the childhood immunization program in  
92 2010. It is available free of charge in the public health network for all children under two  
93 years of age, initially given in 3 doses plus, and a booster (3+1 doses). A change in the  
94 scheme was introduced in 2016, with a schedule of two primary doses at two and four  
95 months of age and a booster dose for children aged 12-18 months (2 +1 doses) [19].

96           PCVs are not available for adults 65 years of age and older in the Brazilian public  
97 healthcare system. Vaccination with the 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine  
98 (PPV-23) is available for adults in Brazil. This vaccine should be administered from two  
99 years of age to individuals with risk factors for developing pneumococcal disease and to  
100 adults from 60 years of age as per medical advice or in special situations. In 2019, a  
101 PCV13 was recently approved in Brazil to be administered sequentially with the PPV-23,  
102 only for individuals over five years of age, at high risk for developing the pneumococcal  
103 disease [20].

104           A positive impact has been reported with the use of PCVs, with a dramatic  
105 decrease in IPD, hospitalization, and mortality rates associated with *S. pneumoniae*  
106 infections, both in the children and in the adult population, due to indirect protection [21,  
107 22, 23, 24, 25]. However, due to the selective pressure caused by PCVs, non-vaccine  
108 serotypes began to occupy the niche of vaccine serotypes. This replacement of serotypes  
109 was reported in IPD and carriage [16, 17, 18, 21, 26, 27, 28, 29]. An increase, mainly of  
110 serotype 19A, was observed in countries that used PCV7 or PCV10. In the US, after the

111 use of PCV7, serotype 19A began to gain prominence when it emerged as the most  
112 prevalent serotype [30]. In Brazil, after the use of PCV10, this increase was also reported  
113 (17, 18, 31, 32). A major concern is that serotype 19A is associated with antimicrobial  
114 resistance, especially penicillin non-susceptibility and multidrug-resistance [17, 30-34].

115 Therefore, it is essential to monitor the serotypes circulating in the healthy  
116 population and evaluate the impact of the vaccine on serotype redistribution, both among  
117 children and the elderly. So far, and particularly in Brazil, few studies are approaching  
118 the carriage of *S. pneumoniae* in both children and adults simultaneously. We aimed to  
119 investigate pneumococcal carriage prevalence and associated variables, serotype  
120 distribution, and antimicrobial resistance of the isolates among children and elderly aged  
121 18-59 months and  $\geq 65$  years of age, respectively, in the South of Brazil.

122

## 123 **Materials and methods**

124

### 125 **Study population and data collection**

126

127 We conducted a cross-sectional study to investigate pneumococcal carriage  
128 among children aged 18-59 months and elderly  $\geq 65$  years of age. We collected NP  
129 specimen from children; NP and OP specimen from adults, from February 2018 to  
130 October 2019, in Veranópolis, Rio Grande do Sul, Brazil. Written and informed consent  
131 was obtained from children's parents/legal guardians and the elderly participants before  
132 collecting samples. Vaccination status for PCV10 was assessed by reviewing the child's  
133 immunization card. As vaccination against pneumococcus is not mandatory in adults, we  
134 recorded only those who had been vaccinated.

135 We recruited the participants from volunteers in the community. Participants were  
136 not eligible for enrollment if: they had been too sick, used antimicrobials, or been  
137 hospitalized in the week prior to swab collection, elderly participants living in a nursing  
138 home, or those without paired NP and OP specimens. Children without satisfactory NP  
139 swab and vaccination histories were excluded from the analysis.

140 Study staff used standardized questionnaires to collect information on the history  
141 of recent illness, chronic medical conditions, recent exposure to antimicrobials, viral  
142 infection, and pneumococcal vaccination history.

143

#### 144 **Specimen collection and processing**

145

146 NP and OP specimens of children and elderly were collected and immediately  
147 placed in two separate vials with transport media containing 1.0 mL skim milk, tryptone,  
148 glucose, glycerol (STGG) transport medium. At the collection site, vials were stored on  
149 dry ice. All NP-STGG and OP-STGG specimens were sent on dry ice to the Federal  
150 University Federal of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA). After that, the  
151 specimens were transferred to freeze at -80°C until culture. The protocol described by  
152 Milucky et al. [11] was used for pneumococcal isolation and identification. Serotypes of  
153 each isolate were initially deduced according to the sequential multiplex PCR for the most  
154 common serotypes reported in Latin America [35]. Serotypes were confirmed by  
155 Quellung using CDC pneumococcal typing antisera [36].

156 NP swabs from the elderly also underwent real-time PCR targeting *lytA* for  
157 detection of pneumococcal DNA. Multiplex PCR serotype assay for 37 serotypes was  
158 performed on all *lytA* positive NP specimens as described by Milucky et al. [11].



159 Minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined for Penicillin,  
160 Amoxicillin-clavulanate, Cefuroxime ceftriaxone, Cefotaxime, Cefepime, Ertapenem,  
161 Meropenem, Azithromycin, tetracycline, erythromycin, Clindamycin, Moxifloxacin,  
162 Trimethoprim-sulfamethoxazole, Chloramphenicol, Linezolid, Levofloxacin, and  
163 Vancomycin using the broth microdilution method. Isolates were classified as  
164 susceptible, intermediate, or resistant based on the Clinical and Laboratory Standards  
165 Institute (CLSI) breakpoint criteria [37].

166

### 167 **Sample size and analysis**

168

169 Sample size in children was based on the prevalence of serotype 19A found in a  
170 Brazilian study of the carriage in 2013, after the introduction of PCV10 [27]. Based on  
171 the colonization prevalence of serotype 19A of 5% with confidence interval limits of  
172 approximately 3% and  $\alpha=0,05$ , the desired sample size for our study was 203 children.  
173 Assuming a colonization prevalence of serotype 19A in adults of 2% [10, 38] with  
174 confidence interval limits of approximately 1% and  $\alpha=0,05$ , the desired sample size  
175 included 753 older adults. But due to the COVID-19 pandemic, only 627 older adults  
176 were able to participate.

177 We used the chi-square test or Mann-Whitney, as appropriate. To identify factors  
178 associated with pneumococcal colonization, we performed a univariate analysis. A *P*  
179 value of  $< 0.05$  was considered statistically significant.

180

181

182

183

184 **Ethical considerations**

185

186 The study was approved by the Ethics Committees of the Federal University of  
187 Health Sciences of Porto Alegre, with an approval number 2.176.785; and the Federal  
188 University of Rio Grande do Sul (Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA) with  
189 approval number 2.106.235.

190

191 **Results**

192

193 A total of 231 children had their specimens collected, out of which only 229  
194 children were included in the study. One child was young, while the isolate of the other  
195 child was not viable for analysis. In 146 children (63.7%; 146/229), pneumococci was  
196 isolated from NP specimens. Among the 146 participants with pneumococcus detected,  
197 148 pneumococci were isolated (two children were isolated with two different  
198 pneumococci) (Figure 1), and 20 serotypes were identified. The most prevalent serotypes  
199 were 6A (18.9%; 28/148), 19A (18.2%; 27/148), 23A (16.2%; 24/148), 6C (6.0%; 9/148)  
200 and 15C (6.0%; 9/148). The only PCV10 serotype detected was 6B (2.7%; 4/148).  
201 However, 39.2% (58/148) represented the additional serotypes of PCV13, and 58.1%  
202 (86/148) were non-PCV10 and non-PCV13 serotypes (Table 1 and Figure 2). Overall, the  
203 mean age was 37.3 months; 50.2% (115/229) were male, and 92.6% (212/229) were  
204 white. According to the vaccination card, 220 children had received PCV10 (96.1%;  
205 220/229), 17 children PCV13 (7.7%; 17/221), and eight children had received both  
206 vaccines. Factors associated with pneumococcal colonization included male sex ( $p =$   
207 0.03), presenting nasal congestion/coryza on the day of collection ( $p < 0.01$ ), and frequent  
208 school or daycare visit ( $p = 0.01$ ) (Table 2).

209           Among the elderly participants, 631 specimens were collected; however, only 627  
210 adults were included in the study. Among the four excluded adults, three were < 65 years  
211 of age, and one did not fill a complete questionnaire; hence, we could not contact the  
212 patient. The carriage was detected by culture in 19 participants (3.0%; 19/627). In 14  
213 individuals, culture was positive exclusively in the NP specimen, whereas only OP  
214 specimens were positive in three individuals. Finally, in two individuals, both NP and OP  
215 were positive for *S. pneumoniae*. Individuals with negative cultures (n=608) had their  
216 NP specimen submitted to conduct a real-time PCR by targeting *lytA*. In eight, the  
217 presence of *lytA* gene was detected by PCR, resulting in an overall pneumococcal carriage  
218 rate of 4.3% (27/627) (Figure 3). Among the 19 participants' carriage, 11 serotypes were  
219 identified. The most prevalent serotypes were 19A (31.6%; 6/19), 3 (6.8%, 2/19), 23A  
220 (6.8%, 2/19) and Non-typeable (6.8%, 2/19). Serotypes 6A, 6C, 9N, 11A, 16F, 22F, and  
221 31 were each isolated in only one sample. No PCV10 serotype was isolated, and 47.4%  
222 (9/19) represented the additional serotypes of PCV13, whereas 52.6% (10/19) were non-  
223 PCV10 and non-PCV13 serotypes (Table 1) (Figure 2). The mean age was 71.8 years;  
224 most of the participants were 65-75 years of age (76.1%; 477/627). Few participants  
225 received any pneumococcal vaccine (4.3%; 27/627). Only 5 participants had been  
226 vaccinated with PCV10/PCV13, and 22 were vaccinated with PCCV23. The only variable  
227 associated with carriage was asthma (p=0.02) (Table 3).

228           The antimicrobial susceptibility profile was performed for 166 isolates, out of  
229 which 147 were from children (one isolated was not viable for MIC testing) and 19 from  
230 the elderly (Table 4). No resistance to moxifloxacin, levofloxacin, linezolid, and  
231 vancomycin was observed among isolates. Serotype 19A showed higher levels of non-  
232 susceptibility for most of the antimicrobials tested. All 33 isolates with serotype 19A were  
233 resistant to Penicillin (meningitis and oral), Cefuroxime (parenteral and oral),

234 Azithromycin, Erythromycin, Tetracycline, and Trimethoprim-sulfamethoxazole (Table  
235 4). Table 5 presents details about the distribution of non-susceptible (intermediate and  
236 resistant) isolates among serotypes.

237

## 238 **Discussion**

239

240 We investigated carriage of *Streptococcus pneumoniae* in two age groups at  
241 higher risk for developing the invasive pneumococcal disease: children and adults >65  
242 years. The carriage was common in children (63.7%) and infrequent in the elderly (3.0%).  
243 A substitution of vaccine serotypes was observed in both infants and the elderly.  
244 Antimicrobial resistance was primarily concentrated in a specific serotype, 19A.

245 In Brazil, PCV10 has been available free of charge for children (two doses at two  
246 and four months, with a booster in the first year of life) since 2010. Our study collected  
247 samples eight years after the introduction of the vaccine. All children had been  
248 vaccinated, predominantly with PCV10. Thus, we observed the effect of vaccination on  
249 carriage not only in children but also in adults. We found a prevalence of carriage at  
250 63.7%, which is higher than those observed in other studies. Brandileone et al. [27]  
251 detected an increase in the carriage from 40.3% to 48.8% from 2010 to 2013. In a study  
252 that investigated carriage among children using culture and qPCR methods, the  
253 prevalence was 59.7% by culture and 61.2% using the molecular amplification method  
254 [18]. Neves et al. [16] identified a carriage rate of 22% among children. The carriage of  
255 pneumococci varies across different regions, even within the same country [39-41]. A  
256 study conducted in Mozambique, a country that also uses a PCV10, found that 80.5% of  
257 children were colonized with pneumococci [42].

258 Variables potentially associated with carriage in children were examined. We  
259 found the association of carriage with male gender, attending school or daycare, and the  
260 presence of nasal congestion or runny nose on the day of collection. The association of  
261 carriage with male sex has already been described in other studies; however, the reasons  
262 for this remain unclear [43-46]. Living with other children in daycare centers and schools  
263 facilitates the transmission of respiratory agents, including pneumococcus, which is  
264 traditionally associated with carriage [16, 26]. The occurrence of nasal congestion or  
265 runny nose can result from viral infections or even allergic processes. Anyway, viral  
266 infection in the nasal mucosa facilitates colonization by pneumococcus, with an  
267 interaction between the agents [47, 48]. Regarding other variables potentially associated  
268 with the carriage, it is worth noting that the studies are not unanimous, and there is  
269 considerable diversity in this issue.

270 The distribution of serotypes among isolates from children demonstrates that the  
271 replacement is well established after eight years of vaccination. The presence of  
272 pneumococci belonging to the vaccine serotype (6B) was detected in only four children,  
273 confirming the action of the vaccine on these serotypes. In a nationwide study conducted  
274 in Brazil, the presence of vaccine serotypes (PCV10) was observed in 1.4% of samples  
275 (5/348) (6B, 9V, 14, 18C, and 23F each serotype) [18]. It is noteworthy that the additional  
276 PCV13 serotypes (3, 6A, and 19A) comprise 39.2% (58/148) of all isolates obtained from  
277 children. Some additional studies may be needed to understand the consequences of the  
278 carriage of vaccine serotypes in vaccinated children and the potential of serotypes 3, 6A,  
279 and 19A in producing invasive disease.

280 There are few studies in Latin American countries that have investigated the  
281 carriage among the elderly. In our study, the carriage was found in only 19 (3.0%) elderly  
282 participants. The prevalence is in accordance with a review performed by Arguedas et

283 al.[12] that found colonization rates from 0% to 6%. It is well known that children are the  
284 main reservoir of *S. pneumoniae*, and that colonization decreased with age [1,2]. In Brazil,  
285 in the only study that investigated carriage of pneumococci among the elderly, the  
286 carriage was 2.2% at the first visit and 2.6% at the follow-up visit [49]. In a recent, cross-  
287 sectional survey conducted among non-institutionalized US adults ( $\geq 65$  years) in four  
288 states in 2015–2016, 55/2989 participants (1.8%) carried pneumococcus (45 identified by  
289 culture and ten by real-time PCR). It should be noted that 45.3% of the participants in  
290 that study had received PCV13 [11], which contrasts with vaccinated adults in our study.  
291 However, 4.3% of the participants received PPV-23 or PCVs (5 participants received  
292 PCV10/PCV13, and 22 received PPV-23). None of the 19 adult participants, identified as  
293 carriers in this study, was colonized by a serotype that is part of PCV10, revealing the  
294 indirect effect of vaccination in children. Serotype 19A was the most frequent among the  
295 elderly, which is consistent with a previous study conducted by our group that  
296 demonstrated an increase in the proportion of isolates belonging to this serotype among  
297 adults with pneumococcal disease [32]. In Brazil, serotype 19A was the most prevalent  
298 non-meningitis case in 2014-2015 [17]. Cassiolato et al. [31] observed an increase in the  
299 proportion of serotype 19A in IPD, from 2.8% in 2005-2009 to 7.0% in 2011-2015, and  
300 16.4% in 2016-2017; this increase was mainly in children aged  $< 5$  years old. Recent  
301 laboratory-based surveillance data from the Ministry of Health of Brazil show that  
302 serotype 19A is the most common serotype in all age groups in IPD in the country [50].

303         Results based solely on culture may underestimate the prevalence of carriage.  
304 Indeed, using an additional amplification method targeting the *lytA* gene increased the  
305 detection of carriers among adults from 3.0% to 4.3% in this study. In a study that  
306 employed a similar approach, the prevalence of carriage increased from 1.5% to 1.8%  
307 [11] with the use of qPCR targeting *lytA* gene. However, the results must be analyzed

308 with caution due to the possibility of false-positive results, mainly among respiratory  
309 samples, since the presence of non-pneumococcal streptococci may carry homolog genes  
310 of pneumococci [51]. Due to the difficulty in interpreting the results, we exclusively  
311 applied qPCR for *lytA* gene on adult NP samples. Besides, we conservatively included  
312 only results of culture in the investigation of variables associated with the carriage.

313 A specific chronic condition, asthma, has been associated with the carriage of  
314 pneumococci among the elderly. This association has previously been demonstrated in  
315 young adults [51] and adolescents [43]. Asthma is a complex disease that involves an  
316 inflammatory condition, and it might be possible that pneumococci may benefit from this  
317 situation to remain in the respiratory tract [51]. The causes for this association, however,  
318 need further investigation. We did not find results that represented statistical significance  
319 for the other variables potentially associated with colonization by *S. pneumoniae*.

320 Antimicrobial resistance is of particular concern in pneumococcal disease. Our  
321 study reveals community circulation of multidrug-resistant serotype 19A pneumococci  
322 (resistance to three or more classes of antimicrobials) in both children and adult carriers.  
323 In our study, all pneumococci belonging to this serotype were resistant to Penicillin  
324 (breakpoint for meningitis) and some other beta-lactams, erythromycin, tetracyclines, and  
325 trimethoprim-sulfamethoxazole. Although resistance to several antimicrobials can be  
326 found in other serotypes, there is an evident relationship between antimicrobial resistance  
327 and serotype 19A. In a previous study, we had found the spread of ST320, belonging to  
328 serotype 19A, among isolates from adults with pneumococcal disease [32, 52]. One  
329 limitation of this study is that it did not investigate clonality among isolates of this  
330 serotype. Globally, an increase in 19A after PCV7/PCV10 vaccination has been linked to  
331 the emergence of antimicrobial-resistant clonal complex 320 (CC320) [53-57]. The  
332 presence of CC320 among carriage children is worrying because of a great chance of

333 spread [18]. The selective pressure caused by the use of antibiotics and vaccines may  
334 explain, at least partially, the high prevalence of 19A carriage after PCV10 introduction  
335 [32].

336

## 337 **Conclusions**

338

339 In Brazil, no studies so far evaluated PCV10 impact on the carriage, conducted  
340 among children and elderly in a population belonging to the same community. This  
341 condition allows for an exceptional approach to the issue of carriage of pneumococci. The  
342 results of this study may impact public policies on vaccination, both for children and the  
343 elderly. We conclude by summarizing the main findings of the study: occurrence of  
344 replacement by non-vaccine serotypes, particularly those additional to PCV13, both in  
345 children and in the elderly; antimicrobial resistance was frequent, especially in members  
346 of serotype 19A.

347

348 **Conflict of interest.** None.

349

350 **Financial support:** This work was supported by Programa Pesquisa para o SUS  
351 (PPSUS).

352

## 353 **References**

354

355 [1] SIMELL B, et al. Pneumococcal Carriage Group. The fundamental link between  
356 pneumococcal carriage and disease. Expert Review of Vaccines. 11:841-855, 2012.  
357 <https://doi.org/10.1586/erv.12.53>

358



359 [2] WEISER JN, FERREIRA DM, PATON JC. *Streptococcus pneumoniae*:  
360 transmission, colonization and invasion. Nat Rev Microbiol. 16(6):335-367, 2018.  
361 [doi:10.1038/s41579-018-0001-8](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0001-8).  
362

363 [3] Global Burden of Disease, Lower Respiratory Infections Collaborators. Quantifying  
364 risks and interventions that have affected the burden of lower respiratory infections  
365 among children younger than 5 years: an analysis for the Global Burden of Disease  
366 Study 2017. Lancet Infect Dis. 20(1): 60-79, 2020. [https://doi.org/10.1016/S1473-](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30410-4)  
367 [3099\(19\)30410-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30410-4)  
368

369 [4] World Health Organization (WHO) 2021. The top 10 causes of death.  
370 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.  
371 [accessed 07.08.2021].  
372

373 [5] JAIN S, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among  
374 U.S Adults. N Engl J Med. 373(5): 415-427, 2015.  
375 <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoal500245>  
376

377 [6] PERDRIZET J, et al. Cost-effectiveness analysis of replacing the 10-valent  
378 pneumococcal conjugate vaccine (PCV10) with the 13-valent pneumococcal conjugate  
379 vaccine (PCV13) in Brazil Infants. Human Vaccines & Immunotherapeutics. 17(4):  
380 1162-1172, 2020. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1809266>  
381

382 [7] ANDRADE AL, et al. Direct and indirect impact of 10-valent pneumococcal  
383 conjugate vaccine introduction on pneumonia hospitalizations and economic burden in  
384 all age-groups in Brazil: A timeseries analysis. PLoS ONE. 12(9): e0184204, 2017.  
385 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184204>  
386

387 [8] BOGAERT D, DE GROOT R, HERMANS P. *Streptococcus pneumoniae*  
388 colonisation: the key to pneumococcal disease. Lancet Infect Dis. 4:144-54, 2004.  
389 [https://doi.org/10.1016/S1473-30999\(04\)00937-7](https://doi.org/10.1016/S1473-30999(04)00937-7)  
390

391 [9] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2020. National Center for  
392 Immunization and Respiratory Diseases, Division of Bacterial Diseases. Pneumococcal

393 Disease. <https://www.cdc.gov/pneumococcal/clinicians/streptococcus-pneumoniae.html>.  
394 [accessed 06.01.2021].  
395

396 [10] ALMEIDA S, et al. Low prevalence of Pneumococcal carriage and high serotype  
397 and genotype diversity among adults over 60 years of age living in Portugal. PLOS  
398 ONE. 9(3): e90974, 2014. doi: [10.1371/journal.pone.0090974](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090974).  
399

400 [11] MILUCKY J, et al. *Streptococcus pneumoniae* colonization after introduction of 13-  
401 valent pneumococcal conjugate vaccine for US adults 65 years of age and older, 2015-  
402 2016. Vaccine. 37(8): 1094-1100, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.075>  
403

404 [12] ARGUEDAS A, et al. Upper Respiratory Tract Colonization with *Streptococcus*  
405 *pneumoniae* in Adults. Expert Review of Vaccines. 19(4):353-366, 2020.  
406 <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1750378>  
407

408 [13] BROOKS LRK, MIAS GI. *Streptococcus pneumoniae's* virulence and host  
409 immunity: aging, diagnostics, and prevention. Front Immunol. 9:1366, 2018. doi:  
410 [10.3389/fimmu.2018.01366](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01366).  
411

412 [14] WHITNEY CG, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the  
413 introduction of protein polysaccharide conjugate vaccine. N Engl J Med. 348:1737–46,  
414 2003. doi: [10.1056/NEJMoa022823](https://doi.org/10.1056/NEJMoa022823).  
415

416 [15] O'BRIEN KL, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal  
417 colonization among immunized and unimmunized children in a community randomized  
418 trial. J Infect Dis. 196:1211–20, 2007. <https://doi.org/10.1086/521833>  
419

420 [16] NEVES FPG, et al. Pneumococcal carriage among children after four years of routine  
421 10-valent pneumococcal conjugate vaccine use in Brazil: The emergence of multidrug  
422 resistant serotype 6C. Vaccine. 35(21): 2794-2800, 2017.  
423 <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.04.019>  
424

425 [17] BRANDILEONE MCC, et al. Distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae*  
426 serotypes before and 5 years after the introduction of 10-valent pneumococcal conjugate

427 vaccine in Brazil. *Vaccine*. 36(19): 2559-2566, 2018.  
428 <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.010>  
429

430 [18] BRANDILEONE MCC, et al. Long-term effect of 10-valent pneumococcal  
431 conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in children  
432 in Brazil. *Vaccine*. 37: 5357-5363, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.043>  
433

434 [19] Brazil. Ministry of Health. 2017. Calendário de Vacinação.  
435 <https://portalarquivos.saude.gov.br/campanhas/> [accessed 06.13.2021].  
436

437 [20] Brazil. Ministry of Health. 2019. Informe Técnico para Implantação da Vacina  
438 Pneumocócica conjugada 13-valente em pacientes de risco  $\geq$  de 5 anos de idade.  
439 [http://sbim.org.br/images/files/notas-tecnicas/informe-tecnico-pneumo13-](http://sbim.org.br/images/files/notas-tecnicas/informe-tecnico-pneumo13-pacientesderisco-menoresde5anos.pdf)  
440 [pacientesderisco-menoresde5anos.pdf](http://sbim.org.br/images/files/notas-tecnicas/informe-tecnico-pneumo13-pacientesderisco-menoresde5anos.pdf). [accessed 06.13.2021].  
441

442 [21] HICKS LA, et al. Incidence of Pneumococcal Disease Due to Non-Pneumococcal  
443 Conjugate Vaccine (PCV7) in the United States during the Era of Widespread PCV7  
444 Vaccination, 1998-2004. *Journal of Infectious Diseases*. 196: 1346-1354, 2007. [doi:](https://doi.org/10.1086/521626)  
445 [10.1086/521626](https://doi.org/10.1086/521626).  
446

447 [22] PILISHVILI T, et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the  
448 era of conjugate vaccine. *J Infect Dis*. 201(1): 32-41, 2010. [doi: 10.1086/648593](https://doi.org/10.1086/648593).  
449

450 [23] GRIFFIN MR, et al. U.S. hospitalizations for pneumonia after a decade of  
451 pneumococcal vaccination. *N Engl J Med*. 369: 155-63, 2013. [doi:](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209165)  
452 [10.1056/NEJMoa1209165](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209165).  
453

454 [24] SCOTTA MC, et al. Impact of 10-Valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus*  
455 *influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) on childhood pneumonia  
456 hospitalizations in Brazil two years after introduction. *Vaccine*. 32: 4495-4499, 2014. [doi:](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.042)  
457 [10.1016/j.vaccine.2014.06.042](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.042).  
458

459 [25] BEREZIN EN, et al. Invasive pneumococcal disease among hospitalized children in  
460 Brazil before and after the introduction of a pneumococcal conjugate vaccine. *Vaccine*.  
461 38(7): 1740 – 1745, 2019. [doi: 10.1016/j.vaccine.2019.12.038](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.12.038).  
462

463 [26] BRUEGGEMANN AB, et al. Clonal relationships between Invasive and Carriage  
464 *Streptococcus pneumoniae* and serotype – and clone- specific differences in invasive  
465 disease potential. *Journal of Infectious Diseases*. 187:1424-1432, 2003. [doi:](https://doi.org/10.1086/374624)  
466 [10.1086/374624](https://doi.org/10.1086/374624)  
467

468 [27] BRANDILEONE MCC, et al. Effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine  
469 on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*  
470 among children in São Paulo, Brazil. *Vaccine*. 34(46): 5604-5611, 2016.  
471 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.02>  
472

473 [28] PATON JC, TRAPPETTI C. *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide.  
474 *Microbiol Spectrum*. 7(2): GPP3 – 0019, 2018. [doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0019-](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0019-2018)  
475 [2018](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0019-2018).  
476

477 [29] HTAR MTT, et al. The impact of pneumococcal conjugate vaccines on serotype 19A  
478 nasopharyngeal carriage. *Expert Rev of Vaccines*. 18(12):1243-1270, 2019. [doi:](https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1675521)  
479 [10.1080/14760584.2019.1675521](https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1675521)  
480

481 [30] RICHTER SS, et al. Pneumococcal serotype before and after introduction of  
482 conjugate vaccines, United States, 1999-2011. *Emerging Infectious Diseases*. 19:1074–  
483 1083, 2013. [doi: 10.3201/eid1907.121830](https://doi.org/10.3201/eid1907.121830).  
484

485 [31] CASSIOLATO AP, et al. Expansion of the multidrug-resistant clonal complex 320  
486 among invasive *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A after the introduction of a ten-  
487 valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *PLoS ONE*. 13(11):e0208211, 2018.  
488 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208211>  
489  
490

491 [32] MOTT MP, et al. Emergence of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* after  
492 PCV10 associated with a ST320 in adult population, in Porto Alegre, Brazil.  
493 Epidemiology and Infection. 147(e93): 1-7, 2019. doi: [10.1017/S0950268819000013](https://doi.org/10.1017/S0950268819000013)  
494

495 [33] ISTURIZ R, et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A: worldwide  
496 epidemiology. Expert Review of Vaccines. 16(10):1007-1027, 2017. doi:  
497 [10.1080/14760584.2017.1362339](https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1362339).  
498

499 [34] WIESE AD, GRIFFIN MR, GRIJALVA CG. Impact of pneumococcal conjugate  
500 vaccines on hospitalizations for pneumonia in the United States. Expert Rev Vaccines.  
501 18(4): 327-341, 2019. doi: [10.1080/14760584.2019.1582337](https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1582337).  
502

503 [35] DIAS CA et al. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of  
504 pneumococci recovered from Brazilian children. Journal of Medical Microbiology. 56,  
505 1185–1188, 2007. doi: [10.1099/jmm.0.47347-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.47347-0).  
506

507 [36] REGEV-YOCHAY G, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*  
508 by adults and children in community and family settings. Clin Infect Dis : Off Publ Infect  
509 Dis Soc Am.38(5):632–9, 2004. doi: [10.1086/381547](https://doi.org/10.1086/381547).  
510

511 [37] Clinical and Laboratory Standards Institute (2019) Performance Standards for  
512 Antimicrobial Susceptibility Testing; 29th Informational Supplement M100-S29. Wayne,  
513 PA: CLSI.  
514

515 [38] ESPOSITO S, et al. Pneumococcal colonization in older adults. Immunity & Ageing.  
516 13:2, 2016. doi: [10.1186/s12979-016-0057-0](https://doi.org/10.1186/s12979-016-0057-0).  
517

518 [39] SCOTT JR, et al. Impact of More Than a Decade of Pneumococcal Conjugate  
519 Vaccine Use on Carriage and Invasive Potential in Native American Communities. J  
520 Infect Dis. 205(2): 288-288, 2012. doi: [10.1093/infdis/jir730](https://doi.org/10.1093/infdis/jir730)  
521

522 [40] BRUCE MG, et al. Impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine  
523 (pcv13) on invasive pneumococcal disease and carriage in Alaska. Vaccine. 33(38):  
524 4813-4819, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.080>

525

526 [41] GOUNDER PP, et al. Re-emergence of pneumococcal colonization by vaccine  
527 serotype 19F in persons aged  $\geq$  5 years after 13-valent pneumococcal conjugate vaccine  
528 introduction—Alaska, 2008–2013. *Vaccine*. 36(5): 691-697, 2018.

529 [doi:10.1016/j.vaccine.2017](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017)

530

531 [42] VERANI JR, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among  
532 HIV-infected and-uninfected children <5 years of age before introduction of  
533 pneumococcal conjugate vaccine in Mozambique. *PLoS ONE*. 13(2): e0191113, 2018.

534 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191111>

535

536 [43] CARDOZO DM, et al. Prevalence and risk factors for nasopharyngeal carriage of  
537 *Streptococcus pneumoniae* among adolescents. *J Med Microbiol*. 57 (Pt2): 185-189,  
538 2008. [doi: 10.1099/jmm.0.47470-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.47470-0).

539

540 [44] MUENCHHOFF M, GOULDER. Sex differences in pediatric infectious diseases. *J*  
541 *Infect Dis*. 209 (Suppl 3): S120-6, 2014. [doi: 10.1093/infdis/jiu232](https://doi.org/10.1093/infdis/jiu232)

542

543 [45] LIMA EJJ, et al. Risk factors for community-acquired pneumonia in children  
544 under five years of age in the post-pneumococcal conjugate vaccine era in Brazil: a case  
545 control study. *BMC Pediatr*. 16:157, 2016. doi: [10.1186/s12887-016-0695-6](https://doi.org/10.1186/s12887-016-0695-6)

546

547 [46] AL-LAHHAM A. Multicenter study of pneumococcal carriage in children 2 to 4  
548 years of age in the winter seasons of 2017-2019 in Irbid and Madaba governorates of  
549 Jordan. *PLoS ONE* 15 (8): e0237247, 2020.

550 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237247>

551

552 [47] GRIJALVA CG, et al. The role of influenza and parainfluenza infections in  
553 nasopharyngeal pneumococcal acquisition among young children. *Clin Infect Dis*.  
554 58(10): 1369-1376, 2014. [doi: 10.1093/cid/ciu148](https://doi.org/10.1093/cid/ciu148).

555

556 [48] KRONE CL, et al. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Aged Adults with  
557 Influenza-Like-Illness. *PLoS One*. 10(3):e0119875, 2015. [doi:](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119875)

558 [10.1371/journal.pone.0119875](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119875)

559 [49] ZANELLA RC, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*,  
560 *Haemophilus influenzae*, and *Staphylococcus aureus* in a Brazilian elderly cohort. PLoS  
561 ONE. 14(8): e0221525, 2019. [doi: 10.1371/journal.pone.0221525](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221525). eCollection 2019.  
562

563 [50] Brazil. Ministry of Health. 2020. Boletim Epidemiológico. Vigilância em Saúde no  
564 Brasil 2003-2019. Secretaria de Vigilância em Saúde.  
565 [https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-](https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf)  
566 [21ago19-web.pdf](https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf). [accessed 08.06.2021].  
567

568 [51] BRANCHE AR, et al. Effect of prior vaccination on carriage rates of *Streptococcus*  
569 *pneumoniae* in older adults: A longitudinal surveillance study. Vaccine. 36:4304-4310,  
570 2018. [doi: 10.1016/j.vaccine.2018.05.107](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.107).  
571

572 [51] JOUNIO U, et al. Pneumococcal carriage is more common in asthmatic than in  
573 non-asthmatic young men. Clin Respir J. 4(4): 222-229, 2010. [doi: 10.1111/j.1752-](https://doi.org/10.1111/j.1752-699X.2009.00179.x)  
574 [699X.2009.00179.x](https://doi.org/10.1111/j.1752-699X.2009.00179.x).  
575

576 [52] CHRISTOPHE BL, et al. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* isolates  
577 from invasive disease in adults following the introduction of PCV10 in Brazil. J Med  
578 Microbiol. 67(5):687-694, 2018. [doi: 10.1099/jmm.0.000717](https://doi.org/10.1099/jmm.0.000717)  
579

580 [53] ARDANUY C, et al. Emergence of a multidrug-resistant clone ST320 among  
581 invasive serotype 19A pneumococci in Spain. Journal of Antimicrobial Chemotherapy  
582 64, 507–510, 2009. [doi: 10.1093/jac/dkp210](https://doi.org/10.1093/jac/dkp210).  
583

584 [54] AGUIAR SI, et al. Denmark14–230 clone as an increasing cause of pneumococcal  
585 infection in Portugal within a background of diverse serotype 19A lineages. Journal of  
586 Clinical Microbiology 48, 101–108, 2010. <https://doi.org/10.1128/JCM.00665-09>  
587

588 [55] ANSALDI F, et al. Increasing incidence of *Streptococcus pneumoniae* serotype  
589 19A and emergence of two vaccine escape recombinant ST695 strains in Liguria, Italy,  
590 7 years after implementation of the 7-valent conjugated vaccine. Clinical and Vaccine  
591 Immunology 18, 343–345, 2011. [doi: 10.1128/CVI.00383-10](https://doi.org/10.1128/CVI.00383-10).  
592

593 [56] TAN TQ. Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in the era of  
594 pneumococcal conjugate vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*. 25: 409–419, 2012.  
595 [doi: 10.1128/CMR.00018-12](https://doi.org/10.1128/CMR.00018-12).

596

597 [57] VAN DER LINDEN M, et al. Epidemiology of serotype 19A isolates from invasive  
598 pneumococcal disease in German children. *BioMed Central Infectious Diseases* 13, 1–9,  
599 2013. [doi: 10.1186/1471-2334-13-70](https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-70).

600

601

602

603

604

605

606

607

608

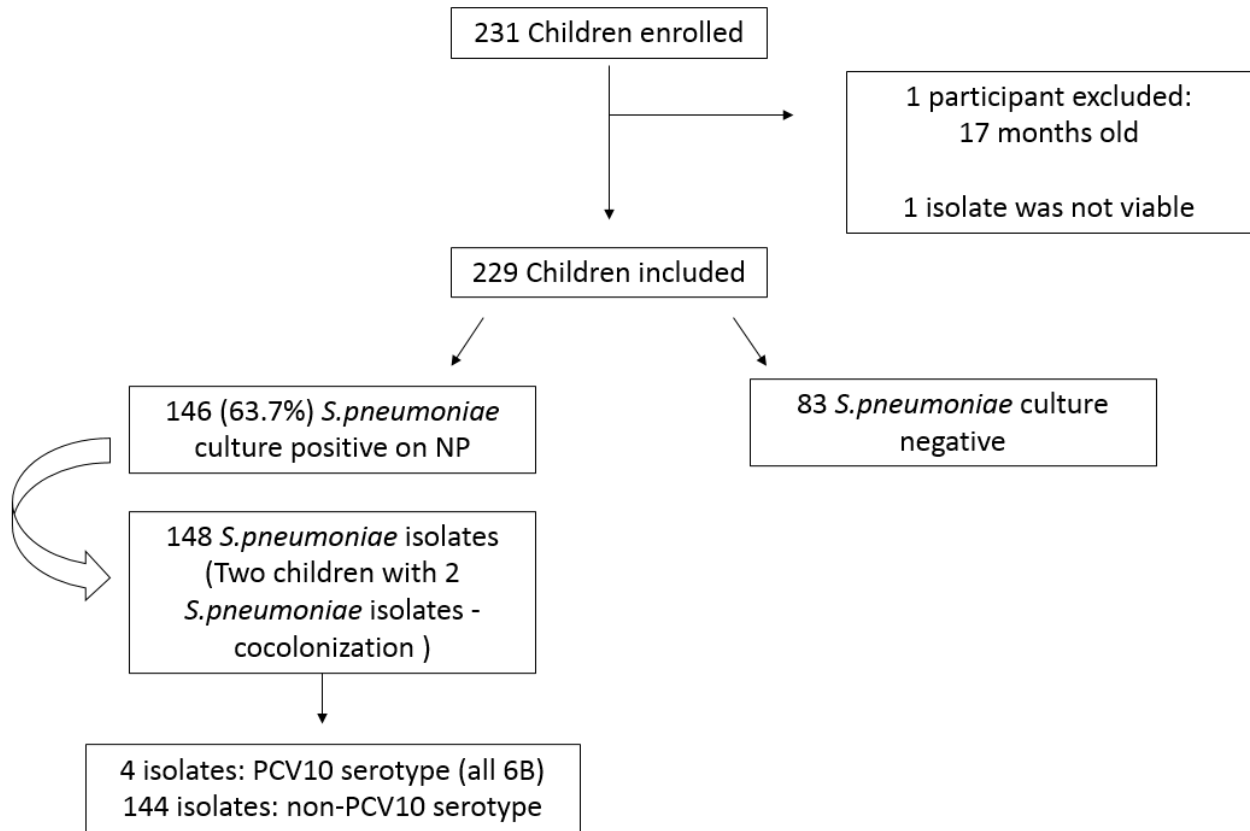
609

610

611

612





614 **Figure 1:** Children 18 to 59 months of age flow diagram

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630 **Table 1:** Pneumococcal serotypes detected in children (n=148 isolates) and elderly  
 631 (n=19 isolates)

632

Serotype	Number of isolates		
	Children	Elderly	Total
PCV10 vaccine type			
6B	4	-	4
PCV13 vaccine type			
3	3	2	5
6A	28	1	29
19A	27	6	33
Non-PCV types			
13	2	-	2
34	2	-	2
37	1	-	1
6C	9	1	10
9N	-	1	1
10A	3	-	3
11A	3	1	4
15A	7	-	7
15B	3	-	3
15C	9	-	9
16F	2	1	3
22F	6	1	7
23A	24	-	24
23B	8	-	8
28A	1	2	3
31	-	1	1
35B	1	-	1
Non-typeable	5	2	7
<b>Total</b>	<b>148</b>	<b>19</b>	<b>167</b>

633

634

635

636

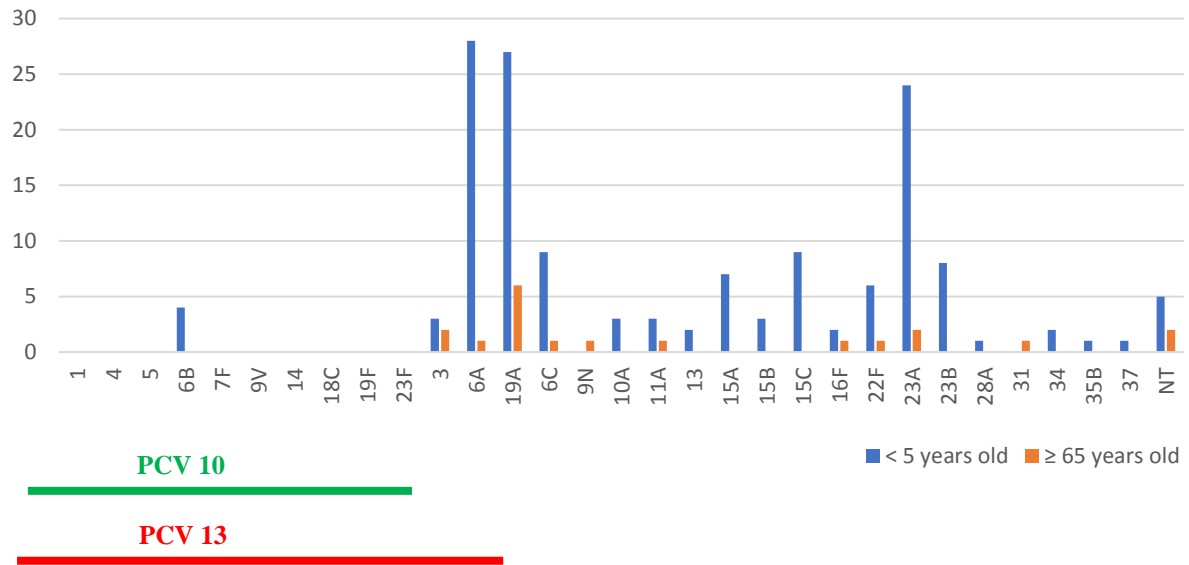
637

638

639

640

641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670



**Figure 2:** Serotype distribution of pneumococcal carriage isolates between children (< 5 years old) and elderly (≥ 65 years old) \*.

671 **Table 2:** Characteristics among 229 children (18-59 months of age) investigated for carriage in  
672 the South of Brazil.

	<b>Non-carriers (83 individuals)</b>	<b>Carriers (146 individuals)</b>	<b>Total (229 individuals)</b>	<i>p</i> value
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
<b>Sex</b>				
Male	34 (41.0)	81 (55.5)	115 (50.2)	<b>0.03</b>
Female	49 (59.0)	65 (44.5)	114 (49.8)	
<b>Age</b>				
18-23 months	19 (19.3)	26 (17.8)	42 (18.3)	0.84
24-35 months	26 (31.3)	40 (27.4)	66 (28.8)	
36-47 months	19 (22.9)	43 (29.5)	62 (27.1)	
48-59 months	22 (26.5)	37 (25.3)	59 (25.8)	
<b>Self-report ethnicity</b>				
White	77 (92.8)	135 (92.5)	212 (92.6)	0.61
Black	1 (1.2)	1 (0.7)	2 (0.9)	
Mixed race	4 (4.8)	9 (6.2)	13 (5.7)	
Yellow/Indian	0	1 (.7)	1 (0.4)	
Doesn't know	1 (1.2)	0	1 (0.4)	
<b>Any chronic conditions</b>				
Asthma	6 (7.2)	7 (4.8)	13 (5.7)	0.44
Diabetes	0	0	0	-
Kidney Disease	1 (1.2)	1 (0.7)	2 (0.9)	0.68
Heart Disease	1 (1.2)	0	1 (0.4)	0.18
Liver Disease	0	1 (0.7)	1 (0.4)	0.45
Cystic Fibrosis	0	0	0	-
Sickle cell Anemia	0	2 (1.4)	2 (0.9)	0.73
Cancer	0	0	0	-
<b>Any illness symptoms at the interview</b>				
Cough	30 (36.1)	50 (34.2)	80 (34.9)	0.77
Nasal congestion/coryza	27 (32.5)	80 (54.8)	107 (46.7)	<b>&lt; 0.01</b>
Fever	1 (1.2)	0	1 (0.4)	0.77
Sore throat	2 (2.4)	3 (2.1)	5 (2.2)	0.86
<b>Any illness symptoms in prior two weeks</b>				
Cough	42 (50.1)	67 (45.9)	109 (47.6)	0.58
Nasal congestion/coryza	41 (49.4)	90 (61.6)	131 (57.2)	0.07
Fever	12 (13.3)	17 (11.6)	29 (12.7)	0.53
Sore throat	14 (16.9)	26 (17.8)	40 (17.5)	0.85
<b>Hospitalization in the past 3 months</b>				
	1 (1.2)	2 (1.4)	3 (1.3)	0.91

<b>Immunosuppressive treatments</b>	9 (10.8)	17 (11.6)	26 (11.4)	0.85
<b>Antibiotic use in the last 3 weeks</b>	20 (24.1)	31 (21.2)	51 (22.3)	0.61
<b>Received PCV10 vaccine*</b>	7 (94.0)	142 (97.3)	220 (96.1)	
<b>Received PCV13 vaccine*</b>	9 (10.8)	8 (5.5)	17 (7.4)	
<b>History of breastfeeding</b>				
Yes	78 (94.0)	137 (93.8)	215 (93.9)	
No	4 (4.8)	9 (6.2)	13 (5.7)	0.38
Does not know/not sure	1 (1.2)	0	1 (0.4)	
<b>School or daycare attendance</b>	72 (86.7)	140 (95.9)	212 (92.6)	<b>0.01</b>
<b>Number of individuals living in the household (including the participant)</b>				
2	2 (2.4)	8 (5.5)	10 (4.4)	
3	41 (49.4)	57 (39.0)	98 (42.8)	
4	26 (31.3)	56 (38.4)	82 (35.8)	
5	10 (12.0)	17 (11.6)	27 (11.8)	0.62
6	2 (2.4)	4 (2.7)	6 (2.6)	
7	0	2 (1.4)	2 (0.9)	
8	1(1.2)	2 (1.4)	3 (1.3)	
Not available	1(1.2)	0	1 (0.4)	
<b>Children less than 5 years old that live in the same household (including the participant)</b>				
1	68	128	196	
2	14	16	30	0.41
3	1	1	2	
Not available	0	1	1	
<b>Numbers of individuals that sleep in the same bedroom of the participant</b>				
0	21 (25.3)	45 (30.1)	66 (28.8)	
1	18 (21.7)	40 (27.4)	58 (25.3)	
2	34 (41.0)	43 (29.4)	77 (33.6)	0.34
3	10 (12.0)	16 (11.0)	26 (11.4)	
4	0	2 (1.4)	2 (0.9)	
<b>Number of children less than 5 years old that sleep in the same bedroom of the participant</b>				
0	72 (86.7)	132 (90.4)	204 (89.1)	
1	10 (12.0)	14 (9.6)	24 (10.5)	0.34
2	1 (1.2)	0	1 (0.4)	

<b>Family has a member that smokes</b>	18 (21.7)	28 (19.2)	46 (20.1)	0.64
--	-----------	-----------	-----------	------

673 \*Eight children received both PCV10 and PCV13

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

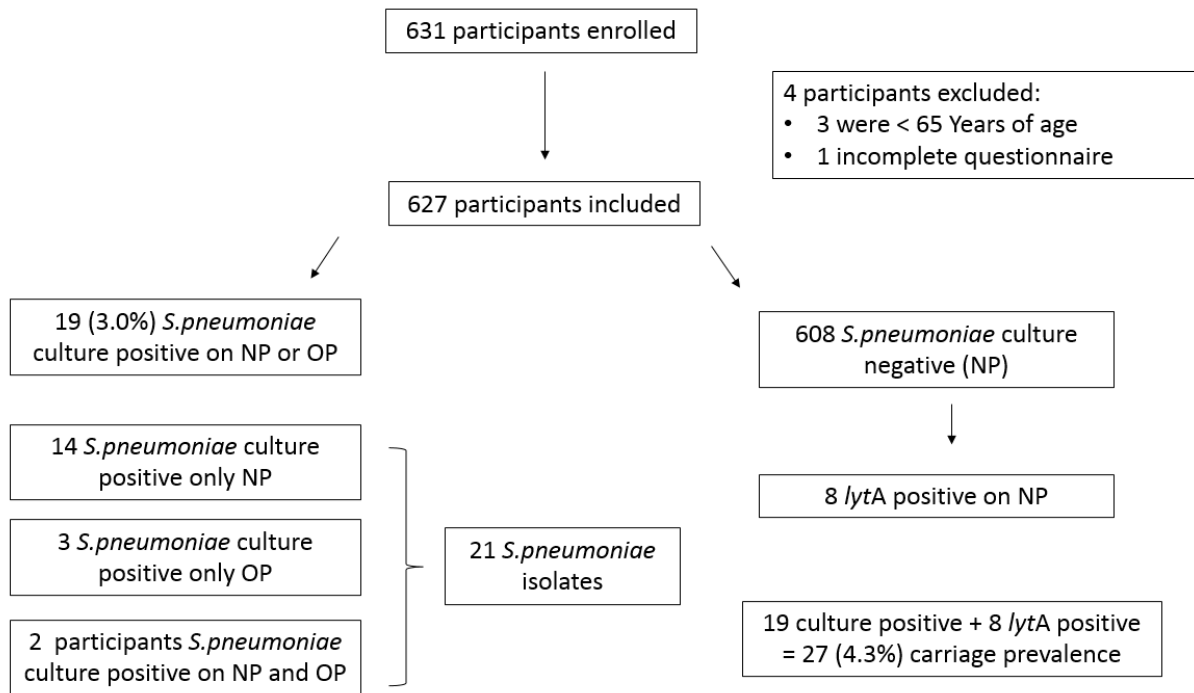
691

692

693

694

695



696

697 **Figure 3:** Elderly ( $\geq 65$  years old) flow diagram

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717 **Table 3.** Characteristics among 627 adults ( $\geq 65$  years of age) investigated for  
 718 pneumococcal carriage in the South of Brazil.

719

	<b>Non-carriers (608 individuals) n (%)</b>	<b>Carriers (19 individuals) n (%)</b>	<b>Total (627 individuals) n (%)</b>	<b>p value</b>
<b>Sex</b>				
Male	258 (42.4)	6 (31.6)	264 (42.1)	0.34
Female	350 (57.6)	13 (68.4)	363 (57.9)	
<b>Age</b>				
65-75	466 (76.6)	11 (57.9)	477 (76.1)	0.66
76-86	130 (21.4)	7 (36.8)	137 (21.8)	0.23
> 86	12 (2.0)	1 (5.3)	13 (2.1)	0.78
<b>Self-report ethnicity</b>				
White	595 (97.8)	19 (100)	614 (97.9)	0.93
Black	1 (0.2)	0	1 (0.2)	
Mixed	11 (1.8)	0	11 (1.7)	
Does not know	1 (0.2)	0	1 (0.2)	
<b>Self-reported residence type</b>				
Private	601 (98.8)	18 (94.7)	619 (98.7)	0.59
Other	7 (1.2)	1 (5.3)	8 (1.3)	
<b>Number of individuals living in the household (including the participant)</b>				
1	102 (16.8)	4 (21.0)	106 (17.0)	0.97
2	301 (49.5)	8 (42.1)	309 (49.5)	
3	116 (19.1)	5 (23.3)	121 (19.4)	
4	42 (6.9)	1 (5.3)	43 (6.9)	
5	24 (3.9)	1(5.3)	25 (4.0)	
6	16 (2.6)	0	16 (2.6)	
7	2 (0.3)	0	2 (0.3)	
8	2 (0.3)	0	2 (0.3)	
Not available	3 (0.5)	0	3 (0.5)	
<b>Children aged &lt; 5 years living in house</b>	31 (5.1)	2 (10.5)	33 (5.3)	
<b>Smoker</b>	19 (3.1)	2 (10.5)	21 (3.3)	0.26
<b>Live with smoker</b>	34 (5.6)	1 (5.3)	35 (5.6)	0.92
<b>Attends activity center for seniors</b>	239 (39.3)	6 (31.6)	245 (39.1)	0.66
<b>Health Plan</b>				
Private	51 (8.4)	3 (15.8)	54 (8.6)	0.39
Health Insurance	325 (53.5)	9 (47.4)	334 (53.3)	



SUS (Public Healthcare)	218 (35.8)	6 (31.5)	224 (35.7)	
Does not know	7 (1.2)	1 (5.3)	8 (1.3)	
Other	7 (1.2)	0	7 (1.1)	
<b>Vaccination (PPV-23 + PCV10 or PCV13)</b>	25 (4.1)	2 (10.5)	27 (4.3)	0.17
<b>Any chronic conditions</b>				
Asthma	28 (4.6)	3 (15.8)	31 (4.9)	<b>0.02</b>
Atherosclerotic Cardiovascular Disease	110 (18.1)	5 (26.3)	115 (18.3)	0.36
Stroke	33 (5.4)	1 (5.3)	34 (5.4)	0.97
Cirrhosis / Liver Failure	10 (1.6)	0	10 (1.6)	0.57
Diabetes Mellitus	92 (15.4)	4 (21.1)	96 (15.3)	0.48
Emphysema/ COPD*	19 (7.1)	1 (5.3)	20 (3.2)	0.60
Cardiac Insufficiency	103 (19.9)	3 (15.9)	106 (16.9)	0.89
Chronic Kidney Disease	19 (3.1)	1 (5.3)	20 (3.2)	0.60
<b>Pneumonia in the last 30 days</b>	0	0	0	1.0
<b>Influenza in the last 30 days</b>	27 (4.4)	1 (5.3)	28 (4.5)	0.86
<b>Any illness symptoms at the interview</b>				
Cough	99 (16.9)	4 (21.1)	102 (16.1)	0.58
Nasal congestion/coryza	138 (22.5)	3 (15.8)	140 (22.3)	0.48
Fever	0	0	0	1.0
Sore throat	28 (4.6)	0	28 (4.5)	0.33
<b>Any illness symptoms in prior two weeks</b>				
Cough	158 (26.0)	7 (36.8)	165 (26.3)	0.28
Nasal congestion/coryza	186 (30.1)	6 (31.6)	192 (30.6)	0.92
Fever	17 (2.8)	0	17 (2.7)	0.98
Sore throat	76 (12.5)	2 (10.5)	78 (12.4)	0.79
<b>Antibiotic use in the last 3 weeks</b>	44 (7.2)	1 (5.3)	43 (6.9)	0.74

720 \* COPD: Chronic obstructive pulmonary disease

721

722

723

724 **Table 4:** Antimicrobial susceptibility profile of 166\* *S. pneumoniae* detected by culture  
 725 method, 33 isolates serotype 19A and 133 isolates other serotypes.

726

	Isolates belonging to serotype 19A (n=33)			Other serotypes (n=133)			Total (n=166)		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
Penicillin parenteral (meningitis)	-	-	33 (100)	52 (39.1)	-	81 (60.9)	52 (31.3)	-	114 (68.7)
Penicillin parenteral (nonmeningitis)	2 (6.1)	26 (78.8)	5 (15.1)	126 (94.7)	6 (4.5)	1 (0.8)	128 (77.1)	32 (19.3)	6 (3.6)
Penicillin (oral Penicilin V)	-	-	33 (100)	52 (39.1)	73 (54.9)	8 (6.0)	52 (31.3)	73 (44.0)	41 (24.7)
Amoxicillin-clavulanate	2 (6.1)	4 (12.1)	27 (81.8)	125 (94.0)	-	8 (6.0)	127 (76.5)	4 (2.5)	35 (21.0)
Cefuroxime (parenteral)	-	-	33 (100)	113 (85.0)	11 (8.3)	9 (6.7)	113 (68.1)	11 (6.6)	42 (25.3)
Cefuroxime (oral)	-	-	33 (100)	124 (93.2)	1 (0.8)	8 (6.0)	124 (74.7)	1 (0.6)	41 (24.7)
Ceftriaxone (meningitis)	-	4 (12.1)	29 (87.9)	126 (94.7)	1 (0.8)	6 (4.5)	126 (75.9)	5 (3.0)	35 (21.1)
Ceftriaxone (nonmeningitis)	4 (12.1)	29 (87.9)	-	127 (95.5)	6 (4.5)	-	131 (79.0)	35 (21.0)	-
Cefotaxime (meningitis)	1 (3.0)	7 (21.2)	25 (75.8)	127 (95.5)	3 (2.25)	3 (2.25)	128 (77.1)	10 (6.0)	28 (16.9)
Cefotaxime (nonmeningitis)	8 (24.2)	25 (75.8)	-	130 (97.7)	3 (2.3)	-	138 (83.1)	28 (16.9)	-
Cefepime (meningitis)	-	4 (12.1)	29 (87.9)	125 (94.0)	4 (3.0)	4 (3.0)	125 (75.3)	8 (4.8)	33 (19.9)
Cefepime (nonmeningitis)	4 (12.1)	27 (81.8)	2 (6.1)	129 (97.0)	4 (3.0)	-	133 (80.1)	31 (18.7)	2 (1.2)
Ertapenem	19 (57.6)	13 (39.4)	1 (3.0)	131 (98.5)	2 (1.5)	-	150 (90.4)	15 (9.0)	1 (0.6)
Meropenem	-	2 (6.1)	31 (93.9)	123 (92.5)	3 (2.3)	7 (5.2)	123 (74.1)	5 (3.0)	38 (22.9)
Azithromycin	-	-	33 (100)	65 (48.9)	1 (0.8)	67 (50.3)	65 (39.2)	1 (0.6)	100 (60.2)
Erythromycin	-	-	33 (100)	66 (49.6)	-	67 (50.4)	66 (39.8)	-	100 (60.2)
Clindamycin	3 (9.1)	-	30 (90.9)	88 (66.2)	-	45 (33.8)	91 (54.8)	-	75 (45.2)
Tetracycline	-	-	33 (100)	79 (59.4)	-	54 (40.6)	79 (47.6)	-	87 (52.4)
Trimethoprim-sulfamethoxazole	-	-	33 (100)	88 (66.2)	23 (17.3)	22 (16.5)	88 (53.0)	23 (13.9)	55 (33.1)
Chloramphenicol	33 (100)	-	-	130 (97.7)	-	3 (2.3)	163 (98.2)	-	3 (1.8)

727

728 S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

729 \*One sample MIC repeated and the isolate is not able to grow in the required MIC broth media

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744 **Table 5:** Serotype capsular, non-susceptibility *b*-lactams and other antibiotics

745

	Non- susceptibility (R+I) profile (n)	Capsular type (n/total)
Penicillin parenteral (nonmeningitis)	38	6A (1/29); 6B (3/4); 6C (1/10); 19A (31/33); 23A (2/24)
Amoxicillin- clavulanate	39	6A (2/29); 6B (3/4); 6C (1/10); 19A (31/33); 23A (2/24)
Cefuroxime (parenteral)	53	6A (9/29); 6B (4/4); 6C (1/10); 19A (33/33); 23A (2/24); 23B (3/8); 35B (1/1)
Ceftriaxone (nonmeningitis)	35	6A (1/29); 6B (3/4); 6C (1/10); 19A (29/33); 23A (1/24)
Cefotaxime (nonmeningitis)	28	6A (1/29); 6B (1/4); 19A (25/33); 23A (1/24)
Cefepime (nonmeningitis)	33	6A (1/29); 6B (1/4); 19A (29/33); 23A (2/24)
Ertapenem	16	6A (1/29); 11A (1/4); 19A (14/33)
Meropenem	43	6A (1/29); 6B (1/4); 6C (1/10); 11A (1/4); 19A (33/33); 23A (2/24); 35B (1/1)
Azithromycin	101	6A (28/29); 6B (4/4); 6C (10/10); 15A (3/7); 19A (33/33); 23A (23/24)
Erythromycin	100	6A (28/29); 6B (4/4); 6C (10/10); 15A (2/7); 19A (33/33); 23A (23/24)
Clindamycin	75	6A (10/29); 6B (3/4); 6C (10/10); 19A (30/33); 23A (22/24)
Tetracycline	87	3 (3/5); 6A (11/29); 6B (3/4); 6C (10/10); 9N (1/1); 15A (1/7); 19A (33/33); 23A (24/24); 28A (1/3)
Trimethoprim- sulfamethoxazole	78	6A (2/29); 6B (3/4); 6C (1/10); 9N (1/1); 11A (4/4); 13 (2/2); 15A (7/7); 15B (3/3); 15C (6/9); 16F (2/3); 19A (33/33); 23A (3/24); 23B (8/8); 35B (1/1); NT (2/7)

746 I, intermediate; R, resistant.

747

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A vacina PCV10 vem sendo utilizada no Brasil desde 2010, sendo disponibilizada de forma gratuita por intermédio do SUS. O efeito da vacinação sobre a distribuição de sorotipos vem sendo investigado em diferentes estudos; contudo, o conhecimento acumulado é ainda imperfeito para um país como o Brasil. Especialmente entre idosos, há poucos estudos direcionados a portadores. A prevalência de colonização entre as crianças < 5 anos de idade foi de 63,7% (146/229). Já entre os idosos ( $\geq$  65 anos de idade), a prevalência foi de 3% (19/627) utilizando o método cultural. Quando associado à técnica de qPCR, com pesquisa direta do pneumococo em amostras nasofaringe, a taxa de colonização total aumentou para 4,3% (27/627) entre os idosos.
- Entre as 146 crianças colonizadas, foram observados 148 isolados de pneumococo, e duas crianças estavam co-colonizadas com sorotipos diferentes. Foram identificados 20 sorotipos de pneumococo, sendo que o mais prevalente foi o sorotipo 6A (18,9%; 28/148), seguido dos sorotipos 19A (18,2%; 27/148), 23A (16,2%; 24/148), 6C (6%; 9/148) e 15C (6%; 9/148). Todos são sorotipos não pertencentes à vacina PCV10. Apenas 4 isolados (2,7%; 4/148) pertenciam a um sorotipo vacinal, todos do sorotipo 6B. Entre os idosos, não foi detectado nenhum sorotipo da PCV10. Dos 11 sorotipos identificados, o mais prevalente foi o 19A (31,6%; 6/19).
- O sorotipo 19A apresentou a maior taxa de não suscetibilidade aos antimicrobianos. Todos os 33 isolados de pneumococo identificados entre os colonizados (crianças e idosos) foram resistentes a penicilina parenteral (*breakpoints* para meningite e administração oral), cefuroxima (*breakpoints* para administração parenteral e oral), azitromicina, eritromicina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim. A taxa de resistência a meropenem foi de 93,9%, para clindamicina foi de 90,9% e para cefepime e ceftriaxona foi de 87,9% (*breakpoints* para meningite). Excluindo-se os isolados do sorotipo 19A, a taxa de resistência a penicilina parenteral (*breakpoints* para meningite) diminuiu para 60,9%, cefuroxima para 6,7% (*breakpoints* para administração parenteral), azitromicina para 50,3%, eritromicina para 50,4%, tetraciclina para 40,6% e sulfametoxazol-trimetoprim para 16,5%. Entre os outros sorotipos que mais apresentaram não susceptibilidade a antimicrobianos, destacam-se o sorogrupo 6 e o sorotipo 23A.

- No período pós-PCV10, verificou-se aumento do sorotipo não vacinal 19A entre isolados provenientes de DPI, principalmente no ano de 2014. A prevalência aumentou de 3,5% (2008-2010) para 8,1% (2011-2014). Devido a características bem estabelecidas desse sorotipo, a não suscetibilidade aos antimicrobianos conseqüentemente aumentou no período após a PCV10. A colonização é um pré-requisito para o desenvolvimento da doença invasiva, sendo importante conhecer os sorotipos que estão circulando na população saudável para entender a relação entre colonização e doença pneumocócica, tanto em crianças (consideradas o reservatório de pneumococo) quanto em idosos – os dois grupos mais acometidos pela doença pneumocócica. O sorotipo mais prevalente entre os indivíduos colonizados (crianças e idosos) foi o sorotipo 19A (19,7%; 33/167), que também apresentou perfil de resistência mais elevado a antimicrobianos quando comparado aos outros sorotipos identificados.
- Antes da introdução da vacina, existiam isolados do sorotipo 19A causando doença pneumocócica, com perfil mais sensível e maior diversidade genética. Entretanto, após a vacinação, houve aumento do sorotipo 19A, juntamente à seleção clonal do CC 320 (63,9%; 23/36), especialmente a ST320, que apresenta como característica a resistência a antimicrobianos.
- Entre as crianças colonizadas, os fatores associados à colonização foram: ser do sexo masculino; apresentar no dia da coleta do *swab* da nasofaringe coriza/congestão nasal; e frequentar a creche. Já entre os idosos, o único fator associado à colonização foi apresentar asma, uma condição respiratória crônica.
- Entre os idosos, por meio do método cultural para a pesquisa de portadores, foram identificados 19 indivíduos colonizados. A maioria dos isolados foi identificada a partir do *swab* de nasofaringe, em 14 amostras das 19 identificadas (73,7%). Em apenas 3 indivíduos, foi identificado o pneumococo a partir da cultura do *swab* de orofaringe. Em 2 indivíduos, os *swabs* de nasofaringe e orofaringe foram positivos para o isolamento bacteriano.
- Mesmo com a vacinação, a doença pneumocócica permanece como um importante motivo de preocupação, seja pela emergência de sorotipos não vacinais, seja pela

resistência a antimicrobianos. Os produtos desta tese oferecem melhor compreensão sobre a distribuição de sorotipos no período pós-vacina e podem contribuir para avanços nas políticas públicas de vacinação.

## **7 ANEXOS**

### **7.1 Aprovação do comitê de ética em pesquisa da UFCSPA**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Portadores de Streptococcus pneumoniae entre idosos e crianças: avaliação do efeito da vacina conjugada 10-valente

**Pesquisador:** EMILIO MORIGUCHI

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 66184117.5.3001.5345

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.176.785

**Apresentação do Projeto:**

O projeto submetido é uma versão corrigida do projeto apresentado ao CEP da instituição proponente. Conforme verificou-se na carta-resposta, os ajustes solicitados por aquele CEP foram atendidos. No entanto, não se considera necessário que o projeto seja submetido também ao CEP da UFCSPA, instituição co-participante.

**Objetivo da Pesquisa:**

Os objetivos são coerentes ao que o projeto se propõe.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos e benefícios descritos no projeto e nos termos de apresentação obrigatória estão adequados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Chama a atenção que o projeto submetido à apreciação deste CEP já foi apresentado à instituição proponente, UFRGS, e inclui resposta ao parecer emitido pelo CEP dessa instituição. Não há necessidade de o projeto passar por dois CEPs; a aprovação do CEP de apenas uma instituição é suficiente.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A redação de ambos os TCLs foi ajustada conforme solicitado anteriormente. Contudo, uma

**Endereço:** Rua Sarmento Leite ,245

**Bairro:** Sarmento

**UF:** RS

**Telefone:** (51)3303-8804

**CEP:** 90.050-170

**Município:** PORTO ALEGRE

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br



Continuação do Parecer: 2.176.785

revisão textual deve ser feita para evitar eventuais ambiguidades. Por exemplo: O TCLE dirigido aos responsáveis deve ter a redação revisada em "A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o número de adultos e crianças que carregam na garganta e/ou no nariz (nasofaringe/orofaringe) a bactéria *Streptococcus pneumoniae*. Mas as crianças que vão participar desta pesquisa apenas irão coletar material do nariz." (Nesse caso, pode-se dizer de maneira mais objetiva, e em uma sentença, que só se coletará o material do nariz da criança.) Outro caso de necessidade de revisão ocorre em "Se ocorrer sangramento, a coleta será suspensa, apenas uma única tentativa será realizada. Mas se estes sintomas ocorrem durante a coleta eles são passageiros, mas mesmo assim haverá suporte enquanto os sintomas persistirem." (excluir "MAS SE" no início da segunda frase).

**Recomendações:**

- Recomenda-se que o projeto seja submetido apenas ao CEP (através de emenda) cujo pesquisador responsável faz parte.
- Ajustar a redação dos TCLEs para evitar ambiguidades.
- Incluir nas informações básicas do projeto o nome do orientador da aluna. O atual pesquisador responsável não faz parte da instituição da qual a aluna está vinculada.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Como a nova versão do projeto submetido ao CEP da UFRGS atende às solicitações feitas, e verificando-se que não há mais novas alterações a serem realizadas, não há pendências que comprometam o prosseguimento do projeto. No entanto, recomenda-se que os ajustes nos TCLEs, de cunho textual, sejam feitos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

De acordo com o parecer do Relator.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_853064.pdf	18/05/2017 12:06:58		Aceito
Outros	CRONOGRAMA_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 12:05:40	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	ORCAMENTO_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 11:59:26	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	termo_de_anuencia_responsavel.pdf	18/05/2017 11:57:51	Mariana Preussler Mott	Aceito

**Endereço:** Rua Sarmento Leite ,245

**Bairro:** Sarmento

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3303-8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 2.176.785

Outros	TERMO_RELATORIO_PARCIAL_E_FIN AL.pdf	18/05/2017 11:57:12	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	FLUXOGRAMA_DAS_COLETAS_E_PR OCEDIMENTO_DOS_SWABS.pdf	18/05/2017 11:54:11	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Carta_ao_CEP_lista_de_pendencias.pdf	18/05/2017 11:52:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	DOCUMENTO_COLABORACAO_ESTR ANGEIRA.pdf	18/05/2017 11:50:39	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsaveis_Legais.pdf	18/05/2017 11:49:53	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_crianças.pdf	18/05/2017 11:49:31	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_adultos.pdf	18/05/2017 11:46:34	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_triagem_adultos.pdf	18/05/2017 11:45:49	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Adultos.pdf	18/05/2017 11:44:52	Mariana Preussler Mott	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_PROJETO.pdf	18/05/2017 11:36:21	Mariana Preussler Mott	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_853064.pdf	23/03/2017 21:09:08		Aceito
Outros	QUESTIONARIO_CRIANCAS.pdf	23/03/2017 21:07:07	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	QUESTIONARIO_ADULTOS.pdf	23/03/2017 21:06:32	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	QUESTIONARIO_TRIAGEM_ADULTOS .pdf	23/03/2017 21:06:07	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_RESPONSAVEIS_LEGAI S_CRIANCAS.pdf	23/03/2017 21:05:36	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ADULTOS.pdf	23/03/2017 21:05:23	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_MATERIAL_BIO LOGICO.pdf	23/03/2017 21:05:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_DADOS.pdf	23/03/2017 21:04:36	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	FORMULARIO_DELEGACAO_FUNCO ES.pdf	23/03/2017 21:04:09	Mariana Preussler Mott	Aceito

**Endereço:** Rua Sarmento Leite ,245

**Bairro:** Sarmento

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3303-8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.176.785

Orçamento	ORCAMENTO.pdf	23/03/2017 21:03:21	Mariana Preussler Mott	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	23/03/2017 21:02:16	Mariana Preussler Mott	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA.pdf	23/03/2017 21:01:58	Mariana Preussler Mott	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_853064.pdf	25/01/2017 17:32:35		Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	12/01/2017 11:10:06	EMILIO MORIGUCHI	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 18 de Julho de 2017

---

**Assinado por:**

**Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima  
(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Sarmento Leite ,245

**Bairro:** Sarmento

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3303-8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

## **7.2 Aprovação do comitê de ética em pesquisa do HCPA**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Portadores de Streptococcus pneumoniae entre idosos e crianças: avaliação do efeito da vacina conjugada 10-valente

**Pesquisador:** EMILIO MORIGUCHI

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 66184117.5.0000.5327

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.106.235

**Apresentação do Projeto:**

As infecções por Streptococcus pneumoniae são um problema de saúde pública em todo o mundo, acometendo principalmente os extremos das idades, como crianças e idosos. Com o intuito de controlar a doença pneumocócica várias formulações da vacina contra o pneumococo foram desenvolvidas. O Brasil, em 2010, introduziu a vacina pneumocócica conjugada 10 valente (PCV-10) em seu calendário de vacinação, sendo disponibilizada para crianças menores de 2 anos de idade. Essa vacina tem se demonstrado efetiva na prevenção de doenças invasivas causadas pelos sorotipos vacinais entre as crianças. No entanto, um estudo conduzido no Rio Grande do Sul, a partir de doenças pneumocócica invasiva (DPI), evidenciou um aumento do sorotipo 19A entre os adultos, tornando o manejo das infecções um problema, pois este sorotipo está associado à resistência aos antimicrobianos. O sorotipo 19A não está incluído na formulação da vacina PCV-10, mas está na PCV-13. Este aumento observado de DPI entre os adultos pelo sorotipo 19A pode incluir a falta de proteção cruzada entre o sorotipo 19F presente na PCV-10 e o sorotipo 19A, ou devido à circulação do sorotipo 19A em crianças não imunizadas levando à transmissão para adultos. Vale ressaltar que o S. pneumoniae reside na superfície da mucosa do trato respiratório superior como colonizador assintomático, sendo que a colonização é o passo inicial para o processo infeccioso. Assim a melhor compreensão dos sorotipos que estão circulando na

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

**Bairro:** Bom Fim

**CEP:** 90.035-903

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3359-7640

**Fax:** (51)3359-7640

**E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.106.235

nasofaringe/orofaringe de crianças e adultos poderá informar a política de imunização infantil e adulta no Brasil, para entender o efeito da imunoprevenção sobre a distribuição dos sorotipos e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. No Brasil, as vacinas para prevenção de doença pneumocócica são usadas de maneira limitada em adultos e o presente estudo visa determinar a prevalência de colonização pneumocócica entre adultos e em crianças, avaliar fatores de risco para colonização e distinguir o efeito direto da vacina em crianças do efeito indireto (imunidade de rebanho) sobre a colonização em adultos. Serão coletados swabs da nasofaringe de crianças e swabs de nasofaringe e orofaringe de adultos com idade 65 anos. Resultados deste estudo serão importantes para compreender melhor o aumento da prevalência do sorotipo 19A entre os adultos, já que não existe estudo de portadores com esta população no Brasil.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Definir a prevalência de portadores de *Streptococcus pneumoniae* e distribuição de sorotipos em crianças entre 18 e 59 meses de idade e adultos com idade 65 anos.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar os fatores de risco para colonização por *S. pneumoniae* com ênfase no sorotipo 19A;
2. Fornecer as bases para a introdução da vacina pneumocócica conjugada para prevenção de doença pneumocócica em idosos no Brasil e monitorar o efeito da introdução de PCV10 em crianças de sorotipos não vacinais que causam doença invasiva, como por exemplo, o sorotipo 19A;
3. Verificar a distribuição de sorotipos e padrão de resistência aos antimicrobianos;
4. Avaliar o efeito direto versus indireto da vacinação sobre a colonização; Comparar o desempenho de swab de orofaringe versus nasofaringe na taxa de portadores entre idosos.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são: a coleta pode durar aproximadamente 5 segundos e causa na maioria dos indivíduos tosse ou espirro. Mas também pode ocorrer engasgamento, mais raramente vômito e sangramento que cessa em poucos minutos. Se o paciente apresentar sangramento, engasgue ou vômito, a coleta será suspensa, apenas uma única tentativa será realizada. Mas se estes sintomas ocorrem durante a coleta os sintomas são passageiros, mesmo assim o paciente receberá suporte enquanto os sintomas persistirem. Todas as coletas serão realizadas por membro treinado da equipe do estudo. As coletas serão realizadas para minimizar os riscos e desconfortos.

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

**Bairro:** Bom Fim

**CEP:** 90.035-903

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3359-7640

**Fax:** (51)3359-7640

**E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.106.235

**Benefícios:**

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são apenas indireto, ou seja, não haverá qualquer benefício pessoal direto por fazer parte da pesquisa. No entanto, os resultados deste estudo podem levar à melhoria no cuidado da população como um todo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo transversal com relevante questão de pesquisa epidemiológica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta TCLE.

**Recomendações:**

Nada a recomendar.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências emitidas para o projeto no parecer 2.010.134 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 18/05/2017. Não apresenta novas pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto e TCLEs de 18/05/2017 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto. Para que possa ser realizado o mesmo deve estar cadastrado no sistema WebGPPG em razão das questões logísticas e financeiras.

O projeto somente poderá ser iniciado após aprovação final da Comissão Científica, através do Sistema WebGPPG.

Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.

A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

**Bairro:** Bom Fim

**CEP:** 90.035-903

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3359-7640

**Fax:** (51)3359-7640

**E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL**



Continuação do Parecer: 2.106.235

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_853064.pdf	18/05/2017 12:06:58		Aceito
Outros	CRONOGRAMA_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 12:05:40	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	ORCAMENTO_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 11:59:26	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	termo_de_anuencia_responsavel.pdf	18/05/2017 11:57:51	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_RELATORIO_PARCIAL_E_FINAL.pdf	18/05/2017 11:57:12	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	FLUXOGRAMA_DAS_COLETAS_E_PROCEDIMENTO_DOS_SWABS.pdf	18/05/2017 11:54:11	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Carta_ao_CEP_lista_de_pendencias.pdf	18/05/2017 11:52:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	DOCUMENTO_COLABORACAO_ESTRANGEIRA.pdf	18/05/2017 11:50:39	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsaveis_Legais.pdf	18/05/2017 11:49:53	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_crianças.pdf	18/05/2017 11:49:31	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_adultos.pdf	18/05/2017 11:46:34	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_triagem_adultos.pdf	18/05/2017 11:45:49	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Adultos.pdf	18/05/2017 11:44:52	Mariana Preussler Mott	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_PROJETO.pdf	18/05/2017 11:36:21	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_MATERIAL_BIOLOGICO.pdf	23/03/2017 21:05:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_DADOS.pdf	23/03/2017 21:04:36	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	FORMULARIO_DELEGACAO_FUNCIONES.pdf	23/03/2017 21:04:09	Mariana Preussler Mott	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	23/03/2017 21:03:21	Mariana Preussler Mott	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	23/03/2017 21:02:16	Mariana Preussler Mott	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	12/01/2017	EMILIO MORIGUCHI	Aceito

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

**Bairro:** Bom Fim

**CEP:** 90.035-903

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3359-7640

**Fax:** (51)3359-7640

**E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br



UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.106.235

Folha de Rosto	Folha.pdf	11:10:06	EMILIO MORIGUCHI	Aceito
----------------	-----------	----------	------------------	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 07 de Junho de 2017

---

**Assinado por:**  
**Marcia Mocellin Raymundo**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

**Bairro:** Bom Fim

**CEP:** 90.035-903

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3359-7640

**Fax:** (51)3359-7640

**E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

## 7.3 Questionário – Crianças

ID DO ESTUDO

## IDENTIFICAÇÃO

1. Data da Coleta (DD-MM-AAAA): |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|
2. Iniciais do Entrevistador: \_\_\_\_\_
3. Data de Nascimento: |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|
4. Idade do participante (meses): \_\_\_\_\_ (apenas incluir crianças com idade de 18 – 59 meses)
5. Cidade onde mora: \_\_\_\_\_
6. Bairro: \_\_\_\_\_
7. Local da Coleta:  Veranópolis  Porto Alegre
8. Sexo:  Feminino  Masculino
9. Raça:  Branco  Negro  Pardo  Mulato  Amarelo/Índio  Não Sabe

## INFORMAÇÃO CLÍNICA

10. A criança tem algumas destas condições?

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Asma              | <input type="checkbox"/> Doença no Fígado  |
| <input type="checkbox"/> Diabetes          | <input type="checkbox"/> Fibrose Cística   |
| <input type="checkbox"/> Doença nos Rins   | <input type="checkbox"/> Anemia Falciforme |
| <input type="checkbox"/> Doença no Coração | <input type="checkbox"/> Câncer            |

11. A criança fez algum tratamento com imunossupressores nos últimos 6 meses?

- Sim  Não

11.a) **Se sim**, com qual medicamento?

- Esteroides  Quimioterapia  Radioterapia

12. A criança tem ou teve alguns dos seguintes sintomas?

- |   | Hoje?                        |                              |                                   | A duas semanas atrás?        |                              |                                   |
|---|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| a) Tosse                                | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | <input type="checkbox"/> Não sabe | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | <input type="checkbox"/> Não sabe |
| b) Congestão nasal/<br>Nariz escorrendo | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | <input type="checkbox"/> Não sabe | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | <input type="checkbox"/> Não sabe |
| c) Febre                                | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | <input type="checkbox"/> Não sabe | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | <input type="checkbox"/> Não sabe |
| d) Dor de Garganta                      | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | <input type="checkbox"/> Não sabe | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | <input type="checkbox"/> Não sabe |

13. A criança esteve internada nos últimos 3 meses?

Sim       Não       Não sabe

13.a) **Se sim**, quantas vezes esteve internada nos últimos 3 meses?

1 vez       2 vezes       >3 vezes

13. b) Se já esteve internada, indicar a(s) causa(s) do último internamento:

Infecção Respiratória Aguda ou Pneumonia       Otite  
 Bacteremia/Sepse       Meningite  
 Diarréia  
 Outra causa (especifique): \_\_\_\_\_

14. A criança fez tratamento com antibiótico nas últimas 3 semanas?       Sim       Não

14.a) **Se sim**, qual(is) antibiótico(s)?

<input type="checkbox"/> Amoxicilina	<input type="checkbox"/> Doxiciclina
<input type="checkbox"/> Amoxicilina/Ác. Clavulânico	<input type="checkbox"/> Eritromicina
<input type="checkbox"/> Ampicilina/ Sulbactam	<input type="checkbox"/> Eritromicina/Sulfa
<input type="checkbox"/> Azitromicina	<input type="checkbox"/> Fosfomicina
<input type="checkbox"/> Cefaclor	<input type="checkbox"/> Levofloxacina
<input type="checkbox"/> Cefadroxil	<input type="checkbox"/> Metronidazol
<input type="checkbox"/> Cefuroxima	<input type="checkbox"/> Meropenem
<input type="checkbox"/> Cefalexina	<input type="checkbox"/> Norfloxacina
<input type="checkbox"/> Ciprofloxacina	<input type="checkbox"/> Ofloxacina
<input type="checkbox"/> Claritromicina	<input type="checkbox"/> Penicilina
<input type="checkbox"/> Clindamicina	<input type="checkbox"/> Tetraciclina
	<input type="checkbox"/> Trimetropim/ Sulfa
	<input type="checkbox"/> Vancomicina
	<input type="checkbox"/> Outros antibióticos: _____
	<input type="checkbox"/> Não sabe/Não tem certeza

#### INFORMAÇÃO SOBRE O ESTADO DE VACINAÇÃO

14. Você trouxe a carteira de vacinação da criança?       Sim       Não

14. a) **Se não**, podemos entrar em contato para pegar uma cópia?  Sim  Não

14. b) **Se sim**, qual o contato?

Nome \_\_\_\_\_

Telefone \_\_\_\_\_

15. A criança recebeu a vacina anti-pneumocócica (PCV-10)?  Sim  Não

15.a) **Se sim**, quantas doses já recebeu?

1 dose  2 doses  3 doses  4 doses

15.b) Data da primeira dose da PCV-10 (DD-MM-AAAA): |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

15.c) Data da segunda dose da PCV-10 (DD-MM-AAAA): |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

15.d) Data da terceira dose da PCV-10 (DD-MM-AAAA): |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

15.e) Data do reforço da PCV-10 (DD-MM-AAAA): |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

16. A criança recebeu também a vacina PCV-13?  Sim  Não

16.a) **Se sim**, indicar quantas doses da PCV-13 já recebeu:

1 dose  2 doses  3 doses  4 doses

16.b) Data da primeira dose de PCV-13 (DD-MM-AAAA):|\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

16.c) Data da segunda dose de PCV-13(DD-MM-AAAA):|\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

16.d) Data da terceira dose de PCV-13 (DD-MM-AAAA):|\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

16.e) Data do reforço da PCV-13(DD-MM-AAAA): |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

17. Foi fotografada a carteira de vacina da criança?  Sim  Não  Não disponível

#### FACTORES SÓCIO - ECONÔMICOS E DE EXPOSIÇÃO

18. Nível da educação da mãe/responsável pela criança?

Nenhum  Ensino Fundamental Incompleto  Ensino Fundamental Completo

2º grau Incompleto  2º grau Completo  Faculdade Completa

Faculdade Incompleta  Pós-graduação Completa  Pós-graduação Incompleta

19. A criança foi amamentada no peito?  Sim  Não  Não sabe

19.a) **Se sim**, a criança está em aleitamento agora?  Sim  Não (IR PARA 19.b)

- 19.b) **Se não**, com que idade em meses desmamou? \_\_\_\_\_ meses
20. A criança vai à escolinha ou creche?  Sim  Não
21. Quantas pessoas vivem na casa (total de agregado familiar, **incluindo a criança**)? \_\_\_\_\_
22. Quantas crianças menores de 5 anos, vivem na mesma casa (**incluindo esta criança**)? \_\_\_\_\_
23. Quantas pessoas dormem junto com a criança no mesmo quarto? \_\_\_\_\_
24. Quantas crianças (<5 anos de idade) dormem no mesmo quarto com a criança que está participando do estudo? \_\_\_\_\_
25. Algum familiar da criança fuma?  Sim (IR PARA 25.a)  Não
- 25.a) **Se sim**, qual é relação do fumante com a criança que está participando do estudo:
- Pai  Mãe  Irmão  Tio/Tia  Vô/Vó  Outros: \_\_\_\_\_

## 7.4 Questionário – Adultos



### IDENTIFICAÇÃO

1. Data da Coleta (DD-MM-AAAA): |\_|\_|-|\_|\_| - |\_|\_|\_|\_|
2. Iniciais do Entrevistador: \_\_\_\_\_
3. Data de Nascimento: |\_|\_|-|\_|\_| - |\_|\_|\_|\_|
4. Idade do Participante (Anos): \_\_\_\_\_ (**apenas incluir se  $\geq 65$  anos**)
5. Cidade onde Mora: \_\_\_\_\_
6. Bairro: \_\_\_\_\_
7. Local de Coleta:  Veranópolis       Porto Alegre
8. Sexo:  Masculino       Feminino
9. Raça:  Branco       Negro       Pardo       Mulato       Amarelo/Índio       Não sabe

### FACTORES SÓCIO - ECONÔMICOS E DE EXPOSIÇÃO

10. Onde você mora/reside atualmente?
   
 Residência Privada       Casa de Repouso       Outro (especifique) \_\_\_\_\_
11. Quantas pessoas (**incluindo você**) moram com você? \_\_\_\_\_
12. Há alguma criança com menos de 5 anos de idade morando com você?
   
 Sim       Não       Não Sabe

12.a) **Se sim**, quantas crianças têm em cada grupo de idade?

\_\_\_\_ < 1 ano    \_\_\_\_ de 1 a 2 anos    \_\_\_\_ de 3 a 4 anos

13. Você é fumante?  Sim     Não     Não sabe

14. Alguém que mora ou que cuida de você, fuma quando você está presente?

Sim     Não     Não sabe

15. Você frequenta algum Centro de Convivência (Grupo de Terceira Idade)?

Sim     Não     Não sabe

15.a) **Se sim**, qual a média de ida ao Centro de Convivência?

1 vez na semana     2 vezes na semana

3 vezes ou mais na semana     diariamente

16. Você frequenta alguma “daycare” (local com supervisão)?

Sim     Não     Não sabe

16.a) **Se sim**, qual a média de frequência de ida a “daycare”?

1 vez na semana     2 vezes na semana

3 vezes ou mais na semana     diariamente

17. Qual o plano de saúde que você utiliza atualmente?

Particular     Convênio     SUS     Não sabe

Outro (especifique) \_\_\_\_\_

### INFORMAÇÃO SOBRE O ESTADO DE VACINAÇÃO

18. Você foi a alguma clínica privada para se vacinar?

Sim       Não       Não sabe

18.a) **Se sim**, qual o nome da Clínica? \_\_\_\_\_

18.b) Localização da Clínica: \_\_\_\_\_

18.c) Podemos obter seus dados de vacinação na Clínica?  Sim       Não

19. Você trouxe a sua carteira de vacinação?

Sim     Não (IR PARA PRÓXIMA QUESTÃO)     Não sabe (IR PARA A PRÓXIMA QUESTÃO)

20. Você possui a sua carteira de vacinação em casa?

Sim (IR PARA A QUESTÃO 20a e 20 b)       Não (IR PARA A QUESTÃO 20c)

Não sabe (IR PARA A QUESTÃO 20c)

20. a) **Se sim**, nós podemos entrar contato mais tarde pagar pegar uma cópia?

Sim. Telefone \_\_\_\_\_

Não

20.b) **Se sim na questão 20.a**, quando é o melhor momento para entrar em contato?

\_\_\_\_\_

20.c) **Se não**, tem alguém que poderíamos conversar sobre o seu histórico de vacinação?



Sim       Não

20.d) Se sim na questão 20.c, qual é o seu contato?

Nome \_\_\_\_\_ Telefone \_\_\_\_\_

21. Você foi vacinado com PCV?  Sim       Não

### INFORMAÇÕES CLÍNICAS

22. Você tem alguma destas doenças?

- a) Asma  Sim       Não       Não sabe
- b) Doença Cardiovascular Aterosclerótica  Sim       Não       Não sabe
- c) Acidente Vascular Cerebral ou Encefálico  Sim       Não       Não sabe
- d) Cirrose/Insuficiência Hepática  Sim       Não       Não sabe
- e) Diabetes Mellitus  Sim       Não       Não sabe
- f) Enfisema/ DPOC  Sim       Não       Não sabe
- g) Insuficiência Cardíaca  Sim       Não       Não sabe
- h) Doença Crônica dos Rins (Sem diálise)  Sim       Não       Não sabe

23. Você teve pneumonia nos últimos 30 dias?  Sim       Não       Não sabe

24. Você foi diagnosticado com influenza nos últimos 30 dias?

Sim       Não       Não sabe

25. Você tem ou teve alguns dos seguintes sintomas?

	<b>Hoje?</b>	<b>A duas semanas atrás?</b>
a) Tosse	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe
b) Congestão nasal /Nariz escorrendo	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe
c) Febre	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe
d) Dor de Garganta	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe

26. Você tomou algum antibiótico oral ou via intravenosa nas últimas 3 semanas?

Sim    Não    Não sabe

26.a) **Se sim**, qual o nome do antibiótico? (NÃO LEIA A LISTA PARA O PARTICIPANTE – VERIFIQUE TODOS QUE SE APLICAM):

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Amoxicilina                 | <input type="checkbox"/> Doxiciclina        |
| <input type="checkbox"/> Amoxicilina/Ác. Clavulânico | <input type="checkbox"/> Eritromicina       |
| <input type="checkbox"/> Ampicilina/ Sulbactam       | <input type="checkbox"/> Eritromicina/Sulfa |
| <input type="checkbox"/> Azitromicina                | <input type="checkbox"/> Fosfomicina        |
| <input type="checkbox"/> Cefaclor                    | <input type="checkbox"/> Levofloxacin       |
| <input type="checkbox"/> Cefadroxil                  | <input type="checkbox"/> Metronidazol       |
| <input type="checkbox"/> Cefuroxima                  | <input type="checkbox"/> Meropenem          |
| <input type="checkbox"/> Cefalexina                  | <input type="checkbox"/> Norfloxacin        |
| <input type="checkbox"/> Ciprofloxacina              | <input type="checkbox"/> Ofloxacin          |
| <input type="checkbox"/> Claritromicina              | <input type="checkbox"/> Penicilina         |

Clindamicina

Tetraciclina

Trimetropim/ Sulfa

Vancomicina

Outros antibióticos: \_\_\_\_\_

Não sabe/Não tem certeza



# VACCINE

The official journal of [The Edward Jenner Society](#) and [The Japanese Society for Vaccinology](#).

## AUTHOR INFORMATION PACK

### TABLE OF CONTENTS

---

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.8</b>



ISSN: 0264-410X

### DESCRIPTION

---

*Vaccine* has an open access companion journal [Vaccine: X](#).

*Vaccine* is **unique** in publishing the highest quality science across **all disciplines** relevant to the field of vaccinology - all original article submissions across basic and clinical research, vaccine manufacturing, history, public policy, behavioral science and ethics, social sciences, safety, and many other related areas are welcomed. [The submission categories](#) as given in the Guide for Authors indicate where we receive the most papers. **Papers outside these major areas are also welcome and authors are encouraged to contact us with specific questions.** We also invite authors **to submit relevant basic science and clinical reviews, methodological articles, opinion and commentary pieces, visual pieces, and letters.** Authors are required to consult the [Guide for Authors](#) as the submission guidelines are dynamic and therefore subject to change.

***The Editors retain the right to desk reject submissions without peer review when it is clear that the [Guide for Authors](#) and the [submission categories](#) have not been consulted.***

### AUDIENCE

---

Research workers, product developers, clinicians and practitioners with interests in virology, bacteriology, parasitology, mycology, immunology, genetics, biotechnology and biochemistry in the medical and veterinary fields.

### IMPACT FACTOR

---

2020: 3.641 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2021

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Current Opinion in Infectious Diseases  
Current Contents  
SIIC Data Bases  
Current AIDS Literature  
PubMed/Medline  
Embase  
Index Veterinarius  
AIDS Information  
AIDS  
Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases  
ADONIS  
BIOSIS Citation Index  
Biotechnology Abstracts  
Chemical Abstracts  
Elsevier BIOBASE  
Current Opinion in Immunology  
Focus on: Veterinary Science and Medicine  
Telegen  
Tropical Diseases Bulletin  
Veterinary Bulletin  
Virus Information Exchange Newsletter  
Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**Gregory A. Poland**, Mayo Foundation for Medical Education and Research, Rochester, United States of America  
Vaccinology, Infectious Diseases, Internal Medicine

### *Managing Editor*

**Dior Beerens**, Elsevier

### *Basis Science Reviews Editor*

**Angela Rasmussen**, Vaccine and Infectious Disease Organization International Vaccine Centre, Saskatoon, Saskatchewan, Canada  
Transcriptomics, Emerging viruses, Vaccines, Correlates of protection, Animal models

### *Clinical Reviews Editor*

**Myron J. Levin**, University of Colorado Denver School of Medicine, Aurora, Colorado, United States of America  
Clinical virology, Vaccinology, Antiviral therapy, Immune response to viral infections and, Immunesenescence

### *Associate Editors*

**Daniel M. Altmann**, Imperial College London Department of Immunology and Inflammation, London, United Kingdom

T cell, viral immunity, HLA, bacterial immunity, epitope

**Ray Borrow**, Manchester University -NHS, Public Health England, Vaccine Evaluation Unit, Manchester, United Kingdom

Conjugate vaccines, polysaccharide vaccines, meningococcal, pneumococcal

**Maria Elena Bottazzi**, Baylor College of Medicine Texas Children's Hospital Center for Vaccine Development, Houston, Texas, United States of America

Subunit vaccines, Vaccine product development, Neglected tropical diseases, Emerging infections, Microbiology, Immunology

**Anthony R. Fooks**, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom

Virology, Zoonoses, Vaccinology

**Ivan Hung**, The University of Hong Kong, Department of Medicine, Hong Kong SAR, China

Influenza, vaccine, antiviral

**Sylvia van den Hurk**, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada

Human and veterinary vaccines, viral vaccines, immunology and animal models, adjuvants

**Ken Ishii**, The University of Tokyo Institute of Medical Science Division of Vaccine Science, Minato-Ku, Japan

Vaccine Science, Adjuvant, Innate immunity, TLR, RLR, clinical trials

**Steven Jacobsen**, Kaiser Permanente Southern California, Pasadena, California, United States of America  
Epidemiology, Vaccine Safety, Health Services Research, Clinical Epidemiology

**Richard B. Kennedy**, Mayo Clinic Division of General Internal Medicine, Rochester, Minnesota, United States of America

Immunology, vaccines, systems biology, immunogenetics, transcriptomics

**Florian Krammer**, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, United States of America  
Influenza, Hemagglutinin, Neuraminidase, Stalk, Heterosubtypic Immunity

**Heidi J. Larson**, London School of Hygiene and Tropical Medicine Department of Infectious Disease Epidemiology, London, United Kingdom

Vaccine Acceptance/Hesitancy, Ethics, Policy Legislation and Digital Health

**Linda Lua**, The University of Queensland, Protein Expression Facility, Brisbane, Australia  
Biotherapeutic and vaccine technology, protein technologies, virus-like particle

**Helena Maltezos**, National Public Health Organization, Athens, Greece

Healthcare personnel vaccinations, influenza epidemiology, vaccination of pregnant women and vaccination policies

**Jennifer Clark Nelson**, Kaiser Permanente Washington Health Research Institute, Seattle, Washington, United States of America

Study Design, Biostatistical Methods, Vaccine Safety, Vaccine Effectiveness, Surveillance

**Arthur Reingold**, University of California Berkeley, Berkeley, California, United States of America  
Epidemiology; Vaccine Efficacy and Effectiveness; Vaccine Safety; Vaccine Policy

**Daniel Salmon**, Johns Hopkins University Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, United States of America

#### **Assistant Editors**

**Sapna Sadarangani**, Tan Tock Seng Hospital Institute of Infectious Diseases and Epidemiology, Singapore, Singapore

Influenza vaccine, clinical research, vaccine-preventable diseases in children and adults, travel vaccines, emerging infectious diseases

#### **Editorial Board**

**Carl R. Alving**, Laboratory of Adjuvant and Antigen Research, US Military HIV Research Program, Silver Spring, United States of America

adjuvants; liposomes; antibodies to lipids; antibodies to drugs of abuse; vaccine carriers

**Jon K. Andrus**, Pan American Health Organization, Washington, United States of America

polio eradication, rubella and CRS elimination, measles elimination, new vaccine introduction, surveillance of VPDs

**Bernard Arulanandam**, The University of Texas at San Antonio, San Antonio, United States of America

Bacterial Pathogenesis, Mucosal Immunity, Innate Immune Responses

**Robert L. Atmar**, Baylor College of Medicine Department of Molecular Virology and Microbiology, Houston, United States of America

influenza, norovirus, respiratory viruses, enteric viruses

**Ian G. Barr**, Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory, North Melbourne, Australia

Influenza, vaccines, RSV, respiratory disease, serology

**Noel Barrett**, Baxter Innovations GmbH Orth an der Donau, Orth an der Donau, Austria

Preclinical and Clinical Vaccine Development, Influenza Vaccines, Lyme Disease Vaccines, Flavivirus Vaccines, Alphavirus Vaccines

**Kenneth Beagley**, Queensland University of Technology Institute of Health and Biomedical Innovation, Brisbane, Australia

Vaccines for sexually transmitted infection, Mucosal vaccines, Transcutaneous vaccination, Development of novel adjuvants

**Martin Beer**, Friedrich-Loeffler-Institute Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald, Germany

Veterinary vaccines, especially vaccines against avian and swine influenza, pestivirus vaccines, orbivirus vaccines, and "recombinant viral vaccines", 1.Virology, especially the field of Pestiviruses (BVDV, CSFV, BDV), Influenza viruses (animal influenza A viruses), Orbiviruses (e.g. Bluetongue virus), Schmallenberg virus 2.Vaccines for viral diseases (especially "recombinant vaccines") 3.Diagnostics for viral diseases (especially "molecular diagnostics")

**Igor Belyakov**, Gaithersburg, Maryland, United States of America

mucosal vaccines, viral immunology and vaccines, HIV/SIV vaccines, adjuvant, CD8+CTL and MHC class I

**Paolo Bonanni**, University of Florence Department of Health Sciences, Firenze, Italy

Vaccination strategies, surveillance, economics, safety

**Xavier Bosch**, Catalan Institute of Oncology Cancer Epidemiology Research Programme, Barcelona, Spain  
HPV

**Prosper Boyaka**, The Ohio State University, Columbus, United States of America  
 Innate regulation of mucosal immune responses, Adjuvants and mucosal vaccines, Mucosal immunity and allergy, Microbiota

**David Briles**, The University of Alabama at Birmingham, Birmingham, United States of America  
 Streptococcus pneumoniae, virulence, host immunity, vaccines, virulence factors, mechanisms of virulence, vaccine antigens

**Alexander Bukreyev**, University of Texas Medical Branch, Galveston National Laboratory, Galveston, United States of America  
 Virus, Vaccine, Ebola, Respiratory Syncytial Virus, Pathogenesis, Antibody.

**Antonella Caputo**, University of Ferrara Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, Ferrara, Italy  
 Vaccine development, preclinical model, immune responses, nano-micro particles, viral infections

**Antonio Cassone**, University of Perugia, Perugia, Italy  
 Parasitic and Immune-mediated Diseases

**Yung-Fu Chang**, Cornell University, Ithaca, United States of America  
 Microbial pathogenesis, vaccine and adjuvant, glycoengineering vaccine, animal models, proteomics.

**Allan Cripps**, Griffith University - Gold Coast Campus, Southport, Australia  
 Mucosal immunology, lung, middle ear, gastrointestinal tract, conjugate vaccines, oral vaccines, microbiome, probiotics, immune modulation, inflammation.

**Roy Curtiss III**, University of Florida, Gainesville, United States of America  
 Biotechnology, genetics, microbiology, immunology, vaccinology

**Ron Dagan**, Soroka Medical Center, Be'er Sheva, Israel  
 Pediatric infectious diseases, Vaccines, Respiratory infections, Otitis media, Streptococcus pneumoniae disease and prevention

**Pierre van Damme**, University of Antwerp, Antwerp, Belgium  
 Epidemiology, prevention, infectious diseases

**Amanda Dempsey**, University of Colorado - Anschutz Medical Campus, Aurora, United States of America  
 Pediatrics, Immunization Delivery

**Betty Dodet**, Dodet Bioscience, Caluire et Cuire, France  
 Biology – Vaccinology – Experimental Cancerology – Public health

**Philippe Duclos**, World Health Organization Department of Immunization Vaccines and Biologicals, Genève 27, Switzerland  
 Policies and strategies, vaccine efficacy and effectiveness, vaccine safety, post-market surveillance, decision making epidemiology and modeling

**Kathryn M. Edwards**, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, United States of America  
 Pertussis disease and vaccines; Influenza vaccines; Adjuvants; Vaccine safety; Pediatric vaccines

**Barbara Ensoli**, National Institute of Health HIV and AIDS Research Center, Roma, Italy  
 Virology, Immunology

**Ian Hector Frazer**, The University of Queensland Diamantina Institute, Brisbane, Australia  
 Papillomaviruses, Oncogenic viruses, Vaccines, Viral immunology

**Tong-Ming Fu**, Sanofi Pasteur Biologics Co, Cambridge, United States of America  
 Virus, neutralization, monoclonal antibodies, adjuvants, T-cells

**Jose de la Fuente**, University of Castilla La Mancha Research Institute of Hunting Resources, Ciudad Real, Spain  
 Molecular biology, vaccinology, immunology, biotechnology, tick

**Kohtaro Fujihashi**, The University of Alabama at Birmingham, Birmingham, United States of America  
 Mucosal vaccine development, Mucosal infection and immunity, Oral tolerance, T cells and dendritic cells

**James Galen**, University of Maryland Baltimore, Baltimore, United States of America  
 Genetic engineering of bacterial protein expression systems (both chromosomal and plasmid-based), Salmonella vaccines (typhoidal and non-typhoidal), bacterial live vector-based vaccines

**Adolfo García-Sastre**, Icahn School of Medicine at Mount Sinai Department of Microbiology, New York, United States of America  
 Influenza, RNA viruses, Antivirals, vaccines, Virus-host interactions

**John W. Glasser**, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, United States of America  
 Infectious diseases, mathematical modeling, public policy

**Dan Granoff**, UCSF Benioff Children's Hospital Oakland, Oakland, United States of America  
 Meningococcal Vaccines. Factor H binding Protein

**Marie Griffin**, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, United States of America  
 Pharmacoepidemiology, Vaccine Safety, Geriatrics

**Carlos Guzman**, Helmholtz Centre for Infection Research Department of Vaccine and Applied Microbiology, Braunschweig, Germany  
 adjuvants, mucosal adjuvants, mucosal delivery, humanized mice

**Robert Hall**, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, United States of America

Cholera, *E. coli*, enteric bacteria

**Scott Halperin**, Dalhousie University, Halifax, Canada

Bacteriology, Vaccinology, Pertussis, Clinical Trials Immunization, Meningococcal Vaccine, Influenza Vaccine

**Ali Harandi**, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden

1. Vaccine adjuvants 2. mucosal immunity and vaccines 3. genital tract immunity 4. vaccine against genital herpes

**Jorma Hinkula**, Linköping University, Linköping, Sweden

Virology, Vaccines, Monoclonal antibodies, Mucosal immunity, Animal models, Antivirals

**Kiyoko Iwatsuki-Horimoto**, The University of Tokyo Institute of Medical Science, Tokyo, Japan

Influenza, Negative strand RNA virus, Molecular biology

**Lisa Jackson**, Kaiser Permanente Washington Health Research Institute, Seattle, United States of America

Influenza vaccines, pneumococcal vaccines, vaccine safety

**Rodrigo Jiménez-García**, Rey Juan Carlos University, Madrid, Spain

Influenza vaccines, pneumococcal vaccine, epidemiological studies on vaccine coverage, vaccines in high risk groups such as diabetics, COPD sufferers or heart disease sufferers.

**Mark Jit**, Public Health England, London, United Kingdom

Mathematical modelling, health economics and national decision making around vaccination programmes. Vaccine-preventable diseases I am particularly familiar with are, HPV, rotavirus, pneumococcus, influenza (seasonal and pandemic), tuberculosis and measles

**Yoshihiro Kawaoka**, University of Wisconsin at Madison, School of Veterinary Medicine; Influenza Research Inst., Dept. of Pathobiological Sciences, Madison, United States of America

influenza, ebola, COVID-19, SARS-CoV-2, Pathogenesis

**Stephen Kent**, The University of Melbourne Department of Microbiology and Immunology, Melbourne, Australia

HIV vaccines, macaques, SIV, ADCC antibodies

**Ki Hong Kim**, Pukyong National University, Busan, South Korea

Recombinant or attenuated bacterial vaccines in fish, recombinant or attenuated viral vaccines in fish, vaccines against parasitic diseases in fish, immunostimulants and adjuvants used for fish and shellfish, RNA interference-mediated protection against viral diseases in fish

**Dennis Klinman**, Frederick National Laboratory for Cancer Research, Frederick, United States of America

DNA vaccines, Antrax vaccines, TLR-based vaccine adjuvants (particularly CpG ODN), whole-cell based cancer vaccines

**Keith Klugman**, Bill and Melinda Gates Foundation, Pneumonia program, Seattle, United States of America

pneumococcal conjugate vaccine, typhoid Vi vaccine

**Eiji Konishi**, Osaka University Research Institute for Microbial Diseases, Osaka, Japan

flavivirus, mosquito-borne virus, DNA vaccine

**Thomas Lehner**, Guy's Hospital, London, United Kingdom

vaccination against HIV or SIV, the effect of stress on immunity, mechanism of immunological memory

**Margaret Liu**, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

DNA vaccines, T cell immunity, vaccines for HIV and influenza, immunotherapy, Prime boost immunization

**Pier Luigi Lopalco**, European Centre for Disease Prevention and Control, Solna, Sweden

vaccine preventable disease epidemiology, vaccine preventable disease surveillance, post-marketing vaccine monitoring, epidemiological aspects of vaccination

**Shan Lu**, University of Massachusetts Medical School, Worcester, United States of America

Vaccines, HIV, influenza, biodefense agents, emerging infectious diseases.

**Raina MacIntyre**, University of New South Wales, Sydney, Australia

Adult immunisation, influenza, herpes zoster, pneumococcal disease, vaccines

**Tetsuro Matano**, National Institute of Infectious Diseases AIDS Research Center, Tokyo, Japan

HIV vaccine, viral vector vaccine, T-cell responses, monkey AIDS model

**Peter McIntyre**, Children's Hospital at Westmead, Westmead, Australia

Immunisation Registers, Serosurveillance, Vaccine effectiveness, Pertussis, Pneumococcal infections

**Dennis Metzger**, Albany Medical College, Albany, United States of America

respiratory tract and approaches to induce protection against pulmonary pathogens, including influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*, as well as to prevent deadly co-infections by those two pathogens

**Mark Miller**, National Institutes of Health, Bethesda, United States of America

vaccine policy and economics, including health outcomes; International programs and vaccines; Computational biology and mathematical modelling of vaccine programs

**Anthony Newall**, University of New South Wales, Sydney, Australia

Infectious diseases, economic evaluation, cost-effectiveness, epidemiology, vaccine-preventable diseases



**Peter Newman**, University of Toronto, Toronto, Canada

HIV

**Slobodan Paessler**, The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, United States of America  
RNA viruses, encephalitic viruses, hemorrhagic viruses, respiratory viruses

**Peter Palese**, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, United States of America

Antivirals, Apoptosis/Cell Death, Biodefense, Coronavirus, Influenza Virus, Interferon, Interferon Antagonists, Nipah Virus, Paramyxovirus, RNA, SARS Virus, Vaccine Development, Virulence Genes

**Marcela Pasetti**, University of Maryland Baltimore, Baltimore, United States of America

Vaccine Immunology, pediatric vaccines, maternal-infant immunity, correlates of protection, mucosal immunity

**Stephen Pelton**, Boston Medical Center, Boston, United States of America

pneumococcal disease, colonization and prevention (specifically in children), acute otitis media, chronic suppurative otitis media, meningococcal disease and vaccines, epidemiology, treatment and prevention of HIV in children

**Michael Pichichero**, Rochester General Hospital Research Institute, New York, United States of America

Bacterial respiratory bacteria, streptococcus pneumonia, haemophilus influenza, Moraxella catarrhalis, group A streptococcus, Pertussis, pediatric vaccines, immunology of vaccine responses in neonates and children

**Stanley Plotkin**, Sanofi Pasteur, Doylestown, United States of America

Rubella, Cytomegalovirus, Pertussis, Rotavirus

**Maarten Postma**, University of Groningen, Groningen, Netherlands

pharmacoconomics; health economics; reimbursement; health technology assessment; mathematical modelling

**Nicola Principi**, University of Milan, Milan, Italy

Pediatrics, Infectious Diseases, Vaccines, Antibiotics, Immunology

**Roman Prymula**, Charles University Faculty of Medicine in Hradec Kralove Department of Social Medicine, Hradec Králové, Czechia

pneumococcal vaccines, MMRV, TBE vaccines, meningococcus B vaccines

**Rino Rappuoli**, GSK Vaccines SRL, Siena, Italy

bacterial toxins, infectious diseases, reverse vaccinology

**Steven Reed**, Infectious Disease Research Institute, Seattle, United States of America

Immunological response to mycobacteria infections

**Guus Rimmelzwaan**, University of Veterinary Medicine, Research Center for Emerging Infections and Zoonoses, Hannover, Germany

Virus, Infection, Vaccines, Immunity, T cells

**Lance Rodewald**, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, United States of America

Any study with coverage as an outcome, Provider knowledge, attitude and practise studies, Studies about parental confidence in vaccines, Global vaccination studies - related to the Expanded Program on Immunization priorities, Polio eradication and measles elimination studies

**Ted Ross**, Vaccine and Gene Therapy Institute of Florida, Port Saint Lucie, United States of America

Development of Broadly Reactive Vaccines, COBRA modeling, Influenza, HIV, Dengue.

**Mark Rozenbaum**, Pfizer BV, Capelle Aan Den IJssel, Netherlands

health economics/cost effectiveness evaluations, pneumococcal and pertussis vaccines, epidemiology of pneumococcal and pertussis disease

**Xavier Saelens**, Ghent University, Gent, Belgium

1. Influenza A and B vaccine development (preclinical research) 2. Vaccine development against human and bovine Respiratory Syncytial virus 3. Innate immunity against influenza and RSV, e.g. applied as adjuvant strategies 4. State of the art recombinant vaccine antigen expression systems

**William Schaffner**, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, United States of America

Infectious Disease, Preventative Medicine, Immunization Policy

**David Scheifele**, BC Children's Hospital, Vancouver, Canada

vaccine trials in children and adults, especially those involving influenza, meningococcal, pneumococcal and combination childhood vaccines

**Claire-Anne Siegrist**, University of Geneva Center of Vaccinology and Neonatal Immunology, Genève, Switzerland

vaccine immunology, neonatal immunology, vaccine adjuvants

**Mark Slifka**, Oregon Health & Science University Oregon National Primate Research Center, Beaverton, United States of America

immunology, virology, vaccines, immunological memory

**Kanta Subbarao**, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, United States of America

Influenza; Pandemic influenza; SARS coronavirus

**Andreas Suhrbier**, QIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, Australia

alphaviruses, inflammation, cancer

**Rik de Swart**, Erasmus Medical Center Department Viroscience, Rotterdam, Netherlands  
Measles, morbillivirus pathogenesis, immunosuppression, respiratory syncytial virus, host response

**H. Keipp Talbot**, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, United States of America  
influenza, viral respiratory disease, and aging

**Geraldine Taylor**, Pirbright Institute - Compton, Newbury, United Kingdom  
respiratory syncytial virus, African swine fever, Peste des petits ruminants, bluetongue, other virus diseases of livestock

**Ralph Tripp**, University of Georgia Department of Infectious Diseases, Athens, United States of America  
viral immunology, RNA viruses, therapeutics, vaccines, host-pathogen

**Takafumi Tsuboi**, Ehime University Proteo-Science Center Cell-Free Science and Technology Research, Matsuyama, Japan  
Infectious diseases, Malaria, Parasite, Plasmodium, Vaccine

**Bruce G. Weniger**, Chiang Mai University Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai, Thailand  
Disease surveillance, outbreak investigation and control, epidemiology training, vaccination technology

**Cynthia Whitney**, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, United States of America  
haemophilus influenza type B disease or vaccine, pneumococcal disease or vaccine issue, or anything related to group B strep or group A strep vaccine

**Sabine Wicker**, University Hospital Frankfurt Occupational Health Service, Frankfurt, Germany  
Occupational infections, Occupational vaccinations, Work related vaccines, Health care workers

**Fred Zepp**, Johannes Gutenberg University Mainz, Mainz, Germany  
pediatric vaccines and combination vaccines, immune response after vaccination (especially regulation of T-cell responses), and immunological aspects of basic vaccine development, expertise also exists for Pertussis vaccines, MMR-VRZ, Meningococcal-, Influenza- and Rotavirus-vaccines, also involved in public health issues concerning the implementation of public vaccination programs

**Qinjian Zhao**, Xiamen University School of Public Health, Xiamen, China  
Recombinant protein, epitope characterization, potency assay

**Gregory Zimet**, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, United States of America  
HPV vaccination (particularly related to predictors of vaccine acceptance and interventions to increase acceptance) Behavioral/Social science research related to vaccination in general, Vaccines for prevention of sexually transmitted infections, including HIV

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

Vaccine has an open access companion journal, JVAC: X. **Vaccine** is the most comprehensive and pre-eminent journal for those interested in vaccines and vaccination, serving as an interface between academics, those in research and development, regulatory and governmental agencies, charities, and health and industry professionals.

#### *Types of article*

#### *Types of paper*

**Vaccine** publishes primary research papers, review articles, short communications and letters on the following topics: Basic Science Review Clinical Science Review Commentary/Editorial History of Vaccinology Human Fungal/Parasite/Other Vaccines Human Non-Infectious Disease Vaccines (cancer, allergy, other) Human Viral Vaccines: Basic Research Letter to the Editor Novel Pathogen Vaccines (Biodefense/High Consequence Pathogens/Emerging Diseases) Vaccine Acceptance/Hesitancy Vaccine Basic Science (Immunology/Animal Models) Vaccine Ethics Vaccine Manufacturing and Bioprocessing Vaccine Operational Research (Evaluation/Epidemiology/Informatics/Models /Big Data and Analytics) Vaccine Policy Legislation/Economics/Digital Health) Vaccine Regulatory Science (Implementation/Guidelines/Public Health) Vaccine Safety Science Vaccine Technology (Vectors/Adjuvants/Delivery Systems/Nanotechnology) Veterinary Bacterial Vaccines Veterinary Fungal/Parasite/Other Vaccines Veterinary Viral Vaccines Visual Vaccinology

**For more specifics please go to [Article Type - Guidelines](#)**

**Vaccine** also welcomes thoughtful Opinion pieces and similar Commentary on topics of interest to the readership of the journal. Authors proposing such work should contact the journal mailbox via ([jvac@elsevier.com](mailto:jvac@elsevier.com)), in advance of its preparation to describe the general subject of the article in order for a formal solicitation to be made. Authors who wish to submit a **Review** article should also seek approval of topic before submission. Please send your enquiry to the Managing Editor at [d.beerens@elsevier.com](mailto:d.beerens@elsevier.com). However, the resulting submission is still subject to standard peer review, and the solicitation does not guarantee acceptance for publication. Please note that ALL articles must now carry a single sentence before the article's bibliography stating: "All authors attest they meet the ICMJE criteria for authorship" and all authors must submit written confirmation in their cover letter that "All authors attest they meet the ICMJE criteria for authorship". Authors must ensure that any documentation submitted to Vaccine for review purposes may be published should their article be accepted. Therefore, confidential and/or proprietary information contained in documentation submitted for review should be redacted or removed prior to submission.

#### *Contact details for submission*

Papers should be submitted using the *Vaccine* online submission system, <https://www.editorialmanager.com/jvac>

#### *10 essentials to ensure fast handling*

Manuscript is in accordance with [ARTICLE TYPE - GUIDELINES](#) Manuscript-text is saved as a Word-file, line-numbers are added and text is double spaced Clinical trial registry is mentioned at the end of the abstract if applicable Conflict of interest statement is included at the end of the manuscript Figures and tables are prepared as separate files and are clearly labeled Cover letter is prepared, introducing your article and explaining the novelty of the research Keywords are prepared Contact details of 6 suggested reviewers (Name, affiliation and email address) are prepared Highlights are prepared (a birds' eye view of your article in 3-5 points, 85 characters each) The work presented in the article has been carried out in an ethical way

For any further information please consult this Guide For Authors or visit our customer support site at <https://service.elsevier.com>

#### *Submission checklist*

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details. [Submission checklist](#)

**Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

## **BEFORE YOU BEGIN**

### ***Ethics in publishing***

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

### ***Studies in humans and animals***

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

### ***Policy and ethics (additional information)***

*Informed consent*

Investigations on human subjects must include a statement indicating that informed consent was obtained after the nature and possible consequences of the studies had been fully explained.

*Animal welfare*

Authors using experimental animals must state that their care was in accordance with institutional guidelines. For animals subjected to invasive procedures, the anesthetic, analgesic and tranquilizing agents used, as well as the amounts and frequency of administration, must be stated.

*Availability of Materials*

Publication of an article in *Vaccine* is taken to imply that the authors are prepared to freely distribute materials used in the published experiments (e.g. antibodies, cell lines) to academic researchers for their own use.

### ***Informed consent and patient details***

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author but copies should not be provided to the journal. Only if specifically requested by the journal in exceptional circumstances (for example if a legal issue arises) the author must provide copies of the consents or evidence that such consents have been obtained. For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

### ***Declaration of competing interest***

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of competing interest statement using [this template](#) and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. **Note: Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.** If there are no interests to declare, please choose the first option in the template. [More information](#).

### ***Submission declaration and verification***

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

#### *Preprints*

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

### ***Use of inclusive language***

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

### ***Contributors***

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

## Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

## Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

## Reporting clinical trials

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The [CONSORT checklist and template flow diagram](#) are available online.

All scientific communications describing immunogenicity, effectiveness, or efficacy of a human or veterinary vaccine must include the following details: Vaccine characteristics: Vaccine lot number, manufacturer, dosing interval and number of doses, vaccine route of administration, if an injection - the anatomic site of injection, technique for vaccine administration (if by injection, specify needle length), concomitant vaccines administered, cold chain or storage effects if relevant, and a specification of what vaccine antigens and adjuvants were administered. Subject characteristics: Age, race, ethnicity, body mass index or body weight, smoking status, gender, medical/immunologic status, and concomitant drug use.

## Statistical and analytical reporting

Author guidelines for statistical and analytical reporting:

## AUTHOR GUIDELINES

Statistical and analytical guidelines checklist:

## STATISTICAL AND ANALYTICAL GUIDELINES CHECKLIST

### Registration of clinical trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with [International Committee of Medical Journal Editors](#) recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Open access**

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### **Submit your article**

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/jvac>

### **Referees**

#### **Suggestions for potential reviewers**

Authors are invited to provide the names and institutional e-mail addresses of six potential reviewers. It would not be appropriate to nominate individuals that have had any input into the manuscripts submitted or any recent collaboration with the authors or from the same department or institute. The Editors may or may not take these suggestions into account during the reviewing process.

#### **Review process**

All contributions are read by two or more referees to ensure both accuracy and relevance, and revisions to the script may thus be required. On acceptance, contributions are subject to editorial amendment to suit house style. When a manuscript is returned for revision prior to final acceptance, the revised version must be submitted as soon as possible after the author's receipt of the referee's reports. Revised manuscripts returned after four months will be considered as new submissions subject to full re-review.

## PREPARATION

### *Queries*

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

### *Peer review*

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

### *Use of wordprocessing software*

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. Source files must have "consecutive" line numbering added by authors (this must include tables, captions, references). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced, with details of supplier and catalogue number when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### *Results*

Results should be clear and concise.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### *Essential title page information*

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.



• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

#### Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

#### Stereochemistry abstract

For each important chiral compound you are requested to supply a stereochemistry abstract detailing structure, name, formula and all available stereochemical information for eventual incorporation into a database. An abstract for only one enantiomer per compound is required.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

#### Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### *Units*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

#### *Math formulae*

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

#### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### **References**

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

#### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies

will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/vaccine>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

#### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### *Reference style*

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **Supplementary material captions**

Each supplementary material file should have a short caption which will be placed at the bottom of the article, where it can assist the reader and also be used by search engines.

### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

#### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

#### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

#### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **News and embargoes**

If you think your article would be interesting for a wider audience, we would be happy to hear from you. Please contact the Journal Manager, John Bailey (jd.bailey@elsevier.com) and we'll send you an information form to complete. You must inform the Journal Manager if you are planning publicity for your article through your institution or funding body. Any publicity materials must be approved by Elsevier before release, and must not be distributed before the article has been published.

Uncorrected proofs of articles are published online on ScienceDirect as soon as they are available. As such, information about embargoes is not available. Authors can track the status of their article via the **Track Your Accepted Article service**. Uncorrected articles are normally available online within two working days of you receiving the email to download the proofs.

### **Online proof correction**

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>