**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**CAMILA SOUZA COSTA**


# AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE ANTICORPOS IgG A VACINA PNEUMOCÓCICA CONJUGADA 10-VALENTE EM CRIANÇAS NA CIDADE DE SALVADOR-BA


Salvador, BA
2014

**CAMILA SOUZA COSTA**

# AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE ANTICORPOS IgG A VACINA PNEUMOCÓCICA CONJUGADA 10-VALENTE EM CRIANÇAS NA CIDADE DE SALVADOR-BA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta.

Salvador, BA
2014

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: meus amados pais, meu irmão, minha querida avó e amigos pelo que me ensinaram e transmitiram, pelo apoio e amor incondicional. A minha orientadora por acreditar e confiar em mim.

## AGRADECIMENTOS

O principal agradecimento a Deus, que sempre me deu força e saúde para que eu continuasse lutando e pela paz nos momentos em que me encontrei incapaz de prosseguir.

Aos meus pais, Vera Lucia Costa e Antonio Costa, por me apoiarem nos momentos mais difíceis e pela formação do meu caráter. Sem eles essa realização não seria possível.

Ao meu irmão, Igor, que com suas atitudes me ensinou a jamais desistir.

A toda minha família, pela dedicação e cuidado, por sempre acompanharem meu caminhar.

Aos meus queridos amigos que sempre torceram pelo meu sucesso.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta, pela confiança em minha capacidade como pesquisadora, além da paciência e tranquilidade para me transmitir os conhecimentos da Imunologia.

Ao professor Ajax Mercês Atta, pelo incentivo a realização desta dissertação e ensinamentos que contribuíram de forma incomensurável para meu desenvolvimento acadêmico.

Aos meus mestres, funcionários e colegas do Programa de Pós Graduação em Imunologia que foram fundamentais para o meu crescimento profissional.

À família DILDA/LAPIM por me acolherem, pelos conselhos e por me auxiliarem durante toda pesquisa. Todos fizeram do meu aprendizado não um trabalho, mas um contentamento.

Às queridas amigas doutorandas Isabela, Milena, Mariana e Taciana por todo carinho, aprendizado e amizade. A Atailza Silva que esteve sempre disposta a me ajudar. Esse agradecimento também se estende a Larissa, João e Diana pelo eterno companheirismo.

A todos os técnicos e funcionários do CRIE/UFBA, especialmente a Dra. Jacy Andrade e Livio Matheus Oliveira por proporcionarem que a parte prática deste trabalho fosse realizada. Minha eterna gratidão a todos.

A equipe do LPM/UFBA e LPBM/FIOCRUZ, especialmente a Profa. Dra. Joice Neves e doutoranda Milena Soares que contribuíram significativamente nesta pesquisa com apoio e ensinamentos. À Maíra, Alana, Vanessa e Raiana pelo auxílio na execução das atividades.

Ao Dr. Mustafa Akkoyunlu, por toda atenção e por me permitir prosseguir com a metodologia deste trabalho.

À Universidade Federal da Bahia por me acolher como aluna desde o período da graduação.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

Quero agradecer a todos que participaram dessa trajetória, pessoas tão especiais, que não pouparam esforços para que essa vitória fosse alcançada.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

**Introdução:** As infecções pneumocócicas são as principais causas de mortalidade e morbidade infantil em todo o mundo. Ainda não há resultados conclusivos sobre a imunogenicidade da vacina pneumocócica 10-valente (PCV10), recomendada pelo Programa Nacional de Imunizações, em crianças com risco aumentado para doenças infecciosas. **Objetivo:** O principal objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune de anticorpos IgG contra os sorotipos presentes na PCV10. **Materiais e Métodos:** O estudo foi conduzido no Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais (CRIE/UFBA) e no 16º Centro de Saúde. Foram incluídas, 13 crianças (Grupo 1) com diagnóstico de alguma patologia ou imunodeficiência (idade = 2,0 meses, IQR 2,0 - 2,5) e 30 crianças saudáveis (Grupo 2) (idade = 2,0 meses, IQR 2,0 - 2,0). Todas as crianças foram imunizadas com 4 doses da vacina e as amostras de sangue foram coletadas das mesmas, antes da 1ª e 4ª imunizações (T1 e T4) para medir a concentração de IgGs sorotipo-específicos. Foi realizado um ELISA indireto, utilizando a PCV10 como antígeno. Soros das crianças, controle de referência positivo (007sp) e controles negativos foram misturados com um absorvente contendo polissacarídeos capsulares C e 22F para remover os anticorpos não específicos contra antígenos bacterianos comuns. **Resultados:** Verificou-se que, no Grupo 1, 12/13 (92%) das crianças possuíam anticorpos IgG maiores que o ponto de corte de 1,022 ng/mL (mediana = 10,8 ng/mL, IQR = 3,0 - 18,5 ng/mL). Além disso, da 1ª para 4ª dose houve um aumento de 22 vezes na mediana (P= 0,0002). No Grupo 2, 29/30 (97%) tiveram uma resposta satisfatória acima do ponto de corte (mediana = 16,0 ng/mL, IQR = 7,3-35,6 ng/mL) e um aumento de 53 vezes na mediana (p<0,0001) da 1ª para 4ª dose. Com relação às imunoglobulinas, no Grupo 1, 38,5% (5/13) das crianças apresentaram IgM diminuída e 23% (3/13) tinham IgG inferior ao valor de referência. Todavia, no Grupo 2, 6,7% (2/30) das crianças apresentaram níveis de IgG abaixo do valor preconizado. **Conclusões:** Crianças portadoras de doenças crônicas e/ou imunodeficiências apresentam títulos de anticorpos contra os sorotipos vacinais favoráveis e equivalentes aos títulos de anticorpos anti-PCV10 em crianças imunocompetentes.



**Palavras - Chave:** vacina PCV-10, crianças, anticorpos IgG.

## ABSTRACT

**Introduction:** Pneumococcal infections are the main causes of child mortality and morbidity worldwide. There is still no conclusive results on the immunogenicity of 10-valent pneumococcal vaccine (PCV10), recommended by the National Immunization Program, in children at increased risk for infectious diseases. **Objective:** The main aim of this study was to evaluate the immune response of IgG antibodies against serotypes in PCV10. **Materials and Methods:** The study was conducted with children enrolled in the Reference Center of Special Immunobiologicals (CRIE/UFBA) and at 16$^{th}$ Health Center. Were included, 13 children (Group 1) diagnosed with some disease or immunodeficiency (age = 2.0 months, IQR 2.0 - 2.5) and 30 healthy children (Group 2) (age = 2.0 months, IQR 2.0 - 2.0). All children were immunized with four doses of the vaccine and blood samples were collected from these children before the first and fourth immunization (T1 and T2) to measure serotype-specific IgG concentrations. An indirect ELISA was performed using the PCV10 as antigen. Child serum samples, positive serum (007sp) and negative reference sera were mixed before analysis with an absorbent containing C and 22F capsular polysaccharide to remove non-specific antibodies against bacterial common antigens. **Results:** It was found that, in Group 1, 12/13 (92%) children had higher IgG antibodies than the cutoff of 1,022 ng/mL (median = 10.8 ng/mL, IQR = 3.0 - 18.5 ng/ml). In addition, from the first to fourth dose there was an increase of 22 times in the median (p = 0.0002). In Group 2, 29/30 (97%) had a satisfactory response above the cutoff (median = 16.0 ng / mL, IQR = 7.3 - 35.6 ng/mL) and an increase of 53 times in the median (p = 0.0001) from the first to fourth dose. Regarding immunoglobulins, in Group 1, 38.5% (5/13) of the children had decreased IgM and 23% (3/13) had IgG below the reference value. However, in Group 2, 6.7% (2/30) of the children had IgG levels below the recommended value. **Conclusions:** Children with chronic diseases and/or immunodeficiency may have antibody titers against vaccine serotypes, favorable and equivalent to the titers of PCV10 anti-antibodies in immunocompetent children.



**Keywords:** PCV-10 Vaccine, children, IgG antibody

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES


| | | |
|---|---|---|
| FIGURA 1 | Níveis séricos de anticorpos IgG anti-PCV10 das crianças após 1ª (T1) e 4ª (T4) doses da vacina nos dois grupos de estudo. | 36 |
| FIGURA 2 | Níveis séricos de anticorpos IgG imediatamente após imunização com a 1ª dose da PCV10 (T1) e na 4ª dose da vacina (T4). | 37 |
| FIGURA 3 | Avaliação da resposta vacinal anti-PCV10 nos dois grupos de crianças avaliados (G1 + G2). | 38 |
| FIGURA 4 | Níveis séricos das imunoglobulinas IgM e IgG, nos grupos de crianças (G1, G2) durante a fase inicial da vacinação com a PCV10. | 39 |
| FIGURA 5 | Níveis séricos das imunoglobulinas IgA e IgE, nos dois grupos de crianças (G1 e G2) durante a fase inicial da vacinação com a PCV10. | 39 |
| FIGURA 6 | Níveis séricos de IgG, dos dois grupos de crianças (G1, G2), determinadas nas amostras coletadas durante a 1ª (T1) e 4ª (T2) doses vacinais. | 41 |

## LISTA DE TABELAS


| | | |
|---|---|---|
| TABELA 1 | Esquema vacinal estabelecido pelo Programa Nacional de Imunizações, através do informe técnico da vacina pneumocócica 10-valente conjugada. | 25 |
| TABELA 2 | Valores de Referência para as Imunoglobulinas. | 32 |
| TABELA 3 | Características epidemiológicas das crianças incluídas no estudo, separadas de acordo com o Centro de Saúde. | 35 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| BSA | Albumina Sérica Bovina |
| CAAE | Certificado de Apresentação para Apreciação Ética |
| CPS | Polissacarídeo Capsular Pneumocócico |
| CRIE | Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais |
| CRM197 | Toxina Diftérica Mutante Não Tóxica |
| 7vCRM | Toxina Diftérica conjugada a 7 sorotipos pneumocócicos |
| 9vCRM | Toxina Diftérica conjugada a 9 sorotipos pneumocócicos |
| CWPS | Ácido Teicóico |
| CXCL8 | Quimiocina |
| DC | Células Dendríticas |
| DO | Densidade Óptica |
| DPI | Doença Pneumocócica Invasiva |
| ELISA | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FeSOD | Enzima Ferro Superóxido Dismutase |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz |
| GAVI | Aliança Global para Vacinas e Imunização |
| GMC | Concentração Média Geométrica |
| GSK | GlaxoSmithKline |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HUPES | Hospital Universitário Professor Edgard Santos |
| IFN-γ | Interferon tipo gama |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgE | Imunoglobulina E |

| | |
|---|---|
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IL-8 | Interleucina-8 |
| IL-1R | Receptor da Interleucina-1 |
| IQR | Intervalo Interquartil |
| IRAK-4 | Receptor da Interleucina-1 associado à quinase-4 |
| LAPIM | Laboratório de Pesquisa em Imunologia |
| MHCII | Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II |
| MnSOD | Enzima Manganês Superóxido Dismutase |
| MyD88 | Marcador de Diferenciação Mielóide |
| NF-κB | Fator de transcrição nuclear kappa B |
| NOD | Proteínas com Domínio de Ligação a Nucleotídeos e Oligomerização |
| NTHi | *Haemophilus influenzae* não-tipável |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PAMPs | Padrões Moleculares Associados a Patógenos |
| PBP | Proteína de Ligação a Penicilina |
| PBS | Solução Tampão Salina Fosfatada |
| PCV7 | Vacina Conjugada Pneumocócica 7- Valente |
| PCV10 | Vacina Conjugada Pneumocócica 10- Valente |
| PCV13 | Vacina Conjugada Pneumocócica 13- Valente |
| PHiD-CV | Vacina Pneumocócica conjugada a proteína D do *Haemophilus influenzae* não-tipável |
| PNI | Programa Nacional de Imunizações |
| PS | Polissacarídeo |
| PS-C | Polissacarídeo C |
| PsaA | Adesina A de superfície do pneumococo |

| | |
|---|---|
| PspA | Proteína A de superfície do pneumococo |
| PspC | Proteína C de superfície do pneumococo que se liga ao Fator H e IgA |
| SAD | Deficiência de Anticorpo Específico |
| TLR | Receptores Semelhantes à Toll |
| TMB | Tetrametilbenzidina |
| TNF-α | Fator de Necrose Tumoral - Alfa |
| UFBA | Universidade Federal da Bahia |
| USA | United States of America |

**SUMÁRIO**


| | | |
|---|---|---|
| 1 | **INTRODUÇÃO GERAL** | 14 |
| 2 | **REVISÃO DA LITERATURA** | 15 |
| 2.1 | *STREPCOCOCCUS PNEUMONIAE* E SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA | 15 |
| 2.2 | RESPOSTA IMUNE APÓS INVASÃO DO PNEUMOCOCO | 18 |
| 2.3 | DOENÇAS PNEUMOCÓCICAS | 20 |
| 2.4 | EPIDEMIOLOGIA | 21 |
| 2.5 | POPULAÇÃO DE RISCO | 22 |
| 2.6 | VACINAS LICENCIADAS NO BRASIL E EM OUTROS PAÍSES | 23 |
| 2.7 | VACINA PNEUMOCÓCICA 10-VALENTE – PCV10 | 24 |
| 3 | **RELEVÂNCIA** | 26 |
| 4 | **HIPÓTESES** | 27 |
| 5 | **OBJETIVOS** | 28 |
| 5.1 | OBJETIVO GERAL | 28 |
| 5.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 28 |
| 6 | **METODOLOGIA** | 29 |
| 6.1 | GRUPOS DE ESTUDO | 29 |
| 6.2 | MATERIAIS E MÉTODOS | 30 |
| 6.2.1 | AMOSTRA BIOLÓGICA | 30 |
| 6.2.2 | QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-PCV10 | 30 |
| 6.2.3 | DOSAGEM DAS IMUNOGLOBULINAS | 32 |
| 6.2.4 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 32 |
| 7 | **RESULTADOS** | 34 |
| 7.1 | GRUPOS DE ESTUDO | 34 |
| 7.2 | PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI-PCV10 | 36 |
| 7.3 | DOSAGENS DE IMUNOGLOBULINAS (IgA, IgM, IgG e IgE) | 38 |
| 8 | **DISCUSSÃO** | 42 |
| 9 | **CONCLUSÕES** | 48 |
| 10 | **REFERÊNCIAS** | 49 |
| | **ANEXO A: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA I** | 54 |
| | **ANEXO B: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA II** | 55 |

**ANEXO C: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA III** 56

**ANEXO D: TERMO DE COMPROMISSO LIVRE E ESCLARECIDO** 59

**ANEXO E: MODELO DO QUESTIONÁRIO APLICADO AS CRIANÇAS DO CRIE/UFBA (P) APÓS 1ª, 2ª, 3ª E 4ª DOSES DA VACINA.** 61

**ANEXO F: MODELO DO QUESTIONÁRIO APLICADO AS CRIANÇAS DO 16° CENTRO DE SAÚDE (C) APÓS 1ª, 2ª, 3ª E 4ª DOSES DA VACINA.** 63

**ANEXO G: QUESTIONÁRIO SOBRE DADOS PESSOAIS DAS CRIANÇAS DE AMBOS OS GRUPOS.** 65

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

A colonização da nasofaringe pelo *Streptococcus pneumoniae* em crianças e adultos é uma etapa inicial e essencial para o desenvolvimento de patologias e a resistência aos antibióticos por esse patógeno tornou-se uma grande preocupação.

Inicialmente apresentamos uma breve revisão da literatura, com os aspectos microbiológicos do pneumococo e seus potenciais fatores de virulência, formas de transmissão desse patógeno, seus mecanismos de resistência aos antibióticos e evasão do sistema imune.

Os aspectos imunológicos também foram abordados, para compreendermos como a imunidade inata e imunidade adaptativa agem na tentativa de impedir uma possível infecção. Todavia, indivíduos mais susceptíveis podem desenvolver as doenças pneumocócicas invasivas e não invasivas. Assim relatamos tais patologias, as populações de risco e epidemiologia atualizada.

Até o momento, a vacinação é a única ferramenta disponível na prevenção dessas doenças e avaliação imune de anticorpos produzidos após imunização com a vacina pneumocócica decavalente (conjugada) – PCV10 em crianças com risco aumentado para doenças infecciosas pouco era descrita na literatura.

Neste trabalho, apresentamos um histórico das vacinas administradas contra o pneumococo, com mais detalhes sobre a PCV10, licenciada no Brasil e alvo de nosso estudo. Nosso principal objetivo foi avaliar a imunogenicidade da PCV10 em crianças sadias e crianças imunocomprometidas na cidade de Salvador-Bahia.

Para tal, dosamos os anticorpos IgG porque crianças com resposta imune prejudicada, seja devido ao tratamento com imunossupressores, a uma anomalia genética, à infecção por HIV, seja por outras causas, podem apresentar resposta de anticorpos reduzida à imunização ativa.

Na metodologia, abordamos nossa população de estudo, descrevemos o método do ELISA indireto realizado, dosagem das imunoglobulinas para avaliação de possível imunodeficiência e por fim, toda análise estatística.

Nossos resultados foram apresentados em gráficos e correlacionados na discussão com os dados de outros autores. Finalizamos com as conclusões obtidas através de todo trabalho experimental.

# 2. REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 *STREPCOCOCCUS PNEUMONIAE* E SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA

*Streptococcus pneumoniae* ou pneumococo, em termos microbiológicos, é um microrganismo gram-positivo, em forma de lanceta, que tende a crescer aos pares (diplococos) ou em cadeias (ZHANG; WILSON; PACE, 2006). Sua caracterização é baseada na morfologia das colônias em placa de ágar sangue ou ágar chocolate. São anaeróbios facultativos, homofermentadores, catalase-negativos, oxidase-negativos e α-hemolíticos (XIA; GUO; ZHOU, 2014). Em geral, sensível a optoquina e apresentam solubilidade em bile (KONEMAN, 2008, p.707-712).

Esse significativo patógeno humano foi reconhecido como uma das principais causas de pneumonia no final do século 19, e atualmente é o assunto de muitos estudos de imunidade humoral (XIA; GUO; ZHOU, 2014).

Bactérias extracelulares que expressam cápsulas de polissacarídeo, como o *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* e *Neisseria meningitidis* são as principais causas de morbidade e mortalidade em vários países (ARJUNARAJA et al., 2012). A cápsula polissacarídica é o principal imunógeno e também o principal fator de virulência do pneumococo em virtude de suas propriedades antifagocíticas (VESIKARI, 2009; WERNETTE, 2003). A toxina pneumolisina também tem grande importância na virulência desse patógeno, além das proteínas de superfície (PspA, PsaA e PspC). Os pneumococos contêm dois tipos de superóxido dismutase (MnSOD e FeSOD) que aumentam a inflamação no pulmão e alteram a difusão dos neutrófilos (YESILKAYA et al., 2000).

A cápsula pneumocócica desempenha um papel importante não só na proteção da fagocitose, mas também na modulação da resposta imune pró-inflamatória no trato respiratório. De acordo com o estudo realizado por Küng (2014, p.1) com experimentos *in vivo* e *in vitro*, a cápsula suprime a liberação das citocinas pró-inflamatórias CXCL8 (IL-8) e IL-6 a partir da linhagem de células epiteliais da faringe humana (Detroit 562).

O polissacarídeo capsular pneumocócico (CPS) é imunogênico e induz proteção imune sorotipo-específica. Este é tradicionalmente usado para distinguir os sorotipos dos estreptococos. Contém cerca de 5% de ácido teicóico (CWPS) e a

proteína de superfície do pneumococo (PspA) (SKOVSTED et al., 2007). Cada tipo de cápsula contém uma composição distinta e diferentes ligações dos açúcares.

A estrutura do CWPS já foi anteriormente determinada e consiste de um pentassacarídeo de repetição: (6-)-β-D-Glcp-(1→3)-α-ATTp-(1→4)-α-d-GalpNAc-(1→3)-β-d-GalpNAc-(1→1)-d-ribitol-5-P-(O→) com uma única fosfocolina ligada à posição 6 do resíduo de galactose (KARLSSON; JANSSON; SKOV SORENSEN, 1999). Até o presente momento são conhecidos 94 sorotipos de pneumococos, incluindo o sorotipo 6D, descoberto em 2009 (DEL AMO, 2013; MUÑOZ-ALMAGRO, 2010). Apesar desta diversidade, um número relativamente pequeno de sorotipos está associado com as doenças invasivas em todo o mundo.

Tem sido amplamente demonstrado que a proteção contra diversas manifestações da doença pneumocócica é mediada por anticorpos induzidos para os polissacarídeos pneumocócicos tipo-específico (POOLMAN et al., 2009). Atualmente, o principal método de avaliação de anticorpos (IgG) contra o polissacarídeo capsular pneumocócico é o ensaio imunoenzimático (ELISA) (HENCKAERTS et al., 2006).

A função biológica destes anticorpos é de se ligar à superfície da célula pneumocócica e induzir a ativação do sistema complemento, o que leva à captação e morte das células pneumocócicas por células fagocíticas como polimorfonucleares (POOLMAN et al., 2009).

Um grupo de pesquisadores se propôs a analisar fenotipicamente as células B produtoras desses anticorpos específicos para polissacarídeos pneumocócicos e relataram que indivíduos pré-vacinados com a vacina pneumocócica polissacarídica 23-valente tiveram um predomínio de células naïve $CD27^{-}IgM^{+}$ respondendo por 61,4% das células B. Em contraste, as células específicas obtidas após a imunização eram predominantemente células de memória $CD27^{+}IgM^{+}$, 54,2% para o sorotipo 14 e 66% para sorotipo 23F (KHASKHELY et al., 2012). Estes resultados sugerem um papel dominante de células de memória IgM na resposta imunológica a polissacarídeos de pneumococos.

A PspA interfere com a ativação das vias clássica e alternativa do sistema complemento e liga-se também a lactoferrina. A PspC interage com a IgA e com o receptor de imunoglobulina polimérica, promovendo, assim, a adesão e a transcitose de pneumococos em superfícies mucosas. Essa proteína também tem propriedades antifagocíticas, devido à sua capacidade de se ligar a C3 do complemento e ao fator

H (RICCI et al., 2013). PsaA foi descrita como uma adesina de superfície. Os pneumococos que não expressam PsaA são praticamente avirulentos em modelos animais de doenças e mostram reduzida capacidade de aderir a pneumócitos tipo II *in vitro.* A expressão do gene de virulência PsaA pode ser útil para a invasão do pneumococo para o sistema sanguíneo (HU et al., 2013).

Pneumolisina, neuraminidases A e B, e hialuronidase são fatores de virulência desse patógeno que parecem estar envolvidos na patogênese da meningite. A pneumolisina é liberada durante a autólise da bactéria e, provavelmente, também através de um mecanismo independente de autólise. Interage com o colesterol na parede celular das células hospedeiras e forma poros transmembranares por oligomerização, conduzindo a perda de integridade da membrana das células hospedeiras. Em baixas concentrações é capaz de inibir a quimiotaxia e atividade bactericida de leucócitos polimorfonucleares (BALACHANDRAN et al.,2001).

Em um estudo com modelo murino de meningite após infecção intracerebral usando mutantes de *Streptococcus pneumoniae* D39, apenas camundongos infectados com uma cepa deficiente de pneumolisina permaneceram saudáveis de 32h a 36h, apresentaram menor bacteremia e sobreviveram mais que aqueles infectados com a cepa padrão (WELLMER et al., 2002).

Evidências sugerem que enzimas neuraminidases, que clivam as ligações glicosídicas do ácido neuramínico (ácido siálico) presente na membrana celular, desempenham um papel importante na patogênese. Estado de coma e bacteremia ocorrem com maior frequência em pacientes com meningite pneumocócica, quando a concentração do ácido N-acetil neuramínico no líquido cefalorraquidiano está elevada (MITCHELL, 2000).

O pneumococo produz ainda a enzima hialuronidase, que degrada o ácido hialurônico, um componente do tecido conjuntivo, assim, desempenha um papel importante na translocação de pneumococos entre os tecidos. Produção de hialuronidase pode também afetar a resposta inflamatória no pulmão. As cepas que causam meningite apresentam maior concentração *in vitro* de hialuronidase (WELLMER et al., 2002).

As bactérias são disseminadas através de gotículas de saliva ou muco como, por exemplo, quando as pessoas infectadas tossem ou espirram. O principal nicho ecológico do pneumococo é a nasofaringe de crianças e adultos saudáveis, que são colonizados assintomaticamente (DEL AMO et al., 2013).

Estas pessoas podem ser portadoras do pneumococo sem apresentar sinais ou sintomas da doença, mas podem infectar outras pessoas. No entanto, em indivíduos susceptíveis, como idosos, imunocomprometidos e crianças, o patógeno pode se espalhar para outros locais e causar doenças (XIA; GUO; ZHOU, 2014).

É importante salientar que *Streptococcus pneumoniae* com resistência à penicilina e outros antibióticos são altamente prevalentes em todo o mundo. Tal resistência é conseguida através de dois mecanismos genéticos diferentes descritos na literatura.

O primeiro mecanismo envolve uma alteração dos genes que codificam antibióticos alvos, que podem incluir recombinação inter ou intraespecíficas, como no caso da proteína de ligação à penicilina (PBP) e genes da topoisomerase, que levam a resistência aos β-lactâmicos e fluoroquinolonas, respectivamente (MARIMÓN et al., 2006).

O segundo mecanismo de resistência é geralmente devido à incorporação de novo material genético, mediada por transposons que são carreadores de diferentes genes de resistência (MARIMÓN et al., 2006).

Estudo sobre testes de susceptibilidade antimicrobiana revelou que 22,1% dos isolados de meningite eram não suscetíveis à penicilina, 56% eram não suscetíveis à trimetoprim/sulfametoxazol e 29,6% eram não suscetíveis à tetraciclina (MENEZES et al., 2011).

## 2.2 RESPOSTA IMUNE APÓS INVASÃO DO PNEUMOCOCO

Infecções por *Streptococcus pneumoniae* está caracteristicamente associada com inflamação, incluindo uma forte resposta de fase aguda, o recrutamento de leucócitos rapidamente para o local da infecção, e a participação de barreiras epiteliais ou endoteliais (TOMLINSON et al., 2014).

Embora a resposta inflamatória seja necessária para a imunidade do hospedeiro, inflamação excessiva contribui para complicações graves da infecção pelo pneumococo, tais como danos neurológicos, choque séptico, e lesão aguda do pulmão (TOMLINSON et al., 2014).

Sinalização por receptores semelhantes à Toll (TLRs) é um mecanismo fundamental para detecção e resposta imune inata do hospedeiro contra o *S.*

*pneumoniae*. Deficiência genética nas vias de sinalização dos TLRs aumenta substancialmente o risco de infecções invasivas pelo pneumococo. Cinquenta e quatro por cento das crianças com deficiência em IL-1R–associado à quinase-4 (IRAK-4) e 41% dos pacientes com deficiência de MyD88 tiveram pelo menos um episódio de doença pneumocócica invasiva (PICARD; CASANOVA; PUEL, 2011).

Embora o reconhecimento imune inato desse patógeno seja dependente de várias contribuições de TLR, incluindo TLR2, TLR4 e TLR9, a liberação de citocinas inflamatórias, tais como TNF-α e IL-6, parece ser particularmente dependente de TLR2 (MOREIRA et al., 2008).

Sabe-se também que interações bactéria-hospedeiro se iniciam pela detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores semelhantes à Toll (TLR) e por proteínas com domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização (NOD), na resposta imune inata.

Ligantes de TLR2 incluem peptidoglicano (PGN) e ácido lipoteicóico (LTA), ambos componentes da parede celular de bactérias gram-positivas. A parede celular do *S. pneumoniae* é altamente pró-inflamatória, sugerindo que PGN e LTA sejam grandes agonistas do TLR2 (DRAING et al., 2008).

A meningite bacteriana é uma doença grave e muitas vezes intratável que afeta as meninges e parênquima cerebral. Uma vez que o *Streptococcus pneumoniae* passa a ter acesso ao sistema nervoso central, a multiplicação das bactérias dentro dos espaços subaracnóideos e ventriculares desencadeia uma intensa resposta inflamatória do hospedeiro.

Alguns pesquisadores mostraram em modelo murino, que a ativação do NF-κB nos tecidos cerebrais foi significativamente aumentado e que NOD2 medeia essa ativação. Do mesmo modo, os níveis de TNF-α e IL-6 foram aumentados no cérebro após administração *in vivo* do pneumococo. Os autores concluíram que NOD2 desempenha um importante papel na iniciação e/ou progressão da inflamação no Sistema Nervoso Central, o que está associado com a meningite pneumocócica (LIU; HAN; LENG, 2014).

Os macrófagos também contribuem para respostas imunes a bactérias nos tecidos. Eles ativam um programa de morte celular chamado apoptose, maximizando a eliminação bacteriana e limitando a inflamação prejudicial. Alguns autores relataram que a própria toxina pneumolisina, tem o potencial de ativar macrófagos para liberar fatores inflamatórios, ativar a apoptose de macrófagos ao

invés da necrose, aumentando a morte bacteriana e limitando a inflamação (BEWLEY et al.,2014).

Com relação à resposta imune celular, vários relatos demonstram um papel significativo de linfócitos $TCD4^+$ em fornecer imunidade contra o pneumococo. Em crianças mais velhas e nos adultos, as células $TCD4^+$ antígeno-específicas reduzem a colonização nasofaríngea (ZHANG et al., 2007).

Crianças propensas a doenças invasivas apresentam níveis reduzidos de células dendríticas (DC). Tais células apresentadoras de antígenos ativam os linfócitos T naïve, porém as DCs dessas crianças têm níveis de moléculas MHCII significativamente reduzida na sua superfície, o que contribui para uma disfunção imunológica (SHARMA; PICHICHERO, 2013).

Indivíduos que sofrem de otite média recorrente apresentam células $TCD8^+$ produtoras de IFN-γ no sangue periférico e nos adenóides reduzida, o que induz susceptibilidade a infecções recorrentes (AVANZINI et al., 2008).

A resposta humoral também é fundamental. Recentemente, verificou-se uma menor percentagem de células B de memória antígeno-específicas em crianças mais propensas a otite média aguda quando comparada com crianças saudáveis. A porcentagem mais baixa de células B de memória nessas crianças foi associada a níveis reduzidos de IgG específica do pneumococo em seu respectivo soro (SHARMA; CASEY; PICHICHERO, 2012).

## 2.3 DOENÇAS PNEUMOCÓCICAS

*Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* são os dois principais patógenos bacterianos do trato respiratório e que causam otite média aguda nas crianças (VESIKARI et al., 2009). O pneumococo é geralmente considerado principal causador de pneumonia adquirida na comunidade, e também provoca bacteremia, septicemia e meningite bacteriana (SLOTVED, 2006; VESIKARI, 2009; WERNETTE, 2003). Patógeno que causa, portanto, doenças invasivas e não invasivas. Diferentes sorotipos do pneumococo têm diferentes capacidades de causar doenças e manifestações clínicas.

A propagação dessas bactérias dentro do trato respiratório pode resultar em otite média, sinusite ou bronquite recorrente. Comparado com as doenças invasivas,

as manifestações não invasivas são geralmente menos graves, mas consideravelmente mais comuns.

A associação dos sorotipos específicos com a doença pneumocócica varia de acordo com idade, geografia e clínica do paciente (RUSSELL et al., 2009). Os sorotipos 6B, 14 e 19F são importantes em todo o mundo, ao passo que o sorotipo 5 é principalmente encontrado em países de baixa renda e o 18C é mais comum em países desenvolvidos.

Em geral, os sorotipos que causam patologias em países em desenvolvimento são mais amplos. Portanto, a vacina utilizada abrange uma proporção menor dos sorotipos de pneumococos que causam doenças em crianças que residem nesses países em relação as que moram em países desenvolvidos (RUSSELL et al., 2009).

## 2.4 EPIDEMIOLOGIA

Infecções causadas por pneumococos são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Nos países em desenvolvimento, *S. pneumoniae* provoca até 1 milhão de mortes todos os anos entre as crianças menores de 5 anos de idade, a maioria dos quais são causadas por pneumonia e ocorrem no primeiro ano de vida (KLUGMAN, 2003; VESIKARI, 2009). Segundo Russell (2009) a taxa de letalidade é particularmente elevada em crianças com menos de 6 meses de idade.

As crianças que vivem em países com baixa condição socioeconômica são colonizadas precocemente (MADHI et al., 2011). Na Turquia, durante o ano 2000, infecções pneumocócicas do trato respiratório e meningite, foram a 5° causa mais comum de morte na população e a 2° causa mais comum de morte entre crianças de 0-14 anos de idade (BAKIR et al., 2012).

Em 2008, em Mali e Nigéria, casos de pneumonia respondeu por quase 200.000 mortes em crianças abaixo de 5 anos de idade. Devido à elevada carga de pneumonia infantil nesta região, a Aliança Global para Vacinas e Imunização (GAVI) apoiou a introdução de vacinas conjugadas pneumocócicas em países africanos de baixa renda (DICKO et al., 2011).

O aumento da taxa de doenças pneumocócicas invasivas (DPI) causadas por cepas não vacinais tem sido uma grande preocupação. A taxa global de DPI entre

as crianças e adultos inclui entre 11 e 23,2 / 100.000 pessoas por ano (HAMMITT et al., 2014).

O estudo de Menezes e colaboradores (2011) na cidade de Salvador-Bahia-Brasil (no período de 2000-2007 antes da PCV10) mostrou um declínio nas taxas de incidência anual de meningite pneumocócica durante o período do estudo, de 1,12 casos para 0,83 casos/100.000 habitantes de todas as faixas etárias com uma taxa de letalidade geral de 28,6% para todos os pacientes e 41,9% para aqueles <5 anos de idade.

Com relação à distribuição dos sorotipos, esse trabalho supracitado, mostrou que sorotipos 14 (n=55; 13.9%), 3 (n=32; 8.1%), 23F (n=32; 8.1%), 19F (n=31; 7.8%), 6B (n=30; 7.6%), 18C (n=28; 7.1%) e 6A (n=20; 5%) foram os mais prevalentes (MENEZES et al., 2011).

Dados do Ministério da Saúde divulgado em 2009 mostraram que no grupo de crianças menores de dois anos, a incidência média anual de meningite pneumocócica foi de 5,9 casos/100.000 habitantes, sendo que para os menores de um ano a incidência média anual foi de 9,5 casos/100.000 habitantes. A letalidade média para estas duas faixas etárias foi 33 e 34%, respectivamente (BRASIL, 2009).

## 2.5 POPULAÇÃO DE RISCO

O pneumococo causa infecções mais frequentemente em crianças e idosos porque seus sistemas imunológicos não estão completamente desenvolvidos ou apresentam alguma deficiência para responder eficazmente a este patógeno (WERNETTE et al., 2003). Crianças com doença falciforme têm um risco significativamente aumentado de infecção invasiva e mortalidade por esse patógeno (ADAMKIEWICZ et al., 2008). Além disso, outros pacientes com certas condições crônicas, como doenças cardiovasculares, doenças pulmonares, diabetes mellitus, neoplasias, e condições de imunossupressão incluindo a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana e os fumantes têm um risco maior de desenvolverem doença pneumocócica grave (WERNETTE et al., 2003).

Balmer e colaboradores (2006) descreveram que: “Os indivíduos que sofrem da deficiência parcial ou completa de anticorpos, defeitos do sistema complemento e asplenia congênita ou adquirida apresentam maior risco de infecção pneumocócica”.

Em um estudo realizado na África do Sul com crianças menores de 12 anos, submetidas à coleta de hemocultura ou cultura de líquido cefalorraquidiano, foram encontrados 237 casos de doença invasiva por pneumococo, dos quais 64,9% ocorreram em crianças HIV positivas, mostrando um risco maior destas crianças desenvolverem infecção invasiva em relação as crianças sadias (MADHI et al., 2000).

Os prematuros também têm um risco aumentado para infecções pneumocócicas. Omeñaca e colaboradores (2011) relatou que existe um risco nove vezes mais elevado para doenças pneumocócicas em crianças nascidas com idade gestacional de < 32 semanas em comparação com não prematuros.

## 2.6 VACINAS LICENCIADAS NO BRASIL E EM OUTROS PAÍSES

A vacina polissacarídica pneumocócica 23-valente foi incorporada pelo Programa Nacional de Imunizações, no ano de 1992, para grupos com quadros clínicos específicos. Essa vacina é amplamente utilizada e recomendada pela OMS para todos os indivíduos acima de 60 e 65 anos de idade, para aqueles com doença crônica subjacente e pré e pós-esplenectomia (TOBUDIC et al., 2012).

Porém, em contraste com as proteínas, polissacarídeos (PS) não são processados por células apresentadoras de antígeno em associação com o complexo principal de histocompatibilidade classe II ou MHC-II (do inglês major histocompatibility complex) e, portanto, não recrutam células T $CD4^{+}$. Assim, são antígenos células T independentes que não conseguem provocar a formação efetiva do centro germinativo e memória imunológica (ARJUNARAJA et al., 2012).

Por esse motivo, não se administra a vacina polissacarídica pneumocócica 23-valente em crianças menores de 2 anos de idade.

No entanto, PS promovem a proliferação eficiente e robusta de células B, e na presença de segundos sinais, como por exemplo, TLR e/ou citocinas, ocorre indução de secreção de imunoglobulinas e troca de classe (ARJUNARAJA et al., 2012).

Estes anticorpos facilitam a fagocitose via opsonização do patógeno. É geralmente aceito que a proteção contra doenças invasivas é alcançada quando anticorpos funcionais circulantes alcançam um nível mínimo (VESIKARI et al., 2009).

A resposta imune através da ativação de células T é mais eficaz na produção de células B de memória que pode ser potenciada com subsequentes doses de

vacinas conjugadas (polissacarídeo + proteína) para produzir uma grande quantidade de anticorpos (TOBUDIC et al., 2012).

A vacina pneumocócica conjugada 7-valente (conjugada com a proteína diftérica CRM197) contêm os polissacarídeos capsulares derivados dos sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F (OMEÑACA et al., 2011). Essa vacina foi incorporada pelo Ministério da Saúde em 2001.

Em março de 2010, a vacina pneumocócica conjugada 13-valente (PCV13) - Prevenar substituiu a vacina 7-valente nos EUA (SIMONSEN et al., 2014). Essa vacina fornece a mesma soroproteção da PCV7 e contêm os 10 sorotipos da PCV10 mais três sorotipos de pneumococos adicionais: 3, 6A e 19A (EARNSHAW et al., 2012).

## 2.7 VACINA PNEUMOCÓCICA 10-VALENTE – PCV10

Em março de 2010, o Brasil introduziu ao Programa Nacional de Imunizações (PNI), a vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV10), que foi licenciada com base na não inferioridade dos correlatos imunológicos de proteção, a exemplo da vacina conjugada 7-valente (DOMINGUES et al., 2014).

A vacina pneumocócica 10-valente (PHiD-CV; Synflorix™, produzida pelo laboratório GlaxoSmithKline [GSK] Biologicals, Rixensart, Bélgica, ou pelo Laboratório Bio-Manguinhos/FIOCRUZ-RJ) possui os sorotipos pneumocócicos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Oito dos dez polissacarídeos são conjugados a proteína D (uma proteína da membrana externa) do *Haemophilus influenzae* não-tipável (NTHi) e os outros dois polissacarídeos (sorotipos 18C e 19F) são conjugados a um toxóide tetânico e um toxóide diftérico, respectivamente (VESIKARI et al., 2009). A proteína D foi selecionada por proporcionar proteção contra infecções de *Haemophilus influenzae* (EARNSHAW et al., 2012).

A decisão de introduzir a vacina pneumocócica 10-valente no Brasil ocorreu graças ao acordo de transferência de tecnologia do laboratório GlaxoSmithKline – GSK para o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Biomanguinhos/Fiocruz), o que viabilizou a sustentabilidade da vacinação no país.

O esquema vacinal da PCV10 proposto pelo PNI está ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1. Esquema vacinal estabelecido pelo Programa Nacional de Imunizações, através do informe técnico da vacina pneumocócica 10-valente conjugada.

| IDADE (MESES) | QUANTIDADE DE DOSES | REFORÇO VACINAL |
|---|---|---|
| **2 – 4 – 6 ou<br>3 – 5 – 7 ou<br>4 – 6 – 8 ou<br>5 – 7 – 9 ou<br>6 – 8 – 10** | 3 doses com intervalo de 2 meses | 1 dose preferencialmente entre 12 e 15 meses |
| **7 – 9 ou<br>8 – 10 ou<br>9 – 11 ou** | 2 doses com intervalo de 2 meses | 1 dose preferencialmente entre 12 e 15 meses |
| **10 – 12 ou<br>11 – 13** | 2 doses com intervalo de 2 meses | Nesta faixa etária, ao receber a 2ª dose, não há a necessidade do reforço |
| **12 a <24** | Dose única | - |

Fonte: Ministério da Saúde/Brasil, 2014.

PCV10 é a primeira vacina que surgiu como “nova candidata” desde o aparecimento das vacinas pneumocócicas conjugadas 7-valente (7vCRM, Prevenar™/Prevnar™; Pfizer Inc., New York, EUA) e 9-valente (9vCRM) e representa a primeira de uma nova geração de vacinas conjugadas pneumocócicas com cobertura de sorotipo global (DAGAN; FRASCH, 2009).

Esta vacina foi projetada para cobrir ≥ 80% dos sorotipos causadores das doenças pneumocócicas invasivas (DPI) na maioria das regiões do mundo (MENEZES et al., 2011).

Sorotipos pneumocócicos 1 e 5, que não estão contidos na vacina conjugada pneumocócica 7-valente são conhecidos por desempenhar um papel importante nas infecções pneumocócicas em crianças na África. Estima-se que os mesmos causam 22% da doença pneumocócica invasiva (DICKO et al., 2011). A PCV10 possui os sorotipos 1,5 e 7 em adição aos sorotipos da PCV7.

## 3. RELEVÂNCIA

A vacina pneumocócica PCV10 já teve sua segurança, eficácia e imunogenicidade comprovadas em crianças saudáveis, porém alguns pontos permanecem em aberto com relação à imunogenicidade da PCV10. Ainda pouco se sabe sobre a resposta humoral dessa vacina em crianças com risco aumentado para patologias infecciosas a exemplo de crianças com anemia falciforme e imunodeficiência humana adquirida.

A bula da vacina Synflorix™ relata que não estão disponíveis dados de segurança e imunogenicidade em crianças que correm maior risco de contrair infecções pneumocócicas (anemia falciforme, disfunção esplênica congênita e adquirida, infecção por HIV, malignidade e síndrome nefrótica).

A Bahia é o estado brasileiro que registra a maior incidência de anemia falciforme, segundo dados do Ministério da Saúde, onde são registrados 40 novos casos por mês, com uma incidência de 1 caso para cada 650 nascidos-vivos (BRASIL, 2010).

Não há publicação de trabalhos que avalie a concentração de anticorpos utilizando a PCV10 como antígeno.

Desta forma, avaliar a imunogenicidade da vacina PCV10 em diferentes grupos populacionais poderá gerar conhecimentos relevantes sobre a resposta imune humoral dessa vacina pneumocócica conjugada para outras regiões e para a ciência.

## 4. HIPÓTESES

H0= Pacientes pediátricos portadores de doenças crônicas e/ou imunodeficiências apresentam títulos de anticorpos antivacina pneumocócica 10-valente favoráveis e equivalentes aos títulos de anticorpos de crianças imunocompetentes.

H1= A resposta imunogênica para a vacina pneumocócica conjugada 10-valente é inferior em crianças portadoras de doenças crônicas e/ou imunodeficiências quando comparada com crianças saudáveis.

# 5. OBJETIVOS

## 5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a imunogenicidade da vacina pneumocócica 10-valente (PCV10) em crianças sadias e crianças imunocomprometidas na cidade de Salvador-Bahia.

## 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração de anticorpos IgG anti-PCV10 pré- e pós-vacinação de crianças hígidas e crianças imunocomprometidas;

- Medir os níveis séricos das imunoglobulinas (IgA, IgE, IgG e IgM) das crianças de ambos grupos;

- Avaliar o índice de resposta vacinal e a frequência de deficiência de anticorpos antígeno-específico na população em estudo.

# 6. METODOLOGIA

## 6.1 GRUPOS DE ESTUDO

A pesquisa foi desenvolvida com dois grupos distintos de crianças vacinadas na cidade de Salvador/Bahia. No primeiro foram selecionadas crianças, de ambos os gêneros, e com idade de 2 a 12 meses.

Esses pacientes foram imunizados no Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais, localizado no Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos (CRIE/HUPES/UFBA). O CRIE é um órgão vinculado à Secretaria do Estado e regido pela norma da Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Portaria nº 48, de 28 de julho de 2004.

No CRIE a vacina pneumocócica decavalente conjugada é oferecida às crianças com alguma condição de risco para a doença pneumocócica: Portadoras do HIV/ Síndrome da imunodeficiência adquirida; Asplenia anatômica ou funcional e doenças relacionadas; Pneumopatias crônicas, exceto asma; Asma grave em uso de corticoides em dose imunossupressora; Cardiopatias crônicas; Nefropatias crônicas/hemodiálise/síndrome nefrótica; Transplantados de órgãos sólidos ou medula óssea; Imunodeficiência devido a câncer ou imunossupressão terapêutica; Diabetes mellitus; Fístula liquórica; Fibrose cística (muscoviscidose); Doenças neurológicas crônicas incapacitantes; Implante de cóclea; Trissomias; Imunodeficiências congênitas; Doenças de depósito e para crianças menores de 1 ano de idade nascidas com menos de 35 semanas de gestação submetidas à assistência respiratória.

Foram adotados como critérios de exclusão: crianças que tiveram infecção prévia pelo pneumococo e/ou tomaram dose única da vacina por terem idade superior a 12 meses.

O segundo grupo foi constituído por crianças hígidas, sem nenhuma história prévia de doença crônica ou imunodeficiência, de ambos os gêneros e com idade inferior a 6 meses. As mesmas foram imunizadas com a PCV10 no 16º Centro de Saúde Maria da Conceição Santiago Imbassahy coordenado pela Prefeitura da cidade de Salvador. Crianças com patologias, que desenvolveram alguma doença pneumocócica ou que tomaram apenas uma dose da vacina, foram excluídas do estudo.

Todos os responsáveis pelas crianças foram previamente esclarecidos sobre a pesquisa e sua relevância, e foram convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo-D), conforme previsto na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, e aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos do HUPES, sob CAAE número 0100.0.442.000-11 (Anexo-A; Anexo-B; Anexo-C).

## 6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.2.1 AMOSTRA BIOLÓGICA

Foram coletadas cerca de 1-2 mL de amostras de sangue dos pacientes pediátricos imediatamente ou dias após a vacinação da 1ª, 2ª, 3ª e 4ª doses da PCV10. Após coagulação e separação dos soros, os mesmos foram armazenados à temperatura de -80ºC até a realização dos testes. Com a finalidade de cumprir os objetivos do trabalho, determinou-se a concentração dos anticorpos IgG séricos em dois períodos da vacinação (1ª dose=T1 e após a 4ª dose=T4), utilizando-se assim, os soros de 1ª e 4ª doses.

### 6.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-PCV10

Para medir a concentração de anticorpos IgG séricos das crianças participantes, realizou-se um ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) de 3ª geração. Toda técnica foi padronizada no LAPIM /UFBA seguindo recomendações descritas no protocolo da Organização Mundial de Saúde (OMS), que se encontra disponível em: http://www.vaccine.uab.edu e descrito por Wernette e colaboradores (2003).

Utilizou-se 11 frascos-ampola da PCV10 para revestimento dos poços das microplacas fornecidos pelo CRIE/UFBA. A vacina foi fabricada pelo Laboratório Bio-Manguinhos / FIOCRUZ-RJ, Lote: 128VPN023A; Validade: 07/2015.

Todo método foi realizado em ambiente estéril, utilizando Câmara de Fluxo Laminar (VECO, Campinas-SP, BR) e com materiais estéreis, de modo a evitar contaminação por outros microrganismos e todas as soluções foram feitas no

laboratório com posterior medição do pH (7,2 ± 0,2) usando um pHmetro digital (PG 1800 - GEHAKA).

Considerando que cada unidade da vacina (frasco-ampola) possui 1µg de cada um dos sorotipos capsulares 1, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F e 3µg dos sorotipos conjugados 4, 18C e 19F, as placas com 96 poços de poliestireno de fundo plano (Maxisorp$^{TM}$,Nunc) foram revestidas com a vacina PCV10 diluída 1/2 em solução tampão salina fosfatada estéril (phosphate buffered saline 1X – PBS 1X / azida sódica - $NaN_3$ 0.02%), constituindo assim o antígeno com 10 sorotipos capsulares. A esterilização da solução PBS foi feita por filtração, com filtro de 0,22 µm. As placas foram incubadas durante a noite a 4°C. Todas as lavagens foram feitas em lavadora automática de microplacas (ThermoPlate, TP Washer), com solução tampão de lavagem (PBS 1X / Tween-20 0,05%). O bloqueio dos poços foi feito com albumina sérica bovina 1% (bovine serum albumin - BSA 1%) em solução tampão de revestimento por 1 hora a temperatura ambiente.

Para quantificar a IgG PCV10-específica, os soros das crianças foram analisados em duplicata e diluídos com solução tampão de anticorpo (PBS 1X / NaN3 0.02% / Tween-20 0,05%). A fim de validar o ensaio, utilizou-se um controle positivo (007sp, gentilmente cedido pelo Dr. Mustafa Akkoyunlu), fornecido pela *Food and Drug Administration* – FDA/EUA (através do contato fornecido no website http://www.vaccine.uab.edu) e recomendado pela OMS, contendo anticorpos para todos os sorotipos vacinais, numa concentração total de 108,98 µg/mL de IgG. O mesmo foi diluído 1/200. Amostras de soros para controles negativos foram fornecidos pela FIOCRUZ/Ba, provenientes de crianças sem infecção pneumocócica e ausência de colonização (diluídos 1/100). Os soros dos pacientes também foram diluídos 1/100. Utilizando o soro de referência padrão, obteve-se a curva de calibração (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1.600). Todas as amostras foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente.

Etapa crucial na realização do ELISA, considerado de 3ª geração, foi a adição de um adsorvente contendo 5 µg/mL do polissacarídeo C (PS-C) e 5 µg/mL do polissacarídeo capsular 22F específicos do pneumococo a todas as amostras, anterior à incubação, de modo a neutralizar anticorpos inespecíficos que se ligam a antígenos bacterianos comuns. A reação foi revelada com anticorpo de cabra anti-IgG humana marcado com peroxidase com posterior adição do substrato $H_2O_2$ e cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) e finalizada com $H_2SO_4$ 2N.

A densidade óptica de cada poço foi medida por uma leitora de microplacas de ELISA (ThermoPlate, TP Reader) a 450 e 630 nm. Correções analíticas de interferentes foram feitas pela densidade ótica (DO) dos poços do “branco”.

### 6.2.3 DOSAGEM DAS IMUNOGLOBULINAS

As imunoglobulinas IgA, IgG, IgM foram quantificadas por imunoprecipitação com antissoros policlonais, através do método de nefelometria, que utiliza o princípio da difração (desvio) da luz ao passar pela solução contendo esses imunocomplexos. Utilizou-se assim, o nefelômetro IMMAGE® (Beckman Coulter Ins., Califórnia, USA).

A determinação da IgE foi realizada por ensaio imunométrico usando o sistema Access2® (Beckman Coulter Ins., Califórnia, USA) cujo método de detecção é a quimioluminescência.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores de referência das imunoglobulinas para a faixa etária dos participantes, na época da inclusão no estudo.

Tabela 2. Valores de Referência para as Imunoglobulinas.

| IMUNOGLOBULINA | FAIXA ETÁRIA | VALORES DE REFERÊNCIA |
|---|---|---|
| **IgA** | **Até 4 meses** | **5 a 63 mg/dL** |
| **IgE** | **Até 1 ano** | **< 2 U/mL** |
| **IgG** | **Até 4 meses** | **135 a 893 mg/dL** |
| **IgM** | **Até 4 meses** | **13 a 135 mg/dL** |

Nota: Valores de Referência obtido da literatura. ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA. Guia de medicina laboratorial. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2008. (Guias de medicina ambulatorial e hospitalar).

### 6.2.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc.,USA). Através da interpolação da curva de calibração ($R^2$ = 0,96) foi possível obter as concentrações de IgG sérica anti-PCV10 em µg/mL e, logo em seguida, transformadas para ng/mL para uma melhor visualização. O teste de normalidade D'Agostino-Pearson foi utilizado para avaliar a distribuição das

variáveis. As variáveis quantitativas contínuas com distribuição normal foram expressas em média ± desvio padrão e as que não tiveram distribuição normal, em mediana com intervalo interquartil (IQR).

As análises das variáveis categóricas foram feitas pelo Teste Exato de Fisher ou do Qui-quadrado. Os testes não-paramétricos de Wilcoxon e de Mann-Whitney foram utilizados para comparação entre os grupos pareados ou independentes, respectivamente. Utilizou-se o teste t-Student não pareado para as variáveis independentes com distribuição normal.

Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valor de $P < 0,05$.

O ponto de corte (cutoff) da concentração sérica de anticorpos IgG foi determinado pelo método estatístico descrito por Frey, Di Canzio e Zurakowski (1998), através da fórmula Cutoff = $\overline{X}$ + SDf. Para um intervalo de confiança de 95%, o valor encontrado para o cutoff do ELISA foi de 1,022 ng/mL.

# 7.0 RESULTADOS

## 7.1 GRUPOS DE ESTUDO

Este estudo avaliou 43 crianças do gênero masculino e feminino, a partir dos 2 meses de idade, que foram selecionadas em dois postos de vacinação na cidade de Salvador/Bahia (CRIE/UFBA e 16° Centro de Saúde) e divididas em dois grupos, de acordo com o posto de saúde: (G1=CRIE) 13 crianças (8 do sexo masculino e 5 do sexo feminino) com diagnóstico de patologias e/ou imunodeficiências e (G2= 16ºCS) 30 crianças saudáveis (13 do sexo masculino e 17 do sexo feminino) As características demográficas das crianças estão apresentadas na Tabela 3. No grupo 1, das crianças selecionadas no CRIE, as mesmas são portadoras de doenças crônicas como doença neurológica, hemoglobinopatia, gastrosquise, ou são expostas ao vírus da imunodeficiência humana (HIV). Através de questionário (Anexo-E e Anexo-F) aplicado antes de todas coletas e informações fornecidas pelos responsáveis, foi possível obter os dados epidemiológicos das mesmas. Os responsáveis definiram as crianças com relação a sua raça, além disso, relataram se as mesmas estiveram doentes durante o intervalo entre as doses da vacina. No G1, 30,8% das crianças tiveram gripe e no G2, 16,6% tiveram gripe. As demais crianças de ambos grupos estiveram saudáveis durante o período ou os cuidadores não souberam informar a comorbidade.

Tabela 3. Características epidemiológicas das crianças incluídas no estudo, separadas de acordo com o Centro de Saúde.

| CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS | CRIE/UFBA (n=13) | 16° CENTRO DE SAÚDE (n=30) | Nível de significância P |
|---|---|---|---|
| **GÊNERO (MASCULINO/FEMININO)** | 8/5 | 13/17 | |
| **IDADE NA 1° DOSE (MESES), MEDIANA; IQR** | 2,0 (2,0 - 2,5) | 2,0 (2,0 - 2,0) | 0,7377 |
| **IDADE NA 4° DOSE (MESES), MÉDIA ± SD** | 23.9 ± 6.2 | 18.7 ± 4.1 | 0,0027 |
| **RAÇA DECLARADA (NEGRO, BRANCO, PARDO, MULATO, INDÍGENA)** | 6/1/4/1/1 | 4/7/19/0/0 | 0,0377 |
| **PATOLOGIAS/ IMUNODEFICIÊNCIAS:** | | | |
| **DOENÇA NEUROLÓGICA INCAPACITANTE** | 1/13 (7,7%) | 0/30 (0%) | |
| **HEMOGLOBINOPATIA - AS** | 1/13 (7,7%) | 1/30 (3,3%) | |
| **GASTROSQUISE** | 1/13 (7,7%) | 0/30 (0%) | |
| **EVENTO ADVERSO A OUTRAS VACINAS** | 1/13 (7,7%) | 0/30 (0%) | |
| **EXPOSTOS AO HIV** | 8/13 (61,5%) | 0/30 (0%) | |
| **SEM DIAGNÓSTICO PRÉVIO** | 1/13 (7,7%) | 0/30 (0%) | |
| **CRIANÇAS DOENTES NOS INTERVALOS VACINAIS** | 4/13 (30,8%) | 5/30 (16,6%) | 0,4173 |

## 7.2 PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI-PCV10

A concentração de anticorpos IgG séricos foi transformada em ng/mL após interpolação da curva de calibração com o valor de coeficiente de correlação ($R^2$) igual a 0,9630.

Avaliando-se, de uma forma geral, no grupo 1 e no grupo 2 houveram um aumento significativo na concentração de anticorpos IgG anti-PCV10 após a quarta imunização (P <0,0001, Teste de Kruskal-Wallis), como mostra a Figura 1.

No Grupo 1, crianças que apresentam uma maior susceptibilidade a doença pneumocócica, 12/13 (92%) das mesmas possuíam níveis séricos de IgG maiores que o ponto de corte definido em 1,022 ng/mL (mediana = 10,8 ng/mL, IQR = 3,0 - 18,5 ng/mL). Além disso, da 1ª para 4ª dose houve um aumento de 22 vezes na mediana (P= 0,0002), como revela a Figura 2(A).

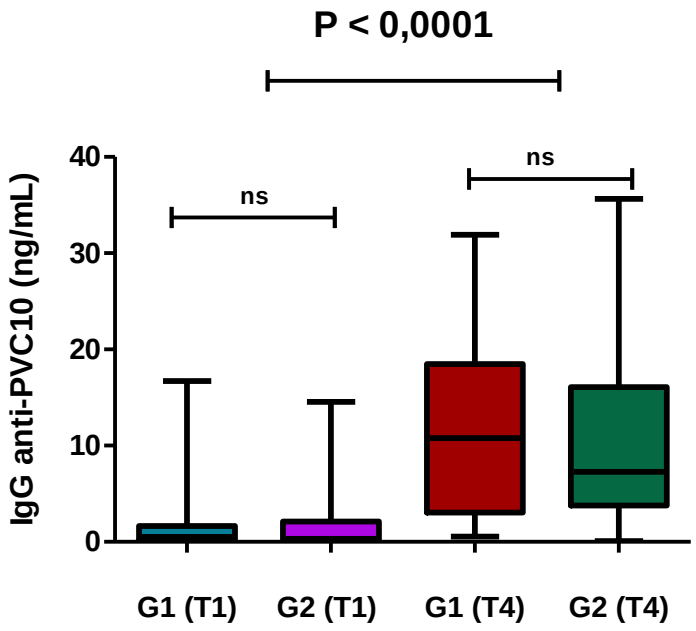


Figura 1. Níveis séricos de anticorpos IgG anti-PCV10 das crianças após 1ª (T1) e 4ª (T2) doses da vacina nos dois grupos de estudo. G1, T1: mediana = 0,5 ng/mL (IQR = 0,2 - 1,6 ng/mL) e T4: mediana = 10,8 ng/mL (IQR = 3,0 - 18,5 ng/mL). G2, T1: mediana = 0,3 ng/mL (IQR = 0,0 - 2,1 ng/mL) e T4: mediana = 16,0 ng/mL (IQR = 7,3 – 35,6 ng/mL). Mediana e intervalo interquartil (IQR) estão representados no boxplot.

No Grupo 2, crianças aparentemente saudáveis e com menor probabilidade à infecção, 29/30 (97%) tiveram uma resposta satisfatória acima do ponto de corte estabelecido (1,022 ng/mL). Além disso, da 1ª para 4ª dose houve um aumento de 53 vezes na mediana, como apresentado na Figura 2(B).

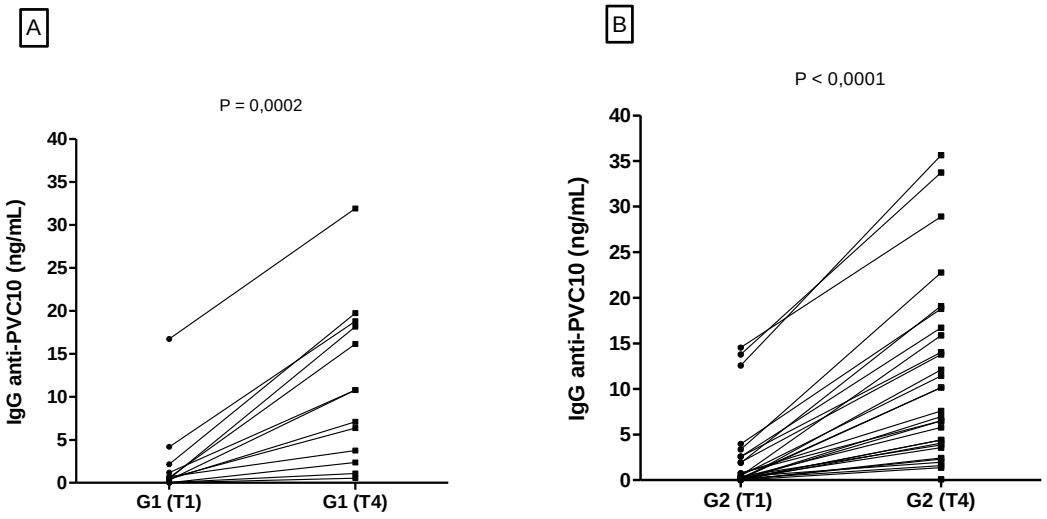


Figura 2. Níveis séricos de anticorpos IgG imediatamente após imunização com a 1ª dose da PCV10 (T1) e na 4ª dose da vacina (T4). A: Grupo 1 (G1); B: Grupo 2 (G2). Teste t-pareado de Wilcoxon.

Comparando-se os indivíduos pertencentes ao Grupo 1 com os do Grupo 2, é possível perceber a importância da dose de reforço na proteção contra doenças pneumocócicas. Crianças de ambos os grupos apresentaram boa resposta a PCV10 na 4ª dose (T4). De T1 para T4 houve um aumento de 19 vezes na mediana (Figura 3). Em T1 (após 1ª dose), a resposta vacinal ainda é nula ou muito abaixo do ponto de corte estabelecido. Em T4, das 43 crianças avaliadas, cerca de 5% não responderam após a 4ª dose, sendo uma criança de cada grupo.

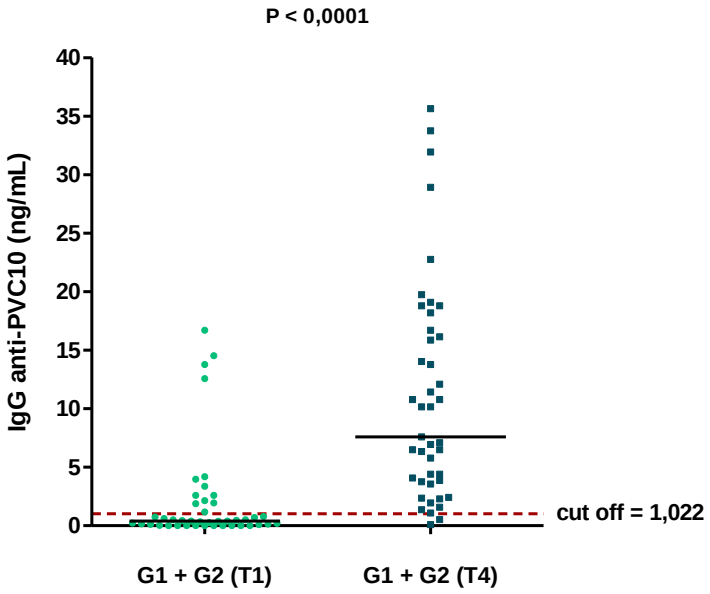


Figura 3. Avaliação da resposta vacinal anti-PCV10 nos dois grupos de crianças avaliados (G1 + G2). T1, mediana = 0,4 ng/mL, IQR = 0,0 – 1,9 ng/mL e T4, mediana = 7,6 ng/mL, IQR = 3,8 – 16,7 ng/mL). Teste não pareado de Mann-Whitney.

## 7.3 DOSAGENS DE IMUNOGLOBULINAS (IgA, IgM, IgG e IgE)

Para avaliar possível imunodeficiência de produção de anticorpos, as imunoglobulinas séricas foram quantificadas e avaliadas conforme os valores de referência mostrados na Tabela 2 e descritos na metodologia deste trabalho.

Os níveis séricos de IgM (mediana 21,5 mg/dL, IQR = 10,5 – 26,4) e IgG (mediana 259 mg/dL, IQR = 139 – 312) das crianças do Grupo 1 estavam significativamente mais baixos do que os níveis séricos das crianças do Grupo 2: IgM (mediana 31,5 mg/dL, IQR = 26,4 – 42,9), IgG (mediana 397 mg/dL, IQR = 315,5 – 480,5). Níveis séricos de IgA abaixo do limite de detecção do método de nefelometria foi encontrado em 8/13 das amostras do Grupo 1 e em 9/30 das amostras do Grupo 2. Apesar disso, as classes de IgA (mediana 22,8 mg/dL, IQR = 9,8 – 28,9) e IgE (mediana 7,1 U/mL, IQR = 2,9 – 18,8) do Grupo 1 tiveram níveis séricos semelhantes aos do Grupo 2: IgA, mediana 11,6 mg/dL (IQR = 7,9 – 19) e para a IgE, 6,9 U/mL (IQR = 3,2 – 16,7) (Figura 4 e Figura 5).

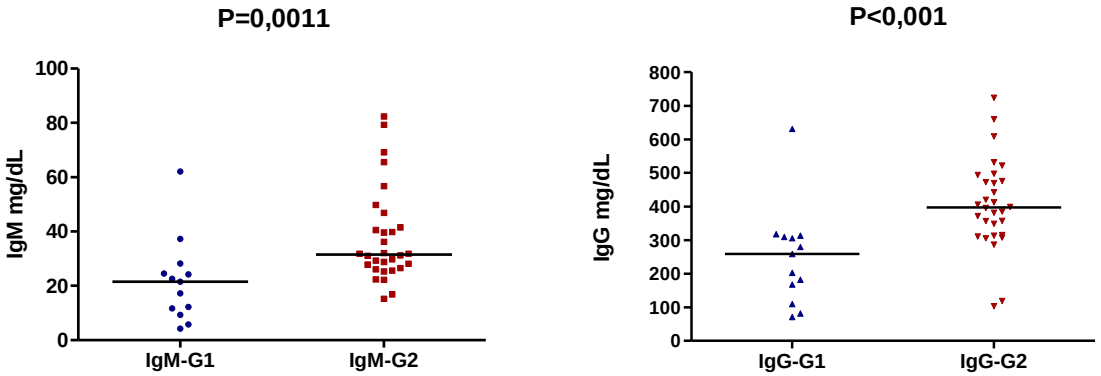


Figura 4. Níveis séricos das imunoglobulinas IgM e IgG, nos grupos de crianças (G1, G2) durante a fase inicial da vacinação com a PCV10. As linhas horizontais mostram as medianas. Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

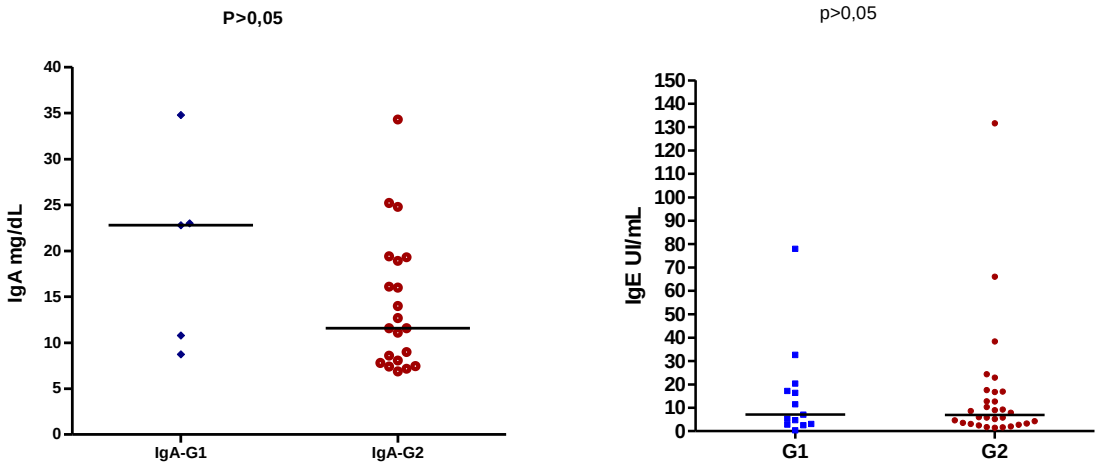


Figura 5. Níveis séricos das imunoglobulinas IgA e IgE, nos dois grupos de crianças (G1 e G2) durante a fase inicial da vacinação com a PCV10. As linhas horizontais mostram as medianas. Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Ao analisar os níveis séricos das imunoglobulinas das crianças em relação aos valores de referência descritos na Tabela 2, foi verificado que no Grupo 1 38,5% (5/13) das crianças possuíam IgM diminuída e 23% (3/13) com IgG inferior ao limite inferior de referência. Todavia, no Grupo 2 somente 6,7% (2/30) das crianças apresentaram níveis de IgG abaixo do valor preconizado.

Das 17 crianças que apresentaram níveis de IgA abaixo do detectável pela nefelometria (≤ 6,67 mg/dL) na 1ª amostra (T1), todas tiverem níveis detectáveis dessa imunoglobulina na 4ª amostra (T4), com mediana de 46 mg/dL (IQR= 27,2 – 58,5).

Quanto aos níveis de IgE, ocorreu grande discrepância dos valores séricos das crianças, tanto do Grupo 1 quanto do Grupo 2, com relação ao valor de referência (< 2 U/mL). No Grupo 1, 92% (12/13) das crianças apresentaram IgE elevada e, no Grupo 2, 90% (27/30) tiveram resultado acima do limite de referência.

Devido à presença de IgG materna na maioria das amostras das crianças que foram coletadas durante a 1ª dose da vacina, a dosagem da IgG sérica foi novamente realizada nas amostras coletadas após a 4ª dose da vacina.

No Grupo 1, durante a 1ª dose, as crianças tinham níveis séricos de IgG com mediana de 259 mg/dL (IQR = 139 – 312) e, após a 4ª dose, os níveis séricos de IgG passaram para uma mediana de 846 mg/dL (IQR = 737 – 1130), significando um aumento de três vezes na mediana da 1ª para a 4ª amostra (Figura 6).

No Grupo 2, na 1ª amostra, a mediana da concentração sérica de IgG foi de 397,5 mg/dL (IQR = 315,5 – 480,5) e, passou depois, para uma mediana de 886 mg/dL (IQR = 770,5 – 1043), representando um aumento de apenas 2 vezes entre a 1ª e 4ª amostra (Figura 6).

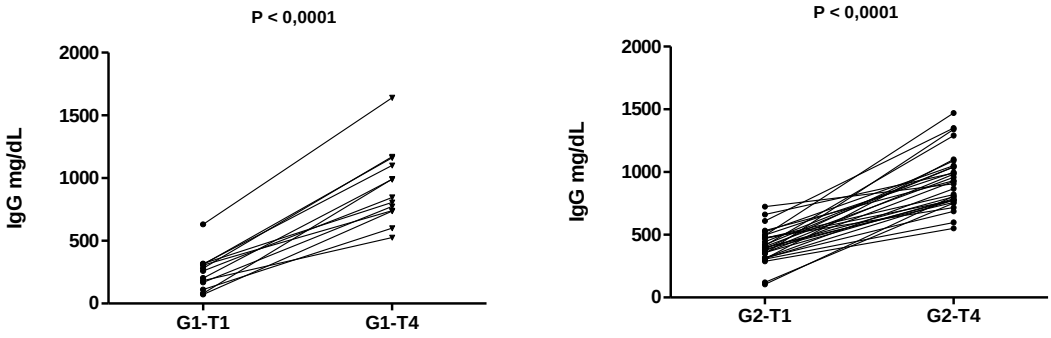


Figura 6. Níveis séricos de IgG, dos dois grupos de crianças (G1, G2), determinadas nas amostras coletadas durante a 1ª (T1) e 4ª (T2) doses vacinais. Teste t pareado de Wilcoxon.

## 8.0 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a imunogenicidade e a estimativa da eficácia da vacina pneumocócica 10-valente conjugada através da dosagem de anticorpos IgG de amostras biológicas oriundas de crianças aparentemente saudáveis e crianças com maior susceptibilidade a doenças pneumocócicas.

As infecções pneumocócicas são as principais causas de mortalidade e morbidade infantil em todo o mundo e a resistência do *Streptococcus pneumoniae* aos antibióticos tem sido uma grande preocupação, especialmente em países em desenvolvimento (WANG; CURTISS, 2014).

Os anticorpos antipolissacarídeos capsulares fornecem proteção sorotipo-específica (WERNETTE et al., 2003) e, baseado nisso, um formato de ELISA de terceira geração foi adotado por especialistas em reunião realizada no ano 2000, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em Genebra, Suíça.

Uma limitação do uso na rotina laboratorial do referido ELISA, é a necessidade de testar individualmente a resposta de anticorpos IgG para os diferentes sorotipos presentes nas vacinas. No ELISA padronizado neste trabalho, realizamos modificações no ensaio da OMS, conforme metodologia apresentada, caracterizada principalmente pelo uso da PCV10 como único antígeno investigado.

Não há na literatura descrição de uma metodologia que utilize a própria vacina como antígeno em busca de mensurar a concentração de anticorpos IgG contra os 10 sorotipos do pneumococo. Vários pesquisadores utilizam os sorotipos liofilizados isoladamente como antígenos (HAMMITT et al., 2014), visto que o uso de polissacarídeos altamente purificados para o revestimento da placa melhora a especificidade do ensaio (POOLMAN et al., 2010).

No entanto, a realização de um imunoensaio para cada sorotipo, para avaliação da resposta de anticorpos a uma vacina composta de 10 sorotipos, é bem mais oneroso e não muito prático para avaliação de resposta imune de grandes populações e com recursos financeiros limitados.

A análise quantitativa de anticorpos IgG para estimar resposta humoral de vacinas conjugadas tem sido constantemente descrita (HENCKAERTS, 2006; SKOVSTED, 2007; ARJUNARAJA; PAOLETTI; SNAPPER, 2012). Todavia, não há definição de ponto de corte ou valor de referência para avaliar a resposta sorológica para a PCV10 na população sadia e nem para indivíduos com maior suscetibilidade

de infecção pelo *S. pneumoniae*. Por conta disso, foi necessário definir um ponto de corte para a nossa população de estudo, e usado um método estatístico previamente descrito (FREY; DI CANZIO; ZURAKOWSKI, 1998).

A OMS definiu a concentração protetora mínima de anticorpos a ser utilizada para crianças saudáveis vacinadas de 0,35 µg/mL (SIBER et al., 2007). Um estudo comparativo realizado entre dois laboratórios, a fim de avaliar as diferenças entre dois imunoensaios enzimáticos, revelou que o ponto de corte de 0,35 µg/mL para o ELISA antipolissacarídeos não-22F é comparável à concentração de 0,20 µg/mL para ELISA 22F em indivíduos hígidos (HENCKAERTS et al., 2006).

Neste trabalho, apesar da limitação de não ser determinado os anticorpos específicos para cada sorotipo, foi mostrado que, com o corte em 1,022 ng/mL de anticorpos IgG (equivalente a aproximadamente 0,001 µg/mL), e utilizando a própria vacina diluída como antígeno, é possível usar essa modalidade de ELISA como um método de triagem para estimar a concentração geral desses anticorpos em inquéritos soroepidemiológicos.

Desta forma, foi possível determinar que 95% das crianças avaliadas apresentaram níveis séricos de anticorpos IgG anti-PCV10 após a 4ª dose da vacina, sem distinção entre grupo de crianças saudáveis e grupo de crianças de maior risco para infecção pneumocócica.

A doença pneumocócica invasiva é importante causa de morbi-mortalidade em crianças infectadas pelo HIV. Previamente, também foi realizado no Brasil um estudo com 40 crianças infectadas pelo HIV, entre 2 a 9 anos de idade para avaliar a resposta humoral da PCV7 antes da 1ª dose e após a 2ª dose (COSTA et al., 2008).

Utilizou-se nesse estudo supracitado, dois critérios de ponto de corte. Para o primeiro critério (≥1,3 µg/mL), 26 (65%) crianças obtiveram resposta sorológica à vacina, 12 (30%) delas apresentaram títulos de IgG pós-imunização em níveis de pelo menos 1,3 µg/mL para todos os sorotipos. Para o segundo critério (incremento >4 vezes nos títulos para quatro sorotipos ou mais), obteve-se resposta sorológica para 15 (37,5%) crianças (COSTA et al., 2008).

Outro trabalho, com 1.247 crianças residentes em Atlanta, Georgia, portadoras de doença falciforme, teve como objetivo avaliar o efeito da vacina pneumocócica conjugada 7-valente sobre as taxas de doença pneumocócica invasiva (DPI) entre essas crianças. Um declínio significativo na DPI foi observado após a introdução da PCV7, de 1,7 infecções por 100 pessoas-ano (1995-2000) para

0,5 infecções por 100 pessoas-ano (2001-2002), o que representou uma redução de 68% (ADAMKIEWICZ, et al., 2008).

Em 357 crianças saudáveis, residentes em Mali e na Nigéria, recrutadas em centros de vacinação, a PCV10 apresentou boa imunogenicidade num estudo de fase III, randomizado, aberto e controlado. Um mês após a 3° dose, 97,2% ou mais das crianças no grupo das vacinadas com a PCV10 tiveram uma concentração de anticorpos ≥ 0,2 µg/mL para cada sorotipo vacinal, exceto para o 6B (82,0%) e 23F (87,6%), versus <10% no grupo controle, que não recebeu as doses, exceto para os sorotipos 14 (35,7%) e 19F (22,5%) (DICKO et al.,2011). Esses resultados foram obtidos a partir de um ELISA 22-F.

É bem descrito também que os prematuros têm um risco aumentado para infecções pneumocócicas. Segundo Omeñaca e colaboradores (2013) a PCV10 apresentou alta imunogenicidade em prematuros. Esses pesquisadores dividiram 286 crianças em 3 grupos de acordo com os períodos gestacionais. Antes da primeira dose de vacina, porcentagens de indivíduos com concentrações de anticorpo ≥ 0,2 µg/mL tendiam a ser maior no grupo com mais de 36 semanas do que nos outros dois 2 grupos para a maioria dos sorotipos vacinais.

Após a terceira dose, para cada sorotipo, pelo menos 92,7% das crianças de cada grupo tiveram concentrações de anticorpo ≥ 0,2 µg/mL. A média das concentrações geométrica de anticorpos foram mais baixas em prematuros do grupo I (≥ 27 e < 31 semanas) para os sorotipos 4, 5, e 9V e em prematuros do grupo II (≥ 31 e < 37 semanas) para o sorotipo 9V quando comparado com o grupo de não prematuros (IC de 95%). Para tais resultados, um ELISA-22F foi realizado (OMEÑACA et al., 2013).

Esses autores mostram que crianças imunodeficientes tiveram boa resposta a vacinas conjugadas, tais como as crianças incluídas no Grupo 1 do nosso estudo, portadoras de doença neurológica, hemoglobinopatia, gastrosquise ou expostas ao HIV, em que 92% das mesmas tiveram concentração de anticorpo IgG acima do ponto de corte, sendo equivalente à resposta das crianças saudáveis do Grupo 2 (97%).

É possível verificarmos também a importância do número de doses vacinais para desenvolvimento da imunidade. Em um trabalho realizado com 552 crianças saudáveis no total, divididas em grupos que receberam 0,1,2 ou 3 doses da PCV7, depois de três doses da vacina, a concentração média geométrica (GMC) para todos

os 7 sorotipos foram ≥ 1.0 µg/mL, e mais de 85% das crianças alcançaram níveis de anticorpos ≥ 0.35 µ/mL (RUSSELL et al.,2009).

Além disso, com 18 semanas de idade, as proporções de crianças com concentrações de anticorpo ≥ 1.0 µg/mL foram significativamente menores para os sorotipos 6B (p <0,001), 14 (p = 0,004), e 23F (p <0,001) no grupo de duas doses quando comparado com o grupo de três doses (RUSSELL et al.,2009).

Nossa pesquisa mostrou que ocorreu um aumento de mais de 20 vezes na mediana após administração da 1ª para 4ª dose da PCV10 no Grupo 1, e mais de 50 vezes avaliando-se o Grupo 2. Portanto, independentemente da criança ter patologia ou não, a resposta foi satisfatória.

É importante registrar que, neste sistema, além da detecção dos prováveis anticorpos para os sorotipos capsulares presentes na vacina, incluem-se também anticorpos para os componentes proteicos incluídos na mesma, como a proteína D não tipável do *H. influenzae* (NTHi) e os toxóides tetânico e diftérico.

Outro recente trabalho revelou que a vacinação de crianças quenianas de 12-59 meses com duas doses da PCV10 com intervalos de dois a seis meses foi imunogênica. Nesse estudo de fase III, duplo-cego, randomizado e controlado, foram coletadas amostras de sangue de 375 crianças 30 dias após a 1ª dose e 30 dias após a 2ª dose e analisadas com ELISA 22F (HAMMITT et al., 2014).

Depois da 1ª dose da vacina, >90% das crianças (Grupo A e B) desenvolveram anticorpos IgG ≥ 0,35 µg/mL para os sorotipos 1, 4, 5, 7F, 9V e 18C quando comparado ao Grupo C (não imunizadas com a PCV10). Após a 2ª dose da vacina > 90% das crianças desenvolveram anticorpos IgG ≥ 0,35 µg/mL para todos os sorotipos vacinais (HAMMITT et al., 2014).

Nossa população de estudo, 43 crianças, apresentou boa resposta a PCV10 na 4ª dose. De T1 para T4 houve um aumento de 19 vezes na mediana de anticorpos IgG.

Adicionalmente, este trabalho também se propôs avaliar possível presença de deficiências de imunoglobulinas nos dois grupos (Grupo 1 e Grupo 2). Deficiência de imunoglobulina (Ig) é um fator de risco conhecido para infecções por *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae* e doenças invasivas notáveis (MARTINOT et al., 2014).

Como resultados, relatamos que 38,5% das crianças do Grupo 1 tiveram baixos níveis séricos de IgM e 23% apresentaram níveis séricos reduzidos de IgG.

Essas crianças apresentam uma probabilidade maior a doenças pneumocócicas invasivas (DPI) por pneumococo e, por conseguinte, a comorbidades, diferentemente das crianças do Grupo 2, em que apenas 6,7% apresentaram baixos níveis séricos de IgG. Não foi encontrado nenhum caso sugestivo de deficiência de IgA.

Num estudo com 119 pacientes adultos e crianças, hospitalizados devido a doenças invasivas, 110 casos por *Streptococcus pneumoniae*, 45 destes casos (37,8%) apresentavam certa anormalidade e 37 tinham deficiência de Ig (20 IgG <6 g/l, 4 IgA <0.7 g/l, e 13 IgM <0.5 g/l). Dentre esses 45 pacientes, 19 tiveram imunodeficiências primárias (imunodeficiência variável comum e deficiência completa de IgA) e 14 com deficiências secundárias, principalmente doenças linfoproliferativas (MARTINOT et al., 2014).

Infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV) aumenta ainda mais o risco de infecção por pneumococos em até 100 vezes. Acredita-se que um defeito na imunidade mediada por células T seja responsável pela alta carga de doença pneumocócica, todavia, uma deterioração da imunidade de células B, particularmente durante as primeiras fases da progressão do HIV, pode amplificar o defeito imunológico (IWAJOMO et al., 2011).

Avaliando-se 76 crianças HIV positivas e 37 crianças saudáveis africanas, o número de células B de memória específicas contra antígenos do pneumococo foi menor em crianças infectadas pelo HIV do que em não infectadas. Ocorre uma maior depleção das subpopulações de células B mesmo naquelas minimamente sintomáticas com uma proporção de células T CD4 de ≥15% (IWAJOMO et al., 2011).

Isso pode em parte explicar por que essas crianças são particularmente propensas à DPI e destaca a necessidade de novas abordagens para alcançar a proteção induzida pela vacina em longos períodos.

Também, muitos distúrbios de imunodeficiência primária predispõe o indivíduo a uma infecção com organismos de polissacarídeos revestidos, em particular os distúrbios imunológicos, que incluem uma deficiência da subclasse IgG2 (BOYLE et al., 2006).

Além disso, um grupo distinto de pacientes tem resposta sorológica baixa a antígenos polissacarídicos, mas níveis normais de imunoglobulinas e subclasses de IgG e respostas normais a antígenos proteicos. Este padrão de disfunção imune tem

sido chamado de deficiência de anticorpo específico (SAD), notificada mais frequentemente em crianças (BOYLE et al., 2006). No nosso estudo, apenas duas crianças (5%) não apresentaram níveis significativos de anticorpos IgG anti-PCV10, podendo representar casos sugestivos de SAD.

É bem descrito na literatura que durante a gravidez humana, a IgG materna é transportada da mãe para o feto através da placenta para conferir imunidade passiva para o feto. Por um lado, protege o feto de infecção e, por outro, protege o feto de uma rejeição imunológica pela mãe (LI et al., 2014).

Por conta disso, dosamos a IgG sérica não somente nas amostras após a 1ª dose da vacina, mas também após a 4ª dose, para verificar a produção própria de IgG das crianças avaliadas, desde que é possível encontrar IgG materna até os seis meses de idade. Em ambos os grupos encontramos um aumento de mais de 2 vezes nas medianas das concentrações de IgG, nem foi encontrado amostra com IgG sérica inferior a 400 mg/dL (valor referencial para crianças acima de 12 meses de idade).

Finalmente, sugerimos através de nossos achados, que a resposta imunogênica à PCV10 não é inferior em crianças portadoras de doenças crônicas e/ou imunodeficiências quando comparada com crianças hígidas. Sugerimos ainda, que é possível usar a vacina PCV10 para avaliação geral da resposta imunogênica por imunoensaio, como triagem, sem desconsiderar a detecção de anticorpos individuais específicos para os sorotipos presentes na vacina como teste padrão para avaliação de cobertura vacinal adequada em uma população.

## 9.0 CONCLUSÕES

1. A resposta imune humoral de anticorpos IgG pode ser estimada através da utilização da vacina conjugada que apresenta em sua composição 10 sorotipos pneumocócicos, como mostrou esse estudo pioneiro.

2. Imunogenicidade de anticorpos IgG a vacina pneumocócica conjugada 10-valente é satisfatória tanto em crianças portadoras de doenças crônicas ou potencialmente imunocomprometidas quanto em crianças saudáveis.

3. Os níveis de anticorpos aumentam significativamente da 1ª para a 4ª dose da vacina. A dose de reforço é fundamental para adequada imunoproteção de crianças mais susceptíveis a doenças pneumocócicas.

4. Níveis séricos mais baixos de IgG e IgM foram encontrados em crianças potencialmente imunocomprometidas em relação às crianças hígidas. A pesquisa de possível deficiência de imunoglobulinas nessa faixa etária é importante, devido a maior probabilidade de doenças invasivas causadas pelo pneumococo.

## 10.0 REFERÊNCIAS


1. ADAMKIEWICZ, T. V. et al. Effectiveness of the 7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Children With Sickle Cell Disease in the First Decade of Life. **Pediatrics**, v. 121, n. 3, mar. 2008.

2. ARJUNARAJA, S.; PAOLETTI, L. C.; SNAPPER, C. M. Structurally identical capsular polysaccharide expressed by intact Group B *Streptococcus* versus *Streptococcus pneumoniae* elicits distinct murine polysaccharide-specific IgG responses *in vivo.* **The Journal of Immunology**, v. 188, n.11, p. 5238–5246, 1 jun. 2012.

3. AVANZINI A. M. et al. Children with recurrent otitis show defective IFNγ-producing cells in adenoids. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 19, n. 6, p. 523–526, 2008.

4. BAKIR, M.; TÜREL, Ö.; TOPACHEVSKYI, O. Cost-effectiveness of new pneumococcal conjugate vaccines in Turkey: a decision analytical model. **BMC Health Services Research**, v. 386, n. 12, p.1-12, 2012.

5. BALACHANDRAN, P. et al. The Autolytic Enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* Is Not Responsible for Releasing Pneumolysin. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 10, p. 3108–3116, mai. 2001.

6. BALMER, P.; CANT, A. J.; BORROW, R. Anti-pneumococcal antibody titre measurement: what useful information does it yield? **Journal of Clinical Pathology**, v. 60, n. 4, p. 345-350, abr. 2007.

7. BEWLEY, M. A. et al. Pneumolysin Activates Macrophage Lysosomal Membrane Permeabilization and Executes Apoptosis by Distinct Mechanisms without Membrane Pore Formation. **MBio**, v. 5 , n. 5, p. 1-13, 2014.

8. BOYLE, R. J. et al. The clinical syndrome of specific antibody deficiency in children. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 146, n. 3, p. 486-492, dez. 2006.

9. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. **Informe Técnico da Vacina Pneumocócica 10-valente (conjugada)**. Brasília, DF, fev. 2010. p. 5. Disponível em: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_723_infotec.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2014.

10. COSTA, I. C. et al. Evaluation of humoral response to heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in HIV-infected children. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 5, p. 844-850, 2008.

11. DAGAN, R.; FRASCH, C. Clinical characteristics of a novel 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine candidate (PHiD-CV). Introduction. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 4, p. S63-S65, abr. 2009.

12. DEL AMO, E. et al. High invasiveness of pneumococcal serotypes included in the new generation of conjugate vaccines. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 7, p. 684-689, jul. 2014.

13. DICKO, A. et al. Primary vaccination with the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) in infants in Mali and Nigeria: a randomized controlled trial. **BMC Public Health**, v. 882, n. 11, p. 1-12, 2011.

14. DOMINGUES, C. M. et al. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. **The Lancet Respiratory Medicine**, v.2, n. 6, p. 464-471, jun. 2014.

15. DRAING, C. et al. Cytokine induction by Gram-positive bacteria. **Immunobiology**, v. 213, p. 285–296, 2008.

16. EARNSHAW, S. R. et al. Cost-effectiveness of 2 + 1 dosing of 13-valent and 10-valent pneumococcal conjugate vaccines in Canada. **BMC Health Services Research**, v. 101, n. 12, p.1-13, 2012.

17. FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for Immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v. 221, p. 35-41, 1998.

18. HAMMITT, L. L. et al. Immunogenicity, Impact on Carriage and Reactogenicity of 10-Valent Pneumococcal Non-Typeable *Haemophilus influenzae* Protein D Conjugate Vaccine in Kenyan Children Aged 1–4 Years: A Randomized Controlled Trial. **PLOS ONE Journal Information**, v. 9, n. 1, p. 1-10, jan. 2014.

19. HAMMITT, L. L. et al. Population effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and non-typeable *Haemophilus influenzae* in Kilifi, Kenya: findings from cross-sectional carriage studies. **The Lancet Global Health**, v. 2, p. 397-405, jul. 2014.

20. HENCKAERTS, I. et al. Critical Differences between Pneumococcal Polysaccharide Enzyme-Linked Immunosorbent Assays with and without 22F Inhibition at Low Antibody Concentrations in Pediatric Sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, n. 3, p. 356–360, mar. 2006.

21. HU, D. K. et al. Roles of virulence genes (PsaA and CpsA) on the invasion of *Streptococcus pneumoniae* into blood system. **European Journal of Medical Research**, v. 18, n. 14, p. 1-6, 17 mai. 2013.

22. IWAJOMO, O. H. et al. Deteriorating Pneumococcal-Specific B-Cell Memory in Minimally Symptomatic African Children With HIV Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 4, p. 534-543, 15 ago. 2011.

23. KLUGMAN, K. P. et al. A Trial of a 9-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Children with and Those without HIV Infection. **The new england journal of medicine**, v. 349, n. 14, p. 1341-1348, 2 out. 2003.

24. KONEMAN, Elmer W. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, c2008. 707-712p.

25. KÜNG, E. et al. The Pneumococcal Polysaccharide Capsule and Pneumolysin Differentially Affect CXCL8 and IL-6 Release from Cells of the Upper and Lower Respiratory Tract. ***PLOS ONE* Journal Information**, v. 9, n. 3, p. 1-6, mar.2014.

26. LI, J. et al. Two ultrastructural distribution patterns of immunoglobulin G in human placenta and functional implications. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 5, p. 1-25, nov. 2014.

27. LIU, X.; HAN, Q.; LENG. J. Analysis of nucleotide-binding oligomerization domain proteins in a murine model of pneumococcal meningitis. **BMC Infectious Diseases**, v. 648, n. 14, p.1-6, 2014.

28. MADHI, S. A. et al. Inferior quantitative and qualitative immune responses to pneumococcal conjugate vaccine in infants with nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* during the primary series of immunization. **Vaccine**, v. 29, p. 6994– 7001, 2011.

29. MARIMÓN, J. M. et al. Molecular epidemiology and variants of the multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* Spain$^{14}$-5 international clone among Spanish clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, n. 4, p. 654–660, 2006.

30. MARTINOT, M. et al. Immunoglobulin deficiency in patients with *Streptococcus pneumonia* or *Haemophilus influenzae* invasive infections. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 19, p. 79-84, 2014.

31. MENEZES, A. P. O. et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000–2007. **Vaccine**, v. 29, n. 6, p. 1139–1144, 1 fev. 2011.

32. MITCHELL, T. J. Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae.* **Research in Microbiology**, v. 151, p. 413–419, 2000.

33. MUNÕZ-ALMAGRO, C.; SELVA, L.; PALLARES, R. Influence of pneumococcal vaccine on the incidence of empyema. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.16, n. 4, p. 394-398, jul. 2010.

34. MOREIRA, L. O. et al. The TLR2-MyD88-NOD2-RIPK2 signalling axis regulates a balanced pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory cytokine response to Gram-positive cell walls. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2067–2077, 2008.

35. OMEÑACA, F. et al. Immunization of Preterm Infants With 10-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine. **Pediatrics**, v. 128, n. 2, ago. 2011.

36. PICARD, C.; CASANOVA, J. L.; PUEL, A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IκBα deficiency. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 490–497, jul. 2011.

37. POOLMAN, J. T. et al. Evaluation of Pneumococcal Polysaccharide Immunoassays Using a 22F Adsorption Step with Serum Samples from Infants Vaccinated with Conjugate Vaccines. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n.1, p. 134–142, jan. 2010.

38. RICCI, S. et al. Contribution of different pneumococcal virulence factors to experimental meningitis in mice. **BMC Infectious Diseases**, v. 444, n. 13, p. 1-11, 2013.

39. RUSSELL, F. M. et al. Immunogenicity following one, two, or three doses of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. **Vaccine**, v. 27, p. 5685–5691, 2009.

40. SHARMA, S. K.; CASEY, J. R.; PICHICHERO, M. E. Reduced Serum IgG Responses to Pneumococcal Antigens in Otitis-Prone Children May Be Due to Poor Memory B-Cell Generation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 8, p. 1225–1229, 2012.

41. 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. **The Lancet Respiratory Medicine**, v.2, n. 5, p. 387-394, mai. 2014.

42. SKOVSTED, I. C. Purification and structure characterization of the active component in the pneumococcal 22F polysaccharide capsule used for adsorption in pneumococcal enzyme-linked immunosorbent assays. **Vaccine**, v. 25, n. 35, p. 6490–6500, 29 ago. 2007.

43. SLOTVED, H.-C. et al. Developing an ELISA using serotype-specific antigens from selected pneumococcal strains of own selection. **Vaccine**, v. 25, p. 2513–2517, 2007.

44. TOBUDIC, S. et al. Randomized, Single Blind, Controlled Trial to Evaluate the Prime-Boost Strategy for Pneumococcal Vaccination in Renal Transplant Recipients. **PLOS ONE Journal Information**, v. 7, n. 9, p. 1-7, set. 2012.

45. VESIKARI, T. et al. Immunogenicity of the 10-Valent Pneumococcal Non-typeable *Haemophilus influenzae* Protein D Conjugate Vaccine (PHiD-CV) Compared to the Licensed 7vCRM Vaccine. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 4, p. S66-S76, abr. 2009.

46. WANG, S.; CURTISS, R. Development of *Streptococcus pneumoniae* Vaccines Using Live Vectors. **Vaccines** *(Basel)*, v. 2, n. 1, p. 49–88, 7 jan. 2014.

47. WELLMER, A. et al. Decreased Virulence of a Pneumolysin-Deficient Strain of *Streptococcus pneumoniae* in Murine Meningitis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6504–6508, nov. 2012.

48. WERNETTE, C. M. et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantitation of Human Antibodies to Pneumococcal Polysaccharides. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 4, p. 514–519, jul. 2003.

49. XIA, Y.; GUO, X. G.; ZHOU, S. Rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Thoracic Disease**, v. 6. n. 9, p 1193-1199, set. 2014.

50. YESILKAYA, H. et al. Role of manganese-containing superoxide dismutase in oxidative stress and virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2819-2826, mai. 2000.

51. ZHANG, Q. et al. Low CD4 T Cell Immunity to Pneumolysin Is Associated with Nasopharyngeal Carriage of Pneumococci in Children. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 8, p. 1194-1202, 15 abr. 2007.

52. ZHANG, S.; WILSON, F.; PACE, L. *Streptococcus pneumoniae*-associated cellulitis in a two-month-old Domestic Shorthair kitten. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 221, n. 18, p. 221-224, 1 mar. 2006.

# ANEXOS

## ANEXO A: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA I

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

Salvador, 30 de junho de 2011.

**PARECER**

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

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

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

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

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

Salvador, 30 de junho de 2011.

**Almir Silva Ferreira**
Téc. Capacitação/CDRH/SMS.

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

# ANEXO B: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA II

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

## PARECER ADENDO CEP/HUPES

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

O referido adendo solicita as seguintes modificações:

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

**Protocolo CEP/HUPES – 04/2011**

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

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

# ANEXO C: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA III

## Parecer Consubstanciado de Projeto

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

**Pesquisador Responsável** Joice Neves Reis Pedreira .

| Data da Versão 15/12/2010 | Cadastro 04/11 | Data do Parecer 19/05/2011 |
|---|---|---|

**Grupo e Área Temática** I.8 Cooperação estrangeira

**Objetivos do Projeto**
Estimar o impacto da vacina conjugada PCV10 em infecções invasivas na cidade de Salvador e avaliar o impacto da mesma em eventos de colonização nasofaringeana pelo pneumococo em dois grupos de crianças, sendo um vacinado e outro contactante dos vacinados.

**Sumário do Projeto**
Apresenta boa fundamentação teórica sobre vacinas pneumocócicas e infecções pneumococicas em crianças. Justifica adequadamente a realização do projeto considerando-se que o amplo uso da PCV7 em outros países alterou a epidemiologia da colonização e da doença invasiva pneumocócica, aumentando a doença por sorotipos não-vacinais. No Brasil, muito provavelmente, o benefício em longo prazo da vacina conjugada (PCV10) está comprometido pela substituição dos sorotipos vacinais por não-vacinais. Assim, manter e ampliar os sistemas de vigilância para doença pneumocócica invasiva na era de implantação da vacina é essencial para compreender a dinâmica da transição nos eventos de colonização e o impacto da mesma na doença invasiva.
O desenho para o estudo de colonização caracteriza-se como de coorte prospectiva a ser realizado no CRIE (Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais) da UFBA. Serão selecionadas crianças com idade entre 6 semanas e menores que 2 anos (grupo dos expostos) e menores ou igual a 6 anos (grupo comparação). Os procedimentos de coleta e processamento do material e amostras para estudo estão bem detalhados no método. Será desenvolvido paralelamente uma vigilância epidemiológica para identificar as culturas positivas de fluido cérebro-espinhal para S. pneumoniae no Hospital Couto Maia.
Os critérios de inclusão e de exclusão estão descritos, orçamento, referências bibliográfias e local de realização do estudo, bem como as avaliações finais. As análises estatísticas estão descritas.

| *Aspectos relevantes para avaliação* | *Situação* |
|---|---|
| Título | Adequado |
| Relação dos Pesquisadores | Adequada |
| Local de Origem na Instituição | Adequado |
| Projeto elaborado por patrocinador | Não |
| Local de Realização | Outro (citar no comentário) |
| Outras instituições envolvidas | Não |
| Condições para realização | Adequadas |
| Introdução | Adequada |
| Objetivos | Adequados |
| Método | |
| Tipo de projeto | Pesquisa em Seres Humanos |
| Delineamento | Adequado |
| Tamanho de amostra | Total Na Instituição |
| Cálculo do tamanho da amostra | Não informado |
| Participantes pertencentes a grupos especiais | Menores de 18 anos |
| Seleção eqüitativa dos indivíduos participantes | Adequada |
| Critérios de inclusão e exclusão | Adequados |
| Relação risco- benefício | Adequada |
| Uso de placebo | Não utiliza |

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

Recomendação

**Aprovar**

Comentários Gerais sobre o Projeto

**Projeto Aprovado.**

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

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

**Informações ao pesquisador:**

**• O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).**

**• O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.**

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

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

ROBERTO BADARÓ, MD PHD
Coordenador CEP
CHUPES

## ANEXO D: TERMO DE COMPROMISSO LIVRE E ESCLARECIDO

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

**Paciente:_____ No. de estudo:_____**
**Para ser lido a todos responsáveis legais dos pacientes menores**: As informações que se seguem descrevem o estudo de pesquisa e o seu papel como participante. O entrevistador responderá a quaisquer perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo de pesquisa. Por favor, ouça com atenção e não hesite em fazer qualquer pergunta sobre a informação que está sendo fornecida.

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

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

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

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

responsável por nenhuma despesa associada a este estudo de pesquisas, nem receberá compensação financeira. Você receberá uma cópia deste formulário.

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

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

**Consentimento**:

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

_____ _____ _____
Assinatura do paciente Data Hora

Impressão datiloscopia do paciente

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

_____ _____ _____
Assinatura do pai ou mãe ou responsável legal Data hora

Impressão datiloscopia do pai ou mãe ou guardião legal

_____ _____ _____
Assinatura do Investigador Data Hora

_____ _____ _____
Assinatura da testemunha Data Hora

## ANEXO E: MODELO DO QUESTIONÁRIO APLICADO AS CRIANÇAS DO CRIE/UFBA (P) APÓS 1°, 2°, 3° E 4° DOSES DA VACINA.

UFBA

**QEPIP1- Questionário Epidemiológico**
**Caso P1**

**Estudo do Impacto da Vacina Pneumocócica**

| Etiqueta | Codificado | | 1ª Digitação | | 2ª Digitação | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | CDIND | DCDIND | DGIND | DDGIND | DG2IND | DDG2IND |
| | | | | | | |

| | | |
|---|---|---|
| | Data da Entrevista: | DEINDP1 |
| | Iniciais do Entrevistador: | EINDP1 |

**I. IDENTIFICAÇÃO:**

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 | Nº de Identificação no estudo: | EIVP1 \|__\|__\|__\|__\|__\| |

**II. HISTÓRIA EPIDEMIOLÓGICA**

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

**III. DADOS DOMICILIARES**

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

**IV. COMORBIDADES**

| | | |
|---|---|---|
| 4.1 | O indivíduo apresenta alguma das doenças abaixo? (1=SIM; 2=NÃO; 8=NÃO SE APLICA; 9= NÃO SABE)<br>Asplenia anatômica e funcional I__I<br>Diabetes melitus I__I<br>Doença cardiovascular I__I<br>Doença neurológica incapacitante I__I<br>Doenças de depósito I__I<br>Doença pulmonar crônica (incluindo asma) I__I<br>Hepatopatia crônica I__I<br>Imunodeficiência congênita I__I<br>Imunodeficiência adquirida (HIV,uso corticóide, QT/RT, outros) I__I<br>Hemoglobinopatias I__I<br>Renal crônico I__I<br>Bebê exposto ao HIV I__I<br>Outro I__I Qual? _____<br>Qual idade a criança tinha quando a doença foi detectada? (em meses) I__I__I | COMORBP1\|__\|<br>AAFP1 \|__\|<br>DMP1 \|__\|<br>DCVP1 \|__\|<br>DNIP1 \|__\|<br>DDP1 \|__\|<br>DPCP1 \|__\|<br>HECP1 \|__\|<br>ICP1 \|__\|<br>IAP1 \|__\|<br>HMGP1 \|__\|<br>RCP1 \|__\|<br>BBHIVP1 \|__\|<br>QCOMORBP1 \|__\|<br>QIDADEP1 \|__\|__\| |

**V. FATORES DE RISCO PARA COLONIZAÇÃO NASOFARINGEANA**

| | | |
|---|---|---|
| 5.1 | A criança esteve doente no último mês?<br>Sim [1] Não [2] Não sabe [9] | CDOENP1 \|__\| |

26/05/2011 1/2 Versão : 01

QUEST_IMPACTO VP_CASO_MODIFICADO (1).DOC IMPACTO DA PCV10

UFBA

# QEPIP1- Questionário Epidemiológico
## Caso P1

| | | |
|---|---|---|
| 5.2 | Caso sim, a criança teve alguma das doenças abaixo no último mês?<br>1 Gripe; 2 Bronquite; 3 Sinusite; 4 Otite; 5 Pneumonia; 6 Outra; 8 Não se aplica; 9 Não sabe<br>Se outra, qual?_____ | DOENCAP1 \|__\|<br>QDOENCAP1_____<br>_____ |
| 5.3 | A criança ficou internada?<br>Sim [1] Não [2] Não se aplica [8] Não sabe [9]<br>Caso sim, em que unidade de saúde?<br>_____ | INTERNP1 \|__\|<br>QINTERNP1<br>_____ |
| 5.4 | A criança fez uso de algum antibiótico?<br>Sim [1] Não [2] Não se aplica [8] Não sabe [9]<br>Caso sim, qual?<br>_____ | ANTIBP1 \|__\|<br>QANTIBP1<br>_____ |
| 5.5 | O paciente vai para creche?<br>Sim [1] Não [2] Não se aplica [8] Não sabe [9] | CREP1 \|__\| |
| 5.6 | O paciente freqüenta escola?<br>Sim [1] Não [2] Não se aplica [8] Não sabe [9] | ESCP1 \|__\| |

## VI. IMUNIZAÇÃO

| | | |
|---|---|---|
| 6.1 | Qual a data em que fez uso da vacina pneumocócica (1ª DOSE)? | DVACP__/___/____ |
| 6.2 | Qual o lote da vacina?<br>_____ | LOTVP1<br>\|__\|__\|__\|__\|__\|__\|__\|<br>\|__\|__\|__\|__\|__\| |
| 6.3 | Qual o tipo de vacina?<br>PCV10 [1] PCV13 [2] | TIPVAP1 \|__\| |
| 6.4 | Fez uso da Vacina em que lugar:<br>1 CRIE<br>2 16º Posto de saúde do distrito da Liberdade | LVACP1 \|__\| |
| 6.5 | Foi coletado o swab da nasofaringe da criança?<br>Sim [1] Não [2] | CNASOP1 \|__\| |
| 6.6 | Foi coletado o sangue da criança?<br>Sim [1] Não [2] | CSANGUEP1 \|__\| |

## ANEXO F: MODELO DO QUESTIONÁRIO APLICADO AS CRIANÇAS DO 16° CENTRO DE SAÚDE (C) APÓS 1°, 2°, 3° E 4° DOSES DA VACINA.

UFBA

# Questionário Epidemiológico Grupo Comparação C1

**Estudo do Impacto da Vacina Pneumocócica**

| Etiqueta | 1ª Digitação | | 2ª Digitação | |
|---|---|---|---|---|
| | DGEPI | DDGEPI | DG2EPI | DDG2EPI |

| | | |
|---|---|---|
| | Data da Entrevista: | DEINDC1 |
| | Iniciais do Entrevistador: | EINDC1 |

**I. IDENTIFICAÇÃO:**

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 | Nº de Identificação do indivíduo caso no estudo: | EIVC1 \|__\|__\|__\|__\| |

**II. HISTÓRIA EPIDEMIOLÓGICA**

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

**III. DADOS DOMICILIARES**

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

**IV. COMORBIDADES**

| | | |
|---|---|---|
| 4.1 | O indivíduo apresenta alguma das doenças abaixo? (1=SIM; 2=NÃO; 8=NÃO SE APLICA; 9= NÃO SABE) \|__\|<br>Asplenia anatômica e funcional \|__\|<br>Diabetes melitus \|__\|<br>Doença cardiovascular \|__\|<br>Doença neurológica incapacitante \|__\|<br>Doenças de depósito \|__\|<br>Doença pulmonar crônica (incluindo asma) \|__\|<br>Hepatopatia crônica \|__\|<br>Imunodeficiência congênita \|__\|<br>Imunodeficiência adquirida (HIV,uso corticóide, QT/RT, outros) \|__\|<br>Hemoglobinopatias \|__\|<br>Renal crônico \|__\|<br>Bebê exposto ao HIV \|__\|<br>Outro \|__\| Qual? _____<br>Qual idade a criança tinha quando a doença foi detectada? (em meses) \|__\| | DOENCAC1\|__\|<br><br>AAFC1 \|__\|<br>DMC1 \|__\|<br>DCVC1 \|__\|<br>DNIC1 \|__\|<br>DDC1\|__\|<br>DPCC1 \|__\|<br>HECC1 \|__\|<br>ICC1 \|__\|<br>IAC1 \|__\|<br>HMGC1 \|__\|<br>RCC1 \|__\|<br>BBHIVC1 \|__\|<br>QUALC1 \|__\|<br>QIDADEC1 \|__\|__\| |

**V. FATORES DE RISCO PARA COLONIZAÇÃO NASOFARINGEANA**

| | | |
|---|---|---|
| 5.1 | A criança esteve doente no último mês?<br>Sim [1] Não [2] Não se aplica [8] Não sabe [9] | CDOENC1 \|__\| |

21/12/2011 1/2 Versão : 02

QUEST_IMPACTO VP_COMPARACAO_MODIFICADO.DOCO IMPACTO DA PCV10

UFBA

# Questionário Epidemiológico Grupo Comparação C1

| | | |
|---|---|---|
| 5.2 | Caso sim, a criança teve alguma das doenças abaixo?<br>1 Gripe<br>2 Bronquite<br>3 Sinusite<br>4 Otite<br>5 Pneumonia<br>6 Outra<br>8 Não se aplica<br>Se outra, qual?_____ | DOENCAC1 \|__\|<br>QDOENCAC1_____<br>_____ |
| 5.3 | A criança ficou internada?<br>Sim [1] Não [2] Não se aplica [8] Não sabe [9]<br>Caso sim, em que unidade de saúde?<br>_____ | INTERNC1 \|__\|<br>QINTERNC1<br>_____ |
| 5.4 | A criança fez uso de algum antibiótico?<br>Sim [1] Não [2] Não se aplica [8] Não sabe [9]<br>Caso sim, qual?<br>_____ | ANTIBC1 \|__\|<br>QANTIBC1<br>_____ |
| 5.5 | O paciente vai para creche?<br>Sim [1] Não [2] Não se aplica [8] Não sabe [9] | CREC1 \|__\| |
| 5.6 | O paciente freqüenta escola?<br>Sim [1] Não [2] Não se aplica [8] Não sabe [9] | ESCC1 \|__\| |

## VI. IMUNIZAÇÃO

| | | |
|---|---|---|
| 6.1 | Qual a data em que fez uso da vacina pneumocócica (1ª DOSE)?<br>____/_____/_____ | DVACC__/___/____ |
| 6.2 | Qual o lote da vacina?<br>_____ | LOTVC1<br>\|__\|__\|__\|__\|__\|__\|__\|<br>\|__\|__\|__\|__\| |
| 6.3 | Qual o tipo de vacina?<br>PCV10 [1] PCV13 [2] | TIPVAC1 \|__\| |
| 6.4 | Fez uso da Vacina em que lugar:<br>1 CRIE<br>2 16º Posto de saúde do distrito da Liberdade | LVACC1 \|__\| |
| 6.5 | Foi coletado o swab da nasofaringe da criança?<br>Sim [1] Não [2] | CNASOC1 \|__\| |
| 6.6 | Foi coletado o sangue da criança?<br>Sim [1] Não [2] | CSANGUEC1 \|__\| |

## ANEXO G: QUESTIONÁRIO SOBRE DADOS PESSOAIS DAS CRIANÇAS DE AMBOS OS GRUPOS.

UFBA

# Questionário M01IND01

**Projeto: Estudo do Impacto da Vacina Pneumocócica**

**Estudo do Impacto da Vacina Pneumocócica**

**Questionário de Dados Pessoais**

| Etiqueta | Codificado | | 1ª Digitação | | 2ª Digitação | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | CDIND | DCDIND | DGIND | DDGIND | DG2IND | DDG2IND |

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

| | | |
|---|---|---|
| | Data da Entrevista: | DEIND1 |
| | Iniciais do Entrevistador: | EIND1 |

**I. IDENTIFICAÇÃO:**

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 | Nº do estudo: | NEIVP1 |
| 1.4 | Termo de consentimento: Sim: 1 Não: 0 | CONS |
| 2.1 | Nome: | NOME |
| 2.2 | Apelido: | APE |
| 2.6 | Data de Nascimento: | NASC |
| 2.7 | Contactantes: | CONTACT |

**II. ENDEREÇO:**

| | | |
|---|---|---|
| 3.1 | Rua / N°: | ENDER |
| 3.2 | Telefone (n° e nome de contato): | TEL |
| 3.3 | Ponto de Referencia: | REF |
| 3.4 | Bairro: | BAI |
| 3.5 | Cidade: | CID |