Sağlıklı Çocuklarda Konjuge Pnömonokok Aşısı Uygulaması Sonrası Pnömonokokal Menenjit ve Bakteriyemi Hastalık Yükü, Serotip Dağılımı ve Antibiyotik Direnci: Tek Merkez Deneyimi

Burden of Pneumococcal Meningitis and Bacteremia, Serotype Distribution and Antibiotic Resistance in Healthy Children After Conjugated Pneumococcal Vaccine Implementation: Single Center Experience

Halil ÖZDEMİR¹(ID), Nihal EKİN DAĞ²(ID), Esra ÇAKMAK TAŞKIN¹(ID), Hatice Kübra KONCA¹(ID), Gül ARG¹(ID), Selin NAR ÖTGÜN³(ID), Haluk GÜRİZ⁴(ID), Atilla ELHAN⁵(ID), Ergin ÇİFTÇİ¹(ID), Erdal İNCE¹(ID)

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı, Ankara.

¹ Ankara University Faculty of Medicine, Division of Pediatric Infectious Diseases, Ankara, Turkey.

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

² Ankara University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Ankara, Turkey.

³ Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı, Ankara.

³ Republic of Turkey Ministry of Health, General Directorate of Public Health, National Respiratory Pathogens Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

⁴ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Cebeci Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

⁴ Ankara University Faculty of Medicine, Cebeci Hospital Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

⁵ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara.

⁵ Ankara University Faculty of Medicine, Department of Biostatistics, Ankara, Turkey.

Makale Atfı: Özdemir H, Ekin Dağ N, Çakmak Taşkın E, Konca HK, Arga G, Nar Ötgün S ve ark. Sağlıklı çocuklarda konjuge pnömonokok aşısı uygulaması sonrası pnömonokokal menenjit ve bakteriyemi hastalık yükü, serotip dağılımı ve antibiyotik direnci: tek merkez deneyimi. Mikrobiyol Bul 2021;55(4):492-506.

ÖZ

Türkiye’de yedi bileşenli konjuge pnömonokok aşısı (KPA7), çocukluk çağı ulusal aşı takvimine Nisan 2008’de alınmış ve Nisan 2011’de bu aşı yerini 13-bileşenli konjuge pnömonokok aşısına (KPA13) bırakmıştır. Geriye dönük tek merkezli gerçekleştirilen bu çalışmada, KPA7 ve KPA13’ün uygulamaya başlanmasından sonra invaziv pnömonokok hastalığı (IPH) nedeni ile *Streptococcus pneumoniae* üreyen çocuk hasta izolatlarında serotip dağılımı ve antibiyotik direncinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya Ekim 2009 ile Ekim 2019 tarihleri arasında menenjit ve sepsis/bakteriyemi tanısı konulan 50 çocuk hasta dahil edilmiştir. Çocuk hasta grubu, önceden sağlıklı olup kan veya beyin omurilik sıvılarında *S.pneumoniae* izole edilen menenjit ve sepsis/bakteriyemi tanısı alan hastalardan oluşmuştur. Pnömoni ilişkili bakteriyemi ve ampiyem tanısı olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. İzolatların serotiplendirme işlemi özgül antiserumlar (Statens Serum Institute, Danimarka) kullanılarak Quellung reaksiyonu ile yapılmış ve antibiyotik (penisilin

ve seftriakson) duyarlılıkları ise Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)] kriterleri temel alınarak antibiyotik gradiyent yöntemiyle belirlenmiştir. Çocukların 29 (%58)'u erkek, 21 (%42)'i kız olarak saptanmış ve hastaların ortalama yaşı 19 ay (1 ay-18 yıl) olarak hesaplanmıştır. Beş yaş altındaki çocuklar değerlendirildiğinde 30 (%79) hastanın gizli bakteriyemi/sepsis ve 8 (%21)'inin menenjit tanısı aldığı saptanmıştır. Çalışma süresince beş yaş altı sağlıklı çocuklarda yıllık İPH sıklığının, 2009 yılında 100 000 hastane başvurusunda 9.35 olduğu, bu değer 2019'da 0.83'e gerilediği istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($p < 0.001$). Elde edilen 50 pnömokok izolatının 44'ünün serotip tanımlaması yapılmıştır. Ancak altta yatan hastalığı olan altı hasta değerlendirilmeye alınmadığı için geriye kalan 38 izolatın sırasıyla %28.9 ($n = 11$) ve %44.7 ($n = 17$) oranında KPA7 ve KPA13 içeriğindeki serotiplerinden biri olduğu tespit edilmiştir. KPA7 döneminde görülen KPA13 serotiplerinin oranı %81.8 iken, KPA13 uygulaması sonrası sekiz yıl içinde bu oranın %29.6'ya gerilediği saptanmıştır. Aşı dışı serotiplerin oranı ise KPA7 döneminde %54.5, KPA13 döneminde %70.3 olarak tespit edilmiştir. Beş yaş altındaki hastalarda aşı dışı serotiplerin oranı KPA7 döneminde %60 iken, KPA13 döneminde %75 olarak belirlenmiştir. Aşı dışı serotiplerin oranı zaman içinde artmıştır. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). İzolatlarda en sık saptanan serotipler 19F, 23F, 7F, 31 ve 24B olarak belirlenmiştir. Menenjitli hastalardan elde edilen izolatların minimum inhibitör konsantrasyon değerlerine göre penisilin ve seftriaksona direnç oranı sırasıyla %43.9 ve %9.8 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, çalışmamızda KPA7 ve KPA13 uygulaması sonrası beş yaş altı çocuklarda İPH'nin sıklığında %91.1 oranında azalma olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda aşı içeriğindeki serotiplerin oranı azalırken, aşı dışı serotiplerde artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, antibiyotik direnç oranlarında yıllara göre belirgin bir değişim gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: Çocuk; invaziv pnömokok hastalığı; konjuge pnömokok aşısı; serotip; *Streptococcus pneumoniae*.

ABSTRACT

In Turkey, the seven-valent pneumococcal conjugated vaccine (PCV7) was included in the childhood national immunization programme in April 2008 and was replaced by the 13-valent pneumococcal conjugated vaccine (PCV13) in April 2011. In this retrospective, single-center study, it was aimed to determine the serotype distribution and antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates of pediatric patients with invasive pneumococcal disease (IPD) after the introduction of PCV7 and PCV13. Fifty pediatric patients diagnosed with meningitis and sepsis/bacteremia between October 2009 and October 2019 were included in the study. The pediatric patient group consisted of previously healthy patients diagnosed with meningitis and sepsis/bacteremia with *S. pneumoniae* isolated in their blood or cerebrospinal fluids. Patients with pneumonia-associated bacteremia and empyema were not included in the study. Serotyping of the isolates was performed by Quellung reaction using specific antisera (Statens Serum Institute, Denmark) and antibiotic (penicillin and ceftriaxone) susceptibility was determined by antibiotic gradient method based on Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria. Of the children, 29 (58%) were boys and 21 (42%) were girls. The median age of the patients was 19 months (1 month-18 year). When the children under the age of five were evaluated, it was found that 30 (79%) patients were diagnosed with occult bacteremia/sepsis and 8 (21%) with meningitis. The overall annual incidence rate of IPD among the healthy children aged < 5 years decreased significantly from 9.35/100000 to 0.83/100000 ($p < 0.001$). Serotype identification was determined for 44 of 50 pneumococcal isolates. However, since six patients with underlying disease were not included in the evaluation, the remaining 38 isolates were found to be one of the serotypes included in PCV7 and PCV13 at a rate of 28.9% ($n = 11$) and 44.7% ($n = 17$), respectively. While the rate of PCV13 serotypes seen in the PCV7 period was 81.8%, this rate decreased to 29.6% within eight years after PCV13 administration. The rate of non-vaccine serotypes was determined as 54.5% in PCV7 period and 70.3% in PCV13 period. The rate of non-vaccine serotypes in patients under 5 years was 60% in the period of PCV7 and 75% in the period of PCV13. The proportion of non-vaccine serotypes has increased over time. However, this difference was not statistically significant ($p > 0.05$). The most common serotypes detected in isolates were 19F, 23F, 7F, 31 and 24B. According to the minimum inhibitory concentration values of the isolates recovered from patients with meningitis, penicillin and ceftriaxone resistance rates were found as 43.9% and 9.8%, respectively. In conclusion, our study showed that there was a 91.1% decrease in the incidence of IPD in healthy children aged under five years after the implementation of PCV7 and PCV13. It was determi-

ned that while the rate of serotypes in vaccine content decreased, there was an increase in non-vaccine serotypes. In addition no significant change was observed in antibiotic resistance rates over the years.

Keywords: Child; conjugated pneumococcal vaccine; invasive pneumococcal disease; serotype; *Streptococcus pneumoniae*.

GİRİŞ

Streptococcus pneumoniae, yaygın aşılama programlarına rağmen enfeksiyon hastalıkları ile ilişkili ölümlerin temel nedenlerinden olan bir patojen olup, günümüzde önemli halk sağlığı sorunlarından biri olmayı sürdürmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün raporuna göre pnömokok aşılmasının yaygın olarak kullanıma girmesinden önce pnömokok ilişkili enfeksiyonlar her yıl 1.6 milyon kişinin ölümüne neden olmuştur ve bu ölümlerin 0.7-1 milyonu beş yaşından küçük çocuklarda görülmüştür¹.

Pnömonokların polisakkarit yapıda farklı antijenik özelliklere dayanan 90'dan fazla kapsüller serotipi vardır. Serotip dağılımı yaşa, coğrafik bölgelere, sosyo-ekonomik duruma göre farklılık göstermektedir². Pnömonokok enfeksiyonlarının sıklığı ve ciddi hastalık tablolarına yol açması ve potansiyel antibiyotik direnç durumu nedeniyle 1980'li yıllarda konjuge pnömokok aşı çalışmaları başlamış, yedi bileşenli konjuge pnömokok aşısı (KPA7), ABD'de 2000 yılında lisans almıştır. Bu aşı 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F ve 23F serotiplerinin polisakkaritleri ile difteri proteini olan CRM197'yi içermektedir. Bu serotipler ABD'de 1978-1994 yılları arasında altı yaşın altındaki çocuklarda bakteriyemilerin %86'sından, menenjitlerin %83'ünden ve AOM'nin %65'inden sorumludur³. Aşının kullanıma girmesinden sonra ABD'de beş yaş altındaki çocuklarda İPH ile aşı serotipleri kaynaklı İPH insidansında sırasıyla %77 ve %98 oranında azalma saptanmıştır⁴. Ancak daha uzun süre sonra izlemde aşı dışı serotiplere bağlı İPH sıklığında artış görülmüştür; 1997-1998'de %17 olan KPA7 dışı serotiplerin 2006-2007 yılları arasında sıklığının %98'e çıktığı görülmüş ve 2007 yılında beş yaş altındaki çocuklarda saptanan en sık serotiplerin 3, 15B/C, 19A, 22F ve 33F olduğu saptanmıştır^{5,6}. Aşılamayla penisilin dirençli suşların oranında azalma olacağı öngörülmüş ve ABD'de KPA7 sonrasında özellikle iki yaş altında penisiline dirençli pnömokokların görülme sıklığı %81 oranında azalmıştır. Ancak bu durumun aksine penisiline dirençli 19A serotipinin görülme sıklığının %2'den %35'e yükseldiği gözlenmiştir⁷.

Zamanla İPH etkeni serotiplerin dağılımındaki değişimler ve 19A serotipi başta olmak üzere KPA7 dışı serotiplerin ön plana çıkması ve aşı dışı serotiplerde antibiyotik direnç oranında artış görülmesi, daha geniş serotip içeren bir aşının gereksinimi ortaya koymuştur⁸. Sonuçta KPA7 içinde bulunan yedi serotipe ilave olarak altı serotip daha içeren (1, 3, 5, 6A, 7F, 19A) 13 bileşenli konjuge pnömokok aşısı (KPA13), 2010 yılında ABD'de 6 hafta-71 aylık çocuklarda kullanımı için lisans almıştır. Ülkemizde ise KPA7 Nisan 2008'de çocukluk çağı ulusal aşı takvimine alınmış ve Nisan 2011'de aşı takviminde yerini KPA13'e bırakmıştır.

Bir toplumda konjuge pnömokok aşılama sonrası görülen aşı içeriğinde yer almayan serotiplerin bilinmesi, yeni geliştirilecek aşı etkinliğinin belirlenmesi açısından önem taşı-

maktadır. Ülkemizde KPA7 ve KPA13 ile aşılama sonrası İPH sıklığının azaldığı kliniğimizde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Ancak söz konusu çalışma, KPA13 sonrası kısıtlı bir süreyi kapsamaktadır⁹. Ayrıca, KPA13 uygulanması sonrası daha uzun süreli dönemde hastalık sıklığının ne durumda olduğunun bilinmesi toplumumuzda İPH'nin epidemiyolojisinde olan değişimi izlemek açısından büyük önem taşımaktadır. Aşılama ile birlikte pnömokoklarda görülen antibiyotik direnç oranındaki değişimler pnömokokların neden olduğu hastalıklarda ampirik tedavi planlanması açısından önem taşıdığı için zaman içinde oluşan antibiyotik duyarlılık değişimlerinin bilinmesi de önemlidir.

Türkiye'de KPA13 uygulaması sonrası İPH epidemiyolojisi, serotip dağılımı ve antibiyotik direnci hakkındaki veriler kısıtlıdır bu nedenle bu çalışmanın ülkemiz için yararlı olduğu düşünülmüştür. Bu çalışmada, KPA7 ve özellikle de KPA13 sonrası İPH görülme sıklığının yıllara göre değişiminin saptanması, aşılama sonrası ortaya çıkan invaziv hastalıklarda gözlenen serotiplerin incelenmesi, aşı dışı serotiplerin belirlenmesi ve serotipler ile antibiyotik direnç ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 13.05.2019 ve Karar No: 09-711-19).

Bu çalışmaya, Ekim 2009 ile Ekim 2019 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Çocuk Hastanesi Genel Pediatri ve Çocuk Acil Servis poliklinikleri, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı servisi ve polikliniğinde İPH ön tanısı ile ayaktan veya yatarak takip edilen çocuk hastalar dahil edildi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı ile Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarının ortak yürüttüğü retrospektif çalışmada, hastaların kan ve beyin omurilik sıvılarında (BOS) üreyen pnömokoklarda antibiyogram ve serotiplendirme yapıldı.

Çalışmaya Alınan Hastaların Özellikleri

Çalışmaya 2009-2019 yılları arasında hastanemizin ilgili polikliniklerine başvuran 0-18 yaş arasındaki çocuklarda İPH tanısı (menenjit, bakteriyemi, sepsis ve steril bölge kültürlerinde üreme olan) konulan hastalar dahil edildi. Pnömoni ilişkili bakteriyemi ve ampiyem tanısı olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmaya alınan çocuklar yaşlarına göre iki yaşından küçük olanlar, 2-5 yaş arası olanlar ve 5-18 yaş arası olanlar olmak üzere üç gruba ayrıldı. Ayrıca, ABD Aşılama Uygulamaları Danışma Komitesi'nin belirlediği KPA7 veya KPA13 ile aşılanma durumuna göre hastalar tam aşı (iki yaş ve altında olanlarda ≥ 3 doz, iki yaşından büyük olanlarda 1 doz), kısmen aşı (iki yaşından küçük olanlarda ≤ 2 doz) ve aşısız (0 doz) olmak üzere gruplara ayrıldı¹⁰. Hastalığın sıklığındaki (yükündeki) değişim yukarıda bahsedilen alanlara her yıl başvuran ve İPH tanısı alan hastaların sayısı yine her yıl bu alanlara başvuran toplam hasta sayısına oranlanarak belirlendi. Hastalara ait diğer demografik ve klinik özellikler hasta dosyalarından elde edildi.

Kan ve Steril Vücut Sıvısı Kültürlerinde *Streptococcus pneumoniae*'nin Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına ulaştırılan steril vücut sıvısı (kan, BOS, apse materyali, doku örneği, periton sıvısı, vb.) kültüründe üreyen şüpheli pnömokok kolonilerinin Gram morfolojik özellikleri, katalaz aktivitesi, optokin duyarlılığı ve safrada çözünme yeteneği araştırıldı. Optokin duyarlılık testi (Bioanalyse, Türkiye) 14 mm ve üzeri olanlar duyarlı kabul edildi¹¹. Ayrıca optokin duyarlılık testi 12 ya da 13 mm olması halinde Becton Dickinson Phoenix otomatize bakteri tiplendirme sistemiyle izolatin pnömokok olup olmadığı kontrol edildi. İzolatların antibiyotik duyarlılığının araştırılmasında gradiyent test (E-test, bioMerieux, Fransa) yöntemi uygulandı. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)] kriterleri temel alınarak penisilin G ve seftriakson antibiyotikleri için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri saptandı. Antibiyotik duyarlılığın araştırılmasında kalite kontrol suşu olarak *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 kullanıldı¹².

İzolatların Kapsüler Serotiplendirilmesi

Pnömokok izolatları, daha önceden Sorensen ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olan Quellung reaksiyonu ile serotiplendirildi¹³. Serotiplendirme işlemi özgül antiserumlar (Statens Serum Institute, Danimarka) kullanılarak yapıldı. Bunun için serotiplendirilecek izolat, koyun kanlı agarı pasajlandı; mikroaerofilik ortamda, 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Takiben 0.5 ml %0.85'lik NaCl içeren steril cam tüpte, 1 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlandı. Temiz bir mikroskop lamına 3 µl pnömokokal havuz antiserumu, 3 µl bakteri süspansiyonu ve 3 µl %0.3'lük metilen mavisi ilave edilerek karıştırıldı. Lamin üzerine temiz bir lamel kapatılıp immersiyon yağı damlatıldı. Oda sıcaklığında beş dakikalık inkübasyonu takiben ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelendi. Koyu zeminli bakteriyi çevreleyen şeffaf bir bölge (kapsül şişme reaksiyonu) varsa test pozitif olarak değerlendirildi. Serotiplendirme işlemine sırayla pnömokokal grup, tip ve faktör antiserumları kullanılarak devam edildi¹¹.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi "Statistical Package for Social Sciences (SPSS 11.5)" bilgisayar programında yapıldı. Verilerin analizinde tanımlayıcı istatistiklerin dağılımı normal olan değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma, dağılımı normal olmayan değişkenler için ortanca (min-maks), nominal değişkenler ise olgu sayısı ve (%) olarak gösterildi. Grup sayısı iki olduğunda gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemi t testi ile, ortanca değerler yönünden farkın önemi Mann-Whitney U testi ile araştırıldı. Nominal değişkenler Pearson ki-kare veya Fisher's exact testi ile değerlendirildi. Sürekli değişkenler arasındaki ilişki araştırılırken dağılım normal olmadığında Spearman korelasyon testi ile normal olduğunda Pearson korelasyon testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma süresince toplam 50 çocuğa İPH tanısı konulmuştur. Çocukların 29 (%58)'u erkek, 21 (%42)'i kız olarak tespit edilmiş ve hastaların ortanca yaşı 19 ay (1 ay-18 yıl) olarak hesaplanmıştır. Çocukların altısında İPH için risk oluşturan altta yatan hastalık bulunmaktadır. Bu hastalar dışında İPH tanısı konulan 44 hastanın altısında teknik nedenlere bağlı serotip ve üçünde ise antibiyotik duyarlılığı değerlendirilememiştir. Önceden sağlıklı olan 44 hasta değerlendirildiğinde hastalardan 27 (%61.3)'si iki yaş ve altında, 11 (%25)'i 2-5 yaş arasında ve 6 (%13.7)'si beş yaş üzerinde bulunmuştur (Şekil 1). Önceden sağlıklı olan 44 çocuğun 26 (%59)'sı KPA7 veya KPA13 ile tam aşıliken, 9 (%20.5)'u parsiyel olarak aşılanmıştır. Geriye kalan 9 (%20.5) çocuk ise hiç aşılanmamıştır. Aşılanma durumları yaşlara göre incelendiğinde beş yaş altındaki çocukların %63.1'inin tam aşıli, %24'ünün kısmen aşıli ve %13'ünün ise hiç aşılanmamış olduğu saptanmıştır. Beş yaşın üzerindeki altı çocuğun 2 (%34)'si tam aşıli ve 4 (%66)'ü ise hiç aşılanmamıştır (Şekil 2). Beş yaş altındaki çocuklar İPH'nin tipine göre değerlendirildiğinde 30 (%79) hastanın gizli bakteriyemi/sepsis ve 8 (%21) hastanın pürülan menenjit tanısı aldığı saptanmıştır.

Çalışma süresince beş yaş altı sağlıklı çocuklarda yıllık İPH sıklığının, 2009 yılında 100 000 hastane başvurusunda 9.35'ten, 2019'da 0.83'e gerilediği istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($p < 0.001$) (Şekil 3). Bir başka ifadeyle, beş yaş altı sağlıklı çocuklarda yıllık İPH sıklığının KPA7 ve KPA13 kullanımı ile %91.1 oranında azalmıştır.

Elde edilen 50 pnömokok izolatinin 44'ünün serotip tanımlaması yapılmıştır ancak altta yatan hastalığı olan altı hasta değerlendirilmeye alınmamıştır. Geriye kalan 38 izolatin

Şekil 1. Önceden sağlıklı olan hastaların yaş dağılımı.

Şekil 2. Hastaların yaşlarına göre KPA ile aşılanma durumları.

Şekil 3. Beş yaş altı çocukları invaziv pnömokok hastalığı sıklığı.

sırasıyla %28.9 (n= 11) ve %44.7 (n= 17) oranında KPA7 ve KPA13 içeriğindeki serotiplerinden biri olduğu tespit edilmiştir. KPA7 döneminde görülen KPA13 serotiplerinin oranı %81.8 (9/11) iken, KPA13 uygulaması sonrası sekiz yıl içinde bu oranın %29.6 (8/27)'ya gerilediği saptanmıştır. KPA7 döneminde görülen dokuz KPA13 serotipinden dördünün KPA7'nin içermediği serotipler olduğu ve KPA13 döneminde görülen sekiz KPA13 serotipinden ikisinin KPA7'nin içeriğinde yer almayan serotipler olduğu tespit edilmiştir. Aşı dışı

Tablo I. KPA7 ve KPA13 Döneminde İzolatların Serotip Dağılımı

Aşı dönemi	Toplam izolat n	Aşı serotipi n (%)	Aşı dışı serotip n (%)
KPA7 dönemi	11	5 (45.5)	6 (54.5)
KPA13 dönemi	27	8 (29.7)	19 (70.3)

Tablo II. Hastaların Aşılama Durumları ile Elde Edilen İzolatların İlişkisi

	Tam aşı n (%)	Kısmen aşı- aşısız n (%)	Toplam n (%)
KPA7 dönemi			
Aşı serotipi	0 (0)	5 (62.5)	5 (45.5)
Aşı dışı serotip	3 (100)	3 (37.5)	6 (54.5)
KPA13 dönemi			
Aşı serotipi	3 (15.8)	5 (62.5)	8 (29.6)
Aşı dışı serotip	16 (84.2)	3 (37.5)	19 (70.4)
Tüm dönemi			
Aşı serotipi	3 (13.6)	10 (62.5)	13 (34.2)
Aşı dışı serotip	19 (86.4)	6 (37.5)	25 (65.8)

serotiplerin oranı ise KPA7 döneminde %54.5 (6/11), KPA13 döneminde %70.3 (19/27) olarak tespit edilmiştir (Tablo I). Beş yaş altındaki hastalarda aşı dışı serotiplerin oranı ise KPA7 döneminde %60 (6/10) iken, KPA13 döneminde %75 (18/24) olarak belirlenmiştir. Aşı dışı serotiplerin oranı zaman içinde artmış ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Toplam 44 izolatın 11'i KPA7 döneminde, 33'ü KPA13 döneminde saptanmıştır. KPA7 döneminde saptanan serotiplerin %45.5 (5/11)'inin KPA7, %81.8'inin (9/11) KPA13 tarafından kapsanmakta olduğu saptanmıştır. Aşı dışı serotip görülen hastaların tamamı beş yaş altındayken bunların üçü tam aşı, diğer üçü kısmen aşı veya aşısız bulunmuştur. Bu dönemde KPA7 ile tam aşılanmış hastaların hiçbirinde aşı içeriğinde yer alan serotiplere bağlı İPH saptanmamıştır. KPA13 döneminde saptanan 27 serotipin %29.7 (8/27)'sinin KPA13 tarafından kapsandığı ve KPA13 tarafından kapsanmayan bu serotiplerin %5.2 (1/19)'sinin KPA15 ve %26.3 (5/19)'ünün KPA20 tarafından kapsandığı belirlenmiştir. KPA13 döneminde, beş yaş altındaki 24 hastanın altısında (%25) izole edilen serotipleri KPA13 kapsamaktayken 18 (%75)'inde KPA13 dışı serotip belirlenmiş olup, bunların %5.5 (1/18)'i KPA15 ve %27.7 (5/18)'si KPA20 tarafından kapsandığı tespit edilmiştir. KPA13 dönemindeki çocukların üçü aşısızken bunlardan izole edilen serotiplerin tamamının KPA13'ün içeriğinde yer aldığı belirlenmiştir. Tam aşı 19 çocukta görülen serotiplerden üçü KPA13 kapsamındayken kısmen aşı/aşısız çocuklarda görülen serotiplerin beşi aşı kapsamında, üçü aşı kapsamında bulunmamıştır. Tam aşı 3 çocukta İPH'ye neden olan serotipin 19F olduğu belirlenirken, bu hastaların hepsinin beş yaş altında olduğu saptanmıştır. Kısmen aşı/aşısız olan çocuklarda görülen KPA13 kapsamında olmayan üç serotip, KPA15 ve KPA20 içeriğinde de yer almamaktadır. KPA7 ve KPA13 döneminde

saptanan izolatların hastaların aşılama durumlarına göre dağılımları Tablo II'de gösterilmiştir.

En sık saptanan serotipler, 19F (n= 6), 23F (n= 4) ve 7F (n= 3), 31 (n= 2) ve 24B (n= 2) olarak tespit edilmiştir. Çalışma süresince sadece KPA7 aşılama döneminde 19A serotipinin etken olduğu menenjit tanısı alan bir hasta olmuş ve bu hasta KPA7 ile üç doz aşılanmıştır. Altta yatan hastalığı olan altı hastanın ikisinde serotip 6A, diğerlerinde serotip 8, 23F, 15B ve 3 görülmüştür (Tablo III). Çalışma dönemi boyunca tüm hastalarda aşı kapsama oranları incelendiğinde KPA7, KPA13, KPA15 ve KPA20'nin sırasıyla serotip kapsama oranları %28.9 (11/38), %44.7 (17/38), %47.3 (18/38) ve %57.8 (22/38) olarak saptanmıştır. Ayrıca, çalışma dönemi boyunca beş yaş altı hastalarda elde edilen izolatların aşı kapsama oranları, KPA7 aşısında %23.5, KPA13'de %41.1, KPA15'de %44.1 ve KPA20'de %55.8 olarak saptanmıştır.

Menenjit dışı enfeksiyona göre penisilin MİK değerleri incelendiğinde 41 hastadan elde edilen izolatların tümü duyarlıyken, menenjitli hastalardan elde edilen izolatların penisilin MİK değeri incelendiğinde 18 (%43.9) izolat dirençli olarak saptanmıştır. Menenjit dışı enfeksiyona göre seftriakson MİK değerleri incelendiğinde tüm izolatlar duyarlı bulunmuştur. Menenjitli hastalardan elde edilen izolatlara göre değerlendirildiğinde ise 4 (%9.8) izolatın dirençli olduğu belirlenmiştir (Tablo IV). KPA7'nin kapsadığı serotipteki izolatlar penisilin (menenjitli hastalardan elde edilen izolatların MİK'ine göre) duyarlılıkları açısından değerlendirildiğinde, izolatların %70 (7/10)'ünün penisilin dirençli, KPA13'ün kapsadığı serotipteki izolatların %43.7 (7/16)'sinin penisilin dirençli olduğu saptanmıştır. Penisilin direnci görülen izolatlar içerisinde en sık 19F (n= 4) ve 23F (n= 3) serotipleri belirlenmiştir. Bu iki serotip hem KPA7 hem de KPA13 tarafından kapsanmakta olup penisilin dirençli izolatların %38.8 (7/18)'ini oluşturmaktadır. Aşı dışı serotiplerin penisilin direnç oranı ise %44.4 (8/18) olarak belirlenmiş ve en sık 24B (n= 2)'de penisilin direnci görülmüştür. Ayrıca penisilin direnci görülen aşı dışı serotiplerin hepsi KPA13 döneminde saptanmıştır. Sefalosporin direnci görülen dört izolattan ikisinin hem KPA7, hem de KPA13 tarafından kapsandığı, diğer iki izolatın aşı dışı serotiplerden oluştuğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Pnömonokok enfeksiyonlarının sıklığı ve ciddi hastalık tablolarına yol açması ve potansiyel antibiyotik direnç durumu nedeniyle konjuge pnömonokok aşı çalışmaları başlamış ve 2000 yılında KPA7, ardından 2009'da KPA10 ve 2010'da KPA13 üretilmiş ve birçok ülkenin ulusal aşı takviminde yerlerini almışlardır. Tahmin edildiği gibi aşı uygulamalarından sonra İPH insidansında ve antibiyotik direncinde azalma görülmüştür. Ancak bu yüz güldürücü sonuçlarla birlikte devam eden çalışmalar, aşı dışı serotiplerin arttığını ve bu serotiplerin antibiyotik direnç oranında artış olduğunu göstermiştir. Bu nedenle pnömonokok aşılarının rutin olarak uygulandığı ülkelerde aşı sonrası pnömonokok hastalıklarının epidemiyolojisinin izlenmesi önem taşımaktadır. Ülkemizde aşı sonrası epidemiyolojik verilerin kısıtlı olması nedeniyle tek merkezli olsa da çalışmamızın bu konuda yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

Tablo III. İzolatların Serotip Dağılımı

Serotip	Önceden sağlıklı çocuklar (n= 38)	Altta yatan hastalığı olan çocuklar (n= 6)
19F	6	
23F	4	1
7F	3	
31	2	
24B	2	
5	1	
18F	1	
14	1	
10	1	
6A	1	2
19A	1	
15F/A/B/C	1	
17F/A	1	
8		1
15F/A	1	
35B	1	
33F/A/B/C/D	1	
15B/C	1	
35A/B/C	1	
12B	1	
3		1
21	1	
15B	1	1
20	1	
16F	1	
24F	1	
15F/B	1	
11A	1	

İnvaziv pnömokok hastalığı, en sık beş yaş altı çocuklarda ve 65 yaş üzerinde görülmektedir. ABD’de 1998’de İPH insidansı 12 aydan küçük çocuklarda 100 000’de 203 ve 12-24 ay arasında ise 100 000’de 165 olarak tahmin edilmiştir. KPA7’nin 2000 yılında ABD’de lisans almasıyla İPH insidansında dramatik şekilde azalma görülmüştür. ABD’de 1998-1999 yılları arasında beş yaş altındaki çocuklarda gözlenen İPH insidansı 100 000’de 88.7’den, 2004’te 100 000’de 22.4’e düşmüştür¹⁴. Avrupa’da 1990-2008 arasında İPH tanısı olan çocuklar üzerinde yapılmış çalışmaların irdelendiği derlemede¹⁵, iki yaş altı çocuklarda KPA7 sonrası İPH insidansının 32.5/100 000’den 23.4/100 000’e gerilediği

Tablo IV. İzolatların Antibiyotik (Penisilin ve Seftriakson) Duyarlılıkları

Yaş	Penisilin (menenjit dışı)		Penisilin (menenjit)		Seftriakson (menenjit dışı)		Seftriakson (menenjit)	
	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)
≤ 2 yaş	25 (100)	0 (0)	15 (60)	10 (40)	25 (100)	0 (0)	24 (96)	1 (4)
2-5 yaş	11 (100)	0 (0)	7 (63.6)	4 (36.4)	11 (100)	0 (0)	9 (81.8)	2 (18.2)
> 5 yaş	5 (100)	0 (0)	1 (20)	4 (80)	5 (100)	0 (0)	4 (80)	1 (20)
Toplam	41 (100)	0 (0)	23 (56)	18 (44)	41 (100)	0 (0)	37 (90)	4 (10)

belirlenmiştir. KPA13, ABD’de 2010 yılında lisans almış ve takiben KPA13 sonrası beş yaş altı çocuklarda İPH insidansının %69 oranında azaldığı saptanmıştır. Bunların %82’sinin KPA13’ün içerdiği serotipler olduğu ve özellikle 19A serotipinde %80 oranında azalmanın izlendiği görülmüştür¹⁶. Avrupa ülkelerinde de KPA13 sonrasında İPH insidansı açısından olumlu sonuçlar alınmıştır. İngiltere’de KPA7 ve KPA13 öncesi döneme göre tüm yaş gruplarında genel İPH görülme sıklığı sırasıyla %56 ve %32 oranında azalmıştır¹⁷. Danimarka’da KPA13 sonrasında iki yaş altı çocuklardaki İPH insidansı %71 oranında azalırken bunların %84’ünün KPA13 ile ilişkili serotipler olduğu belirlenmiştir¹⁸. Almanya’da İPH insidansı %48’den, KPA13 ulusal aşı uygulaması sonrası %26’ya gerilediği görülmüştür¹⁹. Japonya’da 2010-2017 yılları arasında yapılan bir çalışmada²⁰, KPA13 uygulaması sonrası aşı serotiplerinin neden olduğu İPH oranının %89’dan %12.1’e gerilediği görülmüştür.

Çalışmamız boyunca beş yaş altı sağlıklı çocuklarda yıllık İPH sıklığının, 2009 yılında 100 000 hastane başvurusunda 9.35’ten, 2019’da 0.83’e anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Bu azalma diğer ülkelerden elde edilen verilerle benzerdir. Çalışmamızda İPH yükü hastaneye başvuru yapan hasta sayıları üzerinden belirlenmiştir. Bu nedenle toplumsal İPH insidansını ve bundaki değişimleri belirlemek için geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak yine de ulaştığımız sonuçlar, çalışma bölgemizde özellikle KPA13 sonrası İPH insidansındaki azalmayı göstermesi bakımından önemlidir ve aşının önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

ABD’de KPA7 uygulamasıyla İPH insidansında önemli bir azalma görülmüştür. Aşı serotipleri ile ilişkili İPH oranı 100 000’de 78.9’dan 2.7’ye gerilerken, aşı dışı serotiplerin 16.3’ten 19.9’a yükseldiği görülmüştür. Aşı dışı serotipler tüm olguların %17’sini oluştururken, bu oranın 2004’te %88’e yükseldiği saptanmıştır⁵. İngiltere’de KPA7’nin ulusal aşılama şemasına alınması ile rutin kullanımı sonrasında iki yaş altında aşı serotiplerinin insidansının %98 oranında azaldığı saptanırken, aşı dışı serotiplerin %68 oranında arttığı görülmüştür. Bu çalışmada izole edilen aşı dışı serotipler yaygın olarak 7F, 19A ve 22F olarak saptanmıştır²¹. ABD’de KPA13 sonrası yapılan bir çalışmada özellikle 19A serotipinde %80 oranında azalma saptanmıştır¹⁶. ABD’de yapılan başka bir çalışmada, KPA13 sonrası 23A, 15B/15C, 7C, 8 ve 31 gibi KPA13’ün içeriğinde yer almayan serotiplerin neden olduğu İPH oranında artış görülmüştür²². İngiltere’de KPA7 ve KPA13 öncesi döneme göre

tüm yaş gruplarında İPH görülme sıklığı azalmakla birlikte, beş yaş altındaki çocuklarda KPA13 dışı serotiplere bağlı İPH'nin arttığına dair kanıtlar mevcuttur ve bu serotipler 8, 15A, 15B/C, 22F, 23B ve 24F olarak belirlenmiştir¹⁷. 2019 yılında Hong Kong, İsrail, Güney Afrika, Malawi, Gambia ve ABD'nin dahil olduğu altı farklı ülkeden elden edilen verilerle gerçekleştirilen bir çalışmada, 5, 12F, 15B/C, 19A, 33F ve 35B/D serotiplerinin ikiden fazla ülkede yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir²³.

Ülkemizde KPA'ların uygulanmasından önce, 2001-2004 yılları arasında yapılan çalışmada; KPA7, KPA10 ve KPA13'ün serotip kapsama oranlarının sırasıyla %52, %74 ve %81 olduğu bildirilmiştir²⁴. Bu tarihten sonra çocuklarda pnömokok menenjitleri ile ilgili yapılan diğer iki çalışmada da benzer sonuçlar gösterilmiş ve en sık rastlanan serotipler; 1, 5, 6A/B, 19F ve 23F olmuştur²⁵. Çalışmamız süresince elde edilen 50 pnömokok izolatinin 44'ünün serotip analizi yapılmış ve en sık saptanan serotipler; 19F (n= 6), 23F (n= 4), 7F (n= 3), 31 (n= 2) ve 24B (n= 2) olarak saptanmıştır. Bu serotipler tüm hastaların %29.5'ini oluşturmaktadır. Bu serotiplerden 19F ve 23F hem KPA7 hem KPA13 içeriğinde yer almaktadır. Bu durum, KPA7 ve KPA13'ün ulusal aşı takviminde yer almasına rağmen 19F, 23F ve 7F'nin toplumda dolaşımının halen devam etmekte olduğunu ve aşılamaya rağmen 19F ve 23F'nin toplumumuz için önde gelen serotipler olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, çalışmamızda 19F saptanan üç hastanın tam aşılı ve beş yaş altında olması bu serotipin invazyon yeteneğinin yüksek olduğunu veya aşının etkinliği ile ilgili bir sorun olabileceğini düşündürmektedir. KPA7 sonrasında ABD, Kanada ve Avrupa'nın birçok bölgesinde artış gösteren 19A serotipi, çalışmamız süresince sadece bir hastada izole edilmiştir. KPA13 kullanımı sonrasında diğer ülkelerde yapılan araştırmalarda en sık izole edilen aşı dışı serotipler olan 22F ve 33F çalışmamızda hiç tespit edilmezken, serotip 8 altta yatan hastalığı mevcut olan bir hastamızda saptanmıştır. Çalışmamızda diğer ülkelerde yapılan çalışmaların sonuçları ile benzer şekilde aşı içeriğindeki serotiplerin görülme oranında azalma, aşı dışı serotiplerin oranında artış saptanmıştır. Araştırmamızda aşı dışı serotiplerin görülme yüzdesi, beş yaş altındaki hastalarda KPA7 döneminde %60, KPA13 döneminde %75 olarak belirlenmiştir.

Dünya çapında birçok antibiyotiğe dirençli pnömokok enfeksiyonları, KPA7 aşısının içerdiği serotiplerin beşinden (6B, 9V, 14, 19F ve 23F) kaynaklanmaktadır². Bu nedenle aşılama programıyla, İPH'nin sıklığıyla birlikte dirençli suşların oranında azalma olacağı öngörülmüştür. ABD'de KPA7 sonrasında penisiline dirençli pnömokoklar özellikle iki yaş altında %81 oranında azalmıştır. Ancak penisiline dirençli 19A serotipinin görülme sıklığında ise %2'den %35'e yükselme gözlenmiştir⁷. Yine ABD'de beş yaşından küçük olan çocuklarda penisiline dirençli 19A izolatlarının oranı aşı öncesi %10 iken 2004'te %31'e yükselmiştir. ABD'de sekiz hastanenin katıldığı bir çalışmada pnömokokal menenjitlerde KPA13 sonrası penisilin duyarlılık oranları benzerken seftriakson direnci %13'ten %3'e gerilemiştir²⁶. Teksas'ta yapılan bir çalışmada ise aşı öncesi dönem ile KPA13 sonrasındaki dönem karşılaştırıldığında pnömokokal menenjitlerdeki penisilin direncinde önemli bir azalma görüldüğü bildirilmiştir²⁷. Avrupa'da KPA7 uygulaması sonrası gerçekleştirilen dört çalışmanın irdelendiği derlemeye göre, beş yaş altı çocuklarda penisilin direncinin

%48'den %29'a düştüğü, sefalosporin direncinin ise %10 oranında azaldığı bildirilmiştir¹⁵. İsrail'de yapılan bir çalışmaya göre KPA13 öncesi ve sonrası dönem karşılaştırıldığında, penisilin dirençli izolat oranında %83 oranında azalma olduğu, 2010 yılından itibaren seftriakson dirençli izolat görülmediği bildirilmiştir²⁸.

Ülkemizde KPA7'nin aşı takvimine girmesinden önce yapılan bir çalışmada, 93 invaziv izolatın %39'unun penisiline duyarlı olmadığı bulunmuştur²⁴. 2011 yılında yapılan bir başka çalışmada ise, 202 invaziv izolatın %33.7'sinin penisiline duyarlı olmadığı saptanmıştır²⁵. Penisiline dirençli bu izolatların %77.8'inin KPA7 ve %82.2'sinin KPA13 tarafından kapsandığı belirtilmiştir. Çalışmamızda beş yaş altı çocuklarda menenjit dışı enfeksiyona neden olan tüm izolatların penisilin duyarlı olduğu bulunmuştur. Menenjitli beş yaş altı çocuklardan elde edilen izolatların penisilin MİK değerleri incelendiğinde izolatların %38.8'inin dirençli olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda penisilin dirençli izolatların %55.5'inin iki yaş altındaki hastalardan izole edildiği, ülkemizde yapılan başka bir çalışmada ise penisilin dirençli izolatların %66.2'sinin iki yaş altındaki hastalardan olduğu saptanmıştır²⁵. Çalışmamızdaki izolat sayısı diğer çalışmamıza göre daha azdır ancak KPA13 dönemindeki izolatları da içermektedir. Bu nedenle çalışmamızda iki yaş altındaki hastalarda menenjit için penisilin direnç oranları daha düşük bulunmuştur. Ayrıca penisilin direnci görülen izolatlar içerisinde en sık 19F ve 23F serotipleri belirlenmiş olup ülkemizde yapılan önceki çalışmalarla benzer sonuçlar bulunmuştur^{24,25}.

Sonuç olarak, çalışmamız tek merkezli olsa bile, KPA13 uygulaması sonrası beş yaş altı çocuklarda İPH'nin sıklığında azalma olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda aşı içeriğindeki serotiplerin oranı azalırken, aşı dışı serotiplerde artış olduğu belirlenmiştir. Ancak diğer birçok ülkeden farklı olarak, aşı dışı serotiplerden 22F ve 33F'de artış izlenmemiştir. Çalışmamızda antibiyotik direnç oranlarında yıllara göre belirgin bir değişim görülmemiştir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 13.05.2019 ve Karar No: 09-711-19).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). Pneumococcal conjugated vaccine for childhood immunization-WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec 2007; 82(12): 93-104.
2. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*, pp: 2623-42. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2010, 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia.
3. Butler JC, Breiman RF, Lipman HB, Hofmann J, Facklam RR. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994: implications for development of a conjugate vaccine. J Infect Dis 1995; 171(4): 885-9.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Invasive pneumococcal disease in children 5 years after conjugate vaccine introduction-eight states, 1998-2005. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2008; 57(6): 144-8.

5. Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS, et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis* 2007; 196(9): 1346-54.
6. Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, Beall BW, Bennett NM, Craig AS, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med* 2009; 360(3): 244-56.
7. Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, Craig AS, Hadler J, Reingold A, et al. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med* 2006; 354(14): 1455-63.
8. Cohen R, Levy C, de La RF, Gelbert N, Wollner A, Fritzell B, et al. Impact of pneumococcal conjugate vaccine and of reduction of antibiotic use on nasopharyngeal carriage of nonsusceptible pneumococci in children with acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25(11): 1001-7.
9. Özdemir H, Yıldız C, Nar Ötgün S, Erkol H, Karbuz A, Aldemir Kocabaş B, et al. The effects of pneumococcal conjugate vaccine (PCV7 and PCV13) on Turkish children with invasive pneumococcal disease: a single center experience. *Arch Argent Pediatr* 2017; 115(4): 316-22.
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Advisory Committee on Immunization Practices. Updated recommendation from the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) for use of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) in children aged 24-59 months who are not completely vaccinated. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57(13): 343-4.
11. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. 2nd ed. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 2011. Chapter 8. Identification and Characterization of *Streptococcus pneumoniae*. Available from: <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt08-id-characterization-streppneumo.html>
12. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Zone diameter and MIC breakpoints for *Streptococcus pneumoniae*, pp: 92-7. In: Clinical and Laboratory Standards Institute (ed), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2021, 31st ed. USA.
13. Sorensen UB. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* 1993; 31(8): 2097-100.
14. Pai R, Moore MR, Pilishvili T, Gertz RE, Whitney CG, Beall B. Active Bacterial Core Surveillance Team. Postvaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. *J Infect Dis* 2005; 192(11): 1988-95.
15. Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis* 2010; 14(3): e197-209.
16. Farnham AC, Zimmerman CM, Papadouka V, Konty KJ, Zucker JR, Nattamai GV, Jose S, et al. Invasive pneumococcal disease following the introduction of 13-valent conjugate vaccine in children in New York City from 2007 to 2012. *JAMA Pediatr* 2015; 169(7): 646-52.
17. Waight PA, Andrews NJ, Ladhani SN, Sheppard CL, Slack MP, Miller E. Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its introduction: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2015; 15(5): 535-43.
18. Harboe ZB, Dalby T, Weinberger DM, Benfield T, Mølbak K, Slotved HC, et al. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination in invasive pneumococcal disease incidence and mortality. *Clin Infect Dis* 2014; 59(8): 1066-73.
19. Weinberger R, von Kries R, van der Linden M, Rieck T, Siedler A, Falkenhorst G. Invasive pneumococcal disease in children under 16 years of age: Incomplete rebound in incidence after the maximum effect of PCV13 in 2012/13 in Germany. *Vaccine* 2018; 36(4): 572-7.
20. Ubukata K, Takata M, Morozumi M, Chiba N, Wajima T, Hanada S, et al. Effects of Pneumococcal Conjugate Vaccine on Genotypic Penicillin Resistance and Serotype Changes, Japan, 2010-2017. *Emerg Infect Dis* 2018; 24(11): 2010-20.

21. Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MP, George RC. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2011; 11(10): 760-8.
22. Mendes RE, Costello AJ, Jacobs MR, Biek D, Critchley IA, Jones RN. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of USA *Streptococcus pneumoniae* isolates collected to prior to and post introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 80(1): 19-25.
23. Stephanie W Lo, Rebecca A Gladstone, Andries J van Tonder, John A Lees, Mignon du Plessis, Rachel Benisty, et al. Pneumococcal lineages associated with serotype replacement and antibiotic resistance in childhood invasive pneumococcal disease in the post-PCV13 era: an international whole-genome sequencing study. *Lancet Infect Dis* 2019; 19(7): 759-69.
24. Yalçın I, Gürlü N, Alhan E, Yaman A, Turgut M, Celik U, et al. Serotype distribution and antibiotic susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* disease isolates from children in Turkey, 2001-2004. *Eur J Pediatr* 2006; 165(9): 654-7.
25. Ceyhan M, Gurler N, Yaman A, Ozturk C, Oksuz L, Ozkan S, et al. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with invasive pneumococcal disease in Turkey: baseline evaluation of the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine nationwide. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18(6): 1028-30.
26. Olarte L, Barson WJ, Barson RM, Lin PL, Romero JR, Tan TQ, et al. Impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis in US children. *Clin Infect Dis* 2015; 61(5): 767-75.
27. Claudia L. Gaviria-Agudelo, Alejandro Jordan-Villegas, Carla Garcia, George H. McCracken Jr. The Effect of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine on the Serotype Distribution and Antibiotic Resistance Profiles in Children With Invasive Pneumococcal Disease. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2017; 6(3): 253-9.
28. Ben-Shimol S, Givon-Lavi N, Greenberg D, Stein M, Megged O, Bar-Yochai A, et al. Impact of pneumococcal conjugate vaccines introduction on antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* meningitis in children aged 5 years or younger, Israel, 2004 to 2016. *Euro Surveill* 2018; 23(47): 1800081.