

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Juliana Estevão Porto

**CONTROLE DA QUALIDADE DE VACINAS PNEUMOCÓCICAS CONJUGADAS  
10-VALENTE: REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA**

Rio de Janeiro

2017

Juliana Estevão Porto

**CONTROLE DA QUALIDADE DE VACINAS PNEUMOCÓCICAS CONJUGADAS  
10-VALENTE: REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Tutora: Claudia Maria da Conceição

Preceptora: Anna Carolina Machado Marinho

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Porto, Juliana Estevão

Controle da qualidade de vacinas pneumocócicas conjugadas 10-valente: revisão sistemática da literatura. / Juliana Estevão Porto. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2017.

89 f., il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária)– Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2015.

Preceptora: Anna Carolina Machado Marinho

Tutora: Claudia Maria da Conceição

1. Streptococcus pneumoniae. 2. Vacinas Pneumocócicas. 3. Controle de Qualidade. I.  
Título

Juliana Estevão Porto

**CONTROLE DA QUALIDADE DE VACINAS PNEUMOCÓCICAS CONJUGADAS  
10-VALENTE: REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovado em 10/08/2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

Silvana do Couto Jacob (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Michele Feitoza Silva (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Anna Carolina Machado Marinho (Mestre) - Preceptora

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

A vocês, que abriram mão de momentos de convívio e que se dedicaram sem medir esforços. Meu **marido**, meus **pais** e **avós**, **irmãzinha**, meu porto seguro, pelo extraordinário exemplo de amor, luta, dedicação e determinação. Ao meu **filho amado**, por toda a paciência e por dividir suas horas com a mamãe para a realização deste trabalho. AMORES DE MINHA VIDA, o meu muito obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por mais uma preciosa oportunidade e conquista.

A tutora Claudia Maria da Conceição e a preceptora Anna Carolina Machado Marinho, pela compreensão, carinho, disponibilidade e apoio nos momentos difíceis.

Aos colegas e amigos do Setor de Produtos Biológicos pela colaboração durante todo o período da Residência Multiprofissional em Saúde. Aprendi muito com cada um de vocês. Obrigada!

Aos colegas da Residência Multiprofissional em Saúde, pelo acolhimento e carinho.

Aos funcionários do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Agradeço também a todos aqueles que direta ou indiretamente, de alguma maneira ajudaram em mais esta conquista.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

## RESUMO

O *Streptococcus pneumoniae* é um agente etiológico importante em casos de pneumonia, meningite e sepse, principalmente na faixa etária pediátrica e idosa, podendo causar doença grave e invasiva. Desta forma, a prevenção da doença pneumocócica tem apresentado grande interesse para a saúde pública. Atualmente, a vacina pneumocócica conjugada 10-valente faz parte do Programa Nacional de Imunizações (PNI). Além da oferta de vacinas pneumocócicas à população, é responsabilidade das autoridades sanitárias assegurar a qualidade e eficácia dos imunobiológicos. Na Farmacopéia Européia existem recomendações para a identificação de polissacarídeos presentes nas vacinas pneumocócicas conjugadas, porém não há um consenso internacional com relação a qual tipo de método a ser empregado no controle de qualidade destas vacinas. O objetivo desta revisão foi relacionar as metodologias utilizadas para a identificação dos polissacarídeos encontrados na vacina pneumocócica conjugada 10-valente. Bases de dados (*PubMed*, *Science Direct*) foram consultadas retrospectivamente de 1996 a junho do presente ano, usando as seguintes palavras-chaves: polissacarídeo pneumocócico (*pneumococcal polysacharide*) combinada com caracterização (*characterization*), quantificação (*quantification*), massa molecular (*molecular size*), controle da qualidade (*quality control*) e vacinas conjugadas (*conjugate vaccines*). Os artigos identificados pela estratégia de busca inicial foram avaliados conforme os seguintes critérios de inclusão: (1) polissacarídeos dos sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, (2) metodologias relacionadas à identificação, teor e massa molecular dos polissacarídeos mencionados. Os estudos que cumpriram os critérios de inclusão foram avaliados quanto à qualidade metodológica, e foram excluídos artigos que não foram encontrados na íntegra. Apenas 5 artigos foram incluídos na revisão e apresentados em um quadro em que destacou-se suas características como, autores, ano de publicação desenho metodológico e os principais resultados foram descritos em tópicos segundo o código do artigo. A principal limitação deste estudo refere-se ao número limitado de estudos comparativos entre as metodologias utilizadas para a identificação e quantificação de polissacarídeos na vacina pneumocócica 10-valente. Os métodos avaliados pelos artigos selecionados foram: cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detecção de fluorescência, cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica com detecção amperométrica pulsada, ressonância magnética nuclear e cromatografia gasosa com detecção de massas seletivo, além de um método

imunoquímico, a nefelometria. Desse modo, foi possível relacionar os métodos que podem ser utilizados no controle da qualidade da vacina pneumocócica 10-valente.

Palavras-Chave: *Streptococcus pneumoniae*. Vacinas Pneumocócicas. Controle de Qualidade.

## ABSTRACT

*Streptococcus pneumoniae* is an important etiological agent in cases of pneumonia, meningitis and sepsis, especially in the pediatric and elderly age groups, which can cause severe and invasive disease. In this way, the prevention of pneumococcal disease has shown great interest for public health. Currently, the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine is part of the National Immunization Program (NIP). In addition to the supply of pneumococcal vaccines to the population, it is the responsibility of the health authorities to ensure the quality and efficacy of immunobiologicals. In the European Pharmacopoeia, there are recommendations for the identification of polysaccharides present in the pneumococcal conjugate vaccines, but there is no international consensus regarding which type of method to be used in the quality control of these vaccines. The objective of this review was to relate the methodologies used to identify the polysaccharides found in the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine. Databases (PubMed, Science Direct) were retrospectively consulted from 1996 to June of this year using the following keywords: pneumococcal polysaccharide combined with characterization, quantification, molecular mass, quality control and conjugate vaccines. The articles identified by the initial search strategy were evaluated according to the following inclusion criteria: (1) polysaccharides of serotypes 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F, (2) methodologies related to identification, content and molecular mass of the mentioned polysaccharides. The studies that met the inclusion criteria were evaluated for methodological quality, and articles that were not found in the whole were excluded. Only 5 articles were included in the review and presented in a table highlighting their characteristics as, authors, year of publication, methodological design and the main results were described in topics according to the article code. The main limitation of this study is the limited number of comparative studies between the methodologies used for the identification and quantification of polysaccharides in the 10-valent pneumococcal vaccine. The methods evaluated by the articles selected were: reverse phase high performance liquid chromatography with fluorescence detection, ion exchange high performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection, nuclear magnetic resonance and gas chromatography with selective mass detection, as well as a method immunochemistry, nephelometry. Thus, it was possible to relate the methods that can be used in the quality control of 10-valent pneumococcal vaccine.

Key-words: *Streptococcus pneumoniae*. Pneumococcal Vaccines. Quality Control

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estruturas da cápsula e parede celular do <i>Streptococcus pneumoniae</i>	18
Figura 2	Esquema da biossíntese do polissacarídeo capsular	23
Quadro 1	Marcos históricos no desenvolvimento da vacina contra pneumococos	41
Figura 3	Pesquisa simples PubMed - “ <i>pneumococcal polysaccharide</i> ” AND “ <i>characterization</i> ”	41
Figura 4	Pesquisa simples PubMed - “ <i>pneumococcal polysaccharide</i> ” AND “ <i>quantification</i> ”	41
Figura 5	Pesquisa simples PubMed - “ <i>pneumococcal polysaccharide</i> ” AND “ <i>molecular size</i> ”.	42
Figura 6	Pesquisa simples PubMed - “ <i>pneumococcal polysaccharide</i> ” AND “ <i>quality control</i> ”	42
Figura 7	Pesquisa simples PubMed - “ <i>pneumococcal polysaccharide</i> ” AND “ <i>conjugate vaccines</i> ”.	42
Figura 8	Pesquisa avançada Science Direct - “ <i>pneumococcal polysaccharide</i> ” AND “ <i>characterization</i> ”	43
Figura 9	Pesquisa avançada Science Direct - “ <i>pneumococcal polysaccharide</i> ” AND “ <i>quantification</i> ”	43
Figura 10	Pesquisa avançada Science Direct - “ <i>pneumococcal polysaccharide</i> ” AND “ <i>molecular size</i> ”	44
Figura 11	Pesquisa avançada Science Direct - “ <i>pneumococcal polysaccharide</i> ” AND “ <i>quality control</i> ”.	44
Figura 12	Pesquisa avançada Science Direct - “ <i>pneumococcal polysaccharide</i> ” AND “ <i>conjugate vaccines</i> ”	45
Quadro 2	Teste de relevância aplicado aos títulos e aos resumos dos artigos selecionados nas bases de dados	45
Quadro 3	Roteiro para extração de dados dos artigos incluídos na revisão sistemática da literatura	47
Figura 13	Descrição geral sobre o processo de revisão sistemática da literatura	48
Figura 14	Fluxograma dos estudos selecionados após aplicação do Teste de	49

	Relevância e aos Critérios de Inclusão e Exclusão	
Quadro 4	Características das referências incluídas na revisão sistemática	50
Gráfico 1	Distribuição dos artigos por tipo de autor	51
Gráfico 2	Distribuição dos artigos por tipo de autor (detalhado)	53
Quadro 5	Características dos estudos incluídos na revisão sistemática	54
Figura 15	Comparação entre três métodos diferentes para análise de carboidratos de polissacarídeos pneumocócicos – Tabela 1 e Fatores de resposta relativa à Detecção Amperométrica Pulsada de vários monossacarídeos antes e após hidrólise – Tabela 3 (Artigo 2)	59
Figura 16	Recuperação normalizada dos componentes monossacarídicos, relativo aos valores teóricos, para PNPs submetidos aos métodos de hidrólise e HPAEC-PAD – Tabela 4 (Artigo 2)	60
Quadro 6	Distribuição dos monossacarídeos usados como referência segundo os PSPn	61
Figura 17	Composição percentual em peso dos monossacarídeos usados para a quantificação dos PNPs – Tabela 5 (Artigo 2)	62
Figura 18	Curvas padrão dos polissacarídeos pneumocócicos determinadas por nefelometria (A, usando antissoro NYSPH e B, usando antissoro WLVP) – Figura 2 (Artigo 3)	64
Figura 19	A e B. Reação antígeno-anticorpo dos PSPn oxidados com periodato de sódio e reduzidos com borohidreto de sódio – Figura 3 (Artigo 3)	66
Figura 20	Espectro RMN <sup>1</sup> H na frequência operacional de 600 Hz do polissacarídeo 17F de <i>S. pneumoniae</i> – Figura 1 (Artigo 4)	68
Figura 21	Sobreposição das regiões espectrais selecionadas (4.64 a 5.89 ppm) dos 24 polissacarídeos - Figura 2 (Artigo 4)	70
Figura 22	Composição de monossacarídeos para os 13 sorotipos de polissacarídeos pneumocócicos – Tabela 1 (Artigo 5)	71
Figura 23	Cromatogramas para os 13 polissacarídeos pneumocócicos – Figura 2 (Artigo 5)	72
Figura 24	Otimização da metanólise para os PSPn 1 e 19A – Figura 4 (Artigo 5)	73
Figura 25	Cromatogramas dos polissacarídeos purificados, ativados e conjugados do sorotipo 7F – Figura 6 (Artigo 5)	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Indicações para revacinação com a vacina pneumocócica polissacarídica	29
Tabela 2	Definições dos testes de segurança biológica	34
Tabela 3	Definições dos testes de eficácia	35
Tabela 4	Artigos encontrados nas bases de dados, por palavras-chave	49

## LISTA DE SIGLAS

2-AB	2-aminobenzamida
ACIP	Comitê Consultivo para Práticas de Imunização
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CRIE	Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais
CRM197	Variante não tóxica diftérica
D <sub>2</sub> O	Óxido de Deutério
DPI	Doenças Pneumocócicas Invasivas
E.U.A.	Estados Unidos da América
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EMEA	Comissão Européia
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GC-MSD	Cromatografia Gasosa com Detector de Massas Seletivo
GSK	Glaxo Smith Kline
HF	Ácido Fluorídrico
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
HPAEC-PAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Troca Iônica com Detecção Amperométrica Pulsada
Hyl	Hialuronato liase
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
MS	Ministério da Saúde
NCBI	Centro Nacional para a Informação de Biotecnologia
NYSPH	New York State Public Health Laboratories
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBE	Prática Baseada em Evidência
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PCV10	Vacina Pneumocócica Conjugada 10-valente
PCV7	Vacina Pneumocócica Conjugada 7-valente
PD	Proteína D de <i>Haemophilus</i> não tipável
Ply	Pneumolisina
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PPV23	Vacina Pneumocócica Polissacarídica 23-valente
PSPn	Polissacarídeos Pneumocócicos
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de próton
SIREVA	Sistema Regional de Vacinas da OPAS
SSI	Statens Serum Institut
SUS	Sistema Único de Saúde
TD	Toxóide diftérico
TFA	Ácido Trifluoracético
TT	Toxóide tetânico
WHO	World Health Organization
WLVP	Wyeth-Lederle Vaccines & Pediatrics
Wzx	Fipase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1 Histórico</b> .....	16
<b>1.2 O Micro-organismo <i>Streptococcus Pneumoniae</i></b> .....	17
<b>1.3 Patogênese</b> .....	20
<b>1.4 Fatores de Virulência de Pneumococos</b> .....	22
1.4.1 Cápsula Polissacarídica .....	23
<b>1.5 Epidemiologia</b> .....	25
<b>1.6 Vacinas contra <i>Streptococcus Pneumoniae</i></b> .....	26
1.6.1 Vacinas de Polissacarídeos .....	29
1.6.2 Vacinas Conjugadas Polissacarídeo-Proteína.....	30
<b>1.7 Cenário atual da vacina no brasil</b> .....	32
<b>1.8 Vigilância sanitária e o controle de qualidade de vacinas</b> .....	34
<b>1.9 Revisão sistemática</b> .....	36
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	40
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	41
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	41
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	41
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	42
<b>4.1 Questão norteadora</b> .....	42
<b>4.2 Busca eletrônica</b> .....	42
<b>4.3 Palavras-chave</b> .....	42
<b>4.4 Estratégias de busca</b> .....	42
<b>4.5 Seleção dos estudos</b> .....	47
<b>4.6 Critérios para inclusão dos artigos</b> .....	47
<b>4.7 Critérios para exclusão dos artigos</b> .....	48
<b>4.8 Roteiro para extração de dados</b> .....	48
<b>4.9 Descrição e elaboração de uma revisão sistemática</b> .....	48
<b>5 RESULTADOS</b> .....	51
<b>5.1 Características dos estudos incluídos na revisão sistemática</b> .....	53
<b>5.2 Resultados dos estudos incluídos na revisão sistemática</b> .....	59
5.2.1 Artigo 1.....	60
5.2.2 Artigo 2.....	60
5.2.3 Artigo 3.....	64
5.2.4 Artigo 4.....	69

5.2.5 Artigo 5.....	73
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico

A bactéria *Streptococcus pneumoniae* se apresenta aos pares, denominado diplococo, ou em cadeias curtas, é Gram positiva, com 0,5 a 2,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro (MURRAY et al., 2002), e é, provavelmente, o mais importante agente etiológico bacteriano das otites médias, sinusites, pneumonias, meningites e sepses (TEELE, 1998). Há mais de um século, desde o seu primeiro isolamento, as infecções causadas pela bactéria continuam sendo grande causa de preocupação, pela sua frequência, morbidade e letalidade (CAPUTO et al., 1993). Ademais, as infecções ocorrem em todas as faixas etárias, sendo mais frequentes na infância e nas idades mais avançadas, como também em pessoas com uma doença de base ou imunodeficiência (BURMAN et al., 1985; BUTLER et al., 1998).

O *Streptococcus pneumoniae* foi primeiramente visualizado em tecidos pulmonares, em 1875, por Klebs, posteriormente por Ebert, em 1880 e por Koch em 1881. Paralelamente, em 1880, seu isolamento foi reportado por George Miller Sternberg nos Estados Unidos e por Louis Pasteur na França (AUSTRIAN, 1989; AUSTRIAN, 1999). O primeiro isolamento do pneumococo aconteceu de maneira peculiar, Sternberg inoculou a sua própria saliva em coelhos e Pasteur inoculou coelhos com saliva de um paciente com raiva. (HENRICHSEN, 1995).

O micro-organismo foi objeto de muitas investigações que levaram a muitas descobertas científicas ao longo dos anos. Em 1883, a associação entre o pneumococo e a pneumonia lobar foi descrita por Friedlander e Talamon, mas a pneumonia pneumocócica foi confundida com outros tipos de pneumonia até o desenvolvimento do teste de Gram, em 1884. Finalmente, em 1886, o austríaco Weichselbaum conseguiu estabelecer que o pneumococo era a bactéria mais frequentemente responsável pela pneumonia lobar (AUSTRIAN, 1999). De 1915 a 1945, a estrutura química e antigenicidade do polissacarídeo capsular pneumocócico, sua associação com virulência, e o papel do polissacarídeo bacteriano nas doenças humanas foram relatadas (WATSON et al., 1993).

Em um período de 10 anos este agente já estava associado como o agente causal de endocardites, meningites purulentas, otites, artrites, sinusites e conjuntivites (AUSTRIAN, 1989).

Em 1911, iniciou-se o desenvolvimento de vacinas pneumocócicas para o tratamento da pneumonia. Porém, o surgimento dos antibióticos alterou radicalmente o modo de tratamento das pneumonias e de outras infecções causadas por pneumococos. O aparecimento das sulfonamidas e, a descoberta da penicilina por Fleming em 1929, impulsionou a implementação da antibioticoterapia contra a pneumonia, inicialmente totalmente eficaz no tratamento destas infecções, o que desvalorizou o potencial patogênico da bactéria até o advento da resistência aos antimicrobianos. Com o aparecimento de cepas resistentes surgiu a necessidade de melhor conhecer os mecanismos de patogenicidade do *Streptococcus pneumoniae* (HENRICHSEN, 1995).

No final dos anos 60, a primeira vacina pneumocócica polivalente foi desenvolvida e licenciada nos Estados Unidos em 1977. Já a primeira vacina pneumocócica conjugada foi licenciada em 2000 no mesmo país.

## 1.2 O micro-organismo *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae*, ou pneumococo, é uma bactéria encapsulada e anaeróbia facultativa, com produção de  $\alpha$ -hemólise em placa de ágar sangue. Pertence ao grupo das bactérias ácido lácticas, denominada desta maneira, porque sob condições anaeróbicas, o produto principal do seu metabolismo é o ácido láctico. É nutricionalmente exigente, requerendo um meio complexo para o seu crescimento. Esta bactéria obtém energia estritamente por via fermentativa, sendo incapaz de realizar metabolismo respiratório, tanto aeróbico quanto anaeróbico, que é uma característica para todas as espécies de streptococos. Os únicos nutrientes dos quais os pneumococos conseguem obter energia suficiente para promover o crescimento e a divisão celular são os carboidratos (HOSKINS et al., 2001). É sensível ao calor e ao ressecamento, e por isso precisa de contato direto entre a fonte infectante e a pessoa suscetível (WILLET, 1992). Sua superfície apresenta três estruturas constituintes: membrana plasmática, parede celular e cápsula polissacarídica ilustradas pela Figura 1 (KIM; WEISER, 1998).

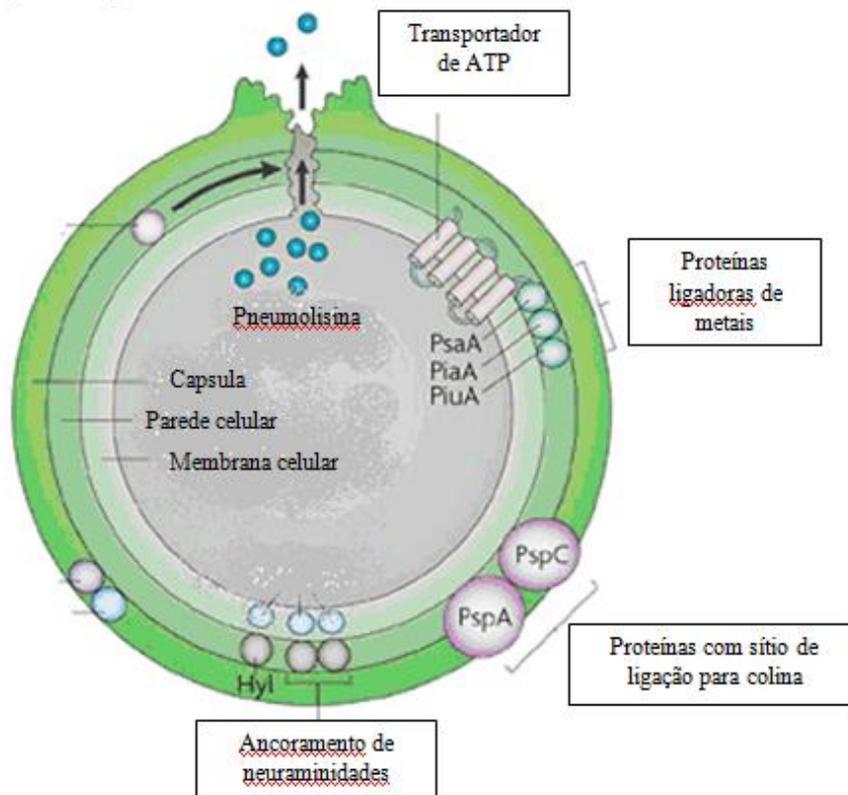
A membrana plasmática do pneumococo é constituída por uma bicamada lipídica, na qual estão inseridas proteínas e moléculas de ácido lipoteicóico (KIM; WEISER, 1998;

DAWSON, 2004). Já a parede celular, é composta de polissacarídeos e ácido teicóico (polissacarídeo C), apresenta resíduos de colina e ancora diversas proteínas de superfície (DAWSON, 2004). Além disso, a parede celular é responsável pela reação inflamatória intensa que acompanha as infecções pneumocócicas, uma vez que estimula o influxo de células inflamatórias e ativa a cascata alternativa do sistema complemento e induz a produção de citocinas (HAMMERSCHMIDT et al., 2005).

A cápsula polissacarídica compõe o envoltório externo do pneumococo, e é essencial para a virulência, sendo a regulação do seu tamanho crítica para a sobrevivência em diferentes ambientes no hospedeiro. Esta estrutura é reconhecidamente o fator de virulência mais expressivo do pneumococo, que o protege contra a ação dos mecanismos de defesa inespecíficos do hospedeiro durante a infecção (MORONA et al., 1999).

Alguns estudos demonstraram que altas quantidades de polissacarídeo impedem a adesão às células do hospedeiro, provavelmente pelo mascaramento dos outros determinantes de virulência, como: hialuronato liase (Hyl), pneumolisina (Ply), NanA e NanB, LytA, CbpA, PsaA e PspA (JEDRZEJAS, 2001), como mostra a Figura 1. A expressão do polissacarídeo torna o micro-organismo resistente aos mecanismos de lise mediada pelo sistema complemento e opsonofagocitose (KIM; WEISER, 1998; DAWSON, 2004; HYAMS et al., 2010). Já as cepas encapsuladas não são virulentas.

Figura 1- Estruturas da cápsula e parede celular do *Streptococcus pneumoniae*.



Fonte: (adaptado de KADIOUGLU et al., 2008)

Diante da grande diversidade de composição dos polissacarídeos na cápsula pneumocócica, já se encontram descritos na literatura cerca de 100 sorotipos diferentes. Os sorotipos de pneumococos são classificados de acordo com dois sistemas de nomenclatura (YOTHER, 2011). O dinamarquês se baseia nas características estruturais e antigênicas da cápsula polissacarídica dividindo-os em grupos. Para distinguir os sorotipos dentro destes grupos adicionam-se letras: F (“first”) para o primeiro tipo descoberto, A para o segundo e assim sucessivamente. A nomenclatura Americana baseia-se somente nas características estruturais da cápsula, designando números de acordo com o isolamento cronológico de cada sorotipo. Embora cada sistema adote uma forma peculiar de classificação, existe uma correlação entre as duas nomenclaturas (LUND; HENRICHSEN, 1978).

A identificação laboratorial do pneumococo pode ser feita por meio da cultura, de métodos imunológicos ou da biologia molecular. Quando há crescimento bacteriano em cultura, o pneumococo é identificado pelo aspecto morfológico das colônias, pela coloração ao Gram e pelo teste de sensibilidade à optoquina, e eventualmente pelo teste de solubilidade à bile (WILLETT, 1992; GUDUCUOGLU et al., 2001). A vantagem da cultura é que se a

cepa for isolada pode-se testar a sensibilidade desta bactéria aos antibióticos, o que não é possível com os testes imunológicos (REQUEJO, 1996).

Os métodos imunológicos baseiam-se nas reações antígeno-anticorpo com a definição do antígeno polissacáride capsular e identificação do pneumococo. Elas compreendem a contra-imunoelektroforese, aglutinação por partículas de látex, coaglutinação e ensaio imunoenzimático (ELISA) (PETER, 1988; FEDSON; MUSER, 1994). Já a biologia molecular surgiu com a PCR (reação em cadeia de polimerase), a qual identifica os agentes a partir do seu material genético (DOMINGUEZ et al., 2001; GREINER et al., 2001; MURDOCH et al., 2003). Associando-se a cultura com os testes imunológicos aumenta-se a possibilidade de identificação do agente etiológico causador da patologia (REQUEJO, 1996).

### 1.3 Patogênese

As doenças pneumocócicas representam um problema de saúde pública, acometendo todas as faixas etárias, principalmente os extremos de idade, e são responsáveis por grande número de hospitalizações em todo o mundo. *Streptococcus pneumoniae* é o principal agente etiológico das pneumonias adquiridas na comunidade, que constituem a principal causa de mortes entre as doenças preveníveis por imunização (O'BRIEN et al., 2009).

A transmissão dos pneumococos se dá, geralmente, por contato direto entre indivíduos e é favorecida pela aglomeração de pessoas. Infecções respiratórias virais e clima frio podem facilitar a disseminação desse micro-organismo. Entre 30% e 40% das otites médias agudas, 40% das sinusites agudas e 60% das pneumonias bacterianas adquiridas na comunidade são causadas pelos pneumococos (FRANCO-ALVAREZ DE LUNA et al., 2005)

O pneumococo pode causar tanto doenças em nível de mucosa (não invasivas) como doenças invasivas quando há o seu isolamento de locais habitualmente estéreis como sangue, líquido encéfalo-raquidiano, pleural ou sinovial. Dentre as doenças não invasivas estão a otite aguda no ouvido médio ou otite média aguda, sinusite, conjuntivite, bronquite e pneumonia. Já entre as doenças pneumocócicas invasivas (DPI) estão a pneumonia bacterêmica, meningite, peritonite, artrite, osteomielite, bacteremia e sepsis (BRICKS; BEREZIN, 2006).

A região da nasofaringe é considerada a porta de entrada e o nicho biológico no qual ocorre a colonização pelo pneumococo. A colonização pode ocorrer sem sintomas ou doença, sendo conhecida como “estado de portador” (BOGAERT et al., 2004). Nos países em

desenvolvimento, a prevalência de portadores assintomáticos está em torno de 95% em crianças saudáveis abaixo de 3 anos de idade e 40% em adultos. A taxa de portadores assintomáticos de pneumococos varia de acordo com o grupo etário, regiões geográficas, ambiente e a presença de infecções do trato respiratório superior (BAROCCHI et al., 2006).

Muitos autores, como Baldy (2005), acreditam que a aquisição de *Streptococcus pneumoniae* ocorra pelo contato com aerossóis. Segundo a literatura, a fixação das bactérias ao epitélio se dá mediante adesão através de moléculas de proteínas presentes na sua superfície seguida de multiplicação na nasofaringe do portador. Sendo assim, a prevalência de sorotipos específicos deve-se, em parte, ao grau de expressão e conformação de adesinas pneumocócicas de superfície que permitem o reconhecimento e a adesão à célula hospedeira.

A patogênese da infecção pneumocócica envolve a colonização da nasofaringe, seguida por sua disseminação pelo ouvido médio, trato respiratório inferior e, em alguns casos, invasão da corrente sanguínea. A progressão para pneumonia se dá pela fagocitose ineficiente, permitindo a multiplicação do pneumococo nos alvéolos e a liberação de citocinas no fluido broncoalveolar, enquanto a meningite e outras doenças invasivas como endocardite, artrite, osteomielite e perionites resultam da disseminação hematogênica (TUOMANEN, 1999; FEDSON et al., 1999; NOVAK; TUOMANEN, 1999; GARCÍA-RODRIGUEZ; MARTINEZ, 2002; BOGARET et al., 2004; BALDY, 2005).

Ademais, há três vias de entrada de bactérias ao sistema nervoso central: por inoculação direta, por continuidade de estruturas adjacentes ou por via hematogênica. Esta última é a mais comum e o ponto de entrada é o trato respiratório superior. Na nasofaringe a bactéria passa por cinco etapas até atingir o sistema nervoso central: fixação e colonização, invasão da corrente sanguínea, sobrevivência e multiplicação no sangue, passagem através da barreira hemato-encefálica, sobrevivência e multiplicação do micro-organismo no líquor (HINRICHSSEN, 2005).

A fisiopatogenia da doença pneumocócica depende fortemente da resposta inflamatória induzida pelos peptidoglicanos e ácido teicóico da parede bacteriana. Essas estruturas são responsáveis pela intensa resposta inflamatória que acompanha a infecção pneumocócica, uma vez que estimulam o influxo de células inflamatórias, ativam a produção de citocinas e a cascata do complemento (QUAGLIARELLO; SHIELD, 1992; BOGAERT et al., 2004).

O complemento é um dos componentes essenciais na imunidade do hospedeiro na eliminação de pneumococos invasivos. As principais funções efetoras do sistema complemento na imunidade natural e humoral específica são promover a fagocitose de micro-organismos nos quais o complemento está ativado, estimular a inflamação e induzir a lise

celular destes micro-organismos, tendo uma particular importância na defesa do hospedeiro contra bactérias encapsuladas, a qual é mediada inteiramente pela imunidade humoral (DELVES et al., 2006; ABBAS et al., 2008).

Por ser uma bactéria Gram-positiva e apresentar uma parede celular espessa, o pneumococo não está sujeito à lise direta pelo sistema complemento através do complexo de ataque à membrana (DOWSON, 2004). Desta forma, a principal função do sistema complemento nas infecções pneumocócicas está relacionada à opsonização e destruição por macrófagos e neutrófilos (BROWN et al., 2002).

No entanto, o pneumococo desenvolveu estratégias de proteção a fim de limitar o ataque pelo complemento, como a cápsula polissacarídica. A capacidade do pneumococo de causar doenças invasivas é altamente dependente do sorotipo capsular. Assim, a capacidade de evasão de sorotipos altamente invasivos dos mecanismos de opsonofagocitose pode ser a principal estratégia utilizada por estes micro-organismos, já que os sorotipos pouco invasivos, de forma contrária, necessitam de fatores predisponentes do hospedeiro para causarem doenças. Este dado pode explicar o fato de que as crianças com deficiências de algumas proteínas do sistema complemento são suscetíveis à infecção por sorotipos pouco invasivos, os denominados sorotipos pediátricos – 6A/6B, 14, 19F e 23F (VALLES et al., 2010).

#### **1.4 Fatores de virulência de pneumococos**

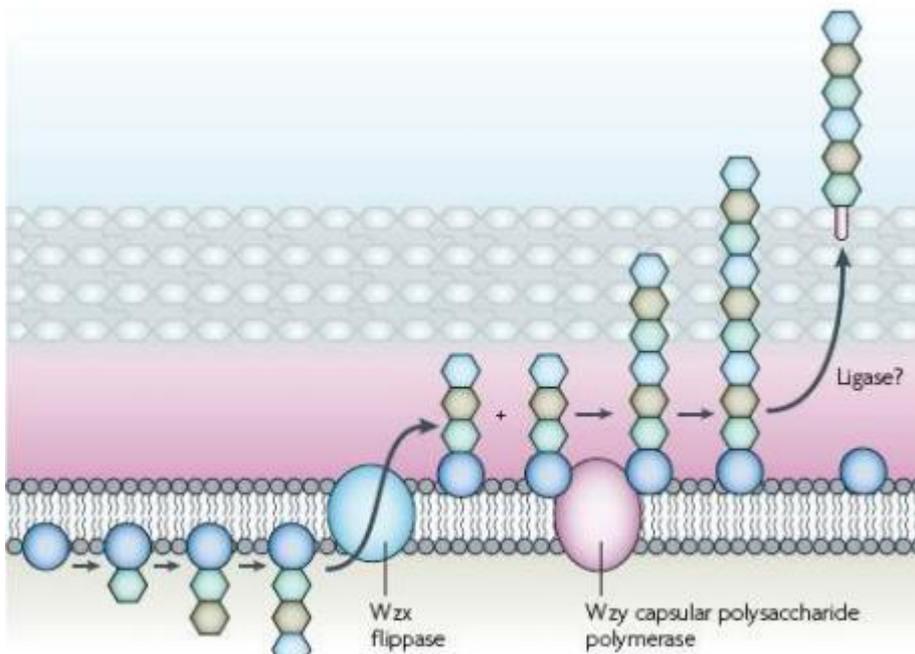
A patogenicidade dos pneumococos é atribuída a estruturas basicamente situadas na superfície da célula bacteriana. Estes fatores podem ser divididos em dois grupos: um grupo formado pela cápsula polissacarídica e proteínas de superfície e o outro composto por componentes da parede celular e a toxina intracelular (pneumolisina). Entretanto, a cápsula polissacarídica tem sido reconhecida como o principal fator de virulência dos pneumococos através do qual o micro-organismo é capaz de driblar os mecanismos não específicos de defesa do hospedeiro, como a fixação do complemento e a fagocitose (BRILES et al., 1992).

#### 1.4.1 Cápsula Polissacarídica

A cápsula polissacarídica é a camada mais externa da célula de *Streptococcus pneumoniae*. Trata-se de um polímero de alto peso molecular composto de unidades repetidas de oligossacarídeos, os quais possuem de dois a oito monossacarídeos que permanecem presos covalentemente na parede da bactéria. Estes polissacarídeos são importantes em uma variedade de processos fisiológicos do micro-organismo, incluindo a integridade estrutural, sinalização e desenvolvimento (VENTURA et al., 2006). Possuem também, alguns componentes que não são sacarídeos, explicando, desta forma, a grande variabilidade antigênica destes polímeros (KADIOGLU et al., 2008).

Os polissacarídeos capsulares são compostos por unidades repetitivas de oligossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. A síntese da maioria dos polissacarídeos capsulares de pneumococos requer uma importante via complexa, que é realizada inicialmente pela transferência de unidades monossacarídicas para um carreador lipídico associado à membrana plasmática da célula bacteriana. Após a formação da unidade repetitiva (Figura 2), esta é transferida para a face externa da membrana citoplasmática através da flipase (Wzx) e polimerizada (polimerase WzX) formando o polissacarídeo maduro que é então ligada a peptidoglicana da parede celular (KADIOGLU et al., 2008).

Figura 2 - Esquema da biossíntese do polissacarídeo capsular.



Fonte: (KADIOGLU et al., 2008)

A cápsula é sintetizada rapidamente e extensivamente durante a fase exponencial de crescimento da bactéria. A maioria dos polissacarídeos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* possui carga negativa e uma pequena parcela é neutra (sorotipos 7F, 14 e 33) (KADIOGLU et al., 2008).

A virulência de um dado sorotipo de pneumococos está relacionada principalmente com a estrutura química da cápsula (AUSTRIAN, 1981) e com a quantidade de cápsula produzida (MAGEE; YOTHER, 2001). Segundo Fernebro e colaboradores (2004), a cápsula polissacarídica está relacionada ao grau de lise espontânea ou induzida por antibióticos. Uma das alternativas para explicar este fenômeno é que dependendo da estrutura química da cápsula, esta protege a membrana plasmática da ruptura. Desta forma, contribuindo para tolerância aos antibióticos. Alguns sorotipos de pneumococos estão mais associados à resistência à antibióticos, no entanto, pode ocorrer troca de material genético entre cepas por transformação e modificar o padrão de resistência vigente (SCHRAG, et al., 2000).

A sobrevivência de pneumococos nos diferentes *habitats* do hospedeiro está diretamente ligada à capacidade da bactéria em regular a quantidade de cápsula produzida. *Streptococcus pneumoniae* apresenta dois fenótipos (morfologia das colônias: opaco e transparente) diferentes de acordo com a quantidade de cápsula produzida e este processo de variação de fase ocorre espontaneamente. No entanto, o mecanismo genético que contribui para tal

processo ainda não está elucidado (GARCÍA; LÓPEZ, 2004). O fenótipo transparente que produz pequena quantidade de polissacarídeo capsular tem sido demonstrado como mais eficiente na colonização da superfície da mucosa da nasofaringe e mais hábil em residir nesta superfície, provavelmente pela exposição de estruturas presentes na superfície de pneumococos, como adesinas, que são requeridas na fase de colonização. Já o fenótipo opaco é mais associado às infecções sistêmicas, onde há requerimento de expressão máxima de cápsula polissacarídica, que inibe a opsonização mediada pelo complemento (HAMMERSCHMIDT et al., 2005).

## 1.5 Epidemiologia

Mundialmente, o *Streptococcus pneumoniae* é responsável por cerca de 14,5 milhões de episódios de doença grave e 826.000 mortes anuais em crianças de 1 a 59 meses (O'BRIEN et al., 2009). Cerca de 20 sorotipos estão associados com mais de 80% da doença pneumocócica invasiva em todas as faixas etárias, onde os 13 mais comuns causam pelo menos 70-75% das doenças invasivas em crianças (WHO, 2007).

Para cada mil crianças nascidas no Brasil, Chile e Uruguai, a doença pneumocócica resulta em 324 casos de otite média, 79 casos de pneumonia, 48 casos de meningite e menos de um apresenta sepse, estimando-se 21 mortes para cada mil crianças por doenças pneumocócicas (WHO, 2007).

Os aspectos epidemiológicos da doença pneumocócica variam de um país a outro, ao longo do tempo e de acordo com a faixa etária da população afetada, o que determina a necessidade de avaliações locais periódicas para o estabelecimento de estratégias de controle (MANTESE et al., 2003; OSELKA, 2003).

De acordo com a estrutura química do polissacarídeo capsular, são reconhecidos cerca de 100 sorotipos de pneumococo, sendo que as decisões acerca da formulação e da aplicação de vacinas dependem das informações regionais e temporais de quais desses sorotipos causam doenças. Desse modo, estudos sobre a distribuição destes sorotipos em diferentes países têm demonstrado que a prevalência destes pode variar conforme a idade, região geográfica, período de tempo e tipo de infecção (DAGAN et al., 1999; GONZALEZ et al., 2004).

Os sorotipos responsáveis pela maior parte das infecções pneumocócicas são: 14, 3, 9V, 19A, 1, 6A, 23F e 7 em adultos e 1, 5, 6B, 14, 19F, 7, 9V, 12, 23F em crianças. Os sorotipos

6A, 6B, 14, 19F, e 23F são pouco imunogênicos e, por isso, são denominados sorotipos pediátricos. A distribuição de sorotipos é um processo dinâmico devido ao aparecimento de novos sorotipos, dentre outros fatores (MANTESE et al., 2003).

Dos sorotipos identificados, 12 (14, 1, 6B, 18C, 5, 3, 6A, 23F, 9V, 19F, 4, 19A) são prevalentes no Brasil, correspondendo a aproximadamente 80% do total das cepas isoladas clinicamente (BRANDILEONE et al., 1999; MANTESE et al., 2003).

Nesse contexto, o conhecimento dos sorotipos prevalentes nas diferentes regiões do mundo é fundamental para a prevenção da doença pneumocócica fundamentada na imunização ativa (BRANDILEONE et al., 1999).

## **1.6 Vacinas contra *Streptococcus pneumoniae***

Um dos avanços mais notáveis na história da humanidade foi a descoberta das vacinas e sua popularização em escala global, com o objetivo de erradicar as doenças infecciosas ou, ao menos, mantê-las sob controle. A descoberta e aperfeiçoamento das vacinas foram impulsionados por muitos fatores, sendo os de natureza psicossocial, como o terror das epidemias, e econômica pelos prejuízos na agricultura e na veterinária, os mais importantes (MARTINS et al., 2008).

O termo vacinação foi citado pela primeira vez como referência à *vaccinia*, o vírus da varíola bovina. Por conseguinte, Pasteur atribuiu o nome *vaccina* a um preparado antigênico como uma maneira de homenagear Edward Jenner pelo seu trabalho no combate à varíola. Estes estudos originaram a idéia de proteção do hospedeiro através do agente causador da doença. Vacina é definida como a preparação de micro-organismos atenuados, ou mortos, ou de seus componentes, ou de seus produtos, utilizada para induzir imunidade ativa contra uma doença (TEIXEIRA; ALMEIDA, 2003; LEAL, 2011).

Os séculos XVIII e XIX tiveram dois grandes marcos na história da vacinação: Jenner com suas observações sobre a indução de proteção contra a varíola e Pasteur com as vacinas atenuadas. Desde então o incremento do conhecimento nas áreas de imunologia e biologia molecular propiciaram o crescimento consolidado da diversidade de vacinas disponíveis à população humana. Dessa maneira, as vacinas tornaram-se ferramentas indispensáveis ao controle de muitas doenças infecto-contagiosas (ROCHA; PIMENTEL, 2008).

As primeiras preparações da vacina contra pneumococos utilizavam a bactéria crescida em caldo e as células inteiras eram suspensas em salina e mortas por aquecimento. Uma série de estudos clínicos foram realizados entre 1911 e os anos 1930 empregando vacina de célula inteira morta pelo calor, e apesar da dificuldade em se avaliar eficácia destas vacinas, os resultados foram considerados positivos na época em termos da redução da incidência de pneumonia. Muitas lições foram aprendidas durante o período de utilização da vacina de célula inteira tais como: métodos para preparação de vacinas, administração, dosagem, desenvolvimento de métodos para avaliação da resposta imune e a importância de um desenho rigoroso dos estudos clínicos para evitar viés nos resultados (MAKELA; BUTLER, 2008).

De acordo com Makela e Butler (2008), a busca por vacinas mais seguras e com o mínimo de reações indesejáveis estimulou a identificação de estruturas específicas, suficientemente imunogênicas capazes de substituir todo equipamento celular. Então, surgem os primeiros experimentos empregando polissacarídeos capsulares purificados de pneumococos.

A descoberta da penicilina em 1929 por Fleming e a sua introdução na década de 40 foi um grande avanço no tratamento das doenças infecciosas causadas por *Streptococcus pneumoniae*, entretanto ocasionou uma diminuição do interesse pelo desenvolvimento e utilização de uma vacina contra essa bactéria (JACOBS, 1998).

As altas taxas de morbidade e mortalidade das doenças pneumocócicas mesmo após o uso generalizado de antimicrobianos apontavam para necessidade de retomar, de forma urgente, o desenvolvimento das vacinas polissacarídicas (LEE et al., 1991). No Quadro 1 estão apresentados os principais eventos relacionados ao desenvolvimento da vacina contra pneumococos.

Quadro 1 - Marcos históricos no desenvolvimento da vacina contra pneumococos.

Ano	Evento
1981	Pasteur e Sternberg descobriram, isolaram e identificaram <i>S. pneumoniae</i> em cultura.
1916	Lister demonstrou o valor protetor da vacina de célula inteira morta por aquecimento.
1926	Felton e Bailey foram os primeiros a isolarem polissacarídeo capsular de pneumococos.
1930	Tillett e Francis verificaram que polissacarídeo capsular purificado de pneumococos induziam anticorpos específicos em humanos.
1938	Felton mostrou que a proteção da doença é tipo-específica em indivíduos vacinados com os tipos de PSs 1 e 2. Ekwurzel e associados conduziram os primeiros testes clínicos do PSs e encontraram uma significativa redução nos episódios de pneumonia e mortalidade.
1945	MacLeod e Heindelberger demonstraram que a infecção pneumocócica é tipo específica no homem e poderia ser prevenida por uma vacina tetravalente, incluindo os PSs tipos 1,2 4, e 7.
1946	Foram produzidas duas vacinas comerciais hexavalente contra pneumococos, uma para adultos e outra para crianças; entretanto, a ampla disponibilidade de antibióticos para o tratamento de infecções pneumocócicas levou a uma diminuição no interesse na vacinação; estas vacinas ficaram disponíveis somente por 3 anos.
1947	Kauffman, utilizando uma vacina trivalente, mostrou proteção tipo-específica contra pneumonia e bacteremia em indivíduos idosos.
1964	Austrian e Gold constataram que os índices de mortalidade por pneumonia permaneciam elevados mesmo em pacientes tratados com antibióticos.
1967	Aparecimento pela primeira vez de cepas resistentes a níveis mais elevados de penicilina.
1968	National Institutes of Health e Merck, Sharp & Dohme conduziram estudos de eficácia e segurança de vacinas pneumocócicas 6 e 13-valente. Estes estudos mostraram uma redução de 82,3% nas bacteremias pneumocócicas para os tipos presentes na vacina.
1977	Robert Austrian e colaboradores produziram uma vacina 14-valente contra pneumococos licenciada pelo FDA.
1983	Substituição da vacina 14-valente contra pneumococos pela 23-valente licenciada pelo FDA.
2000	Vacina comercial conjugada 7-valente Prevnar (Wyeth).
2003	Vacina conjugada: novas formulações – Ensaio clínicos.
2010	Vacina comercial conjugada 10-valente (GSK) e 13-valente (Wyeth).

Fonte: (LEE et al., 1991, adaptado pela pesquisadora)

O avanço da imunogenicidade e a eficácia das vacinas antipneumocócicas, introduzidas desde 1983, colocou em evidência a sua importância no controle e prevenção das doenças pneumocócicas como a primeira causa de mortes evitáveis pela vacinação (HOMMA et al., 2003). Como pode ser visualizado no Quadro 1 as vacinas antipneumocócicas podem ser de

dois tipos, com base em suas contribuições: vacinas antipneumocócicas polissacarídicas, cuja composição apresenta apenas polissacarídeos livres e vacinas antipneumocócicas conjugadas, compostas por polissacarídeos covalentemente ligados a proteínas que atuam como carreadoras.

### 1.6.1 Vacinas de Polissacarídeos

As vacinas polissacarídicas contra *Streptococcus pneumoniae* licenciadas pelo Food and Drug Administration (FDA) vem sendo utilizadas desde o final da década de 70, primeiramente a 14-valente e atualmente a 23-valente, Pneumovax 23 (PPV23) fabricada pelo Merck Research Laboratories nos E.U.A. e Pneumo 23 fabricada pela Sanofi Pasteur AS na França (BUTLER et al., 1993). Estas vacinas contêm 23 antígenos de polissacarídeo capsular purificado (sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F) selecionados baseados em dados da vigilância epidemiológica principalmente nos E.U.A. e Europa. Nestas vacinas estão representados pouco mais de 80% dos sorotipos responsáveis por doenças invasivas no Brasil (RUBINS et al., 1999; OSELKA, 2003).

Apesar das vacinas possuírem um amplo espectro, apresenta baixa imunogenicidade e não é eficaz em crianças abaixo de 2 anos de idade, que sofrem as maiores taxas de doença pneumocócica (RIJKERS et al., 1998).

A baixa eficiência das vacinas polissacarídicas pode ser explicada pela resposta imune no indivíduo. Os antígenos polissacarídicos não estimulam resposta imunológica celular dependente de linfócito T, isso implica a ausência de memória e limita o período de proteção. Portanto, a resposta imunológica aos antígenos T-independentes é de curta duração, não havendo indução de memória imunológica e maturação da resposta imune. O sistema imunológico das crianças abaixo de dois anos de idade não responde adequadamente aos antígenos T-independentes, o que significa uma resposta deficiente exatamente na faixa etária de maior risco em crianças (BIXLER; PILLAI, 1989; LEE et al., 1991; OSELKA, 2003).

De acordo com a WHO (2008), a PPV23 foi desenvolvida para prevenir a doença pneumocócica em adultos. Esta vacina está licenciada para o uso em adultos e crianças acima de 2 anos que possuam um quadro de alto risco em adquirir infecções respiratórias pneumocócicas. O Comitê Consultivo para Práticas de Imunização (ACIP) relata que a

PPV23 tem uma eficácia de 61-75% em crianças acima de 2 anos de idade bem como em adultos e, assim são úteis para diversas finalidades.

O Ministério da Saúde preconizou a partir de 1990 as vacinas polissacarídicas capsulares pneumocócicas licenciadas desde 1977 para a lista de imunobiológicos do Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais/CRIE para grupos populacionais especialmente suscetíveis ao *Streptococcus pneumoniae*. A vacina foi incorporada pelo Programa Nacional de Imunizações, no ano de 1992, para grupos com quadros clínicos específicos. A partir de 1999, passou a ser aplicada durante a Campanha Nacional de Vacinação do Idoso, com vistas a atingir às pessoas de 60 anos ou mais e mais que convivem em locais fechados (SUCCI; FARHAT, 2006). A vacina era aplicada em dose única e a revacinação dependia da indicação e da idade do paciente, de acordo com o esquema da Tabela 1.

Tabela 1 - Indicações para revacinação com a vacina pneumocócica polissacarídica.

<b>Indicação</b>	<b>Revacinação</b>
Idade acima de 60 anos	1 dose após 5 anos, se foi vacinado após 65 anos.
Imunodeficiências, tumores ou após transplante, asplenia anatômica ou funcional, síndrome nefrótica	1 dose após 5 anos
Doenças crônicas cardíacas, pulmonres ou metabólicas, fístula liquórica	Não indicada
Asplenia anatômica ou funcional, síndrome nefrótica	Crianças até 10 anos 1 vez após 3 anos >10 anos 1 vez após 5 anos

Fonte: (SUCCI; FARHAT, 2006)

Na tentativa de solucionar o problema da baixa imunogenicidade dos polissacarídeos capsulares foram propostas vacinas conjugadas obtidas através da ligação covalente destes antígenos a proteínas carreadoras (BLACK et al., 2000).

### 1.6.2 Vacinas Conjugadas Polissacarídeo-Proteína

Desde 1929 já se sabe que a ligação covalente de polissacarídeos capsulares a proteínas eleva a imunogenicidade dos polissacarídeos (POLAND, 1999). Essas proteínas podem ser

provenientes do próprio micro-organismo (proteína homóloga) ou de outro agente como toxóide tetânico, toxóide difitérico, variante não tóxica da toxina diftérica (CRM197) e proteína de membrana externa de meningococo, e são responsáveis pela mudança na natureza da resposta imune (BLACK et al., 2000).

A diferença na resposta imune entre as vacinas baseadas em polissacarídeos e as vacinas conjugadas a proteínas é a promoção de uma resposta dependente da célula T promovida pela proteína. Isso leva à indução de células B de memória, o que ocasiona uma melhor resposta imune na infância (KLEIN, 1997). O sucesso da vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), em diversos países, estimulou o desenvolvimento de vacinas conjugadas contra pneumococos e, no ano de 2000, foi licenciada a primeira vacina conjugada contra *Streptococcus pneumoniae* (BLACK et al., 2000).

A primeira vacina conjugada contra pneumococos licenciada pelo FDA e disponível no mercado foi a vacina 7-valente Prevnar™ produzida pelos laboratórios Wyeth nos E.U.A. e na Europa. A determinação dos sorotipos prevalentes, selecionados como candidatos a vacina foi feita a partir da correlação com as doenças invasivas e resistência aos antibióticos. Assim, os sorotipos incluídos nesta vacina foram 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F conjugados com a proteína carreadora CRM<sub>197</sub> (BLACK et al., 2000; PELTON et al., 2003).

Esta vacina apresenta uma cobertura acima de 80% dos isolados pneumocócicos na América do Norte, 70% na Oceania, aproximadamente 60% na América Latina e África e 40% na Ásia. A vacina 7-valente foi registrada em mais de 70 países e introduzida em 12 Programas Nacionais de Imunizações (WHO, 2007).

No Brasil, a vacina conjugada 7-valente foi licenciada em 2001 e aprovada para uso pelo Ministério da Saúde em outubro de 2002. Esta vacina está disponível na rede pública nos CRIEs somente para crianças com alto risco de desenvolver doenças invasivas. Dados do projeto SIREVA (Sistema Regional de Vacinas da OPAS) relataram que a cobertura oferecida pela vacina 7-valente no Brasil seria de 63,5%, devido à importante participação dos sorotipos 1 e 5, que são prevalentes no país e não fazem parte da composição da vacina (BRANDILEONE et al., 1997).

Em março de 2009, a empresa GlaxoSmithKline (GSK) recebeu autorização da Comissão Européia (EMEA) para iniciar o uso da vacina 10-valente (Synflorix) na Europa. No Brasil este produto foi aprovado em junho de 2009 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esta vacina inclui os sorotipos contidos na vacina 7-valente e mais os sorotipos 1, 5 e 7F, os quais geralmente são responsáveis por doenças em crianças nos países em desenvolvimento. Nesta vacina são utilizados três tipos de proteínas carreadoras: Toxóide

tetânico (TT) conjugado ao polissacarídeo do sorotipo 18C, toxóide diftérico (TD) conjugado ao polissacarídeo 19F e a proteína D de *Haemophilus* não tipável (PD) conjugado aos demais polissacarídeos. A cobertura vacinal com a presença dos três sorotipos é cerca de 88% nos EUA e Canadá, 84% na Europa, 81% na América Latina, África e Oceania, e 66% na Ásia (HAUSDORFF et al., 2000).

A escolha da vacina a ser incluída em um programa nacional de imunização depende de diversos fatores: epidemiologia da doença; evidências de eficácia e efetividade; logística da distribuição das vacinas; esquema a ser empregado, dentre outros (WHITNEY et al., 2001). O Brasil incluiu a Synflorix em sua política nacional de saúde pública e a partir de 2010, o Sistema Único de Saúde (SUS) passou a oferecer esta vacina de forma gratuita para todas as crianças com até um ano de idade (BRASIL, 2010).

A vacina adquirida pelo MS é eficaz contra dez sorotipos, aumentando a cobertura que passou de 63,5% (7-valente) para 82,5% (10-valente) (HAUSDORFF et al., 2014).

Em 2010, a vacina Prevnar 13-valente produzida pela Wyeth também foi licenciada no Brasil e está disponível apenas na rede privada. Esta vacina contém todos os sorotipos presentes na vacina 10-valente da GSK e mais os sorotipos 3, 6A e 19A, todos conjugados com o CRM197. Com o desenvolvimento de novas vacinas pneumocócicas, países que utilizavam a PCV7, a substituíram gradativamente pela PCV10 ou PCV13. Atualmente, mais de 40 países utilizam a PCV10 em seus programas de imunização (BRASIL, 2010; HAUSDORFF et al., 2014).

As vacinas conjugadas são altamente imunogênicas em crianças abaixo de dois anos de idade, entretanto possuem algumas restrições como um custo elevado, tendo em vista o esquema recomendado de quatro doses e a sua eficácia é basicamente sorotipo específica, ou seja, está limitada ao número de sorotipos incluídos na vacina.

## **1.7 Cenário atual da vacina no Brasil**

O Programa Nacional de Imunizações (PNI) é considerado como referência para a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Desde as primeiras vacinações, o Brasil acumulou quase 200 anos de imunizações, sendo que somente a partir da criação do PNI, em 1973, desenvolveu ações planejadas e sistematizadas (BRASIL, 1976).

O objetivo prioritário do PNI era promover o controle da poliomielite, do sarampo, da tuberculose, da difteria, do tétano, da coqueluche e manter erradicada a varíola. Hoje, o PNI tem objetivo mais abrangente, dentre os quais, alcançar e manter o controle das infecções pneumocócicas e suas complicações (TEMPORÃO et al., 2005).

No Brasil, a vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV10) foi introduzida no calendário de vacinação da criança do PNI durante o ano de 2010, sendo implementada de março a outubro em todos os municípios. Antes disto, a vacina pneumocócica conjugada 7-valente (PCV7) estava disponível apenas em clínicas privadas, bem como nos Centros de Referências para Imunobiológicos Especiais (CRIEs). A aprovação da PCV10 inicialmente foi baseada nos estudos de eficácia da PCV7, conforme recomendação da World Health Organization (WHO). Mesmo com a tendência de redução da meningite pneumocócica nos últimos anos no Brasil, a introdução da PCV10 trouxe perspectivas para o controle da doença pneumocócica, destacando o país como o precursor na implantação desta vacina no Serviço Público de Saúde (WHO, 2009; MS, 2010; AZEVEDO et al., 2013).

A PCV10 foi disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde (SUS), gratuitamente, para todas as crianças do Brasil durante o ano de 2010, sendo implementada de março a outubro em todos os municípios. Três diferentes esquemas foram utilizados durante a introdução da PCV10 no Brasil (BRASIL, 2010; WHO, 2012):

- 3p+1: três doses primárias para crianças entre 6 semanas e 6 meses de vida (<6m), com um intervalo de dois meses entre as doses (mínimo quatro semanas) e uma dose reforço seis meses após a terceira dose.
- 2p+1: duas doses primárias para crianças entre 7–11 meses, com um intervalo de dois meses entre as doses (mínimo quatro semanas) e uma dose reforço seis meses após a segunda dose.
- Dose única: uma dose para crianças entre 12–23 meses.

Para o país como um todo, a cobertura vacinal estimada para o esquema de 3 doses completos durante o primeiro ano da introdução da PCV10 foi de aproximadamente 90% (BRASIL, 2011). Após a introdução desta vacina no Brasil, houve uma redução do número de casos e incidência de meningite pneumocócica nas crianças menores de 2 anos, no ano de 2012. Segundo Grando e colaboradores (2015), houve redução de 50% na taxa de incidência e de 69% na de mortalidade por meningite pneumocócica, comparando os anos de 2007 e 2012. As crianças com idade entre seis meses completos e menores de um ano foram as que apresentaram maiores reduções nas taxas: 73% na incidência e 85% na mortalidade. Logo, os

resultados encontrados neste trabalho sugerem o benefício da PCV10 na redução da incidência de meningite pneumocócica.

Torna-se cada vez mais evidente que a vacina é o único meio para interromper a cadeia de transmissão de algumas doenças imunopreveníveis. Entretanto, o cumprimento do calendário de vacinação e dos critérios de qualidade descritos nas normas oficiais são imprescindíveis para o sucesso da vacinação e controle das doenças infectocontagiosas (BRASIL, 2011).

## **1.8 Vigilância sanitária e o controle da qualidade de vacinas**

Entende-se por Vigilância Sanitária o conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde (BRASIL, 1990).

O controle da qualidade de vacinas é uma ação da Vigilância Sanitária de extrema importância, uma vez que esse tipo de produto possui a peculiaridade de ser administrado em pessoas sadias (MIRANDA; HENRIQUES, 2005). Dessa maneira, as autoridades sanitárias devem não só garantir a disponibilidade, mas também assegurar a qualidade e eficácia dos imunobiológicos utilizados no país, de acordo com as normas oficiais. Portanto, ao longo dos anos foram definidas as ações de Vigilância Sanitária que permitiram estabelecer os parâmetros de segurança, qualidade e eficácia dos imunobiológicos como atividades prioritárias para as autoridades sanitárias do país (MIRANDA; HENRIQUES, 2005).

Com a institucionalização do PNI, a progressiva implementação e a dinamização de suas atividades que ocorreu o aumentada utilização de imunobiológicos, alcançado pela adoção de estratégias de imunização em massa proporcionadas pelas campanhas. Esse aumento trouxe a necessidade de garantir a qualidade dos produtos distribuídos pelo sistema público e privado. Tal necessidade se tornou pública em maio de 1981, quando, em virtude de ter sido constatada a contaminação da vacina importada da Iugoslávia que iria ser utilizada na campanha contra a poliomielite, foram adiados os dias nacionais de vacinação, previstos para julho e agosto daquele ano (PONTE, 2003).

Desta forma, em 1979, a fim de minimizar os problemas enfrentados pelo governo brasileiro, criou-se uma comissão interministerial, que recomendava maior apoio ao

desenvolvimento de vacinas nacionais, bem como a criação de estratégias para avaliação da qualidade destes produtos. Nesse contexto, em 1983, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), integrante pleno da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), como órgão público federal que atende ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, assume a responsabilidade pelo controle oficial da qualidade de todos os lotes de imunobiológicos a serem utilizados pelo PNI (PONTE, 2003; NETTO et al., 2010).

A partir desse momento, seguindo critérios preconizados pela WHO, passa a haver a obrigatoriedade de análise laboratorial (como, ensaios físicos, químicos e biológicos) e também documental (como, protocolo resumido de produção e controle de qualidade emitido pelo fabricante) pelo laboratório oficial de controle nacional, previamente à distribuição de tais produtos destinados ao consumo humano. Tal obrigatoriedade não se restringe unicamente aos produtos imunobiológicos de produção nacional; mas também aos produtos importados. Já em 1985, o INCQS realizava análises laboratoriais de uma diversidade de vacinas virais e bacterianas, e de soros hiperimunes adquiridos pelo PNI (TEMPORÃO, 2003).

Conforme um dos objetivos principais do PNI, o INCQS realiza o controle da qualidade lote a lote dos produtos imunobiológicos, segundo os ensaios de controle preconizados por normas nacionais, como a Farmacopeia Brasileira, e internacionais, como a Farmacopeia Americana e Europeia, onde estão estabelecidos os requisitos que a vacina deve obrigatoriamente obedecer, e de acordo com os resultados, emite-se um laudo analítico (BRASIL, 1993).

Desse modo, as autoridades sanitárias nacionais exigem que os imunobiológicos sejam avaliados por testes de segurança (Tabela 2) e eficácia (Tabela 3) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Tabela 2 - Definições dos testes de segurança biológica

<b>Testes de segurança</b>	
<b>Esterilidade</b>	Verificação da ausência de bactérias, fungos e leveduras em insumos farmacêuticos, medicamentos e correlatos
<b>Toxicidade</b>	Determinação da reatividade biológica inesperada e não aceitável de fármacos e medicamentos
<b>Pirogênio</b>	Detecção de endotoxina pelo aumento da temperatura corporal de coelhos após injeção intravenosa do produto

Fonte: (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010)

Tabela 3 - Definições dos testes de eficácia

<b>Testes de eficácia</b>	
<b>Identidade</b>	Identificação do componente designado no rótulo do produto, distinguindo-o de qualquer outro componente presente no processo
<b>Estabilidade</b>	Capacidade da vacina em manter suas propriedades química, física, microbiológica e biológica dentro do limite de especificação
<b>Potência</b>	Avaliação da capacidade de um imunobiológico em induzir uma resposta imune específica

Fonte: (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010)

Logo, o INCQS que tem como missão: “contribuir para a promoção e recuperação da saúde e a prevenção de doenças atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle de qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária” (INCQS, 2004), verifica a documentação de todo o processo de produção dos imunobiológicos emitida pelo produtor e realiza os testes de segurança e de eficácia das vacinas, antes de sua liberação para o PNI.

## 1.9 Revisão sistemática

Este trabalho trata-se de um estudo de revisão sistemática da literatura, descritivo, sobre as metodologias utilizadas para o controle da qualidade da vacina pneumocócica 10-valente.

A revisão sistemática da literatura, assim como outros tipos de estudos de revisão, é uma forma de pesquisa que utiliza como fontes de dados a literatura sobre determinado tema. Esse tipo de investigação disponibiliza um resumo das evidências relacionadas a uma estratégia de intervenção específica, mediante a aplicação de métodos explícitos e sistematizados de busca, apreciação crítica e síntese da informação selecionada. As revisões sistemáticas são particularmente úteis para integrar as informações de um conjunto de estudos realizados separadamente sobre determinada intervenção, que podem apresentar resultados conflitantes e/ou coincidentes, bem como identificar temas que necessitam de evidência, auxiliando na

orientação para investigações futuras (LINDE; WILLICH, 2003; SAMPAIO; MANCINI, 2007).

Ao viabilizarem, de forma clara e explícita, um resumo de todos os estudos sobre determinada intervenção, as revisões sistemáticas nos permitem incorporar um espectro maior de resultados relevantes, ao invés de limitar as nossas conclusões à leitura de somente alguns artigos (AKOBENG, 2005; SAMPAIO; MANCINI, 2007). Assim, a revisão sistemática da literatura é atividade fundamental para a prática baseada em evidência (PBE), pois condensa o conhecimento fracionado em um único estudo (PEREIRA; BACHION, 2006; SAMPAIO; MANCINI, 2007).

A demanda por qualidade máxima do cuidado em saúde, combinada com a necessidade de uso racional de recursos tanto público quanto privado, tem contribuído para aumentar a pressão sobre os profissionais da área no sentido de assegurar a implementação de uma prática baseada em evidências científicas. Logo, PBE tem sido definida como o uso consciente, explícito e criterioso da melhor e mais atual evidência de pesquisa na tomada de decisões clínicas sobre saúde pública (SACKETT et al., 2000).

Para realizar a revisão sistemática o pesquisador deve apreender seu percurso e seus pressupostos, desenvolver habilidades de análise de artigos científicos, síntese dos resultados encontrados e analisar criticamente as evidências encontradas (PEREIRA; BACHION, 2006).

Na revisão sistemática da literatura, o pesquisador utiliza uma metodologia clara e bem definida, planejada para responder a uma pergunta específica, utilizando métodos para identificar, selecionar, avaliar criticamente os estudos, coletar e analisar os dados. Toda esta estrutura é utilizada para evitar viés (tendenciosidade), visando minimizar os erros nas conclusões, possibilitando que diferentes pesquisadores que seguirem os mesmos passos descritos, cheguem às mesmas conclusões. A revisão sistemática é, portanto, uma apropriação das melhores evidências externas, contribuindo para a tomada de decisão baseada em evidência (GALVÃO et al., 2004; PEREIRA; BACHION, 2006; CASTRO, 2010).

Antes de iniciar uma revisão sistemática, três etapas precisam ser consideradas, como: definir o objetivo da revisão, identificar a literatura e selecionar os estudos possíveis de serem incluídos. Essas etapas preliminares são importantes, uma vez que auxiliam os pesquisadores a adequar a pergunta norteadora da revisão com base na informação disponível sobre o tema de interesse (DOMHOLDT, 2005). Segundo Sampaio e Mancini (2007) uma revisão sistemática segue a estrutura de um artigo original, incluindo seções de introdução, métodos, resultados e discussão.

Algumas etapas constituem o processo de elaboração de um estudo de revisão sistemática, como (PEREIRA; BACHION, 2006; SAMPAIO; MANCINI, 2007):

#### Passo 1: Definindo a pergunta

Assim como qualquer outra investigação científica, uma boa revisão sistemática requer uma pergunta ou questão bem formulada e clara, pois só se chega à resolução do problema, se a questão for bem definida.

#### Passo 2: Buscando a evidência

Os pesquisadores devem se certificar de que todos os artigos importantes ou que possam ter algum impacto na conclusão da revisão sejam incluídos. A busca da evidência tem início com a definição de termos ou palavras-chave, seguida de estratégias de busca, definição das bases de dados e de outras fontes de informação a serem pesquisadas.

#### Passo 3: Revisando e selecionando os estudos

Durante a seleção dos estudos, a avaliação dos títulos e dos resumos (*abstracts*) identificados na busca inicial deve ser feita obedecendo rigorosamente aos critérios de inclusão e exclusão definidos no protocolo da pesquisa. É importante destacar que, quando o título e o resumo não são esclarecedores, deve-se buscar o artigo na íntegra, para não correr o risco de deixar estudos importantes fora da revisão.

#### Passo 4: Apresentando os resultados

Os artigos incluídos na revisão sistemática podem ser apresentados em um quadro que destaca suas características principais: como autores, ano de publicação, desenho metodológico, variáveis dependentes e principais resultados. A seção de métodos deve ser bastante detalhada (ex.: estratégias de busca, como os estudos foram selecionados para inclusão na revisão sistemática, entre outros) e passível de reprodução.

Desse modo, a publicação de estudos de revisão sistemática, bem como de outros que sintetizam resultados de pesquisa, é um passo para a prática baseada em evidência. Mas, para que isso ocorra, de fato, torna-se necessária uma mudança de comportamento por parte dos profissionais da saúde. Essa mudança implica não só consumir a literatura disponibilizada, mas também levar essa informação para a prática cotidiana.

### 1.9.1 Busca Eletrônica

Para a realização de uma revisão sistemática, os pesquisadores devem se certificar de que todos os artigos importantes ou que possam ter algum impacto na conclusão da revisão sejam incluídos. Segundo Akobeng (2005), a busca em base de dados eletrônica e em outras fontes é uma habilidade importante no processo de realização de uma revisão sistemática, considerando que pesquisas eficientes maximizam a possibilidade de se encontrarem artigos relevantes em um tempo reduzido. Uma procura eficaz envolve uma estratégia que inclua a escolha de bases de dados que insiram mais especificamente o tema.

Segundo estas orientações, é necessário conhecer as bases de dados em que será realizada a busca eletrônica.

A PubMed é uma base de dados de acesso público, criada e mantida pela Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América (*National Library of Medicine*), que possibilita a pesquisa bibliográfica de referências de artigos médicos. O acesso é realizado pelo Centro Nacional para a Informação de Biotecnologia (NCBI), é uma versão gratuita do banco de dados MEDLINE.

Já o *Scient Direct* consiste em uma base de dados de textos completos e revisados por pares da *Elsevier* que engloba livros e periódicos. Além de buscas sofisticadas e ferramentas para recuperação de resultados, inclui conteúdo integrado de diversas fontes externas na forma de áudio, vídeo e conjuntos de dados. Através dos mecanismos de busca, podem ser encontradas as informações publicadas por uma determinada instituição, ou um determinado autor. A busca online pode ser realizada através da combinação de palavras-chave, ano de publicação e áreas relacionadas.

## 2 JUSTIFICATIVA

Há mais de um século, desde o seu primeiro isolamento, as infecções causadas pela bactéria *Streptococcus pneumoniae* são apontadas como um problema de saúde pública mundial, pela sua frequência, morbidade e letalidade. Desde o início do século XX, pesquisas vêm sendo realizadas para buscar formas de conter e prevenir doenças do trato respiratório como pneumonia, otite média, sinusite, meningites e sepses causadas pelo *Streptococcus pneumoniae*.

Em março de 2010, o MS incluiu a vacina pneumocócica 10-valente conjugada no Calendário Básico de Vacinação da criança de forma rotineira, contemplando aproximadamente 6 milhões de crianças em todo o país, com o objetivo de reduzir os índices de morbidade e mortalidade das crianças menores de cinco anos de idade acometidas por doenças pneumocócicas, principalmente as pneumonias adquiridas na comunidade que frequentemente levam à internação e têm forte impacto na morbidade em crianças nessa faixa etária. A inclusão desta vacina ocorreu graças a um acordo de transferência de tecnologia entre a Fiocruz e a GSK. Assim, a vacina pneumocócica conjugada 10-valente desenvolvida pela multinacional passou a ser produzida pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Biomanguinhos/Fiocruz).

Neste acordo, a transferência de tecnologia de fabricação para Biomanguinhos ocorre de forma gradativa até a transferência total, o que viabilizou a sustentabilidade da vacinação em todo o país.

Tendo em vista a importância do controle de qualidade de vacinas diante às novas tecnologias de produção, é papel do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária de Imunobiológicos, representado pelo INCQS, estar pronto para dar respostas cientificamente satisfatórias às demandas geradas por estes produtos. Porém, há uma carência de referências oficiais para vacinas pneumocócicas no que diz respeito à ensaios de identificação e teor de polissacarídeos.

Desta forma, mediante a importância para a saúde pública, é necessária uma revisão sistemática da literatura para avaliar as metodologias que foram desenvolvidas para o controle de qualidade das vacinas pneumocócicas conjugadas 10-valente.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Relacionar as metodologias utilizadas para a identificação dos polissacarídeos encontrados na vacina pneumocócica conjugada 10-valente do ano de 1996 até junho de 2017.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Identificar a produção científica relacionada ao controle da qualidade de vacina pneumocócica conjugada 10-valente.
- Selecionar a produção científica qualificada segundo critérios para inclusão ou exclusão do estudo.
- Sintetizar os resultados das produções científicas selecionadas, segundo o objetivo do estudo.
- Descrever os resultados da seleção dos estudos incluídos na revisão sistemática.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Questão norteadora

Quais são as metodologias utilizadas para a identificação dos polissacarídeos encontrados na vacina pneumocócica conjugada 10 – valente?

### 4.2 Busca eletrônica

Foram utilizadas as bases de dados PubMed e Science Direct, sendo que a coleta de dados ocorreu no período de 1996 a junho de 2017.

### 4.3 Palavras-chave

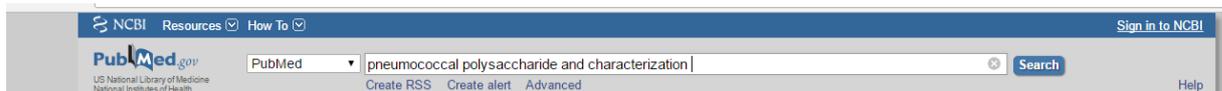
A busca das publicações nas bases de dados foi realizada de acordo com as seguintes palavras-chave, escolhidas mediante avaliação do tema e consulta dos ensaios recomendados pela Farmacopéia Européia para vacinas pneumocócicas: polissacarídeo pneumocócico (*pneumococcal polysaccharide*) combinada com caracterização (*characterization*), quantificação (*quantification*), massa molecular (*molecular size*), controle de qualidade (*quality control*) e vacinas conjugadas (*conjugate vaccines*).

### 4.4 Estratégias de busca

No site da base de dados PubMed escolheu-se fazer a pesquisa simples, apenas com a seleção do período temporal, devido ao número de artigos relacionados ao tema que não foram selecionados através da pesquisa avançada. A busca foi realizada através da palavra-

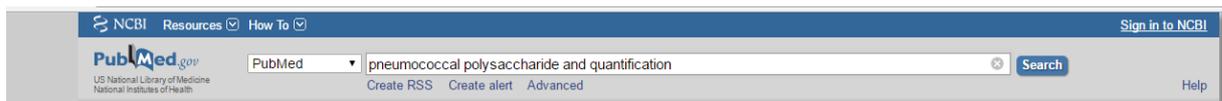
chave “*pneumococcal polysaccharide*” combinada com “characterization”, “*quantification*”, “*molecular size*”, “*quality control*” ou “*conjugate vaccines*”, utilizando a expressão “AND”. Foram escolhidos apenas artigos para a pesquisa e selecionados todos os documentos entre os anos de 1996 e junho de 2017. A estratégia de busca pode ser observada através das Figuras 3, 4, 5, 6 e 7.

Figura 3 - Pesquisa simplesPubMed - “*pneumococcal polysaccharide*” AND “characterization”.



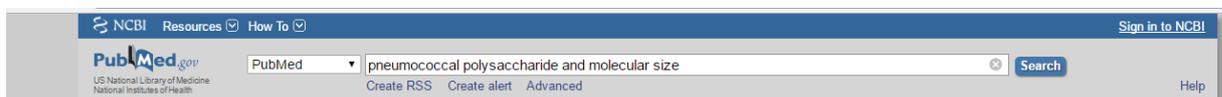
fonte: (PubMed, 2017)

Figura 4 - Pesquisa simplesPubMed - “*pneumococcal polysaccharide*” AND “*quantification*”.



fonte: (PubMed, 2017)

Figura 5 - Pesquisa simplesPubMed - “*pneumococcal polysaccharide*” AND “*molecular size*”.



Fonte: (PubMed, 2017)

Figura 6 - Pesquisa simplesPubMed - “*pneumococcal polysaccharide*” AND “*quality control*”.



Fonte: (PubMed, 2017)

Figura 7 - Pesquisa simplesPubMed - “*pneumococcal polysaccharide*” AND “*conjugate vaccines*”.



Fonte: (PubMed, 2017)

No site da base de dados *ScienceDirect* escolheu-se fazer a pesquisa avançada. A busca foi realizada através da palavra-chave “*pneumococcal polysaccharide*”, nos campos resumo, título e palavras-chave e “*characterization*”, “*quantification*”, “*molecular size*”, “*quality control*” ou “*conjugate vaccines*” nos campos resumo, título e palavras-chave, utilizando a expressão “AND”, de forma a obter o maior número possível de documentos entre os anos de 1996 e junho de 2017. Foram escolhidos apenas artigos para a pesquisa e selecionados todos os campos de aplicação. A estratégia de busca pode ser observada através das Figuras 8, 9, 10, 11 e 12.

Figura 8 - Pesquisa avançada *Science Direct*- “*pneumococcal polysaccharide*” AND “*characterization*”.

The screenshot shows the ScienceDirect advanced search interface. At the top, there are tabs for 'All', 'Journals', 'Books', 'Reference Works', and 'Images'. The 'Advanced search' tab is selected. Below the tabs, there are two search input fields. The first field contains 'pneumococcal polysaccharide' and the second field contains 'characterization'. Both fields have a dropdown menu set to 'Abstract, Title, Keywords'. Between the two fields is a dropdown menu set to 'AND'. Below the search fields is a 'Refine your search' section with several checkboxes: 'Journals' (checked), 'Books' (unchecked), 'All' (checked), 'My Favorites' (unchecked), 'Subscribed publications' (unchecked), and 'Open Access articles' (unchecked). Below the checkboxes is a dropdown menu for subject areas, currently showing '- All Sciences -' and other options like 'Agricultural and Biological Sciences', 'Arts and Humanities', and 'Biochemistry, Genetics and Molecular Biology'. To the right of this dropdown is a note: 'Hold down the Ctrl key (or Apple Key) to select multiple entries.' At the bottom left, there are radio buttons for 'All Years' (unchecked) and '1996' (checked), followed by a 'to:' label and a dropdown menu set to 'Present'. A 'Search' button is located at the bottom left of the form.

Fonte: (Science Direct, 2017)

Figura 9 - Pesquisa avançada *Science Direct* - “*pneumococcal polysaccharide*” AND “*quantification*”.

The screenshot shows the Science Direct advanced search page. At the top, there are navigation tabs: 'All', 'Journals', 'Books', 'Reference Works', 'Images', 'Advanced search', and 'Expert search'. Below these is a 'Search tips' link. The main search area is titled 'Search for' and contains two input fields. The first field contains 'pneumococcal polysaccharide' and the second contains 'quantification'. Between the fields is a dropdown menu set to 'AND'. To the right of each field is a dropdown menu set to 'Abstract, Title, Keywords'. Below the search fields is a 'Refine your search' section with several checkboxes: 'Journals' (checked), 'Books' (unchecked), 'All' (checked), 'My Favorites' (unchecked), 'Subscribed publications' (unchecked), and 'Open Access articles' (unchecked). Below this is a dropdown menu for subject areas, currently showing '- All Sciences -', with options for 'Agricultural and Biological Sciences', 'Arts and Humanities', and 'Biochemistry, Genetics and Molecular Biology'. To the right of this menu is a note: 'Hold down the Ctrl key (or Apple Key) to select multiple entries.' At the bottom, there are radio buttons for 'All Years' (unchecked) and '1996' (checked), followed by a 'to:' label and a 'Present' dropdown. A 'Search' button is located at the bottom left.

Fonte: (Science Direct, 2017)

Figura 10 - Pesquisa avançada *Science Direct* - “*pneumococcal polysaccharide*” AND “*molecular size*”.

The screenshot shows the Science Direct advanced search page. At the top, there are navigation tabs: 'All', 'Journals', 'Books', 'Reference Works', 'Images', 'Advanced search', and 'Expert search'. Below these is a 'Search tips' link. The main search area is titled 'Search for' and contains two input fields. The first field contains 'pneumococcal polysaccharide' and the second contains 'molecular size'. Between the fields is a dropdown menu set to 'AND'. To the right of each field is a dropdown menu set to 'Abstract, Title, Keywords'. Below the search fields is a 'Refine your search' section with several checkboxes: 'Journals' (checked), 'Books' (unchecked), 'All' (checked), 'My Favorites' (unchecked), 'Subscribed publications' (unchecked), and 'Open Access articles' (unchecked). Below this is a dropdown menu for subject areas, currently showing '- All Sciences -', with options for 'Agricultural and Biological Sciences', 'Arts and Humanities', and 'Biochemistry, Genetics and Molecular Biology'. To the right of this menu is a note: 'Hold down the Ctrl key (or Apple Key) to select multiple entries.' At the bottom, there are radio buttons for 'All Years' (unchecked) and '1996' (checked), followed by a 'to:' label and a 'Present' dropdown. A 'Search' button is located at the bottom left.

Fonte: (Science Direct, 2017)

Figura 11 - Pesquisa avançada *Science Direct* - “*pneumococcal polysaccharide*” AND “*quality control*”.

The screenshot shows the Science Direct advanced search page. At the top, there are navigation tabs for 'All', 'Journals', 'Books', 'Reference Works', and 'Images', along with 'Advanced search' and 'Expert search' options. A 'Search tips' link is also present. The main search area is titled 'Search for' and contains two input fields: 'pneumococcal polysaccharide' and 'quality control', both set to search in 'Abstract, Title, Keywords'. The search logic is set to 'AND'. Below this is the 'Refine your search' section, which includes checkboxes for 'Journals', 'Books', 'All', 'My Favorites', 'Subscribed publications', and 'Open Access articles'. A dropdown menu for subject areas is open, showing 'All Sciences', 'Agricultural and Biological Sciences', 'Arts and Humanities', and 'Biochemistry, Genetics and Molecular Biology'. The date range is set to '1996' to 'Present'. A 'Search' button is located at the bottom left.

Fonte: (Science Direct, 2017)

Figura 12 - Pesquisa avançada *Science Direct* - “*pneumococcal polysaccharide*” AND “*conjugate vaccines*”.

This screenshot is identical in layout to Figure 11, showing the Science Direct advanced search page. The search terms are 'pneumococcal polysaccharide' and 'conjugate vaccines', both set to search in 'Abstract, Title, Keywords' with an 'AND' operator. The 'Refine your search' section and the subject area dropdown menu are also visible, matching the configuration in Figure 11. The 'Search' button is at the bottom left.

Fonte: (Science Direct, 2017)

#### 4.5 Seleção dos estudos

Foi utilizado um teste de relevância elaborado a partir da proposta de Pereira (2006) e Pereira e Bachion (2006), composto por uma lista de perguntas claras e objetivas que gera respostas afirmativas ou negativas, que refinou os artigos que foram acessados na íntegra. O teste de relevância foi aplicado aos títulos e aos resumos dos artigos, sendo que o avaliador (a pesquisadora) respondeu de forma afirmativa ou negativa as seguintes perguntas apresentadas no Quadro 2 elaborado a partir da proposta de Pereira (2006).

Quadro 2 – Teste de relevância aplicado aos títulos e aos resumos dos artigos selecionados nas bases de dados.

Questões	SIM	NÃO
1 – O estudo está de acordo com o tema investigado?		
2 – O estudo foi publicado dentro do período estipulado no projeto?		
3 - O estudo aborda a solução do problema que está sendo investigado?		
4 – O estudo foi incluso?		

Fonte: (Pereira, 2006, adaptado pela pesquisadora)

Os artigos selecionados no teste de relevância foram acessados na íntegra para análise da qualidade das informações publicadas e avaliados conforme os critérios de inclusão e exclusão.

#### 4.6 Critérios para inclusão dos artigos

Foram considerados como critérios de inclusão:

- artigos publicados em português, inglês e espanhol, no período de 1996 a junho de 2017. Este corte temporal foi estabelecido devido aos estudos na área de biotecnologia evoluir rapidamente, necessitando de atualizações constantes;
- estudos identificados de acordo com as bases de dados eleitas, de periódicos nacionais e internacionais;
- estudos que envolvem polissacarídeos dos sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F;

- estudos utilizando metodologias relacionadas a identificação, teor e massa molecular dos polissacarídeos mencionados acima.

Fizeram parte da amostra estudos que atenderam a estes critérios.

#### 4.7 Critérios para exclusão dos artigos

Artigos que não estão disponíveis para leitura na íntegra, mesmo através da compra.

#### 4.8 Roteiro para extração de dados

Após a avaliação quanto aos critérios de inclusão e exclusão dos artigos selecionados e acessados na íntegra, foram extraídos dados detalhados das pesquisas de acordo com os itens do roteiro abaixo (Quadro 3) que foi elaborado a partir da proposta de Pereira (2006).

Quadro 3 – Roteiro para extração de dados dos artigos incluídos na revisão sistemática da literatura.

<b>Referência do Estudo:</b>
1 – Objetivo:
2 – Metodologia:
3 – Resultados Encontrados:

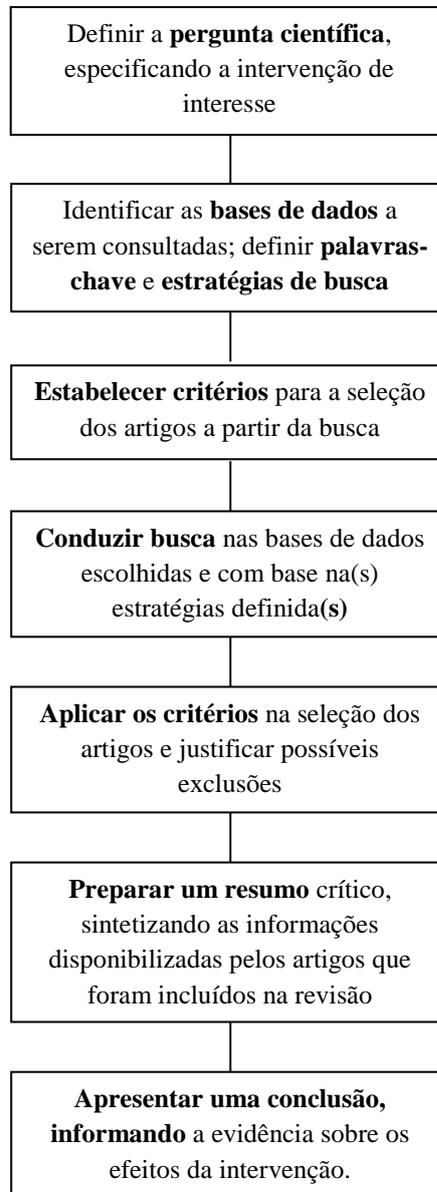
Fonte: (Pereira, 2006, adaptado pela pesquisadora)

#### 4.9 Descrição e elaboração de uma revisão sistemática

A seguir foi realizada uma descrição das etapas que constituíram o processo de elaboração do estudo de revisão sistemática apresentado no presente trabalho, conforme a Figura 13.



Figura 13 - Descrição geral sobre o processo de revisão sistemática da literatura.



Fonte: (adaptado de SAMPAIO; MANCINI, 2007)

## 5 RESULTADOS

Foram encontrados nas duas bases de dados selecionadas artigos no período temporal de 1996 até junho de 2017, que estão sintetizados na Tabela 4.

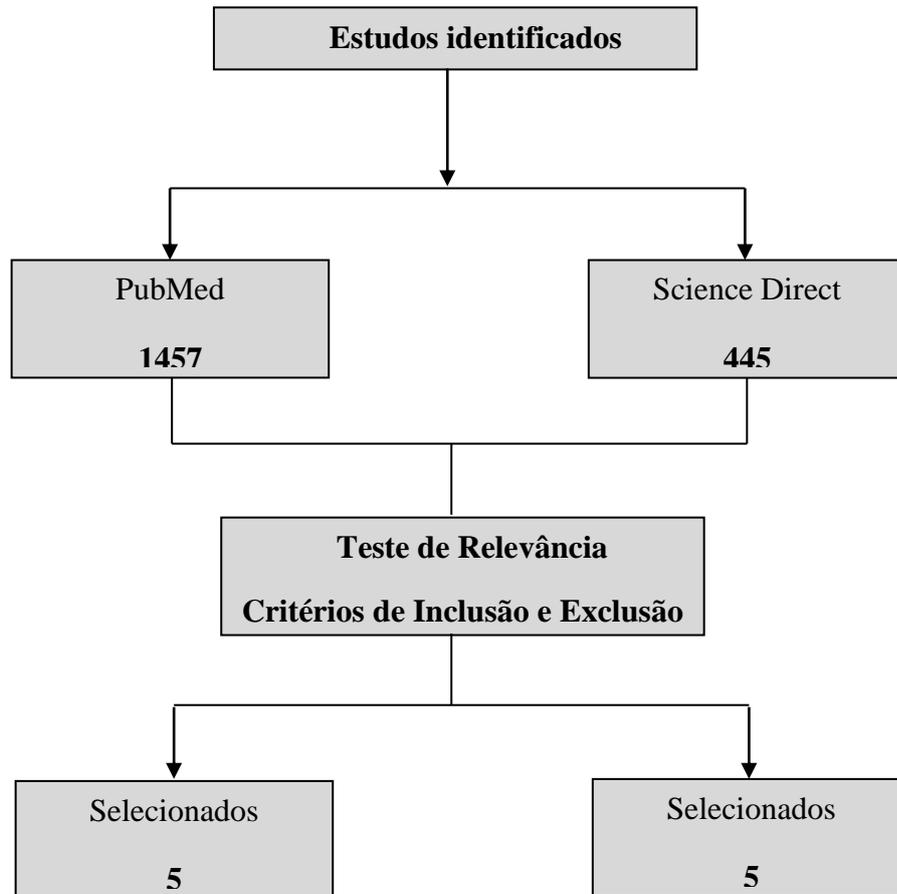
Tabela 4—Artigos encontrados nas bases de dados, por palavras-chave.

<b>Palavras-chave</b>	<b>PubMed</b>	<b>Science Direct</b>	<b>Total</b>
“Pneumococcal Polysaccharide” AND “Characterization”	55	13	<b>68</b>
“Pneumococcal Polysaccharide” AND “Quantification”	24	12	<b>36</b>
“Pneumococcal Polysaccharide” AND “Molecular Size”	18	6	<b>24</b>
“Pneumococcal Polysaccharide” AND “Quality Control”	90	15	<b>105</b>
“Pneumococcal Polysaccharide” AND “Conjugate Vaccines”	1270	399	<b>1669</b>
<b>Total</b>	<b>1457</b>	<b>445</b>	<b>1902</b>

Fonte: (Próprio autor)

A busca resultou na identificação de publicações nas duas bases de dados utilizadas, ocorrendo predominância na base de dados PubMed, com 1457 artigos. Durante a seleção inicial dos estudos, a avaliação dos títulos, foram encontrados estudos repetidos, ou seja, 10 artigos foram encontrados 3 vezes e 3 artigos, 2 vezes. Tendo em vista que estes foram considerados apenas uma vez, foram excluídos 23 artigos (1,21%) artigos repetidos. Assim, restaram 1879 (98,79%) artigos a serem submetidos ao Teste de Relevância, descrito no Quadro 2, e aos Critérios de Inclusão e Exclusão.

Figura 14 - Fluxograma dos estudos selecionados após aplicação do Teste de Relevância e aos Critérios de Inclusão e Exclusão.



Fonte: (Próprio autor)

Após a aplicação do Teste de Relevância e Critérios de Inclusão e Exclusão nos títulos e resumos dos artigos identificados, foram excluídos 1869 (99,47%) artigos, pois estavam em desacordo com o tema investigado ou não foram encontrados na íntegra.

Assim, foram selecionados 10 (0,53%) artigos (Figura 14). Os artigos selecionados foram acessados na íntegra e avaliados quanto a relação com a questão que está sendo estudada, a metodologia utilizada no estudo e se os resultados são compatíveis com a metodologia e merecem credibilidade.

Após a análise, foram selecionados 5 artigos (50%) e excluídos 5 artigos (50%) por apresentarem incompatibilidades metodológicas, tais como: avaliação imunológica dos polissacarídeos pneumocócicos e do complexo epidemiológico do *Streptococcus pneumoniae* através da sorotipagem molecular, determinação quantitativa da produção cinética de

polissacarídeos pneumocócicos em amostras de cultura de *Streptococcus pneumoniae*, entre outros.

Segundo Bouzaet al., (2005), em estudos de revisão sistemática é comum que ocorra um número grande de exclusões, fato ocorrido nesta revisão.

### 5.1 Características dos estudos incluídos na revisão sistemática

Fizeram parte deste estudo 5 artigos com as características das referências e dos estudos, descritas nos Quadros 4 e 5, respectivamente.

Quadro 4 – Características das referências incluídas na revisão sistemática.

Código do estudo	Título	Autor (es)	Local do estudo	Periódico	Idioma	Ano de publicação
1	High-performance reverse phase chromatography with fluorescence detection assay for characterization and quantification of pneumococcal polysaccharides	Canaán-Haden L., Cremata J., Chang J., Valdés Y., Cardos F., Bencomo V. V.	Cuba	Vaccine	Inglês	2006
2	Development of a high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection based quantification assay for pneumococcal polysaccharides and conjugates	Talaga P., Vialle S., Moreau M.	França	Vaccine	Inglês	2002
3	Quality control of polyvalent pneumococcal polysaccharide – protein conjugate vaccine by nephelometry	Lee C. J.	E.U.A.	Biologicals	Inglês	2002
4	Development and validation of an NMR-based identity assay for bacterial polysaccharides	Abeygunawardana C., Williams T.C., Sumner J.S.	E.U.A.	Analytical Biochemistry	Inglês	2000

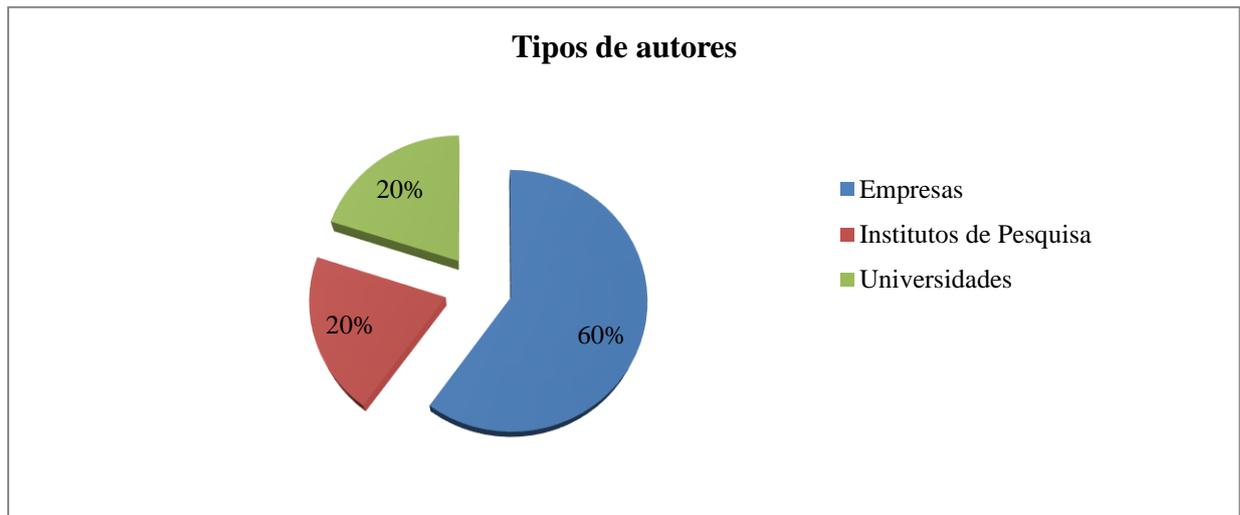
Código do estudo	Título	Autor (es)	Local do estudo	Periódico	Idioma	Ano de publicação
5	Determination of saccharide content in pneumococcal polysaccharides and conjugate vaccines by GC-MSD	Kim J. S., Laskowich E. R., Arumugham R. G., Kaiser R. E., Macmichael G. J.	E.U.A.	Analytical Biochemistry	Inglês	2005

Fonte: (Próprio autor)

Os 5 artigos encontrados foram publicados entre os anos de 2000 e 2006, na língua inglesa, sendo 3 estudos desenvolvidos nos Estados Unidos da América (E.U.A.). Não houve uma alta variabilidade entre os periódicos nos quais os estudos foram publicados, apenas 3, *Vaccine*, *Biologicals* e *Analytical Biochemistry*. Esta pequena amostra demonstra a escassez de estudos para a identificação dos polissacarídeos encontrados na vacina pneumocócica conjugada 10-valente.

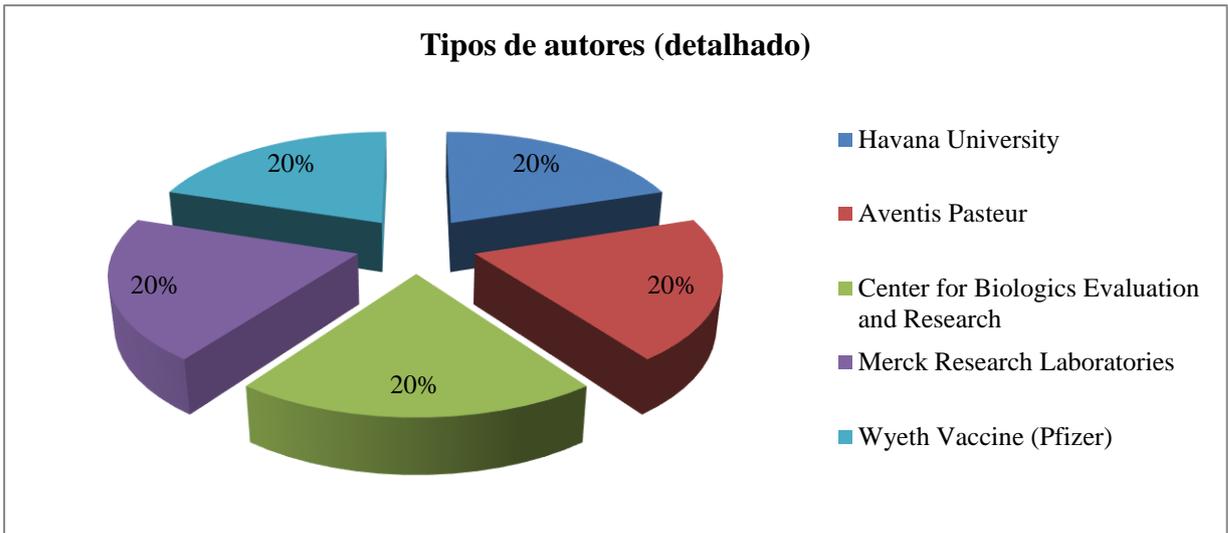
A análise dos artigos considerando os tipos de autores está representada a seguir, no Gráfico 1 e 2, onde é possível observar que 60% das publicações foi realizada por Empresas, enquanto Institutos de Pesquisa esteve presente em 1 artigo e o outro artigo foi publicado por Universidade.

Gráfico 1 – Distribuição dos artigos por tipo de autor



Fonte: (Próprio autor)

Gráfico 2 – Distribuição dos artigos por tipo de autor (detalhado)



Fonte: (Próprio autor)

A Aventis Pasteur é a divisão de vacinas do grupo Sanofi-Aventis, que mudou de razão social e passou a ser chamada Sanofi-Pasteur em 2004. A Sanofi-Aventis, responsável por uma das publicações, é o 3º maior grupo farmacêutico mundial e o 1º na Europa. Esta empresa apóia-se em uma pesquisa internacional para atuar em sete áreas terapêuticas estratégicas: cardiovascular, trombose, oncologia, diabetes, sistema nervoso central, medicina interna e vacinas (SANOFI BRASIL, 2017).

Já a Wyeth Vaccine, responsável pelo desenvolvimento e fabricação da Prevnar (PCV7), foi adquirida pela Pfizer em 2009. Hoje, a Pfizer é a mais completa e diversificada do setor farmacêutico, oferecendo mais de 150 opções terapêuticas para uma variedade de doenças, com um portfólio que engloba desde vacinas para bebês e idosos até medicamentos para doenças complexas, como dor, câncer, tabagismo, artrite reumatóide, infecção hospitalar, Alzheimer entre outras (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2000; PFIZER, 2017).

Os artigos foram submetidos ao roteiro para extração de suas características, que estão apresentadas no Quadro 4.

Quadro 5—Características dos estudos incluídos na revisão sistemática.

Código do estudo	Objetivo	Metodologia	Resultados encontrados
1	Desenvolver um método utilizando cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detecção de fluorescência para determinar a composição e identidade dos polissacarídeos capsulares de <i>Streptococcus pneumoniae</i> utilizados na formulação da vacina conjugada para prevenção da infecção pneumocócica.	Para a composição dos monossacarídeos, os polissacarídeos 19F, 23F, 14, 6B, e 18C foram submetidos a hidrólise ácida, e após os monossacarídeos foram re-N-acetilados e marcados com 2-aminobenzamida (2-AB). Para quantificação de polissacarídeos, uma mistura referência de monossacarídeos (Gal, Glc, Rha, ManNAc, GlcNAc e GalNAc) marcados com 2-AB foram usados como padrão. A cromatografia líquida de fase reversa foi realizada em uma coluna C18, e espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de próton(RMN <sup>1</sup> H) foi usada para confirmar a estrutura química e pureza dos polissacarídeos.	A recuperação de Gal, Glc e ManNAc para os polissacarídeos pneumocócicos sob estudo foi perto dos valores esperados. Enquanto que a recuperação de Rha para o polissacarídeo 23F foi muito eficiente, foi ineficiente para os polissacarídeos 19F, 18C e 6B com valores abaixo de 50%. GlcNAc também apresentou recuperação abaixo do esperado para o polissacarídeo 14 com apenas 54% do valor teórico.
2	Desenvolver um método, usando cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) para determinar as concentrações de polissacarídeos capsulares de <i>Streptococcus pneumoniae</i> e polissacarídeos conjugados usados na formulação de vacinas conjugadas para a prevenção de infecções pneumocócicas.	Para determinar as condições ótimas de hidrólise para a análise, os polissacarídeos pneumocócicos (PSPn) foram submetidos a três métodos de hidrólise diferentes: hidrólise com ácido trifluoroacético (TFA), metanólise seguida de hidrólise com TFA e hidrólise com ácido fluorídrico (HF) seguida de hidrólise com TFA. Para quantificação de todos os polissacarídeos, uma mistura de monossacarídeos de referência (Rha, Gal e GlcA) foram hidrolisados juntamente com as amostras para serem usados como padrões de análise de rotina, já que é muito mais conveniente do que hidrolisar um polissacarídeo de referência bem caracterizado. As massas moleculares das unidades repetidas de PSPn 1 (624), 3 (360), 4(847), 5 (919), 6B(706), 7F (1226), 9V (933), 14 (689), 18C (1012), 19F (613) e 23F (792) foram utilizadas para os cálculos de recuperação normalizados. As recuperações foram calculadas com base nas quantidades (em µg) de cada componente detectados usando padrões de calibração hidrolisados, comercialmente disponíveis, em comparação com a quantidade teórica esperada.	A metanólise seguida pelo TFA deve ser usada apenas no caso de polissacarídeos contendo ácido urônico (PSPn 1, 3, 5 e 9V). Seu uso para outros tipos não é recomendado, pois este procedimento de hidrólise maximiza a degradação dos açúcares de aminoácidos. A fim de reduzir as manipulações excessivas e o número de etapas de manipulação, o uso de hidrólise por HF seguida de hidrólise por TFA só é necessário quando for imprescindível uma quantificação precisa de Rib-ol e Gro em PSPn 6B, 18C e 23F. Neste caso, as análises de hidrolisados devem ser realizadas em uma coluna CarboPac MA 1 especialmente projetada para separações de alcoóis de açúcar. Para a quantificação precisa de PSPn 4, 6B, 7F, 14, 18C, 19F e 23F, utiliza-se a hidrólise de TFA, tal como para todos os outros PSPn, a recuperação de pelo menos um dos monossacáridos constitutivos (Rha ou Gal) é próxima de 100%

Código do estudo	Objetivo	Metodologia	Resultados encontrados
3	<p>Determinar as condições ótimas para a análise quantitativa por nefelometria dos polissacarídeos na vacina pneumocócica conjugada 7-valente. As reações de ligação dos anticorpos aos polissacarídeos ativados com periodato e depois reduzidos foram avaliadas.</p>	<p>Os PSPn foram ligados covalentemente a uma proteína carreadora por um método de aminação redutiva. Neste método, os PSPn foram oxidados por periodato. Em solução aquosa, os grupos aldeído reagiram com grupos aminas primárias da proteína carreadora e metade das amostras foram reduzidos a aminas por borohidreto de sódio (<math>\text{NaBH}_3\text{CN}</math>). A outra metade das amostras continuou ativada com periodato. A vacina pneumocócica conjugada 7-valente foi tratada com tripsina e mantida a 25° C ou 37° C por 17 horas para digestão e liberação dos fragmentos de peptídeos dos PSPn na solução. As concentrações das amostras teste foram determinadas através de uma curva padrão determinadas por nefelometria.</p>	<p>As curvas padrão para os PSPn 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F mostraram um excesso ou alta concentração de PSPn que resultou na inibição da reação de precipitação e redução da ligação antígeno-anticorpo. As concentrações ótimas para estes 7 PSPn foram encontrados no intervalo de 1-5 ug / ml. Maior sensibilidade da taxa de dispersão foi observado para os PSPn 4, 14, 18C, 19F e 23F usando anti-soro NYSPH, em comparação com o soro WLVP. Um grau similar de ligação antígeno-anticorpo foi observado para o PSPn 6B usando anti-soro NYSPH ou WLVP eo PSPn 9V quando os anti-soros SSI ou WLVP foram usados. O tratamento com tripsina a 37° C resultou em um aumento no conteúdo de PSPn 4 e 14. Além disso, foram observados diferentes padrões de reação: (i) para os PSPn 6B, 18C e 19F, maior sensibilidade para PSPn oxidado com periodato e oxidado com periodato/reduzido com <math>\text{NaBH}_4</math> quando comparado ao PSPn não tratado. (ii) para os PSPn 4 e 14, menor sensibilidade para PSPn oxidado com periodato e oxidado com periodato/reduzido com <math>\text{NaBH}_4</math> quando comparado ao PSPn não tratado. (iii) para os PSPn 9V e 23F, a reação de sensibilidade foi similar para PSPn oxidado com periodato e oxidado com periodato/reduzido com <math>\text{NaBH}_4</math> quando comparado ao PSPn não tratado.</p>

Código do estudo	Objetivo	Metodologia	Resultados encontrados
4	Desenvolver um método utilizando espectroscopia RMN <sup>1</sup> H para confirmar a identidade de polissacarídeos bacterianos usados na formulação de vacinas polissacarídicas pneumocócicas polivalentes.	O método é baseado no espectro RMN <sup>1</sup> H na frequência operacional de 600 MHz dos polissacarídeos sorotipo-específicos individuais. Uma porção da região anomérica de cada espectro (5,89 a 4,64ppm) foi comparada a espectros gerados para amostras designadas de referência para cada polissacarídeo de interesse. A similaridade entre dois perfis espectrais foram avaliados utilizando um coeficiente de correlação ( $\rho$ ), onde $\rho \geq 0,95$ entre uma amostra e o perfil de referência, que sugere uma identificação positiva da amostra de polissacarídeo. Então, a amostra de polissacarídeo foi identificada como um sorotipo conhecido se o pente o espectro da amostra e o espectro de referência contido na base de dados excede 0,95; caso contrário, a amostra-teste foi classificada como desconhecida. O método foi validado como um ensaio qualitativo de identificação e foi incorporado na rotina de controle de qualidade da vacina PNEUMOVAX 23.	Apesar do seu grande tamanho molecular, todos os polissacarídeos pneumocócicos incluídos neste estudo produziram espectros RMN <sup>1</sup> H de qualidade aceitável em soluções de óxido de deutério (D <sub>2</sub> O). Devido às diferenças em suas estruturas repetidas e suas propriedades dinâmicas inerentes, cada polissacarídeo produziu um espectro RMN <sup>1</sup> H único e reproduzível, com características de deslocamento químico e larguras da linha de ressonância. Tipicamente, um espectro RMN <sup>1</sup> H unidimensional (1-D) de um polissacarídeo pode ser dividido em regiões contendo ressonâncias características dos grupos funcionais presentes na estrutura de repetição. Muitos desses sinais característicos podem ser usados para a identificação de cada sorotipo. No entanto, é útil definir uma pequena região do espectro que é comum a todos os sorotipos que oferecem tanto as especificações necessárias para o ensaio de identidade e reduzir o tamanho de dados relevantes ao mínimo, sem comprometer a singularidade dos espectros individuais. Três critérios foram usados para avaliar a adequação de uma região espectral para uso como um perfil de identidade: sensibilidade e resolução das ressonâncias dos polissacarídeos capsulares, singularidade do perfil feito por estes sinais, e mínima interferência espectral de outros componentes. A região anomérica dos espectros de polissacarídeos cumpriu estes critérios. Os espectros de polissacarídeos foram, então, classificados de acordo com a largura média das linhas de ressonância anoméricas.

Código do estudo	Objetivo	Metodologia	Resultados encontrados
5	Desenvolver um método de cromatografia em fase gasosa simples e sensível para análise quantitativa de polissacarídeos capsulares de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , polissacarídeos ativados, e polissacarídeos conjugados.	A metanólise anidra é comumente usada para despolimerizar polissacarídeos a glicosídeos de metila, que podem ser submetidos a derivatização subsequente e cromatografia gasosa com detectos de massas seletivo (GC-MSD). Os glicosídeos de metila são produtos relativamente estáveis comparados aos monossacarídeos liberados sob condições aquosas, e podem ser submetidos a hidrólise severa com degradação mínima. Os polissacarídeos pneumocócicos e os conjugados polissacarídeos foram submetidos a metanólise como único passo de hidrólise, seguido por derivatização e cromatografia gasosa com detector de massas seletivo. Os níveis de polissacarídeos foram calculados com base na resposta de quantidades conhecidas de padrões de monossacarídeo. Cada conjunto padrão incluiu 50 µg de cada monossacarídeo, e 20 µg de mio-inositol foi adicionado a todos os padrões e amostras como uma referência interna. Os fatores de resposta para cada padrão de monossacarídeos foram calculados e aplicados para a quantificação de cada amostra.	Um total de 13 polissacarídeos foram submetidos a análise nos vários estágios da vacina pneumocócica, incluindo purificação, ativação conjugação dos polissacarídeos. Foram listados todos os monossacarídeos contidos nos polissacarídeos pneumocócicos, sendo os mais comuns: glicose (Glc), galactose (Gal) e ramnose (Rha), seguido por N-acetil-manosamina (ManNAc), ácido glucurônico (GlcA), N-acetil-fucosamina (FucNAc), ácido galacturônico (GAIA), N-acetil-galactosamina (GalNAc), N-acetil-glucosamina (GlcNAc), glicerol (Gro), ribitol(Rib-ol), N-acetil-pneumosamine (PneNAc), 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy- -galactose D (Sug1), e 2-acetamido-2,6-didesoxi- D -xylo-hexos-4-ulose (Sug2). Os sorotipos 6A e 6B possuem a mesma composição de monossacarídeos e produzem cromatogramas muito similares; da mesma forma, os cromatogramas dos PSPn 19A e 19F parecem ser idênticos. Os sorotipos remanescentes renderam uma distribuição única de monossacarídeos.

Fonte:(próprio autor)

\*Nota: Tradução livre

## 5.2 Resultados dos estudos incluídos na revisão sistemática

O estudo desenvolvido nas cinco pesquisas foi experimental, nos quais desenvolveram metodologias para determinar composição, identidade ou realizar análise quantitativa dos polissacarídeos pneumocócicos e conjugados a proteínas nas vacinas pneumocócicas. Para este fim utilizaram metodologias laboratoriais distintas, como cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detecção de fluorescência, cromatografia líquida de alta

eficiência de troca iônica com detecção amperométrica pulsada, nefelometria, ressonância magnética nuclear e cromatografia gasosa com detector de massas seletivo.

Para confirmar a identidade dos polissacarídeos bacterianos usados na formulação de vacinas polissacarídicas pneumocócicas, utilizaram-se as técnicas de ressonância magnética nuclear e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detecção de fluorescência. Ademais, para a análise quantitativa de polissacarídeos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*, as técnicas utilizadas foram cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica com detecção amperométrica pulsada, nefelometria e cromatografia gasosa com detector de massas seletivo.

### 5.2.1 Artigo 1

O artigo 1 desenvolveu um método cromatográfico seguido de um método de RMN  $^1\text{H}$  para caracterização da composição e identidade química dos polissacarídeos pneumocócicos 19F, 23F, 14, 6B e 18C. Este artigo não discrimina com detalhes a metodologia utilizada, como condições cromatográficas e espectrométricas. Além disso, os resultados apresentados, em sua maioria, foram insatisfatórios. De acordo com o artigo 1, apenas a recuperação do monossacarídeo Rha foi eficiente para o polissacarídeo pneumocócico 23F. Apesar disso, os autores (CANAÁN-HADEN et al., 2006) afirmaram que o método é rápido, muito sensível (são necessários apenas 2  $\mu\text{g}$  de polissacarídeo), e a presença de proteínas carreadoras não interferem na análise. Assim, o estudo 1 relata que o método pode apresentar vantagens em relação aos métodos colorimétricos utilizados para a análise dos polissacarídeos em vacinas conjugadas pneumocócicas.

### 5.2.2 Artigo 2

O artigo 2, que foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores do Departamento de Pesquisas em Bioquímica da Aventis Pasteur, apresenta a metodologia discriminada em detalhes, o que facilitou a análise do estudo. Neste trabalho foi realizada uma comparação entre três métodos diferentes de hidrólise para análise dos carboidratos dos polissacarídeos

pneumocócicos. O método 1 consistiu em hidrólise com TFA, o método 2 consistiu em metanólise seguida de hidrólise com TFA, e já o método 3 hidrólise com HF seguida por TFA, como é apresentado na Figura 15. O objetivo primário em definir as condições ótimas para hidrolisar um polissacarídeo, segundo os autores, é encontrar condições para a hidrólise que proporcionam máxima completude, minimizando a degradação dos componentes da amostra. Em segundo lugar, é desejável que os protocolos definidos sejam práticos e simples.

Figura 15–Comparação entre três métodos diferentes para análise de carboidratos de polissacarídeos pneumocócicos – Tabela 1 e Fatores de resposta relativa à Detecção Amperométrica Pulsada de vários monossacarídeos antes e após hidrólise – Tabela 3 (Artigo 2).

Table 1  
Comparison of three different methods for carbohydrate analysis of pneumococcal polysaccharides

Method	Acid	Hydrolysis conditions		
		Concentration	Temperature (°C)	Time (h)
1	TFA	2N	121	2
2	HCl in methanol	2N	80	24
	TFA	2N	121	2
3	HF	48% (w/v)	65	2
	TFA	2N	121	2

Table 3  
Relative response factors of various monosaccharides toward PAD before and after hydrolysis

Monosaccharide	Relative response factors after hydrolysis			
	Untreated	TFA	Methanolysis + TFA	HF + TFA
Gro	100	113	195 <sup>a</sup>	102
Rib-ol	100	76	4 <sup>b</sup>	71
Fuc	100	88	53	87
Rha	100	82	66	77
GalN	100	82	22	80
ManN	100	82	19	80
GlcN	100	86	32	88
Gal	100	83	73	78
Glc	100	75	92 <sup>c</sup>	85 <sup>c</sup>
GalA	100	28	21	27
GlcA	100	82	84	83

<sup>a</sup> Higher level of Gro observed probably due to co-elution with another compounds generated during the methanolysis step.

<sup>b</sup> Disappearance of Rib-ol most probably due to the co-evaporation of Rib-ol with the methanol during the drying step.

<sup>c</sup> Higher observed level of glucose during these hydrolysis methods.

Fonte: (adaptado de TALAGA et al., 2002)

Após a hidrólise com HF seguido de hidrólise com TFA (método 3), os rendimentos de todos os açúcares testados foram semelhantes ao método que utilizou apenas TFA (método 1), o que mostrou claramente que o passo de hidrólise de HF é um método não destrutivo (Figura 15).

Os aminoaçúcares GalN, ManN, e GlcN, monossacarídeos em que um dos grupos hidroxila é substituído por um grupo amina, mostraram-se sensíveis ao método 2. Este resultado pode ser visualizado através dos fatores de resposta relativos com rendimentos baixos, consequência da degradação destes monossacarídeos pelo procedimento de hidrólise. Neste caso, Talagaet al. (2002) recomenda que este método seja utilizado apenas para polissacarídeos que contém em sua estrutura ácido urônico (GalA, GlcA), como os PSPn 1, 3, 5 e 9V, pois os rendimentos (recuperação dos monossacarídeos/valores teóricos) foram maiores utilizando o método 2 (Figura 16).

Figura 16 – Recuperação normalizada dos componentes monossacarídicos, relativo aos valores teóricos, para PnPS submetidos aos métodos de hidrólise e HPAEC-PAD – Tabela 4 (Artigo 2).

Table 4  
Normalized recoveries of monosaccharide components, relative to the theoretical values, for PnPS subjected to the different hydrolyses, and HPAEC-PAD

PnPS	Hydrolysis method	Recovery vs. theoretical (%)									
		Gro	Rib-ol	Rha	GalN	ManN	GlcN	Gal	Glc	GalA	GlcA
1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	13	–
	2	–	–	–	–	–	–	–	–	68	–
3	1	–	–	–	–	–	–	62	–	–	64
	2	–	–	–	–	–	–	97	–	–	108
4	1	–	–	–	103	72	–	107	–	–	–
5	1	–	–	–	–	–	–	–	113	–	72
	2	–	–	–	–	–	–	–	104	–	98
6B	1	–	9	100	–	–	–	111	114	–	–
	3	–	107	109	–	–	–	109	105	–	–
7F	1	–	–	ND	ND	–	92	114	94	–	–
9V	1	–	–	–	–	71	–	73	76	–	68
	2	–	–	–	–	83	–	104	91	–	107
14	1	–	–	–	–	–	94	99	110	–	–
18C	1	17	–	104	–	–	–	112	115	–	–
	3	96	–	103	–	–	–	108	108	–	–
19F	1	–	–	102	–	6	–	–	67	–	–
	3	–	–	101	–	93	–	–	98	–	–
23F	1	23	–	110	–	–	–	106	105	–	–
	3	94	–	100	–	–	–	103	108	–	–

Note: all analyses are calibrated vs. standards that were subjected to identical hydrolysis conditions. ND, not determined due to the co-elution of Rha and GalN within PnPS 7F hydrolyzates.

Fonte: (adaptado de TALAGA et al., 2002)

Neste estudo o método 3 é recomendado ser utilizado apenas quando for necessária a quantificação dos monossacarídeos Rib-ol e Gro nos PSPn 6B, 18C e 23F, com a finalidade

de reduzir as etapas de manipulação das amostras. A Figura 16 demonstra a justificativa da sugestão, ou seja, os rendimentos foram maiores utilizando o método 3, quando comparado ao método 1.

Ainda que não relatado neste artigo, observou-se que para a quantificação do monossacarídeo ManN contido no polissacarídeo 19F é preferível o método de hidrólise 3, pois o rendimento é 15 vezes maior do que quando utilizado o método de hidrólise 1.

Segundo o artigo 2, para análises de rotina, é difícil estabelecer para cada PSPn uma curva de calibração. Assim, após a escolha do método de hidrólise, foram definidos os monossacarídeos usados como referência para quantificação dos PSPn, conforme descritos no Quadro 6.

Quadro 6 - Distribuição dos monossacarídeos usados como referência segundo os PSPn.

PSPn	Rha (método de hidrólise 1)	Gal (método de hidrólise 1)	GlcA (método de hidrólise 2)
3			X
4		X	
5			X
6B	X		
7F		X	
9V			X
14		X	
18C	X		
19F	X		
23F	X		

Fonte: (próprio autor)

Após a hidrólise desses três monossacarídeos com o método selecionado e a análise por HPAEC-PAD, foram obtidas curvas de calibração lineares utilizadas para quantificação dos PSPn. Para obter a concentração do PnPS, a composição percentual em peso (Figura 17) do monossacarídeo selecionado foi incluída no cálculo.

Figura 17 – Composição percentual em peso dos monossacarídeos usados para a quantificação dos PNPs–Tabela 5 (Artigo 2).

Table 5  
Weight percentage composition of the monosaccharides used for quantification of PnPS

PnPS	Rha <sup>a</sup> (hydrolysis method 1)	Gal (hydrolysis method 1)	GlcA (hydrolysis method 2)
3			53.9
4		21.2	
5			21.1
6B	23.2		
7F		29.4	
9V			21
14		52.2	
18C	16.2		
19F	26.7		
23F	41.4		

<sup>a</sup> As an example, 0.232  $\mu\text{g}$  of Rha should be obtained after quantitative hydrolysis of this residue from 1  $\mu\text{g}$  of PnPS 6B. Therefore, the weight percentage of Rha in PnPS 6B is 23.2%.

Fonte: (TALAGA, et al., 2002)

Logo, com base no artigo 2 e os dados apresentados, as condições ótimas para a hidrólise de polissacarídeos contendo ácido urônico é a metanólise seguida de TFA e a hidrólise com TFA é a condição mais simples para a quantificação de todos os outros PSPn utilizados neste estudo.

### 5.2.3 Artigo 3

O artigo 3, que avaliou as condições ótimas para análise quantitativa de polissacarídeos por nefelometria, apresentou a maioria dos resultados encontrados, o que facilitou o entendimento e descrição do trabalho.

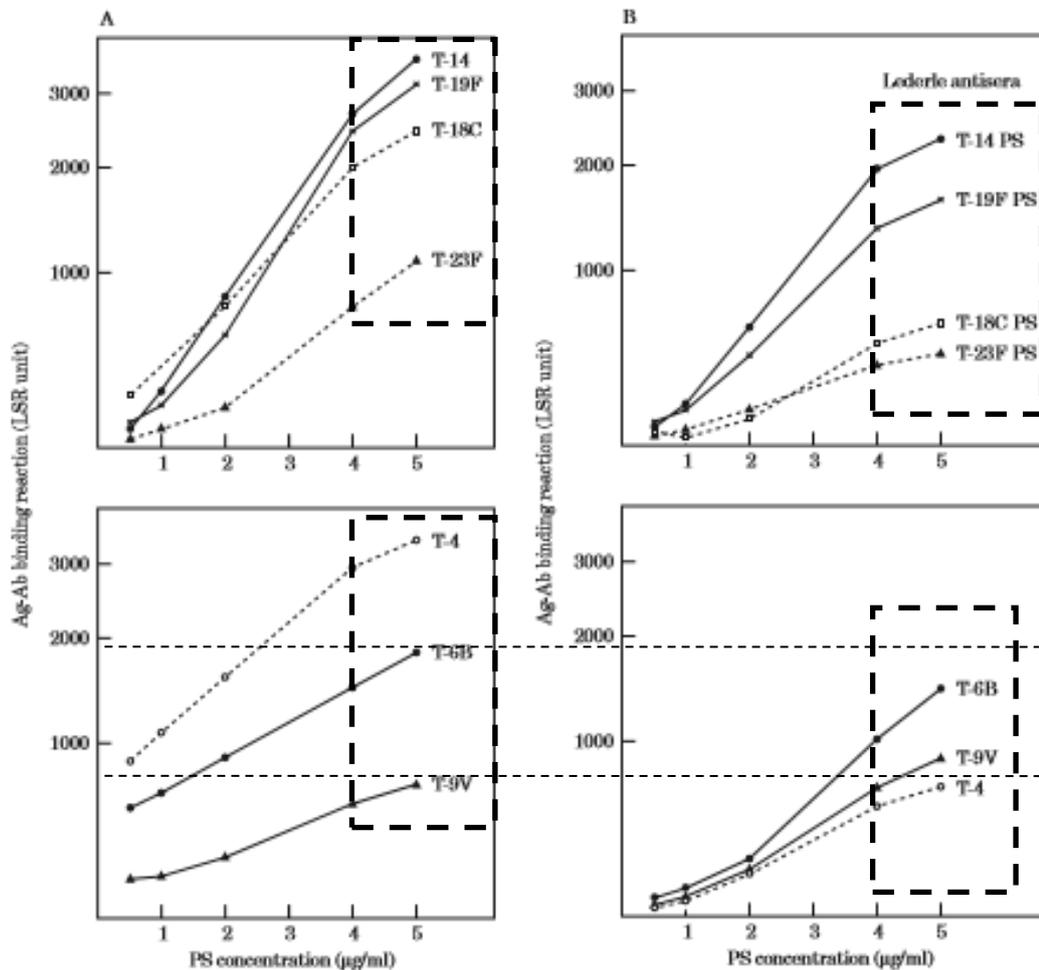
As condições nefelométricas avaliadas, a temperatura de incubação da vacina pneumocócica conjugada 7-valente com tripsina (25°C e 37°C), o antissoro pneumocócico obtido de três institutos distintos (*New York State Public Health Laboratories* (NYSPH),

*Statens Serum Institut (SSI)* e *Wyeth-Lederle Vaccines & Pediatrics (WLVP)*) e a oxidação com periodato de sódio e redução com borohidreto de sódio, mostraram resultados distintos para alguns polissacarídeos pneumocócicos.

O tratamento com tripsina cliva a proteína carreadora a resíduos de lisina ou arginina, liberando peptídeos glicosados e não-glicosados. Em relação à temperatura de incubação (25°C ou 37°C) da vacina com tripsina, ocorreu uma discordância entre o que foi relatado nos resultados e discussão. De acordo com os resultados, o tratamento com tripsina a 37°C resultou no aumento do conteúdo polissacarídico dos sorotipos 4 e 14. Porém, a discussão relata que nos sorotipos 14 e 19F, o tratamento com tripsina a 37°C resultou no aumento da liberação dos PSPn do conjugado. Pode ter ocorrido um erro nos resultados, pois na discussão há o seguinte argumento: “Uma vez que PSPn que contém ligação fosfodiéster, p. ex. sorotipo 19F são sensíveis a despolimerização por tratamento ácido ou alcalino, o tratamento enzimático é melhor que o tratamento alcalino para dissociar o PSPn da proteína carreadora.” É lembrado que este resultado não foi mostrado no estudo.

Como pode ser observado na Figura 18, o estudo apresentou as curvas padrão para os PSPn do sorotipo 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, utilizando o NYSPH e WLVP como antissoros. A taxa de aumento na intensidade da dispersão de luz enquanto passa através do complexo antígeno-anticorpo é proporcional a concentração do complexo, e foi utilizada para a quantificação de PSPn.

Figura 18 –Curvas padrão dos polissacarídeos pneumocócicos determinadas por nefelometria (A, usando antissoro NYSPH e B, usando antissoro WLVP) – Figura 2 (Artigo 3).



**Figure 2.** A and B. Standard curves of pneumococcal polysaccharides determined by nephelometry. The antigen-antibody reaction was performed by mixing 42 ul of 0.5 to 5 ug PS/ml and 42 ul of 1/10 dilution of specific antiserum prepared by New York State Public Health (2A) or Lederle (2B).

Fonte: (adaptado de LEE, 2002)

Como pode ser observado no tracejado em negrito, um excesso ou alta concentração de PSPn resultou na inibição da reação de precipitação e, por conseguinte, redução da ligação antígeno-anticorpo. O estudo mostra que as concentrações ideais para os 7 sorotipos de PSPn (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) está na faixa entre 1-5 µg/mL. Conforme é demonstrado na Figura 18, há uma maior sensibilidade da taxa de dispersão para os sorotipos 4, 14, 18C, 19F e 23F usando o antissoro NYSPH, comparado ao WLVP. Já para os sorotipos 6B e 9V, houve um grau de ligação antígeno-anticorpo similar usando os antissoros NYSPH e WLVP. O estudo não apresentou resultados para a comparação com o outro antissoro utilizado (SSI).

Este estudo apresenta diferenças na produção dos antissoros que podem justificar a maior sensibilidade da taxa de dispersão observada em alguns sorotipos de PSPn usando o antissoro NYSPH. Neste caso, o mesmo foi preparado em coelhos hiperimunizados com pneumococos totalmente inativados, enquanto o antissoro WLVP foi preparado através de várias injeções de PSPn conjugados a proteína.

Além disso, Lee (2002) relatou que as reações de ligação antígeno-anticorpo foram maiores nas amostras de PSPn comparadas às amostras de PSPn conjugadas a proteína. Sendo assim, é necessário investigar mais a caracterização da afinidade e quantidade de ligação, e diferentes epítomos no antissoro preparado pela célula imunogênica com os PSPn conjugados a proteína, pois pode afetar a determinação nefelométrica.

Durante a conjugação usando aminação redutiva, os PSPn são oxidados com periodato de sódio para a introdução de grupos aldeído e reduzidos com borohidreto de sódio. O sacarídeo ativado pode ser armazenado para o uso posterior, porém o conteúdo de polissacarídeos deve ser determinado para garantir a estabilidade durante o armazenamento.

Através dos resultados deste estudo (Figura 19), Lee (2002) observou que a oxidação e oxidação-redução de PSPn podem aumentar ou diminuir a sensibilidade da reação antígeno-anticorpo, comparado a PSPn não-tratados. De acordo com o estudo, é possível que estas reações possam modificar os sítios de ligação do anticorpo ou a estrutura molecular tri-dimensional, resultando na mudança da sensibilidade da reação de ligação antígeno-anticorpo. Ademais, os grupos aldeídos nos PSPn oxidados tendem a ser alterados gradualmente durante o período de armazenamento. Então, a reação de ligação antígeno-anticorpo dos PSPn ativados durante este período podem fornecer uma indicação inicial de mudança no processo de conjugação, demonstrando a utilidade da nefelometria como método analítico para avaliação da estabilidade de vacinas.

Figura 19 – A e B. Reação antígeno-anticorpo dos PSPn oxidados com periodato de sódio e reduzidos com borohidreto de sódio – Figura 3 (Artigo 3).

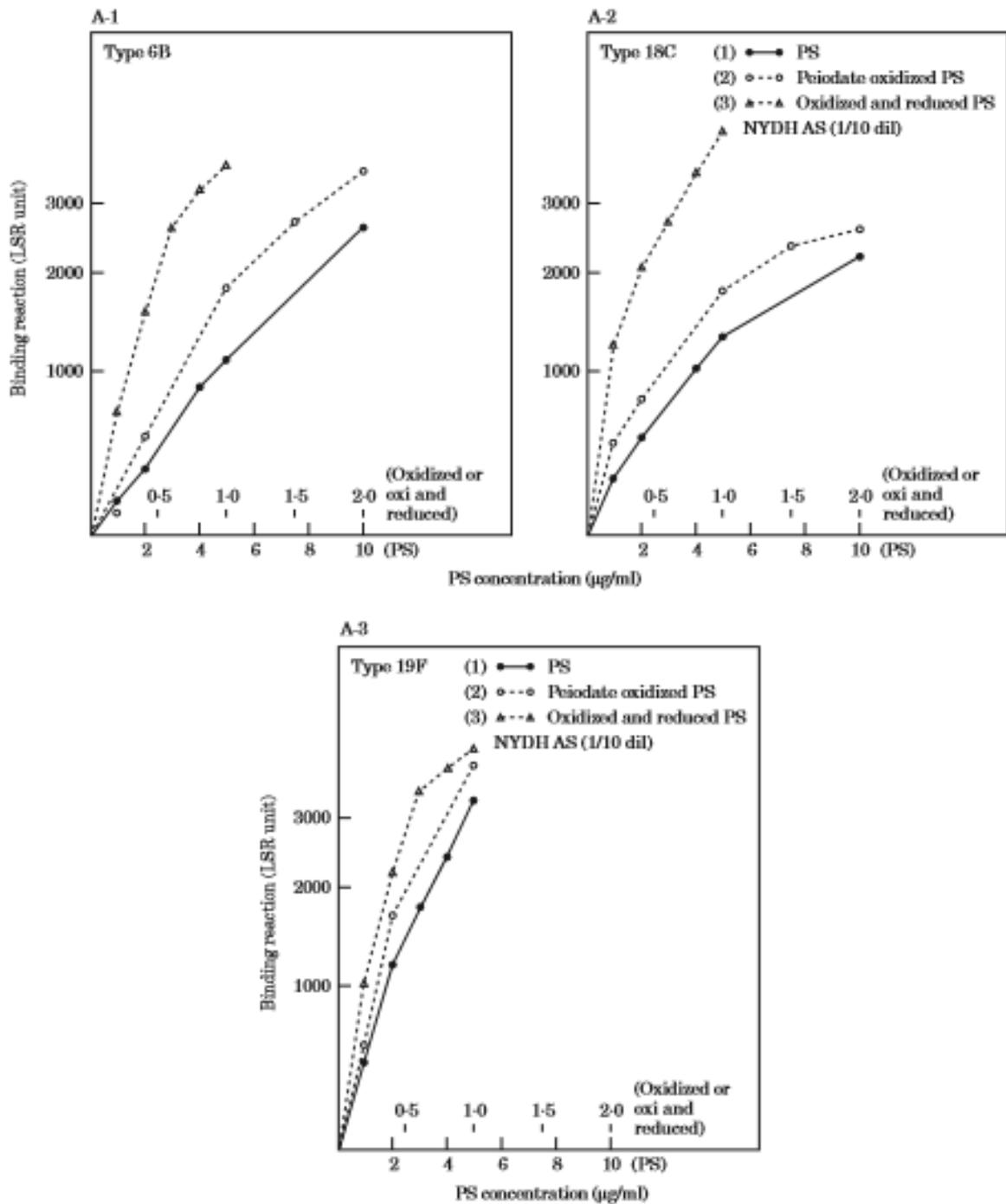
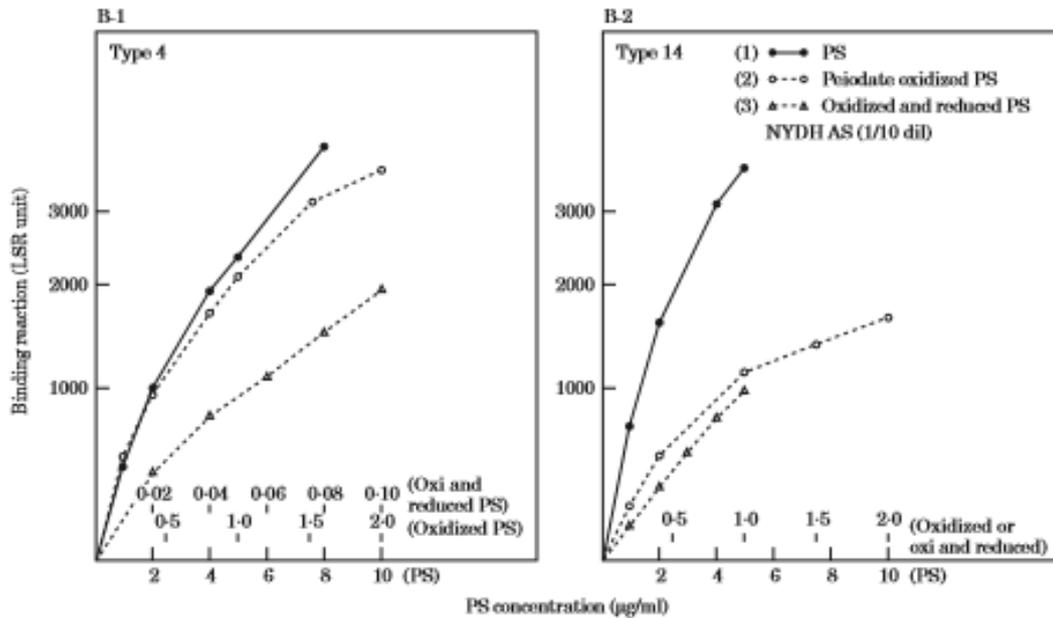


Figure 3. A1–A3.



**Figure 3. A and B.** Antigen-antibody reaction of periodate activated and reduced PSs. The antigen-antibody reaction was performed by mixing equal volume of 1.0 to 10 µg periodate oxidized PS/ml or 0.5 to 2.0 µg reduced PS/ml with 1/10 dilution of specific antiserum (NYSPH). Different reaction patterns were observed: (i) The reduced PS exhibited the highest sensitivity, e.g. types 6B, 18C, and 19F (Figures A-1, A-2, and A-3). (ii) The reduced PS exhibited low sensitivity, e.g. types 4 and 14 (Figures B-1 and B-2).

Fonte: (LEE, 2002)

#### 5.2.4 Artigo 4

O artigo 4 utiliza espectroscopia por ressonância magnética nuclear para confirmar a identidade de polissacarídeos bacterianos usados na formulação de vacinas polissacarídicas pneumocócicas polivalentes. Segundo o estudo, todos os espectros RMN  $^1\text{H}$  produzidos neste estudo demonstraram qualidade aceitável para todos os polissacarídeos capsulares, apesar da grande massa molecular. Devido às diferenças em suas estruturas repetidas e suas propriedades dinâmicas inerentes, cada polissacarídeo produziu um espectro RMN  $^1\text{H}$  único e reproduzível, com características de deslocamento químico e larguras da linha de ressonância. O deslocamento químico, medido em ppm, é a diferença ( $\delta$ ) entre a frequência real de ressonância ( $\nu$ ) e uma frequência de referência ( $\nu^\circ$ ).

Abeygunawardana e colaboradores (2000) relata que, tipicamente, um espectro RMN  $^1\text{H}$  unidimensional (1-D) dos polissacarídeos podem ser divididos em regiões contendo

ressonâncias características dos grupos funcionais presentes na sua estrutura de repetição. A Figura 20 mostra o espectro RMN  $^1\text{H}$  do sorotipo 17F divididas em 4 regiões.

Figura 20 – Espectro RMN  $^1\text{H}$  na frequência operacional de 600 Hz do polissacarídeo 17F de *S. pneumoniae* – Figura 1(Artigo 4).

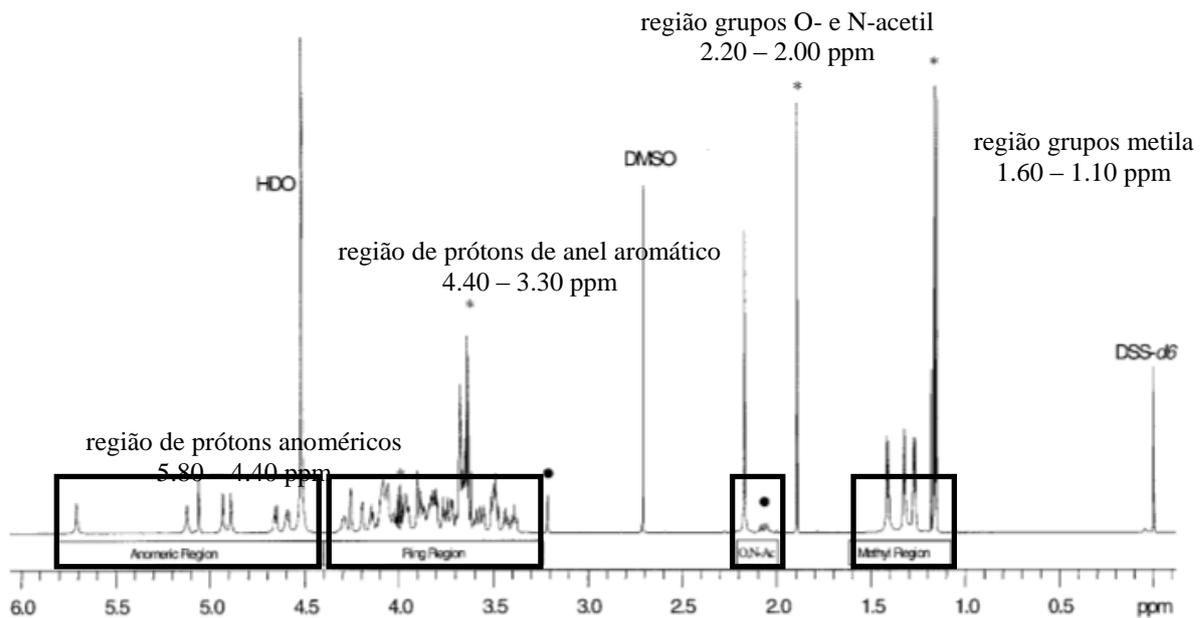


FIG. 1. 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR spectrum of *S. pneumoniae* serotype 17F polysaccharide (5 mg/ml) at 50°C in  $\text{D}_2\text{O}$  containing 0.01% v/v DMSO and 0.01% w/v DSS- $\alpha$ 6. The spectrum was recorded as described under Materials and Methods. The signals indicated by asterisk are due to process residuals ethanol, isopropanol, and free acetate. The signals indicated by dark circle (●) are due to an endogenous residual of pneumococcal C-polysaccharide.

Fonte: (ABEYGUNAWARDANA et al., 2000, adaptado pela pesquisadora)

É importante ressaltar que o artigo 4 analisa os polissacarídeos utilizados na vacina pneumocócica polivalente PNEUMOVAX 23®, sendo que o espectro RMN  $^1\text{H}$  do sorotipo 17F foi utilizado como exemplo para mostrar as quatro regiões características. Ainda que o estudo do PSPn do sorotipo 17F não faz parte do objetivo desta revisão sistemática, é possível utilizá-lo como referência para o entendimento da técnica.

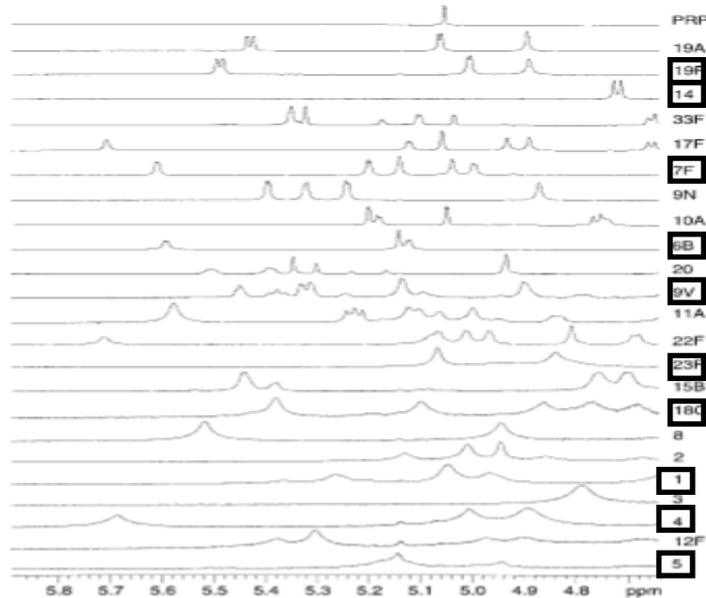
Como é discutido no estudo, muitos destes sinais característicos podem ser usados para a identificação de cada sorotipo. Porém, os autores mencionam que seria útil definir uma pequena região do espectro que é comum a todos os sorotipos, que oferece tanto a

especificidade necessária para o ensaio de identificação como também reduz os dados relevantes ao mínimo sem comprometer a singularidade de cada um dos espectros.

Desse modo, foram definidos três critérios para julgar a adequação da região espectral para usar como perfil de identificação: sensibilidade e resolução das ressonâncias dos polissacarídeos capsulares; singularidade do perfil feito por esses sinais, e interferência espectral mínima de outros componentes. Os autores do estudo chegaram a conclusão, através dos critérios apresentados, que a região anomérica do espectro dos polissacarídeos melhor cumpre estes critérios.

Esta região, geralmente, mostra os picos de RMN bem resolvidos exibindo correspondência um a um com monossacarídeos nas unidades de repetição. Além disso, o deslocamento químico dos sinais anoméricos é sensível a todos os aspectos estruturais nas unidades de repetição. Assim, os limites superior e inferior da região de identidade para os polissacarídeos foram 4.64 a 5.89 ppm, como mostra a Figura 21.

Figura 21 – Sobreposição das regiões espectrais selecionadas (4.64 a 5.89 ppm) dos 24 polissacarídeos- Figura 2 (Artigo 4).



**FIG. 2.** Overlay of the selected spectral region (4.64 to 5.89 ppm) of the 24 polysaccharides included in the NMR-ID reference spectrum library. All spectra are extracted from 600 MHz 1D  $^1\text{H}$  NMR spectra recorded at 50°C in  $\text{D}_2\text{O}$  as described under Materials and Methods. Spectra are ranked according to the average line width of their anomeric resonances.

Fonte: (ABEYGUNAWARDANA et al., 2000, adaptado pela pesquisadora)

A Figura 21 mostra uma sobreposição das regiões de identificação para todos os 24 polissacarídeos. Em negrito estão os polissacarídeos de interesse para esta revisão sistemática. De acordo com a figura e com a discussão do artigo 4, cada sorotipo é definido unicamente por seus sinais anoméricos.

Para fornecer tanto a informação quantitativa quanto a qualitativa necessária para estes ensaios de identificação polissacarídica, muitos parâmetros para preparo de amostras e coleta de dados RMN foram otimizados. Sempre que apropriado, os parâmetros de aquisição de dados controlados pelo espectrômetro RMN foram definidos como valores fixos. Para todos os outros, incluindo a temperatura da amostra e a concentração polissacarídica, configurações nominais baseadas nos limites de variação aceitáveis foram definidas para uso. De acordo com os autores, o ensaio resultante provou ser muito seletivo e preciso, conseguindo facilmente a robustez necessária para ensaios de controle de qualidade de rotina.

Segundo a conclusão do estudo, o método foi validado como um ensaio de identificação qualitativo e, provavelmente, foi incorporado nos testes de controle da qualidade de rotina dos pós de polissacarídeos utilizados na preparação da vacina pneumocócica polivalente PNEUMOVAX 23®.

### 5.2.5 Artigo 5

Neste artigo, um total de 13 polissacarídeos foram submetidos a análises por CG nos vários estágios do processo de conjugação da vacina, incluindo polissacarídeos purificados, ativados e conjugados. A Figura 22 lista todos os componentes monossacarídeos contidos nos sorotipos de polissacarídeos pneumocócicos. O estudo ressalta os monossacarídeos mais comuns, como a glicose (Glc), a galactose (Gal) e a ramnose (Rha), conforme tracejado na Figura 20.

Figura 22 – Composição de monossacarídeos para os 13 sorotipos de polissacarídeos pneumocócicos – Tabela 1 (Artigo 5).

Table 1  
Monosaccharide composition for the 13 pneumococcal serotype polysaccharides

Pn Serotype	Monosaccharide													
	FucNAc	Gal	GalA	GalNAc	Glc	GlcA	GlcNAc	Gro	ManNAc	PneNAc	Rha	Rib-ol	Sug1	Sug2
1			2											1
3					1	1								
4	1	1		1					1					
5	1				1	1				1				1
6A		1			1						1			
6B		1			1						1	1		
7F		2		1	1		1				2			
9V		1			2	1			1					
14		2			1		1							
18C		1			3			1			1			
19A					1				1		1			
19F					1				1		1			
23F		1			1			1			2			

Fonte: (KIM et al., 2005, adaptado pela pesquisadora)

Já a Figura 23 mostra os cromatogramas resultantes da análise dos monossacarídeos dos sorotipos 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F. Os sorotipos 6A e 6B possuem a mesma composição de monossacarídeos e produziram cromatogramas muito similares, assim como os cromatogramas para os sorotipos 19A e 19F, que parecem ser idênticos, como mostra o tracejado na figura.

Figura 23 – Cromatogramas para os 13 polissacarídeos pneumocócicos – Figura 2 (Artigo 5).

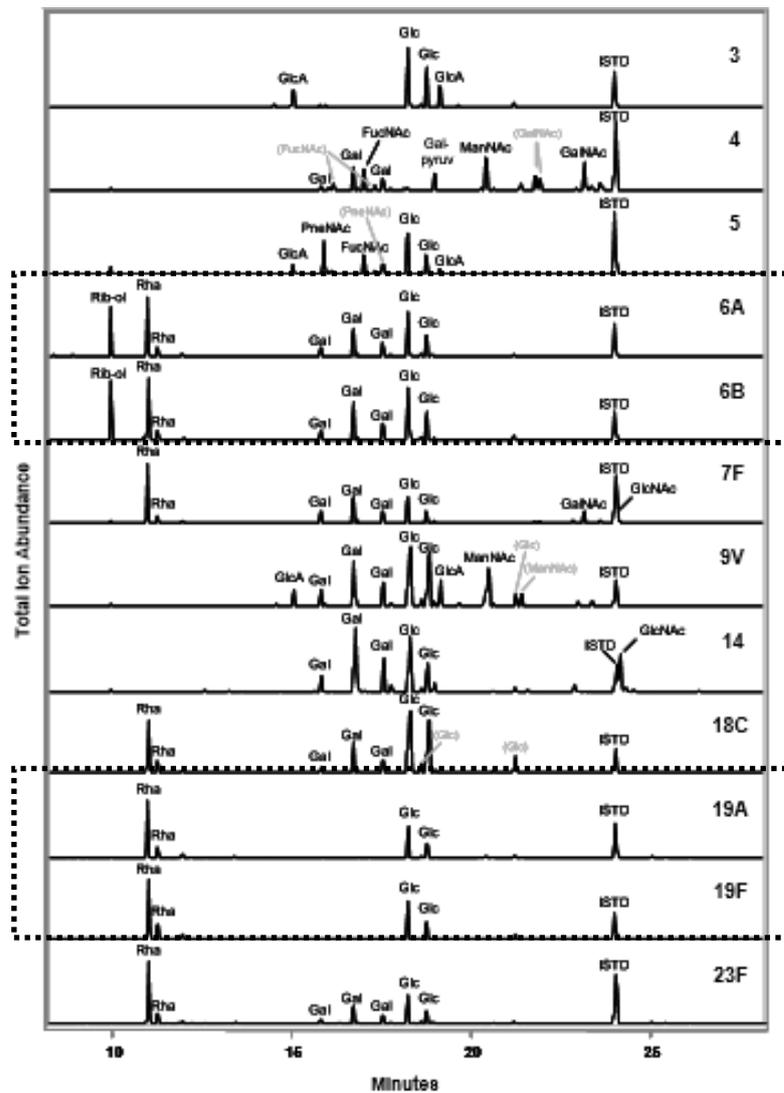


Fig. 2. GC-MSD total ion chromatograms for the 13 pneumococcal polysaccharides. The amounts of polysaccharide tested ranged from 0.1 to 0.5 mg, with 20 µg of myo-inositol included as an internal standard (ISTD).

Fonte: (KIM et al., 2005, adaptado pela pesquisadora)

De acordo com o artigo 5, o espectro de massa para os vários picos pode ser analisado para determinar características como identidade e pureza do pico. Mesmo os epímeros como os fragmentos GalA e GlcA diferem no impacto eletrônico, possibilitando a identificação não-ambígua dos analitos.

As condições de metanólise foram otimizadas para atingir o máximo de recuperação de polissacarídeos para tantos sorotipos quanto possível. O estudo apresenta a Figura 24, que mostra os resultados para os sorotipos 1 e 19A, como um exemplo, para avaliar as condições de metanólise ao longo do tempo.

Figura 24 – Otimização da metanólise para os PSPn 1 e 19A –Figura 4 (Artigo 5).

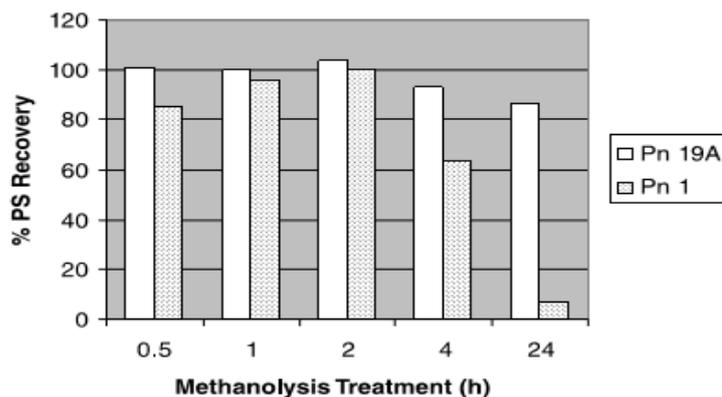


Fig. 5. Optimization of methanolysis in 3 N HCl-methanol for Pn 19A and Pn 1 polysaccharides. Samples were treated for 0.5 to 24 h at 121 °C. PS, polysaccharide.

Fonte: (KIM et al., 2005)

O procedimento de metanólise nas amostras foi realizado com HCl 3N de 2 a 24 horas, seguido dos procedimentos de derivatização e cromatografia. A porcentagem de polissacarídeos recuperados aumentou gradualmente até as 2 horas de tratamento, e caiu após as 2 até 24 horas. Logo, Kim et al., (2005) avaliaram a metanólise por 2 horas como condição ótima e aplicaram similarmente aos outros sorotipos. Além disso, concluíram que as condições de metanólise estabelecidas podem ser usadas para polissacarídeos em outras

etapas do processo de conjugação da vacina, incluindo polissacarídeos ativados e conjugados. A proteína carreadora é não-glicolisada e por isso não interfere nos sinais dos monossacarídeos.

A Figura 25 mostra uma comparação dos resultados, realizada pelo estudo, para polissacarídeos purificados, ativados e conjugados do sorotipo 7F.

Figura 25–Cromatogramas dos polissacarídeos purificados, ativados e conjugados do sorotipo 7F – Figura 6 (Artigo 5).

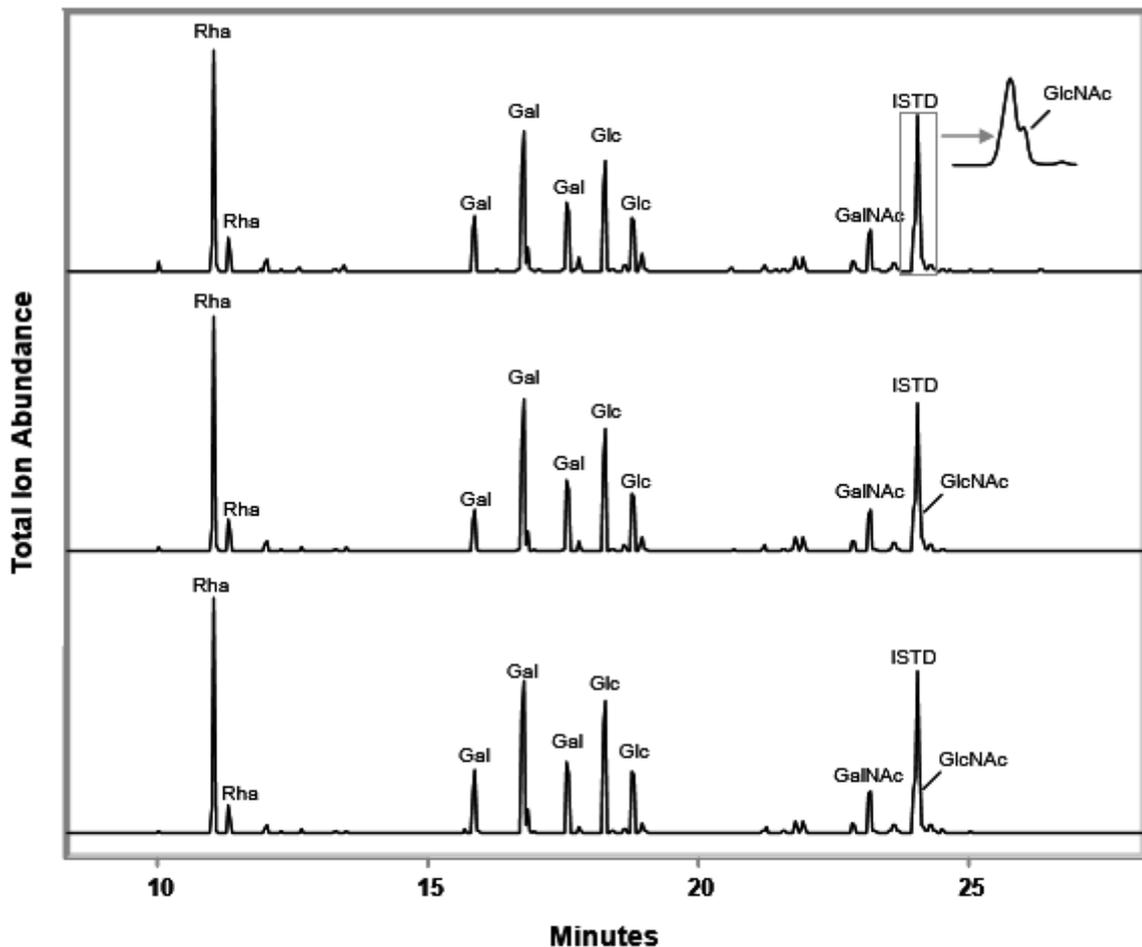


Fig. 6. GC-MSD total ion chromatograms for Pn 7F at the purified, activated, and conjugate stages.

Fonte: (KIM et al., 2005)

Como pode ser visto, todas as três amostras parecem ser muito similares na composição de monossacarídeos. Kim et al. (2005) afirmam que pode ser devido a ativação química moderada, afetando somente uma pequena porcentagem dos resíduos. Ademais, a análise não foi alterada pela detecção da proteína carreadora na amostra de PSPn conjugado.

A conclusão do artigo revela que o método em questão, GC-MSD, é útil para análise dos polissacarídeos pneumocócicos nas várias etapas do processo de conjugação da vacina. Este método tem sido desenvolvido para testes de rotina e caracterização detalhada dos polissacarídeos pneumocócicos e vacinas conjugadas.

## 6 DISCUSSÃO

Nos últimos 20 anos, com a emergência e disseminação global de cepas do pneumococo resistentes e multirresistentes aos antimicrobianos (BAQUERO, 1995), juntamente com o surgimento e distribuição da vacina pneumocócica conjugada 10-valente, eficaz em crianças menores de dois anos, idosos e imunocomprometidos (BLACK et al., 2000), houve uma promoção cada vez maior nos estudos sobre resistência e sorotipos circulantes do pneumococo, porém foi encontrado um número limitado de estudos sobre o desenvolvimento de técnicas para o controle da qualidade de tal vacina.

Além disso, há uma defasagem dos estudos sobre o controle da qualidade de vacinas polissacarídicas conjugadas, sendo que o último estudo foi publicado no ano de 2006. A preocupação com a qualidade dos produtos imunobiológicos se deve, dentre outros motivos, ao fato de que tais produtos são aplicados em grupos de pessoas saudáveis e as campanhas expõem toda uma faixa etária da população ao produto.

Diante da demanda por respostas que sejam capazes de assegurar a qualidade dos produtos, o presente trabalho contribui na identificação de algumas metodologias que podem ser eficazes e seguras na identificação de polissacarídeos no controle da qualidade da vacina pneumocócica conjugada 10-valente.

Sabe-se que a qualidade de vacinas é assegurada pela definição das características críticas das preparações usadas em estudos clínicos e o estabelecimento de especificações para o produto que refletem estas características. Para vacinas polissacarídicas estes parâmetros críticos incluem identificação do sorotipo, massa molecular, e pureza dos componentes polissacarídicos nas preparações (ABEYGUNAWARDANA et al., 2000). Enquanto a massa molecular do polissacarídeo pode ser estimada por uma variedade de técnicas, a identificação e a pureza são mais complexas (LEE, 1983).

Muitos polissacarídeos são avaliados por “identificação sorológica” utilizando antissoro tipo-específico, como apresentado por Lee et al. (2002). Esta técnica apresentada é a nefelometria por taxa de dispersão de luz, que tem sido usada para analisar a cinética de ligação entre antígeno e anticorpo para a determinação da concentração de proteína e conteúdo polissacarídico em vacinas polissacarídicas polivalentes e vacinas conjugadas a

proteínas. Para o controle do conteúdo de polissacarídeos pneumocócicos nestas vacinas, o artigo 3 considera importante (1) padrão de referência para cada sorotipo de polissacarídeo e conjugado monovalente, e (2) antissoro de referência específico para cada sorotipo de polissacarídeo.

Além disso, os polissacarídeos são tipicamente avaliados por “identificação química” por uma série de ensaios colorimétricos que estimam o teor (ou ausência) para classes específicas de monossacarídeos (ex. hexoses, ácido urônico, fósforo, 0-acetil), como o método de antrona e o fenol-sulfúrico. A aplicação destas técnicas fornece uma avaliação razoável, mas não definitiva da identidade química para os polissacarídeos; primeiro, devido ao fato de que alguns sorotipos diferem um do outro apenas por uma ligação glicosídica e segundo, porque a variabilidade inerente e especificidade limitada destes métodos resultam em uma sobreposição dos perfis analíticos para alguns dos sorotipos (MERKE e POPPE, 1994).

Mais recentemente, alguns ensaios têm sido desenvolvidos usando instrumentação cromatográfica e espectrométrica, como a cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), HPLC de fase reversa com detecção de fluorescência, CG com detector de massas seletivo, e RMN. Os métodos cromatográficos demonstraram ser útil para ensaios de rotina de polissacarídeos pneumocócicos e conjugados, pois permitem a detecção de quantidades picomolares de polissacarídeos com o mínimo de amostra. Entretanto, o método usado para a hidrólise ácida de ligações glicosídicas para produzir um rendimento quantitativo de todos os constituintes monossacarídeos pode ser considerado a maior limitação para a análise precisa de polissacarídeos (HARDY et al., 1988; BARDOTTI et al., 2000).

Já RMN é uma técnica analítica que permite determinar a composição e estrutura das unidades repetidas dos polissacarídeos bacterianos, sendo a única técnica capaz de revelar todas as características estruturais dos polissacarídeos e é sensível a pequenas mudanças estruturais, mas é limitada a amostras puras (ABEYGUNAWARDANA et al., 2000). O artigo 4 apresenta um método quantitativo adequado, RMN  $^1\text{H}$  unidimensional, para análise de rotina de polissacarídeos conjugados a proteínas, porém ainda não tem sido utilizado devido aos requisitos de preparo de amostras e a interferência do conteúdo de proteínas na análise.

Um método ideal empregaria um único conjunto de condições analíticas para análise de todos os polissacarídeos pneumocócicos em todas as etapas do processo de conjugação da vacina.

Os artigos 2 e 5 que apresentaram, respectivamente, as técnicas de HPAEC-PAD e CG com detector de massas seletivo, avaliam procedimentos de hidrólise a fim de encontrar o método universal, ou seja, aplicável a todos os polissacarídeos pneumocócicos. Para o artigo 2, as condições de hidrólise ótima para polissacarídeos contendo ácido urônico é a metanólise seguida de TFA e a condição mais simples para a quantificação de todos os outros PSPn é a hidrólise somente com TFA. O artigo 5 apresenta a metanólise como a melhor técnica de hidrólise para a análise cromatográfica de polissacarídeos.

Assim, os ensaios cromatográficos (CG e HPLC) fornecem a quantificação dos polissacarídeos presentes na amostra, mas requerem a aplicação de um método de hidrólise otimizado para a recuperação quantitativa do conteúdo sacarídeo. No entanto, considerações cuidadosas devem ser dadas a vários fatores, dependendo dos requisitos do ensaio. Se for necessário quantificar o conteúdo total de polissacarídeos presente na vacina, ambos os métodos, CG e HPLC, oferecem resultados satisfatórios.

A análise do produto final é trabalhosa devido aos baixos níveis de polissacarídeo na formulação. Além do mais, a quantificação de sorotipos específicos não é possível em alguns casos, por exemplo, a análise de composição de monossacarídeos não consegue distinguir os sorotipos 6A e 6B e os sorotipos 9A e 9F. No entanto, o detector de massas seletivo consegue avaliar sorotipos específicos através da análise das ligações de monossacarídeos, por exemplo, 3 ligações Rib-ol no sorotipo 6A e 4 ligações no sorotipo 6B; ou utilizando marcadores sorotipo-específicos, como GalA para o sorotipo 1 e PneNAc para o sorotipo 5 ou Rib-ol para os sorotipos 6A e 6B (KIM et al., 2005) .

Tendo em vista a importância do ensaio de identificação de polissacarídeos no controle de qualidade de vacinas e o papel do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, representado pelo Laboratório de Produtos Biológicos e Artigos de Saúde, é recomendada a avaliação das técnicas apresentadas pelos artigos incluídos nesta revisão sistemática segundo os aspectos materiais disponíveis no laboratório e satisfatoriedade dos resultados.

## 7 CONCLUSÃO

Este estudo, como qualquer pesquisa, apresenta alguns limites. O principal deles refere-se ao número limitado de estudos comparativos (cinco) entre as metodologias utilizadas para a identificação e quantificação de polissacarídeos na vacina pneumocócica 10-valente.

O grande número de exclusões dos artigos gerou surpresa na pesquisadora ao mesmo tempo motivando-a para a realização deste trabalho como uma forma de mostrar o vazio de conhecimento abordando a questão específica.

Atendendo ao objetivo geral proposto no estudo, conclui-se que as metodologias utilizadas para a identificação dos polissacarídeos encontrados na vacina pneumocócica conjugada 10 – valente incluem métodos físico-químicos e um método imunoquímico. Dentre os métodos físico-químicos estão, a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detecção de fluorescência, a cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica com detecção amperométrica pulsada, a ressonância magnética nuclear e a cromatografia gasosa com detecção de massas seletivo. O método imunoquímico encontrado foi a nefelometria.

Portanto, torna-se premente que profissionais, principalmente os da área de vigilância sanitária, voltem seus olhares para a necessidade da aplicação de um ensaio robusto e sensível para a identificação de polissacarídeos sorotipo específicos na vacina pneumocócica conjugada 10-valente.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2008.

ABEYGUNAWARDANA, C. et. Development and validation of an NMR-based identity assay for bacterial polysaccharides. **Anal Biochem**, v. 279, p. 226-240, 2000.

AKOBENG, A.K. Understanding systematic reviews and meta- -analysis. **Arch Dis Child**, v. 90, p. 845-848, 2005

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Infectious Diseases. Policy statement: recommendations for the prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate vaccine (Pneumovax), pneumococcal polysaccharide vaccine, and antibiotic prophylaxis". **Pediatrics**, v. 106, p. 362–366, 2000.

AUSTRIAN, R. Epidemiology of pneumococcal capsular types causing pediatric infections. **Pediatric Infect Dis J**, v.8, p.S21-S22, 1989.

AUSTRIAN, R. Pneumococcus: the first one hundred years. **Rev Infect Dis**, v.3, p.183-189, 1981.

AUSTRIAN, R. Pneumococcus and the Brooklyn connection. **Am J Med**, v.107, n. 1a, p. 2S-6S, 1999.

AZEVEDO, L.C.P.; TOSCANO, C.M.; BIERRENBACH, A.L. Bacterial meningitis in Brazil: baseline epidemiologic assessment of the decade prior to the introduction of pneumococcal and meningococcal vaccines. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.

BALDY, J. L. Estreptococcias. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Ed). **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: ATHENEU, 2005.

BAQUERO, F. Pneumococcal resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics: a global geographic overview. **Microb Drug Resist**, v. 1, p.115-20, 1995.

BARDOTTI, A. et al. Quantitative determination of saccharide in Haemophilus influenzae type b glycoconjugate vaccines, alone and in combination with DPT, by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection. **Vaccine**, v. 18, p. 1982-1993, 2000.

BIXLER, G. L.; PILLAI, S. The cellular basis of the immune response to conjugate vaccines. **Contrib. Microbiol. Immunol.**, v. 10, p. 18-47, 1989.

BLACK, S. et al. Eficácia, segurança e imunogenicidade da vacina pneumocócica conjugada heptavalente em crianças. **Pediatr Infect Dis J**, v.19, n.3, p.4-12, 2000.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P.W. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect Dis.**, v.4, p. 144-154, 2004.

BOUZA, C.; MUÑOZ, A.; AMATE, J. M. Efficacy of modern dressings in the treatment of leg ulcers: a systematic review. **Wound Repair Regen**, v. 13, n. 3, p. 218-229, 2005.

BRANDILEONE, M.C.C. **Distribuição de sorotipos, resistência antimicrobiana e perfil molecular de Streptococcus pneumoniae isolado de doença invasiva no Brasil: 1993 a 1998.** 1999. 207 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo,1999.

BRANDILEONE, M.C.C. et al. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae strains isolated from Brazilian children with invasive infections. **Microbial Drug Resistance**, v.3, p.141-146, 1997.

BRASIL. Decreto nº 78.231, de 12 de agosto de 1976. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.** Brasília, DF, 13 ago. 1976.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.** Brasília, DF, 20 de set. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações.** Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **SUS oferece duas novas vacinas para seis milhões de crianças.** 2010. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias>>. Acesso em: 14 jun 2017.

BRASIL. Portaria S.V.S. n 109, de 4 de novembro de 1993. Delega ao INCQS a responsabilidade sobre a emissão de parecer técnico sobre solicitação de registro e de programa de inspeções sobre boas práticas de fabricação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.** Brasília, DF, 8 nov. 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário básico de vacinação da criança: incorporação março-2010.** Brasília, DF, 2010. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 12 jun 2017.

BRASIL.Ministério da Saúde. **Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário básico de vacinação da criança: incorporação março-2010.** Brasília, 2010, 14 p.

BRICKS, L.F.; BEREZIN, E. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases. **J Pediatr (Rio J)**, v. 82, n. 3, p. S67-S74 2006.

BRILES, D. E. et al. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 60, n. 1, p. 111-116, 1992.

BROWN, J. S. et al. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **PNAS**, v. 99, n. 26, p. 16969-16974, 2002.

BURMAN, L.A.; NORRBY, R.; TROLLFORS, B. Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors, and prognosis. **Rev Infect Dis**, v.7, p.133-42, 1985.

BUTLER, J.C.; DOWELL, S.F.; BREIMAN, R.F. Epidemiology of emerging pneumococcal drug resistance: implications for treatment and prevention. **Vaccine**, v.16, p.1693-1697, 1998.

CANAÁN-HADEN, L. et al. High-performance reverse phase chromatography with fluorescence detection assay for characterization and quantification of pneumococcal polysaccharides. **Vaccine**, v. 24, n.S2, 2006.

CAPUTO, G.M.; APPELBAUM, P.C.; LIU, H.H. Infections due penicillin resistant pneumococci. **Arch Intern Medic**, v.153, p.1301-1310, 1993.

CASTRO, A. A. Revisão sistemática e meta-análise. **Compacta: temas de cardiologia**, v. 3, n. 1, p. 5-9, 2001.

DAGAN, R. et al. Carriage of resistant pneumococci by children in southern Israel and impact of conjugate vaccines on carriage. **Clin Microbial Infect**, v.5, n.4, p.29-37, 1999.

DELVES, P. J. et al. **Roitt's Essential Immunology**. 11. ed. Malden (MA): Willey Blackwell, 2006.

DOMHOLDT, E. **Rehabilitation research: principles and applications**. Missouri: Elsevier Saunders, 2005.

DOMINGUEZ, J. et al. PCR detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in serum samples for pneumococcal pneumonia diagnosis. **Clin Microbiol Infect**, v.7, n.3, p.164-166, 2001.

DOWSON, C. What is a pneumococcus?. In: TUOMANEN, E.I. et al. (Ed.). **The pneumococcus**. Washington: ASM Press, 2004.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. BRASÍLIA: ANVISA, 2010. 2 v.

FEDSON, D. S.; MUSER, D. M.; ESKOLA, J. Pneumococcal Vaccine. In: PLOTKIN, S. A.; ORENSTEIN, W. A. (Ed.). **Vaccines**. 3. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999. p. 553-608.

FEDSON, D.S.; MUSER, D.M. Pneumococcal Vaccine. In: PLOTKIN, S.A.; MORTIMER JR., E.A. **Vaccine**. 2. ed. Philadelphia: WB Sauder, 1994. p. 527-563.

FERNEBRO, J. et al. Capsular expression in *Streptococcus pneumoniae* negatively affects spontaneous and antibiotic-induced lysis and contributes to antibiotic tolerance. **J. Infect. Dis.**, v. 189, n. 2, p. 328-338, 2004.

FRANCO-ALVAREZ DE LUNA, F. et al. *Streptococcus pneumoniae*: antibiotic resistance and serotypes in a two-year period. **Rev Esp Quimioter.**, v. 18, n. 3, p. 217-221, 2005.

GALVÃO, C. M.; SAWADA, N. O.; TREVIZAN, M. A. Revisão sistemática: recurso que proporciona a incorporação das evidências na prática da enfermagem. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 549-556, maio/jun. 2004.

GARCÍA, E.; LÓPEZ, R. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, p. 553-580, 2004.

GARCÍA-RODRIGUEZ, J. A.; MARTINEZ, M. J. F. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, n. 2, p. 59-73, 2002.

GONZALEZ, B. E. et al. Clonality of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates from pediatric patients in the United States. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 6, p. 2810-2812, 2004.

GRANDO, I.M. et al. Impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis in children up to two years of age in Brazil. *Cad Saude Publica*, v. 31, n. 2, p. 276-284, 2015.

GREINER, O. et al. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. **J Clin Microbiol**, v.39, p.3129-3134, 2001.

GUDUCUOGLU, H. et al. An optochin resistant *Streptococcus pneumoniae* isolate. **Clin Microbiol and Infect**, v.7, n.1, p.102, 2001.

HAMMERSCHMIDT, S. et al. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 4653-4667, 2005.

HARDY, M. R.; TOWNSEND, R. R.; LEE, Y. C. Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed-amperometric detection. **Anal Biochem**, v. 170, p. 54-62, 1988.

HAUSDORFF, W. et al. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. **Clin Infect Dis.**, v. 30, p. 100-121, 2000.

HENRICHSEN, J. The pneumococcal typing system and pneumococcal surveillance. **J Clin Microbiol**, v.33, p.2759-2762, 1995.

HENRICHSEN, J. Typing of *Streptococcus pneumoniae*: past, present, and future. **Am J Med**, v.107, n. 1a, p. 50S-54S, 1999.

HOMMA, A. et al. Desenvolvimento Tecnológico: elo deficiente na inovação tecnológica de vacinas no Brasil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 10, p. 671-696, 2003.

HOSKINS, J.; ALBORN JR, W. E.; ARNOLD, J. Genome of the bacterium *streptococcus pneumoniae* strain r6. **J. BACTERIOL.**, v. 183, 2001.

HYAMS, C. et al. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. **Infect. Immun.**, v. 78, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Atividades Institucionais 2001/2004**. Rio de Janeiro, 2004.

JACOBS, M. R. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and patterns of resistance. **Am J Med**, v. 117, 2004.

JACOBS, M.R. Antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in acute otitis media: an overview and update. **Pediatr Infect Dis J**, v.177, p.1003-1012, 1998.

JEDRZEJAS, M. J. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. **Microbiol Mol. Biol. Rev.**, v. 65, n. 2, p. 187-207, 2001.

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

KIM, J. O.; WEISER, J. N. Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with virulence in streptococcus pneumoniae. **J. Infect. Dis.**, v. 177, 1998.

KIM, J. S. et al. Determination of saccharide content in pneumococcal polysaccharides and conjugate vaccines by GC-MSD. **Analytical Biochemistry**, v. 347, 2005.

KLEIN, D. L.; ELLIS, R.W. Conjugate vaccines against *Streptococcus pneumoniae*. In: LEVINE, M. M. et al. (Ed.). **New generation vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 503-525.

KLEIN, J.O. The pneumococcal conjugate vaccine arrives: a big win for kids. **Pediatr Infect Dis J**, v. 19, n. 3, p. 181-182, 2000.

LEAL, M. L. M. **Desenvolvimento de processo para produção de polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14**. 2011. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

LEE, C.J. The quantitative immunochemical determination of pneumococcal and meningococcal capsular polysaccharides by light scattering rate nephelometry. **J BIOL Stand**, v. 11, p. 55-64, 1983.

LEE, C. J.; BANKS, S. D. Virulence, immunity, and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. **Criçt. Rev. Microbiol.**, v. 18, p. 89-114, 1991.

LEE, C.J. Quality control of polyvalent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine by nephelometry. **BIOLOGICALS**, v.30, 2002.

LINDE, K.; WILLICH, S.N. How objective are systematic reviews? Differences between reviews on complementary medicine. **J R Soc Med**, v. 96, p. 17-22, 2003.

LUND, E.; HENRYCHSEN, J. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. In: BERGAN, T.; NORRIS, J. R. **Methods in Microbiology**, London: Academic Press, 1978. p. 242-262.

MAGEE, A.; YOTHER, J. Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun.**, v. 69, n. 6, p. 3755-3761, 2001.

MÄKELÄ, P. H.; BUTLER, J. C. History of pneumococcal immunization. In: SIBER, G.R.; KLUGMAN, K.P.; MÄKELÄ, P.H. **Pneumococcal vaccines**. Washington, EUA: ASM Press, 2008. cap. 2, p. 19-29.

MANTESE, O.C. et al. Prevalência de sorotipos e resistência antimicrobiana de cepas invasivas do *Streptococcus pneumoniae*. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 6, p. 537-542, 2003.

MARTINS, R.M.; MAIA, M.L.S.; HOMMA, A. Breve História das Vacinações. In: FARHAT, C. K. et al. **Imunizações: fundamentos e práticas**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 1, p. 3-23.

MERKE, R. K.; POPPE, I. Carbohydrate composition analysis of glycoconjugates by gas-liquid chromatography/mass spectrometry. **Methods Enzymol**, v. 230, p. 397-408, 1991.

MIRANDA, D.P.; HENRIQUES, C.M.P. Imunobiológicos e Vigilância Sanitária. In: BUSS P.M. (Org). **Vacinas, Soros e Imunizações no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2005. cap. 6, p. 125-130.

MORONA, J. K. et al. Molecular and genetic characterization of the capsule biosynthesis locus of *streptococcus pneumoniae* type 23f. **Microbiology**, v. 145, 1999.

MUDORCH, D.R. et al. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. **J Clin Microbiol**, v.41, n.1, p.63-66, 2003.

MURRAY, P. et al. **Medical Microbiology**. 4. ed. Mosby: Elsevier, 2002.

NETTO, E. J. R. et al. Avaliação do controle da qualidade realizado nos produtos vacinais para sarampo, caxumba e rubéola utilizados no PNI do Brasil no período de 1999 a 2007. **Rev Inst Adolfo Lutz.**, v. 69, n. 3, p. 408-415, 2010.

NOVAK, R.; TUOMANEN, E. Pathogenesis of pneumococcal pneumoniae. **Semin. Respir. Infect.** v. 14, p. 209-217, 1999.

O'BRIEN, K.L. et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, v. 374, n. 9693, p. 893-902, 2009.

OSELKA, G. Prevenção da doença pneumocócica no Brasil. **J. Pediatr.**, v.79, n. 3, p. 45-54, 2003.

PELTON, S. I., LOUGHLIN, A. M., MARCHANT, C.D. Seven valent pneumococcal conjugate vaccine immunization in two Boston communities: changes in serotypes and antimicrobial susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 23, n. 11, p. 1015-1022, 2004.

PELTON, S.I.; DAGAN, R.; GAINES, B.M. et al. Pneumococcal conjugate vaccines: proceedings from an Interactive Symposium at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **Vaccine**, v. 21, n. 15, p. 1562-1571, 2003.

PEREIRA, A. L. **Revisão sistemática da literatura sobre produtos usados no tratamento de feridas**. 2006. 129 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem)- Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

PEREIRA, A. L.; BACHION, M. M. Atualidades em revisão sistemática de literatura, critérios de força e grau de recomendação de evidência. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, Porto Alegre, v. 27, n. 4, p. 491-498, dez. 2006.

PETER, G. The child with pneumonia: diagnostic and therapeutic considerations. **Pediatr Infect Dis J**, v.17, n.6, p.453-456, 1988.

PFIZER. **Pfizer**: Inovação e compromisso com a saúde. 2017. Disponível em: <<http://www.pfizer.com.br/>>. Acesso em: 19 jun. 2017.

POLAND, G. A. The burden of pneumococcal disease: the role of conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 17, p. 1674-1679, 1999.

POLAND, G.A. The burden of pneumococcal disease: the role of conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 17, n. 13/14, p. 1674-1679, 1999.

PONTE, C.F. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. **História, Ciência, Saúde – Manguinhos**, v. 10, p. 619-653, 2003.

QUAGLIARELLO, V.; SHIELD, M. Bacterial Meningitis: Pathogenesis, Pathophysiology, and Progress. **New England J. Med.**, v. 327, p. 864-872, 1992.

REQUEJO, H.J. Meningites bacterianas. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. **Dianóstico laboratorial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.114-126.

ROCHA, M.A.W.; PIMENTEL, A.M. Tétano. In: FARHAT, C.K. et al. **Imunizações: fundamentos e práticas**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008, p. 253-262. Cap. 23.

RUBINS, J.B. et al. Determination of antibody responses of elderly adults to all 23 capsular polysaccharides after pneumococcal vaccination. **Infect Immun.**, v. 67, n. 11, p. 5979-5984, 1999.

SACKETT, D.L. et al. **Evidence-Based Medicine: how to practice and teach EBM**. 2. ed. London: Churchill Livingstone, 2000.

SAMPAIO, R.F.; MANCINI, M.C. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.11, n.1, p. 77-82, 2007.

SANOFI BRASIL, 2017. Disponível em: <<http://www.sanofi.com.br/l/br/pt/index.jsp>>. Acesso em: 19 jun. 2017.

SCHRAG, S.J.; BEALL, B.; DOWELL, S.F. Limiting the spread of resistant pneumococci: Biological and epidemiologic evidence for the effectiveness of alternative interventions. **Clin Microbiol Rev**, v.13, n.4, p.588-601, 2000.

SUCCI, R. C. M.; FARHAT, C. K. Vaccination in special situations. **J. Pediatr. (Rio J.)**, Porto Alegre, v. 82, n. 3, 2006.

TALAGA, P.; VIALLE, S.; MOREAU, M. Development of a high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection based quantification assay for pneumococcal polysaccharides and conjugates. **Vaccine**, v. 20, n.19, p. 2474-2484, 2002.

TEELE, D.W. Pneumococcal Infections. In: FEIGIN, R.D.; CHERRY, J.D. **Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p.1129-1136.

TEIXEIRA, L.A.; ALMEIDA, M. Os primórdios da vacina antivariólica em São Paulo: uma história pouco conhecida. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 10, p. 475-498, 2003.

TEMPORÃO, J.G. O Programa Nacional de Imunização (PNI): origens e desenvolvimento. **História, Ciências e Saúde**, v. 10, p. 601-617, 2003.

TEMPORÃO, J.G.; NASCIMENTO, M.V.L; MAIA, M.L.S. Programa Nacional de Imunizações (PNI): História, avaliação e perspectivas; In: BUSS, P.M; TEMPORÃO, J.G; CARVALHEIRO, J.R. (Org.). **Vacinas, Soros & Imunizações no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2005. p. 101-123.

TUOMANEN, E. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. **Curr Opin Microbiol.**, v. 2, n. 1, p. 35-39, 1999.

VENTURA, C. L. et al. Controlo f capsular polysaccharide chain length by UDP-sugar substrate concentrations in *Streptococcus pneumoniae*. **Mol. Microbiol.**, v. 63, p. 723-733, 2006.

WATSON, D.A. et al. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. **Clin Infect Dis**, v.17, p.913-924, 1993.

WHITNEY C.; SCHAFFNER, W.; BUTLER, J. Rethinking recommendations for use of pneumococcal vaccines in adults. **Clin Infect Dis.**, v. 33, p. 662-675, 2001.

WILLETT, H.P. *Streptococcus pneumoniae*. In: JOKLIK, W.K. et al. **Zinsser Microbiology**. 20. Ed. USA: Norfolk, 1992. p. 432-442.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Biological Standardization. **Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines.** Geneva: World Health Organization; 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 82, n. 12, p.93-104, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pneumococcal vaccines WHO position paper - 2012. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 87, n. 14, p. 129-44, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Worldwide progress in introducing pneumococcal conjugate vaccine. **Wkly Epidemiol Rec.**, v.43, p. 388-392, 2008.

YOTHER, J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 65, p. 563-581, 2011.