

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

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE SOROTIPOS NÃO-VACINAIS DE
Streptococcus pneumoniae ISOLADOS DE PACIENTES COM MENINGITE
EM SALVADOR, ANTES E APÓS A IMPLEMENTAÇÃO DA VACINA
CONJUGADA PCV10**

EDER SILVA DOS ANJOS

Orientadora: Dra. Leila Carvalho Campos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do título de Mestre.

Salvador – Bahia – Brasil

2013

FONTES DE FINANCIAMENTO

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (#483674/2010-9), Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (PAPES #407551/2012-3) e Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, porque foi Ele quem me deu inteligência, graça e perseverança durante toda minha caminhada. À minha orientadora, Dra Leila Campos Carvalho, por todos os momentos durante essa jornada. Aos meus pais pela educação, amor e limites todos esses anos, principalmente para minha mãe, esta conquista é sua também. A minha irmã e Aos meus familiares pelo apoio e por acreditarem no meu potencial. Aos amigos da equipe meningite, foram momentos de alegria/TRISTEZA, erros/acertos, falhas/aprendizado, amadurecimento, dedicação, responsabilidade...compromisso! Enfim, momentos inesquecíveis. Pessoas se destacaram mais, outras menos neste trabalho! Mas com uma contribuição significativa para a conclusão, afinal foi um trabalho coletivo. A "titulo de mestre" é meu mas a conquista é da equipe Meningite. Eu que fui agregado da noite pro dia e fui muito bem acolhido por todos. Serei grato a todos eternamente e que Deus ilumine a vida de cada um.

Aos professores do corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa - PPgBSMI pelas contribuições no meu aprendizado e na minha formação ao longo do curso. A todos os funcionários e servidores do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM que, de alguma forma, colaboraram durante a execução deste trabalho. Às instituições que fomentaram com recursos financeiros todo o processo de execução e todas as etapas do estudo. Ao CPqGM, pela oportunidade de realização do mestrado, pelo financiamento da minha bolsa e pela estrutura física que permitiu a realização do trabalho.

ANJOS, Eder Silva dos, Caracterização molecular de sorotipos não-vacinais de *Streptococcus pneumoniae* isolados de pacientes com meningite em Salvador, antes e após a implementação da vacina conjugada PCV-10. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

RESUMO

O advento das vacinas pneumocócicas conjugadas veio contribuir de forma decisiva para a redução da incidência dos casos de doença invasiva por *S. pneumoniae* em vários países do mundo. Em contrapartida, tem-se verificado um aumento de casos decorrentes de sorotipos não vacinais, que escapam da vacina e reduzem o seu efeito a partir da expansão de clones pré-existentes com conseqüente substituição de sorotipos e/ou do fenômeno de troca capsular (*capsular switching*). No Brasil, a vacina conjugada 10-valente (PCV10) foi introduzida no calendário nacional de imunização a partir de 2010. Este estudo teve como objetivo caracterizar através de técnicas fenotípicas e moleculares os sorotipos não-vacinais (SNVT) de *S.pneumoniae*, isolados de pacientes com meningite nos períodos anterior (janeiro/2008 - junho/2010) e posterior (julho/2010 - dezembro/2012) à implementação da vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV10), na cidade de Salvador, Bahia. Os isolados de *S. pneumoniae* foram identificados através de métodos microbiológicos clássicos e a determinação do tipo capsular foi realizada através da técnica de Multiplex-PCR e/ou reação de *Quellung*. A sensibilidade a oito antimicrobianos foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo e a caracterização genotípica por intermédio das técnicas de PFGE e MLST. Foram identificados 170 casos de meningite pneumocócica durante a vigilância epidemiológica realizada no Hospital Couto Maia, em Salvador, com 148 apresentando cultura positiva para *S. pneumoniae* a partir do líquido e/ou hemocultura. A incidência da meningite pneumocócica reduziu de 0,9/100.000 habitantes (2008) para 0,36/100.000 habitantes (2012). No período pré-vacinal, os SNVT mais frequentes foram: 3 ($n=6$; 12%), 19A ($n=4$; 8%), 6A ($n=4$; 8%); no período pós-vacinal os SNVT 12F ($n=6$; 22,2%), 10A ($n=3$; 11,1%), 15B ($n=2$; 7,4%) e 18B ($n=2$; 7,4%) foram os mais frequentes. Cerca de 78% dos isolados apresentaram resistência a um ou mais antibióticos. A não susceptibilidade à penicilina foi encontrada nos sorotipos 19A (3 isolados), 9N (1 isolado) e 12F (1 isolado). Por PFGE, foi observada uma grande diversidade genética com a maioria (66,2%) dos isolados pertencendo a grupos não clonais. O grupo clonal X foi composto por dois isolados do sorotipo 19A (ST2878), do período pré-vacinal, não susceptível à penicilina. A técnica de MLST realizada em 26 isolados permitiu a identificação de quatro novos STs e presença de STs (ST180, ST193 e ST218) genotipicamente semelhantes aos clones mundiais *Netherlands*³⁻³¹, *Greece*²¹⁻³⁰ e *Denmark*^{12F-34}. É necessária a continuidade da vigilância epidemiológica da meningite pneumocócica, visando avaliar os efeitos benéficos da vacinação e a dinâmica da distribuição de sorotipos em nossa região.

Palavras-chave: *S. pneumoniae*, PCV10, Sorotipos não-vacinais, Clones, Meningite, Vigilância epidemiológica, Resistência a antimicrobianos.

Anjos, Eder Silva dos, Molecular characterization of non-vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates from meningitis patients in Salvador, before and after implementation of the conjugate vaccine PCV-10. 96 f. Master (Thesis) – Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Research Center, Salvador, 2013.

ABSTRACT

The licensure and subsequent widespread use of pneumococcal conjugate vaccines have contributed for the reduction in the overall incidence of invasive pneumococcal disease worldwide. However, the emergence of *Streptococcus pneumoniae* non-vaccine serotypes (SNVT), which escape from the vaccine by the expansion of pre-existing clones following serotype replacement and/or by capsular switching is a matter of concern. In 2010, Brazil introduced the 10-valent conjugate pneumococcal vaccine (PCV10) into its routine National Immunization Program. Our aim was to characterize the phenotypic and genotypic profile of *S. pneumoniae* non-vaccine serotypes (SNVT) isolated from patients with meningitis before (January 2008 – June 2010) and after (July 2010 – December 2012) the introduction of PCV10 in Salvador, Bahia. The pneumococcal isolates were identified by classical microbiological methods and submitted to capsular deduction by multiplex-PCR and/or Quellung reaction. The antimicrobial susceptibility was performed the broth microdilution method. The genotypic profile was assessed by PFGE and MLST. We identified 170 cases of pneumococcal meningitis during the epidemiological surveillance at the Hospital Couto Maia, in Salvador, with 148 showing positive culture for *S. pneumoniae* from the cerebrospinal fluid and/or blood culture. The incidence of pneumococcal meningitis decreased from 0.9/100.000 (2008) to 0.36/100.000 inhabitants (2012). In the pre-vaccine period the most frequent SNVT were: 3 ($n=6$, 12%), 19A ($n=4$, 8%), 6A ($n=4$, 8%). In the post-vaccine period, the SNVT 12F ($n=6$, 22.2%), 10A ($n=3$, 11.1%), 15B ($n=2$, 7.4%) and 18B ($n=2$, 7.4%) were the most prevalent. About 78% of the isolates were resistant to one or more antibiotics. The non-susceptibility to penicillin was found among serotypes 19A (3 isolates), 9N (1 isolate) and 12F (1 isolate). By PFGE, a wide genetic diversity was found with the majority of the isolates (66.2%) belonging to non-clonal groups. The clonal group X comprised two isolates of the serotype 19A (ST2878) from the pre-vaccine period presenting non-susceptibility to penicillin. MLST assay performed in 26 isolates allowed the identification of four new STs and the presence of STs (ST180, ST193 and ST218) with genotypic similarities of the worldwide clones Netherlands³-31, Greece²¹-30 and Denmark^{12F}-34. Continued surveillance studies are necessary to evaluate the benefits of vaccination and the serotype dynamics in our region.

Keywords: *S. pneumoniae*, PCV10, Non-vaccine serotypes, Clones, Meningitis, Surveillance, Antimicrobial resistance

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Características clínicas e epidemiológicas dos 77 pacientes com meningite pneumocócica causada por sorotipos não vacinais de <i>S.pneumoniae</i> , de acordo com os períodos pré e pós-vacinal ...	57
Tabela 2	Perfil de não-susceptibilidade aos antimicrobianos dos 77 isolados não-vacinais de <i>S. pneumoniae</i> , de acordo com os períodos pré e pós-vacinal.....	59
Tabela 3	Perfil de não-susceptibilidade aos antimicrobianos dos sorotipos não-vacinas de <i>S. pneumoniae</i>	60
Tabela 4	Distribuição dos grupos clonais identificados entre os sorotipos não-vacinais de <i>S. pneumoniae</i>	61
Tabela 5	Distribuição das Sequências Tipo identificadas em relação ao sorotipo, padrão eletroforético por PFGE, resistência a antimicrobianos, período de isolamento e sua comparação com os clones disseminados mundialmente.....	65
Tabela 6	Comparação das Sequências Tipo identificadas neste estudo com aquelas descritas no banco do MLST.....	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Número de doses aplicadas e a cobertura vacinal da vacina PCV-10 na Bahia, entre 2010 e 2012.....	26
Quadro 2	Relação dos sorotipos detectados em cada reação através da técnica de Multiplex PCR.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	1A: Coloração de Gram, evidenciando cocos Gram positivos agrupados aos pares em formato de “chama de vela” ou lanceta; 1B: Colônias de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em meio Ágar + 5% de sangue de carneiro desfibrinado apresentando zona esverdeada proveniente da alfa hemólise; 1C: do teste de sensibilidade à optoquina, no qual apresenta um halo de sensibilidade ≥ 14 mm; 1D: O teste de solubilidade à bile, na qual o pneumococo apresenta um mecanismo de autólise na presença de sais biliares fracos (controle positivo).....	16
Figura 2	Estimativa global da taxa de mortalidade para cada 100.000 crianças HIV-negativas, com idade inferior a cinco anos a cada ano.....	18
Figura 3	Desenho esquemático do genoma do pneumococo e do <i>locus</i> capsular. Em detalhes é apresentado o <i>locus</i> capsular do sorotipo 2 de <i>S.pneumoniae</i>	22
Figura 4	Dendrograma ilustrando a relação genética dos isolados não-vacinais de <i>S. pneumoniae</i> obtida através da técnica de PFGE.....	63
Figura 5	Similaridade genética do grupo clonal X (sorotipo 19A) com os isolados de meningite do banco da vigilância epidemiológica realizada no Hospital Couto Maia (1996-2012).....	64

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** Distribuição do número de casos e incidência da meningite pneumocócica na Região Metropolitana de Salvador durante o período de janeiro de 2008 a dezembro de 2012..... 50
- GRÁFICO 2** Incidência anual dos casos de meningite pneumocócica causados por sorotipos vacinais e não vacinais de *S. pneumoniae* de janeiro de 2008 a dezembro de 2012..... 52
- GRÁFICO 3** Incidência média anual dos sorotipos não-vacinais de *S. pneumoniae* identificados nos períodos pré e pós-vacinal..... 53
- GRÁFICO 4** Distribuição do número de casos de meningite pneumocócica ocasionados pelos sorotipos 12F, 18B, 15B e 10A durante o todo período de vigilância epidemiológica realizada no Hospital Couto Maia (1996-2012)..... 55
- GRÁFICO 5** Distribuição do número de casos de meningite pneumocócica identificados no período pré e pós-vacinal, de acordo com a faixa etária dos pacientes..... 56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDC	Centers for Diseases Control
CIM	Concentração Inibitória Mínima
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP	Deoxicitidina trifosfato
dGTP	Deoxiguanosina trifosfato
dNTP	Deoxirribonucleotídeo trifosfato
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
DPI	Doença pneumocócica invasiva
EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
HCM	Hospital Couto Maia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPD	Doença Pneumocócica Invasiva
LEMB	Laboratório de Epidemiologia Molecular e Bioestatística
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
NS	Não-susceptível
SVT	Sorotipo vacinal
SNVT	Sorotipo não vacinal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCV7	Vacina Pneumocócica Conjugada 7-Valente
PCV10	Vacina Pneumocócica Conjugada 10-Valente
PCV13	Vacina Pneumocócica Conjugada 13-Valente
PFGE	Eletroforese em Campo Pulsátil

PPV	Vacina Pneumocócica Polissacarídica (23-Valente)
S	Sensível
SLV	do inglês, <i>Single Locus Variant</i>
ST	Sequência Tipo
STX-TMP	Sulfametoxazol-trimetoprim
TE	Tris-EDTA
TSA	Ágar Trypticato de Soja
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1	O Micro-organismo	15
1.2	Breve Histórico	17
1.3	Epidemiologia	18
1.4	Cápsula Polissacarídica	20
1.5	Vacinas Pneumocócicas	23
1.6	Impacto no Uso de Vacinas Conjugadas	29
1.7	Resistências aos antimicrobianos	30

2 OBJETIVOS

2.1	Objetivo Geral	35
2.2	Objetivos Específicos	35

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1	Vigilância epidemiológica	36
3.2	Período de estudo	36
3.3	Coleta de dados	37
3.4	Aspectos Éticos	37
3.5	Isolamento e Identificação das amostras	37
3.6	Coloração de Gram	37
3.7	Teste de Sensibilidade à optoquina	38
3.8	Teste de Sensibilidade a Bile	38
3.9	Dedução Capsular	39

4	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	43
5	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DES. <i>pneumoniae</i>	44
5.1	Eletroforese em campo pulsátil (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> , PFGE)	44
5.1.1	<i>Obtenção do DNA Bacteriano</i>	44
5.1.2	<i>Tratamento Enzimático</i>	45
5.1.3	<i>Separação Eletroforética</i>	45
5.1.4	<i>Análise dos Padrões Eletroforéticos e Determinação dos Clones</i>	46
5.2	Multilocus Sequence Typing (MLST)	47
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
7	RESULTADOS	50
8	DISCUSSÃO	71
9	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICE	
	ANEXO	

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1. O micro-organismo

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) constitui um dos mais importantes patógenos das infecções do trato respiratório, tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento, acometendo principalmente crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Os pneumococos podem causar infecções do trato respiratório superior, com importantes manifestações clínicas, como otite e sinusite, bem como doenças invasivas mais graves tais como pneumonia, septicemia e meningite (BRICKS e BEREZIN, 2006; LYNCH e ZHANEL, 2010)

O pneumococo apresenta-se como cocos Gram positivos, com um diâmetro de 0,5-1,25 µm, dispostos aos pares ou em cadeias curtas, com as bordas em formato lanceolar, denominada “chama de vela” ou “lanceta” (Figura 1). São bactérias anaeróbicas facultativas, catalase-negativas, fastidiosas, com crescimento ideal em atmosfera de 5% de dióxido de carbono e temperatura de 35 - 37 °C. Em meio líquido, *S. pneumoniae* replica-se em cadeias; em meio sólido, forma colônias alfa-hemolíticas. Os pneumococos produzem uma hemolisina que quebra a hemoglobina em um pigmento esverdeado, fazendo com que as colônias sejam circundadas por uma zona esverdeada durante o crescimento em placas de ágar sangue (WHO/IVB, 2011).

A identificação laboratorial clássica do pneumococo é realizada através da visualização do aspecto morfológico das colônias, por coloração de Gram e por meio do teste de sensibilidade à optoquina, no qual apresenta um halo de sensibilidade maior ou igual a 14 mm, podendo, entretanto, ocorrer cepas resistentes. É utilizado, ainda, o teste de solubilidade à bile, na qual o pneumococo apresenta um mecanismo de autólise na presença de sais biliares (WHO/IVB, 2011) (Figura 1).

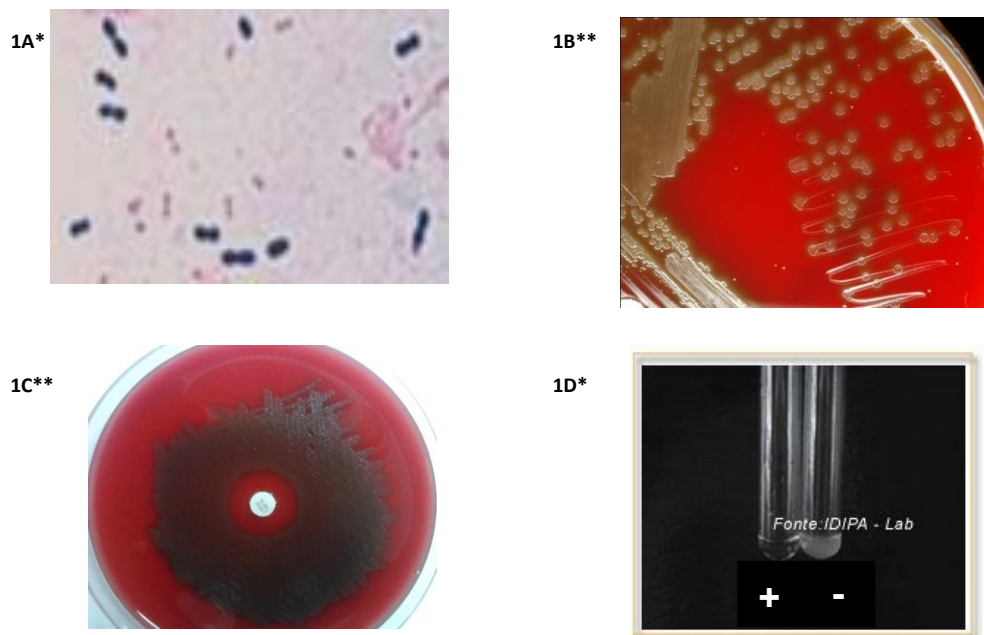


Figura 1 – 1A: Coloração de Gram, evidenciando cocos Gram positivos agrupados aos pares em formato de “chama de vela” ou lanceta; 1B: Colônias de *Streptococcus pneumoniae* em meio Ágar + 5% de sangue de carneiro desfibrinado apresentando zona esverdeada proveniente da alfa hemólise; 1C: do teste de sensibilidade à optoquina, no qual apresenta um halo de sensibilidade maior ou igual a 14 mm; 1D: O teste de solubilidade à bile, na qual o pneumococo apresenta um mecanismo de autólise na presença de sais biliares (controle positivo).

*Fonte: <http://www.gettyimages.com/detail/photo/bacteria-streptococcus-pneumoniae-a-gram-high-res-stock-photography/vis228631>. Adaptado: Coloração de Gram.

*Fonte: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/id_stre5.htm. Adaptado: Prova Bioquímica da Bile Solubilidade.

** Arquivo próprio

A estrutura celular do pneumococo é caracterizada por uma membrana com dupla camada lipídica, envolvida por uma parede bacteriana composta de peptidoglicano associado ao polissacarídeo C e uma cápsula polissacarídea que reveste o micro-organismo (KADIOGLU *et al.*, 2008; TRABULSI *et al.*, 2008).

1.2 Breve Histórico

Esta bactéria foi descoberta por dois pesquisadores quase que simultaneamente, Sternberg em setembro de 1880 nos Estados Unidos e Pasteur em dezembro do mesmo ano na França, através do isolamento do microorganismo em ratos inoculados com saliva humana. Foi inicialmente nomeado como "*Micrococcus Pasteuri, Sternberg*". Após alguns anos, passou a ser chamado de *Streptococcus pneumoniae*, "*Streptococcus*" por apresentar pelo método do Gram a mesma estrutura dos estreptococos e "*pneumoniae*" por ser considerado agente etiológico da pneumonia. Posteriormente, foi relacionada com pneumonia, por Carl Friedländer em 1882 quando examinava cortes histológicos de pulmões de oito pacientes e logo depois outros pesquisadores relacionaram esse patógeno com outras patologias como meningite, artrite, bacteremia e sinusite (AUSTRIAN, 1985; HENRICHSEN, 1999).

Não podemos deixar de mencionar, a importância dos pneumococos nos experimentos de Griffith em 1928 na descoberta do fenômeno da transformação (GRIFFITH, 1928), e de Avery, McLeod e McCarty, demonstrando, em 1944, que os ácidos nucleicos e não as proteínas são as substâncias responsáveis pela informação genética (AVERY e *et al.*, 1944).

1.3 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), em 2000, *S. pneumoniae* foi responsável por cerca de 14,5 milhões de casos, com 735.000 óbitos entre crianças HIV negativo menores de 5 anos de idade, sendo a maioria procedentes de países em desenvolvimento.

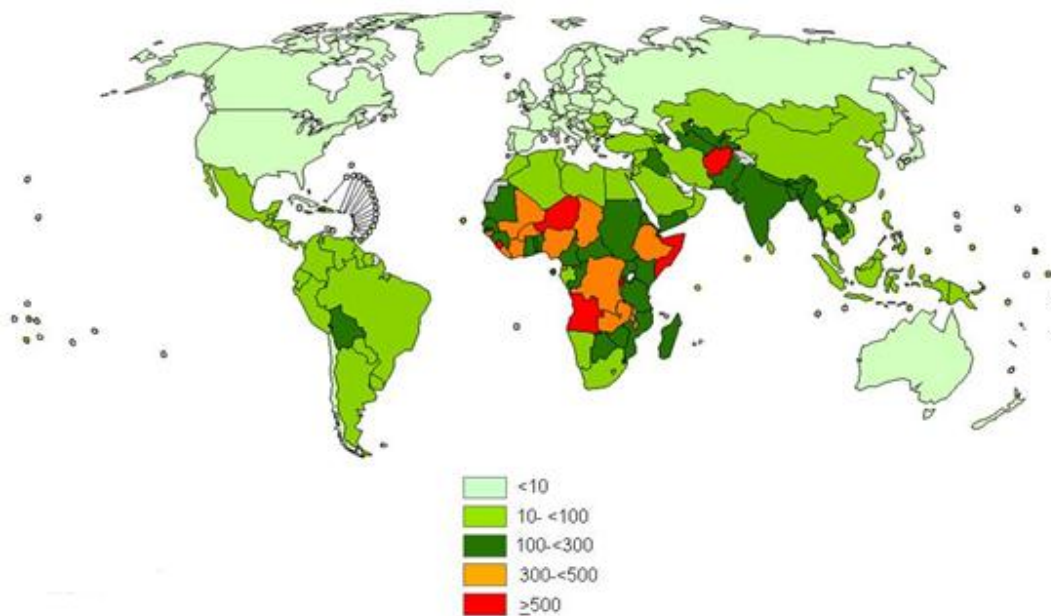


Figura 2 - Estimativa global da taxa de mortalidade para cada 100.000 crianças HIV-negativas, com idade inferior a cinco anos a cada ano.

Fonte: http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/Pneumo_hib_estimates_2000/en/index.html. Adaptação: WHO, 2000.

Em 2008, a WHO estimou 541.000 óbitos causados pelo pneumococo, representando 5% de todas as mortalidades em crianças menores de 5 anos (WHO, 2008).

Na América Latina, dados da vigilância de base laboratorial estabelecida pelo Sistema Regional de Vacinas (SIREVA), revelaram que o período entre 2000 – 2010 entre as doenças pneumocócicas, *S. pneumoniae* foi responsável por 62% dos

casos de meningites, seguindo por pneumonia (22,3%), sepse/bacteremia (14,2%) e outras (artrite séptica, peritonite, celulite, osteomielite, abscesso) (1,5%) (CASTAÑEDA *et al.*, 2010).

Entre os países da América Latina, a pneumonia é considerada o principal agravo das doenças pneumocócicas, apresentando taxas de 51,5%, 26,0% e 75,2%, na Argentina, Colômbia e Paraguai, respectivamente, seguido da meningite, que apresenta taxas de 22,1%, 19,8% e 8,5% nos mesmos países, respectivamente. (CASTAÑEDA *et al.*, 2012)

Após a introdução da vacina conjugada para *Haemophilus influenzae* sorotipo b (Hib) em 1999, no calendário vacinal do Brasil, o pneumococo persistiu como a segunda causa mais comum de meningite, com uma taxa de incidência de 10 casos/100.000 habitantes em crianças com até 1 ano de idade e com taxa de letalidade de 27,5% para a população total (BRANDILEONE *et al.*, 2003). Dados do SIREVA revelaram que no Brasil, no período de 2012, *S. pneumoniae* foi responsável por 44,8% dos casos de meningite, seguindo de pneumonia (19,3%), sepse/bacteremia (34,4%) e outras (artrite séptica, peritonite, celulite, osteomielite, abscesso) (1,6%) (CASTAÑEDA *et al.*, 2012),

Na Bahia, em 2012, dos 415 casos de meningites bacterianas notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e da Diretoria de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (DIVEP), 8% correspondeu à meningite pneumocócica, apresentando uma letalidade de 23,3% (BAHIA, 2013). Em Salvador, um estudo de vigilância populacional conduzido no período de 1995 a 1999, identificou uma incidência anual para a meningite pneumocócica de 1,6 e 24,7 casos/100.000 pessoas-ano para todas as faixas

etárias e para crianças < 5 anos, respectivamente. A taxa de mortalidade foi de 42% para todos os pacientes e 60% para os menores que 5 anos (REIS *et al.*, 2002). No período de 2000 a 2007, ocorreu uma redução na incidência anual da meningite pneumocócica de 1,12 para 0,83/100000 hab., respectivamente, em Salvador e Região Metropolitana (MENEZES *et al.*, 2011).

No ano de 2012, em Salvador, foram registrados 187 casos de meningite bacteriana, sendo 7% confirmados como meningite pneumocócica, com uma letalidade de 30,8% (BAHIA, 2013).

1.4 Cápsula polissacarídica

Vários fatores de virulência associados à colonização e/ou disseminação já foram descritos para *S. pneumoniae*, (MCDANIEL *et al.*, 1991; JEDRZEJAS, 2001; OBERT *et al.*, 2006; BAGNOLI *et al.*, 2008). Entretanto, a cápsula polissacarídica constitui o principal fator de virulência, contribuindo para a permanência do patógeno no hospedeiro, protegendo-o da fagocitose pelos leucócitos polimorfonucleares e do *clearance* durante a colonização faringiana (MITCHELL; MITCHELL, 2010).

A cápsula polissacarídica é codificada pelo *locuscps* (*capsular polysaccharide synthesis*), que, para a maioria dos pneumococos, está localizado entre os genes *dexB* e *aliA* no genoma do pneumococo (BENTLEY *et al.*, 2006; YOTHER, 2011). Os tipos capsulares 3 e 37, por sua vez, são sintetizados através de uma via bioquímica independente e no caso do sorotipo 37, o gene que determina o sorotipo está localizado em outro local do cromossoma (LLULL *et al.*, 1999). Perto do *locuscapsular* são codificadas também duas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), *pbp2x* e *pbp1a*, relacionadas com a resistência à penicilina (BENTLEY *et al.*, 2006).

A análise da sequência de diferentes loci revelou regiões de comprimentos variáveis (aproximadamente 10-30 kb) e um espectro de genes específicos para a produção da cápsula (BENTLEY *et al.*, 2006). O locus *cps* codifica todos os genes para a síntese, translocação através da membrana, polimerização das subunidades e ligação da cadeia polissacarídica sintetizada ao peptidoglicano da parede celular do pneumococo. Destaca-se, ainda, a região 5' do *locuscps* que contém quatro sequências, *wzg*, *wzh*, *wzd* e *wze* (também conhecidas como *cpsABCD*) que são importantes na regulação da síntese da cápsula. A sequência *cpsA* é bastante conservada, enquanto os *cpsBCD* podem ser divididos em dois clusters (VARVIO *et al.*, 2009; YOTHER, 2011).

Baseada na estrutura química e características imunogênicas da cápsula são reconhecidos atualmente 94 diferentes sorotipos (CALIX; NAHM, 2010, CALIX *et al.*, 2012).

Estes sorotipos podem ser identificados laboratorialmente através da técnica clássica de intumescimento capsular, ou reação de *Quellung*, baseada em uma reação sorológica utilizando antissoros específicos. Por outro lado, a dedução capsular pode ser também realizada através da reação de multiplex-PCR, baseada na amplificação de *genes* que codificam a cápsula, a partir de um conjunto de *primers* específicos para cada sorotipo.

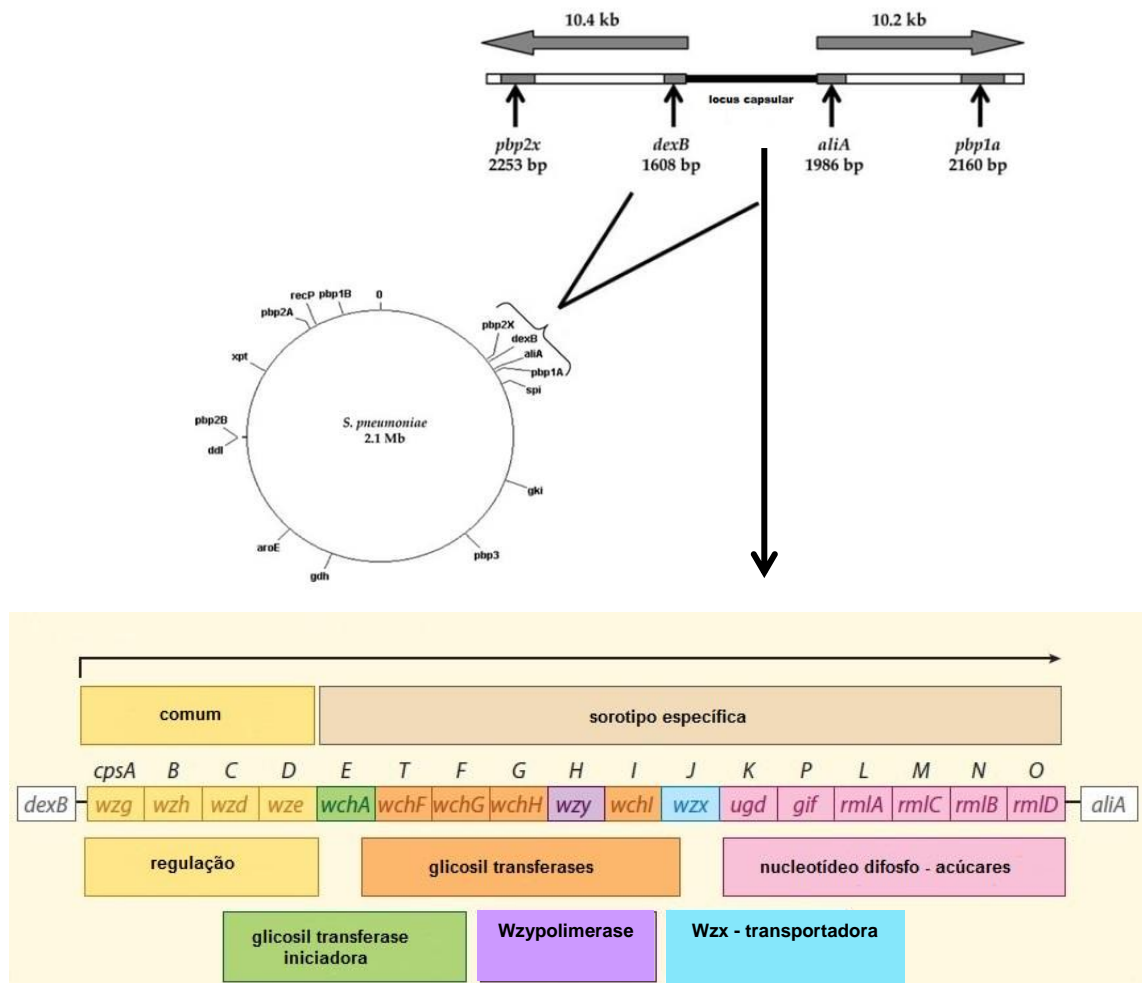


Figura 3 – Desenho esquemático do genoma do pneumococo e do *locus* capsular. Em detalhes é apresentado o *locus* capsular do sorotipo 2 de *S.pneumoniae* (Adaptado de ANGELA B. BRUEGGEMANN *et al.*, 2007; YOTHER, 2011)

A recombinação genética permite a substituição alélica dos *loci* capsulares, sendo este evento bastante frequente no pneumococo (CROUCHER *et al.*, 2011). Acredita-se que a grande diversidade dos *locicps* dos pneumococos tenha ocorrido como consequência da seleção imposta pelo sistema imune humano (SPRATT,

2004). Por outro lado, a evolução e os eventos genéticos pelos quais novos sorogrupos e sorotipos surgem ainda não são claros. A comparação dos *loci cps* disponíveis indicam a ocorrência de uma variedade de eventos genéticos e mostram que os genes centrais responsáveis pela síntese e polimerização das unidades repetidas são altamente variáveis e não são homólogos entre os sorotipos. Esses genes possuem um baixo percentual de conteúdo G+C e novos sorotipos podem ser frequentemente gerados através da introdução de novos genes *cps* no pneumococo através da transferência lateral de genes (BENTLEY *et al.*, 2006).

A prevalência dos tipos capsulares varia com a idade, tempo e região geográfica (BOGAERT *et al.*, 2004). De modo geral, cerca de 20 sorotipos estão associados com >de 80% dos casos de doença pneumocócica invasiva que ocorre em todas as faixas etárias (WHITNEY *et al.*, 2003). Na América Latina, 13 sorotipos mais frequentes são responsáveis por cerca de 86% das doenças invasivas (CASTAÑEDA *et al.*, 2009). Além disto, dependendo do sorotipo existem também diferenças quanto à apresentação clínica da doença pneumocócica, a exemplo dos sorotipos 1 e 3 relacionados altas taxas de empiema pleural (BURGOS *et al.*, 2011).

1.5 Vacinas Pneumocócicas

Em função da elevada incidência de doenças causadas por *Streptococcus pneumoniae*, novas medidas de prevenção foram desenvolvidas, sendo a cápsula polissacarídea o principal alvo para o desenvolvimento de vacinas, pois induz a formação de anticorpos específicos.

Atualmente, existem duas classes de vacinas pneumocócicas, que têm sido amplamente utilizadas: as polissacarídicas e as conjugadas.

A vacina polissacarídica 23-valente (PPV23 - Pneumovax23, *Merck & Company Inc.*), licenciada nos EUA desde 1983, é composta por antígenos capsulares de 23 sorotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F) (CDC, 2010). Como esta vacina não induz a produção de anticorpos com memória biológica, esta vacina é indicada apenas para indivíduos maiores que 2 anos que apresentam alguma doença de base (por exemplo, imunodepressão ou doença genética), na ocorrência de surtos em adultos e para todos os indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos (CDC, 1997).

Uma estratégia para melhorar a resposta imune aos antígenos polissacarídeos, especialmente para as crianças menores de dois anos de idade, consiste na conjugação do polissacarídeo com proteínas, convertendo-o a um antígeno T-dependente. Deste modo, foram desenvolvidas as vacinas pneumocócicas conjugadas.

A vacina pneumocócica conjugada heptavalente (PCV7; Prevnar, Wyeth Pharmaceuticals Inc), conjugada com uma variante não tóxica da toxina diftérica (CRM197), é constituída dos sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Nos Estados Unidos, a introdução da PCV7, no ano de 2000, reduziu o número de casos de doença invasiva causada por *S. pneumoniae* em crianças e também entre adultos, em função do efeito da “imunidade em rebanho” (WHITNEY *et al.*, 2003). No Brasil, essa vacina foi introduzida na rede de saúde privada no ano de 2000. Em 2003, tornou-se disponível gratuitamente apenas para grupos especiais, não estando disponível no programa de imunizações vacinal do governo (CASTAÑEDA *et al.*, 2009).

A vacina PCV10 (Synflorix, GlaxoSmithKline) possui 3 sorotipos (1, 5, 7F) a mais que a vacina 7-valente. A implantação desta vacina no programa de

imunização nacional ocorreu no ano de 2010 (BRASIL, 2010), com uma estimativa de cobrir cerca de 80% dos sorotipos responsáveis por doenças pneumocócicas invasivas. De modo geral, espera-se também que a utilização desta vacina seja também capaz de reduzir o número de casos de otite média aguda (AOM) ocasionados por *Haemophilus influenzae* não tipável, uma vez que a proteína D de *H.influenzae* não tipável é a proteína carreadora dos polissacarídeos de 8 sorotipos presentes na vacina (1, 5, 7F, 4, 6B, 9V, 14, 23F), enquanto os toxóides tetânico e diftérico, constituem, respectivamente, as proteínas carreadoras dos dois outros polissacarídeos, 18C e 19F.

Dados atualizados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostraram que até o ano de 2012, 86 países em todo o mundo já haviam introduzido a vacina pneumocócica conjugada no calendário básico vacinal da criança (WHO, 2013).

A título de ilustração, é apresentado no Quadro 1, o número de doses aplicadas e a cobertura vacinal da vacina PCV-10 na Bahia, entre 2010 e 2012.

Quadro 1 - Número de doses aplicadas e a cobertura vacinal da vacina PCV-10 na Bahia, entre 2010 e 2012. Estão em destaque as cidades que fazem parte da Região Metropolitana.

Local	2010		2011		2012	
	Quantidade de Doses	Cobertura Vacinal	Quantidade de Doses	Cobertura Vacinal	Quantidade de Doses	Cobertura Vacinal
Camaçari	188	4,77	2992	75,94	3.594	91,22
Candeias	67	5,81	1445	125,33	1.292	112,06
Conde	2	0,53	375	98,68	325	85,53
Dias D'Ávila	32	2,72	821	69,87	687	58,47
Itaparica	15	5,43	176	63,77	172	62,32
Lauro de Freitas	219	7,87	2229	80,06	2.648	95,11
Madre de Deus	31	9,39	294	89,09	253	76,67
Mata de São João	51	6,65	632	82,40	768	100,13
Pojuca	24	4,01	523	87,31	518	86,48
Salvador	1.597	4,29	25.932	69,74	29.354	78,94
Santo Amaro	70	7,64	699	76,31	745	81,33
São Francisco do Conde	10	1,95	379	73,88	469	91,42
São Sebastião do Passé	61	9,97	579	94,61	651	106,37
Saubara	35	21,34	143	87,2	155	94,51
Simões Filho	161	7,61	1.534	72,53	1.499	70,87
Vera Cruz	47	7,76	450	74,26	510	84,16
Total	2.610	4,88	39.203	73,26	43.640	81,55

Fonte: Divisão de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Saúde do Estado da Bahia.

Atualmente encontra-se também disponível a vacina pneumocócica 13-valente (PCV13) (Prevnar 13, Wyeth Pharmaceuticals Inc.), também conjugada com a proteína CRM197, que além de englobar os sorotipos presentes na PCV7 e

PCV10, acrescenta os sorotipos 3, 6A e 19A. Países como Estados Unidos, Itália e Canadá já implementaram a PCV13 com o objetivo de ampliar a cobertura vacinal (PANTOSTI *et al.*, 2003; NUORTI e WHITNEY, 2010; ADAM *et al.*, 2012).

Uma vez que a cápsula é o principal alvo para a prevenção sorotipo-específica através de vacinas, existem dois eventos que são especialmente importantes para a compreensão dos efeitos da vacinação: 1) troca capsular (do inglês, *capsularswitching*) e 2) substituição de sorotipo (do inglês, *serotype replacement*).

A troca capsular ocorre quando os genes que codificam para um sorotipo capsular são trocados, através dos processos de transformação e recombinação, com os genes que codificam para outro tipo capsular (BRUEGGEMANN *et al.*, 2007). O que é mais preocupante na troca capsular é a troca de um sorotipo vacinal por um não vacinal. Isto, sem dúvida, contribui para a ocorrência de doenças causadas por sorotipos que “escapam” da vacina e, conseqüentemente, reduzem o seu efeito (COFFEY *et al.*, 1998; BRUEGGEMANN *et al.*, 2007). A substituição de sorotipo refere-se à diminuição na prevalência de sorotipos de pneumococos que são incluídos na vacina (sorotipos vacinais, SVT), acompanhada por um aumento correspondente de sorotipos não incluídos na vacina (sorotipos não-vacinais, SNVT), que preenchem o nicho ecológico primeiramente ocupado pelos sorotipos vacinais (BRUEGGEMANN *et al.*, 2007).

De acordo com Bruegeemann *et al.* (2007), a substituição de sorotipo na nasofaringe de uma criança saudável pode ser problemática ou não, a questão para a saúde pública é se esta substituição é capaz de causar doença.

Esses efeitos não são completamente independentes, uma vez que variantes capsulares podem se expandir subseqüentemente dentro da população e,

consequentemente, levar à substituição de sorotipos (WYRES, 2013). Por outro lado, as estruturas clonais da maioria dos sorotipos caracterizados após a introdução das vacinas conjugadas estão associadas a perfis clonais já existentes. A mais plausível explicação para essa emergência é que eventos de recombinação tendem a selecionar perfis clonais que possam escapar da resposta imune do hospedeiro (FILIPPO *et al.*, 2010).

Os eventos de troca de cápsula e a da substituição de sorotipos podem ser estudados através da comparação dos sorotipos e genótipos presentes nas populações bacterianas antes e após a introdução de vacinas pneumocócicas. Os genótipos de pneumococos, definidos através da técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (ENRIGHT e SPRATT, 1998) mostram associações sorotipo específicas e qualquer isolado que apresente uma combinação diferente de genótipo/sorotipo pode representar uma variante de troca capsular (BRUEGGEMANN *et al.*, 2003; JEFFERIES *et al.*, 2004). Tais variantes geralmente surgem através da recombinação no locus *cps* e alguns estudos indicam que o tamanho dos fragmentos de recombinação variam de 21,9 kb a 56,5 kb (PILLAI *et al.*, 2009; GOLUBCHIK *et al.*, 2012; MARTTINEN *et al.*, 2012). Em alguns casos, esses fragmentos também incluem parte ou a totalidade dos genes *pbp2x* e *pbp1a*, determinantes da resistência à penicilina, que estão localizados, respectivamente, a cerca de 8 kb *upstream* e 7kb *downstream* do locus *cps*(WYRES, 2013).

1.6 Impacto do Uso de Vacinas Conjugadas

A introdução da vacina conjugada resultou em uma mudança dramática na carga da doença pneumocócica. Nos Estados Unidos, o primeiro país a utilizar a PCV7, observou-se uma drástica redução na incidência global de IPD (76%) e na incidência devido a sorotipos PCV7 (99%), na população-alvo de crianças menores de 5 anos (PILISHVILI *et al.*, 2010). As taxas de IPD também diminuíram entre as crianças mais velhas não vacinadas, adultos e idosos, em função da redução da colonização da nasofaringe e da transmissão dos sorotipos vacinais a partir das crianças vacinadas (imunidade de rebanho) (WHITNEY *et al.*, 2003).

Uma consequência observada após a utilização da PCV7 foi, em contrapartida, o aumento da incidência de IPD causada por sorotipos não vacinais. Esta evidência tem sido atribuída ao fenômeno de substituição de sorotipos, à expansão de pneumococos de sorotipos não-vacinais preexistentes e/ou à troca de cápsula (BEALL *et al.*, 2006).

Estudos recentes mostram que a substituição pelos sorotipos 19A, 1, 5, 7F, 33F e sorogrupo 15 foram responsáveis por um aumento significativo de IPD (GONZALEZ *et al.*, 2006; HAUSDORFF, 2007; HICKS *et al.*, 2007). O sorotipo 19A sendo reconhecido como o sorotipo predominante nos Estados Unidos (MOORE *et al.*, 2008; KAPLAN *et al.*, 2010).

Nos Estados Unidos, a incidência do sorotipo 19A triplicou em crianças menores de 5 anos e em adultos com idades entre 50 e 64 e aumentou em 45% em adultos com idade superior a 65 (PILISHVILI *et al.*, 2010). As amostras de 19A isoladas apresentavam, em sua maioria, resistência múltipla aos antibióticos (MOORE *et al.*, 2008; REINERT *et al.*, 2010).

Neste contexto, a caracterização genotípica das amostras de 19A por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) mostrou que a maioria dos clones de 19A nos Estados Unidos estava, em parte, relacionada à expansão clonal da sequência tipo ST199, que já existia na era pré-vacinal. O complexo clonal CC199 (ST199 e suas variantes) predominava entre as amostras de 19A isoladas de crianças < 5 anos de idade antes da introdução da PCV7 e durante 2003-2004, representou aproximadamente 70% das amostras invasivas identificadas (PAI *et al.*, 2005).

Novos genótipos de 19A foram também observados, em função da ocorrência de eventos de recombinação, como por exemplo, o que ocorreu com o clone do sorotipo 19A ST199, onde um fragmento contendo o *locus* capsular e duas proteínas ligadoras de penicilina adjacentes foram transferidas para uma amostra receptora (sorotipo 4 ST695) (BRUEGGEMANN *et al.*, 2007), tornando-se o terceiro clone mais comum entre os casos de IPD ocasionados pelo sorotipo 19A em 2007 nos Estados Unidos (BEALL, 2007). Após a introdução da vacina PCV13 naquele país em março de 2010, as infecções causadas pelo sorotipo 19A pararam de aumentar (RICHTER *et al.*, 2013)

Na Europa, por sua vez, após a implantação da PCV7, ocorreu um aumento do número de casos de IPD ocasionadas pelos sorotipos não-vacinais principalmente os sorotipos 1, 19A, 36A e 7F (ISAACMAN *et al.*, 2010).

1.7 Resistência aos Antimicrobianos

Descoberta em 1928 por Alexandre Fleming e disponível para uso desde a década de 40, a penicilina foi o primeiro fármaco utilizado com sucesso em diversas infecções, ocasionando um grande impacto nas taxas de letalidade, principalmente nas doenças pneumocócicas.

Até meados da década de 60 não havia relatos de pneumococos resistentes à penicilina (PRP). No ano 1969, na Nova Guiné, foi relatado o primeiro caso de PRP. Em 1977, em Johannesburgo, durante uma epidemia de doença pneumocócica invasiva foi reportado um caso de pneumococo multirresistente (resistente a três ou mais classes de antibióticos). Desde a década de 70 relatos já foram descritos acerca da resistência do pneumococo frente à penicilina e a outros antibióticos. Perante o surgimento de cepas resistentes tornou-se necessário delinear a terapêutica atual contra as doenças pneumocócicas (LYNCH e ZHANEL, 2005; CORNICK e BENTLEY, 2012).

Nos últimos anos, a importância do pneumococo tem aumentado em função da emergência de cepas resistentes aos antimicrobianos usados para o tratamento das doenças pneumocócicas, especialmente da meningite, como os β -lactâmicos, macrolídeos e cefalosporinas (KLUGMAN, 2002; DAGAN, 2009). Essa resistência aos antimicrobianos interfere no curso clínico da meningite pneumocócica, principalmente em pacientes pediátricos, já que a resistência aos antibióticos tem sido atribuída a sorotipos mais prevalentes nessa faixa etária (6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F e 23F) (KLUGMAN, 2002). Estas evidências enfatizam a importância da imunização como forma de prevenção da doença pneumocócica.

Com o avanço na disseminação de cepas resistentes na década de 80 tornou-se necessário à implementação de técnicas de tipagem molecular com base epidemiológica. Em 1997 foi criada, a *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network* (PMEN) com o objetivo principal de padronizar a nomenclatura e a classificação de clones de *S. pneumoniae* resistentes a antibióticos em todo o mundo. Atualmente existem 43 clones caracterizados, sendo que destes 26 apresentam um perfil multirresistente (<http://www.sph.emory.edu/PMEN/>).

O primeiro clone reconhecido, PMEN1, foi isolado de um hospital em Barcelona em 1984 e identificado como sendo da sequência tipo 81 (ST81) e do sorotipo 23F (MUNOZ *et al.*, 1991). Esta linhagem, exibindo resistência múltipla aos antibióticos, incluindo à penicilina, foi subsequentemente vista na África, Ásia e América, sendo responsável por quase 40% de todos os isolados resistentes à penicilina nos Estados Unidos durante os anos 90 (CORSO *et al.*, 1998; CROUCHER *et al.*, 2011).

O drástico aumento na dispersão de cepas resistentes deve-se à expansão de poucos clones no mundo. Atualmente, 15% - 30% dos isolados de *S. pneumoniae* são multirresistentes (LYNCH e ZHANEL, 2009).

O uso indiscriminado de um determinado antibiótico está associado a um perfil de resistência e como consequência facilita a emergência de resistência a classes de antibióticos não correlacionados (VANDERKOOI *et al.*, 2005). Outros fatores como características do hospedeiro (idade, imunocomprometidos, presença de comorbidades) e fatores intrínsecos do micro-organismo (ex: sorotipo) também contribuem para o perfil de resistência (HENRIQUES *et al.*, 2000).

A prevalência dos clones varia entre regiões e ao longo do tempo. Estima-se que os sorotipos 6A; 6B; 9V; 14; 19F; 23F sejam responsáveis por mais de 80% dos casos de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina e macrolídeos em todo o mundo (LYNCH e ZHANEL, 2005).

Nos Estados Unidos, durante o período de 2004 - 2005, 63% dos isolados eram multirresistentes e na sua maioria (52%) correspondiam a dois clones internacionais (Taiwan 19F-14 ou Utah 35B-24) (RICHTER *et al.*, 2009). Por outro lado, em 2007, nesse mesmo país, 75% das cepas não suscetíveis à penicilina

(PNSP) isoladas de IPD corresponderam a sorotipos não presentes na vacina PCV7. Além do 19A, responsável por 53% das amostras PNSP, os sorotipos 15A (11%), 23A (8%), 35B (8%) e 6C (5%) foram os mais comumente encontrados (GERTZ *et al.*, 2010).

Diante do exposto, podemos ressaltar que as infecções invasivas causadas por *S. pneumoniae* continuam sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo mundo, particularmente em crianças menores de 5 anos de idade. O micro-organismo constitui um dos principais agentes de doenças invasivas graves, tais como meningite, bacteremia e pneumonia, sendo as crianças até 2 anos de idade e adultos ≥ 65 anos particularmente mais suscetíveis (BRICKS e BEREZIN, 2006; O'BRIEN *et al.*, 2009)

A introdução das vacinas pneumocócicas conjugadas na imunização de crianças levou a uma redução substancial da incidência da doença pneumocócica invasiva (IPD) em vários países (PILISHVILI e LEXAU *et al.*, 2010; RUCKINGER *et al.*, 2010). As taxas também diminuíram entre as crianças mais velhas não vacinadas, adultos e idosos, em função da redução da colonização da nasofaringe e da transmissão dos sorotipos vacinais a partir das crianças vacinadas (imunidade de rebanho) (WHITNEY *et al.*, 2003). Por outro lado, o aumento das taxas de IPD ocasionadas por sorotipos não vacinais, tem sido motivo de grande preocupação, pois a substituição de sorotipos permite que haja a possibilidade do “escape” à vacina (WEINBERGER *et al.*, 2011).

Este aumento na incidência de IPD causada por sorotipos não vacinais tem sido acompanhado por um aumento de casos por SNVT frequentemente resistentes aos principais antimicrobianos de uso para tratamento das infecções, como os beta-

lactâmicos e macrolídeos (MOORE *et al.*, 2008; REINERT *et al.*, 2010). No Brasil, a vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV10) foi introduzida no programa nacional de imunização durante o ano de 2010. É possível que a longo prazo, o benefício a longo prazo do emprego desta vacina possa estar comprometido pela substituição dos sorotipos vacinais (STV) por STNV. Além disto, em alguns países como o Canadá e Estados Unidos, a PCV7 foi substituída pela vacina pneumocócica 13-valente (PCV13) que já está sendo amplamente utilizada (HELFFERTY *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2013).

A vigilância contínua da distribuição de sorotipos sobre o tempo, em áreas geográficas específicas, associada à caracterização genética das amostras, inclusive das cepas resistentes aos antimicrobianos, representam estratégias essenciais e necessárias para a determinação da importância relativa do estabelecimento de determinados clones e do impacto da substituição dos sorotipos capsulares em períodos de intervenção por vacinas conjugadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar, através de técnicas fenotípicas e moleculares, os sorotipos não-vacinais de *S.pneumoniae* isolados de pacientes com meningite nos períodos anterior e posterior à implementação da vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV10) na cidade de Salvador, Bahia.

2.2 Objetivos Específicos

1. Descrever a incidência da meningite pneumocócica causada por sorotipos não-vacinais de isolados de pacientes com meningite nos períodos anterior e posterior à implementação da vacina conjugada pneumocócica 10 valente (PCV10) na cidade de Salvador;
2. Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados não-vacinais de *S.pneumoniae*;
3. Determinar a relação genética entre os isolados não-vacinais de *S.pneumoniae* através das técnicas de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* e *Multilocus Sequence Typing*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Vigilância epidemiológica

Desde dezembro de 1995, um sistema de vigilância ativa de meningites bacterianas foi estabelecido em um hospital de referência para doenças infecciosas, Hospital Couto Maia (HCM), na cidade de Salvador, Brasil, responsável por mais de 95% dos casos notificados de meningite da região metropolitana (Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, 2008). Esta vigilância permite a obtenção de amostras de *S. pneumoniae* isoladas de casos de meningite pneumocócica, que de modo global, refletem os sorotipos que circulam e causam doença invasiva (meningite) na população de Salvador.

3.2 Período do estudo

Durante o período de estudo foram incluídos todos os casos de meningite pneumocócica com cultura de líquido e/ou hemocultura positiva para *S. pneumoniae* identificados no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2012. Após a confirmação microbiológica as amostras foram armazenadas em freezer a -70°C em meio líquido de triptona de soja com glicerol. Posteriormente as amostras foram submetida a dedução capsular, amostras que apresentaram sorotipos não presentes na vacina PVC-10 foram incluídas no estudos. Os procedimentos microbiológicos de confirmação da identificação e tipagem molecular foram realizados nos Laboratórios de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) e de Epidemiologia Molecular e Bioestatística (LEMB) localizados no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ) .

3.3 Coleta de dados

As informações clínicas e demográficas dos pacientes foram obtidas através de entrevista e revisão de prontuários médicos. O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os pacientes e/ou dos seus responsáveis

3.4 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM/FIOCRUZ e do Hospital Couto Maia.

3.5 Isolamento e Identificação das amostras

No Laboratório, as amostras foram semeadas em uma placa de ágar de TSA (*Trypticase Soy Agar*, DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado (ágar sangue). As placas foram incubadas a 35°- 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 18h-24 hs. Após crescimento bacteriano, a identificação de *S. pneumoniae* foi realizada através da coloração de Gram e dos testes de susceptibilidade à optoquina e bile-solubilidade.

3.6 Coloração de Gram

A partir do crescimento em ágar sangue foi realizado um esfregaço de uma colônia isolada em uma gota de salina a 0,9%, em lâmina de microscópio, com posterior secagem à temperatura ambiente e fixação em chama de bico de Bunsen. Em seguida, a preparação foi coberta com o corante cristal violeta durante 1 minuto, lavando-se em seguida com água. Acrescentou-se, então o lugol, por 1 minuto, sendo, que, nesta etapa, tanto as bactérias Gram-positivas quanto as Gram-negativas adquirem a coloração violeta devido à formação de um complexo insolúvel (corante-iodo) na parede celular e citoplasma. Após uma segunda lavagem com água, a preparação foi descorada rapidamente (aproximadamente 10 segundos)

com uma solução álcool-acetona que dissolve a porção lipídica da membrana externa das bactérias Gram-negativas e o complexo corante-iodo é removido, descorando a célula. Por outro lado, nas bactérias Gram-positivas, o complexo fica retido na parede rica em peptiglicano. Em seguida, é realizada a coloração com fucsina durante 1 minuto, observando-se ao microscópio óptico após a devida secagem à temperatura ambiente.

S. pneumoniae apresenta-se pela coloração do Gram como bactérias Gram-positivas, agrupadas aos pares (diplococos) com formato lanceolar ou em cadeias curtas.

3.7 Teste de Sensibilidade à Optoquina

Para a execução do teste de sensibilidade à optoquina, colônias α -hemolíticas foram semeadas em placa de ágar sangue, em três direções. Em seguida, foi colocado sobre a semeadura um disco de 5 μ g de optoquina (BD – BBL Sensi – Disc, Becton Dickinson and Company, USA), com posterior incubação a 35°C em atmosfera de 5% de CO₂. A leitura do teste foi realizada após 24 horas com a medida do halo de inibição de crescimento. Os isolados que apresentaram diâmetro igual ou maior que 14 mm em volta do disco foram considerados sensíveis à optoquina, sugestivo para *S.pneumoniae*. Isolados mostrando zonas de inibição à optoquina entre 8 e 14 mm foram considerados resistentes (WHO/IVB, 2011).

3.8 Teste de Solubilidade em Bile

Todos os isolados foram submetidos ao teste de solubilidade em bile para confirmação da espécie (BOWEN *et al.*, 1957). O teste de solubilidade em bile foi realizado empregando-se uma solução de desoxicolato de sódio a 2% (Sigma – Aldrich, Germany). As bactérias cultivadas em placas de ágar sangue foram

suspensas em 2 mL de solução salina a 0,9%, com turvação ajustada para o padrão 1,0 da escala de McFarland (10^{16} UFC/mL). Alíquotas de 1,0 mL da suspensão foram distribuídas em dois tubos, sendo um teste e outro controle. Ao tubo teste foi adicionado 1,0 mL da solução de desoxicolato de sódio a 2% e ao tubo controle foi adicionado 1,0 mL de solução de salina. Os tubos foram agitados delicadamente e incubados a 35°C e observados a cada 15 minutos por um período de até 2 horas quanto ao desaparecimento ou não da turvação no tubo teste (lise dos pneumococos no tubo contendo sal biliar) (BOWEN *et al.*, 1957).

3.9 Dedução capsular de *S. pneumoniae* por Multiplex-PCR

A dedução é baseada na diversidade estrutural dos polissacarídeos capsulares e foi realizada através da técnica de multiplex-PCR de acordo com as recomendações do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), EUA (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>). Esta metodologia pode definir até 40 sorotipos/sorogrupos em 9 reações de PCR Multiplex com *primers* específicos para detecção de genes capsulares (Quadro 2, apêndice 1).

Quadro 2 - Relação dos tipos capsulares detectados em cada reação através da técnica de Multiplex PCR.

Reação	Sorotipo
1	14, 6A/B/C/D,23F, 19A, 9V/9A
2	19F, 3, 15B/15C, 18A/18B/18C, 17F
3	1, 5, 9N/9L, 7A/7F, 16F
4	8, 2, 4, 20, 22F/22 ^a
5	7C/7B/40, 12F(12A/44/46), 11A/11D, 10A, 23A
6	21, 33F/33A/37, 15A/15F, 33F/47, 13
6C	6A/6B/6C/6D, 6C/6D
7	39, 23B, 35A/35C/42, 38/25F/25A, 35B
8	24(24A/24B/24F), 10F/10C/33C, 34, 31

Para o preparo do DNA molde, todo o crescimento de 24 hs de cada amostra de *S. pneumoniae* em placa de ágar sangue foi suspenso em 300 µL de salina a 0,85% estéril, sendo logo após aquecido em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas por 5 minutos a 12.000 rpm a 4°C, descartando-se o sobrenadante. Ao *pellet* foi adicionado 65 µL de solução de lise [tampão Tris-EDTA 25 mM, mutanolisina a 3.000 unidades/mL (Sigma Aldrich, Germany), hialuronidase a 30 mg/mL (Sigma Aldrich, Germany)] e incubados à 37°C

por 2 hs. A solução de lise foi inativada incubando-se as preparações a 100°C por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm a 4°C, coletando-se o sobrenadante em novo tubo, o qual foi mantido a -20 °C até a realização das reações de PCR (como DNA molde).

Para cada reação de PCR foram utilizados os seguintes componentes: mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs): (dATP, deoxiadenosina trifosfato; dCTP, deoxicitidina trifosfato; dGTP; deoxiguanosina trifosfato e dTTP, deoxitimidina trifosfato) (Biolabs *Inc.*, New England, USA) – 200 µM; tampão de reação (Promega®, USA) – 1X; *Taq*-DNA-polimerase (Promega®, USA) (2U); cloreto de magnésio (MgCl₂ – Promega®, USA) – 3,5 mM, *primer* iniciador direto e *primer* iniciador reverso (Prodimol®, Chile) – 25 µM de cada, de acordo com o conjunto de *primers* utilizados por reação (Apêndice 1); DNA molde – 2,5 µL e água deionizada esterilizada em quantidade suficiente para completar 25 µL, volume total da reação. Todos os pares de *primers* utilizados nas reações, após sua diluição, foram testados com controles sabidamente positivos para cada sorotipo/sorogrupo específico antes de serem utilizados. Paralelamente, em cada reação e eletroforese, utilizou-se um volume total de 25 µL sem adição do DNA molde, como controle negativo. Todas as reações continham o *primer cpsA* (gene regulador da biossíntese da cápsula polissacarídica, que identifica 97% dos isolados de *S. pneumoniae* (KONG *et al.*, 2005). Este *primer* foi utilizado como controle interno da reação.

As reações foram realizadas em termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®, USA), com os seguintes ciclos: desnaturação inicial; ciclo de 94°C por 4 minutos, amplificação; 30 ciclos de 94°C por 45 segundos e 54°C por 45 segundos e extensão com um ciclo de 65°C por 2:30 minutos.

O volume de 10 μ L do produto amplificado foi utilizado para a realização da eletroforese em gel de agarose NuSieve® a 2% (SeaKem® LE, USA), preparada em tampão TAE 1X (Tris, 40 mM; ácido acético glacial, 20mM; EDTA, 1 mM; pH 8,0) acrescido com 4 μ L de solução de brometo de etídio a 10 mg/mL, sob voltagem constante de 100 volts em tampão TAE durante 1:30 – 2 hs. Os tamanhos dos produtos de PCR foram determinados através de análise comparativa utilizando-se como padrão de peso molecular de 50 pb (pares de bases) DNA *Ladder*® (New England, USA). O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, USA) e duas a três imagens de cada experimento foram capturadas em diferentes tempos de exposição.

As amostras que apresentaram resultados negativos ou duvidosos no multiplex-PCR foram encaminhadas ao *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC), Atlanta, EUA, para a realização do teste de entumescimento capsular (Reação de *Quellung*), empregando-se antissoros específicos, sob a coordenação do Dr. Bernard Beall.

4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

As amostras de *S. pneumoniae* foram submetidas aos testes de susceptibilidade através do método de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (CLSI, 2010), empregando-se os seguintes antimicrobianos: cefotax3324-7595ima (0,062 - 64 µg/mL), clindamicina (0,016 - 32µg/mL), cloranfenicol (0,031 - 64 µg/mL), eritromicina (0,016 - 32 µg/mL), levofloxacina (0,031 - 64 µg/mL), penicilina (0,031 - 64 µg/mL), tetraciclina (0,062 - 64 µg/mL), trimetoprim/sulfametoxazol (0,125/2,375 - 64/1216 µg/mL) vancomicina (0,031 - 64 µg/mL) (*Sigma Aldrich*, Germany).

Os testes foram realizados em placas com 96 poços com fundo em forma de “U” (Corning, New York, USA). As placas foram preparadas contendo o meio de caldo Mueller-Hinton (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) com ajuste de cátions e acrescido de 5% de sangue de equino lisado a 50%.

Os antimicrobianos foram diluídos em cada poço da placa em ordem crescente de concentração. Uma vez preparadas, as placas foram estocadas por até três meses em freezer à 20°C.

O preparo do inóculo foi realizado a partir do cultivo da bactéria por 24 horas. O isolado foi suspenso em 0,9% de salina com uma turvação padrão equivalente à escala de 0,5 de McFarland. Após 15 minutos esta suspensão foi diluída na proporção de 1:100, utilizando o meio de ágar Mueller - Hinton com adição de cátions e acrescido de 5% de sangue de equino lisado a 50%, obtendo uma suspensão equivalente a 1×10^6 UFC / mL. Adicionou - se 50 µL desta suspensão ao poço da placa contendo 50 µL da solução antibiótica, obtendo uma concentração

final da bactéria de aproximadamente 5×10^5 UFC / mL. As placas foram incubadas a 35°C por 20-24 hs. Como controle positivo foi utilizada a amostra *S. pneumoniae* ATCC 49619 e como controle negativo foi utilizado 50µl do caldo Mueller-Hinton sem antibiótico e sem bactéria. A leitura para indicar a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento do micro-organismo foi realizada visualmente a partir da detecção de turvação do meio de cultivo no poço ou formação de um botão ≥ 2 mm, definida em comparação com controles através de poços sem antibiótico. A definição de sensibilidade foi realizada com base na referência de valores indicados pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”, 2010 (CLSI, 2010) (Anexo II). Os isolados não-susceptíveis a três ou mais classes de antimicrobianos foram denominados multirresistentes.

5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

A caracterização dos padrões clonais dos isolados de *S. pneumoniae* foi realizada através de eletroforese em campo pulsátil (PFGE) e da técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

5.1 Eletroforese em campo pulsátil (*Pulse Field Gel Electrophoresis*, PFGE)

5.1.1 Obtenção do DNA bacteriano

A partir do cultivo bacteriano em placas de ágar sangue por 18hs, em atmosfera de 5% de CO₂, foi preparada uma suspensão em 1 mL de solução de cloreto de sódio à 0,9% até atingir uma absorbância (OD_{450nm}) de 0,5 (5×10^9 UFC/mL). Esta suspensão foi centrifugada por 5 minutos x 12.000 rpm, a 4°C e ressuspensa em tampão 300 µL PIV (Tris 10mM; 1M NaCl; pH 8,0), acrescido de

4 μ L de lisozima (25mg/mL). Em seguida, foi realizado o preparo da agarose “*Low melting point*” (Bio-Rad Laboratories, California, USA) a 2,0%, em tampão PIV e mantida a 65°C. Em seguida, a suspensão foi dispensada nos moldes de blocos para formação de um bloco de agarose. Os blocos de agarose foram então incubados com tampão EC (Tris-HCl 6mM; NaCl 1M; EDTA 100mM; Brij-58 0,5%; desoxicolato de Na 0,2%; sódio lauril sarcosine 0,5%, pH=7,6), contendo 20 μ L de lisozima (25mg/mL) e 5 μ /mL de mutanolisina a 37°C por 2 horas. Após lavagens consecutivas com tampão TE (Tris 1M, pH 8,0; EDTA 0,5M pH 8,0) por 30 minutos, a preparação foi incubada em tampão ES (EDTA 0,6M, sódio lauril sarcosine 0,003M, pH=9) acrescido de 20 μ L de proteinase K (25mg/mL) (Sigma Aldrich, Germany) à 56°C durante 12-18 hs. Após a lise da parede celular e degradação de proteínas, os blocos passaram por um processo de lavagem com leve homogeneização à temperatura ambiente com tampão TE, que tem por finalidade a retirar o excesso enzimático das incubações. As lavagens foram repetidas por mais três dias.

5.1.2 Tratamento Enzimático

Um bloco de cada amostra foi separado em um tubo e tratado com uma solução enzimática no volume final de 304 μ L contendo: 1 μ L de enzima *Sma*I (20U), 30 μ L de tampão específico da enzima *Sma*I concentrado 10X e 3 μ L de BSA (soro albumina bovina) a 100 μ g/mL. Esta preparação foi mantida a 25°C por 12-18 hs.

5.1.3 Separação eletroforética

Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose a 1,2% utilizando o sistema CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, California, USA). A eletroforese foi processada em TBE 0,5% (Tris base 1M, ácido bórico 0,9 M e EDTA 0,01M, pH 8,0),

a 14°C em corrente 200 volts, com pulsos de tempo inicial de 1 segundo e tempo final de 30 segundos por 21 hs. Em cada gel foi utilizado um marcador externo de de 50-1,000 Kb (kilobases) (Pulse Marker - Sigma), aplicado nas extremidades. Após eletroforese os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL). O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, USA) e capturadas imagens para análise.

5.1.4 Análise dos Padrões Eletroforéticos e Determinação dos Clones

O *software* utilizado foi o GelCompar II (Applied Maths, St. Martens, Belgium) utilizando o método *unweighted pair-group* (UPGMA) para construção dos dendrogramas. Para análise e comparação entre os padrões das bandas, foram utilizados também parâmetros como o coeficiente desimilaridade de *Dice* e nível de tolerância de 1,5%. Dessa forma, foi possível a associação de cepas ou clones, com uma proximidade genética igual ou superior a 80% no dendrograma, tendo como base os perfis do PFGE.

Os padrões de restrição dos fragmentos foram analisados e comparados tendo por base os critérios de Tenover e cols. (TENOVER et al., 1995), através da posição e número de bandas. Os critérios para a definição dos padrões foram os seguintes: **1)** isolados indistinguíveis - quando possuíam o mesmo número e posição de bandas; **2)** isolados clonalmente relacionados - quando possuíam três bandas ou menos de diferença, consistente como um único evento genético; **3)** isolados possivelmente relacionados - quando possuíam de quatro a seis bandas de diferença, o que consiste com dois eventos genéticos independentes; **4)** isolados não relacionados - quando possuíam mais de seis bandas de diferença, consistente com mais de três eventos genéticos. A nomenclatura estabelecida para os padrões

eletroforéticos baseou-se a partir dos critérios de Tenover, isolados indistinguíveis foi estabelecida uma letra alfabética; isolados clonalmente relacionados, recebeu a mesma letra com um asterisco; isolados possivelmente relacionados, recebeu mesma letra com uma numeração; isolados não relacionados, uma letra diferente.

Os padrões de bandas dos isolados de *S. pneumoniae* obtidos por PFGE foram comparados ao banco de padrões eletroforéticos de *S. pneumoniae* obtidos no estudo de vigilância epidemiológica das meningites pneumocócicas realizado no Hospital Couto Maia durante o período de 1996 a 2008.

5.2. Multilocus Sequence Typing (MLST)

A técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Enright et al. (ENRIGHT; SPRATT, 1998 empregando-se *primers* específicos para sete genes conservados (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* e *ddl*). Os tipos de sequências obtidos pelo MLST foram determinados com base na sequência dos alelos dos sete *loci* sequenciados. Para isto, utilizamos os softwares disponíveis no site da web para pneumococos (<http://www.mlst.net>), comparando o perfil dos alelos dos isolados com as cepas de referências depositadas no banco de dados de MLST de pneumococos, para identificar a relação clonal com grupos que se disseminaram de outras regiões geográficas.

Os fragmentos de DNA foram purificados utilizando a enzima exosap (*GE Healthcare*), adicionando 4µL da enzima para cada 3 µL do produto da reação de PCR. Esta mistura foi incubada por 15 minutos à 37°C e depois por 15 minutos à 80°C. Os produtos purificados foram armazenados a - 20°C até realização da reação de sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado seguindo os protocolos da Plataforma de Sequenciamento PDTIS-FIOCRUZ, no sequenciador automatizado Applied Biosystems Prism 377 (Applied Biosystems ABI 3100). No entanto, alguns produtos foram sequenciados a partir de um serviço privado disponível na empresa Macrogen, Coréia. Os produtos foram enviados para sequenciamento seguindo as recomendações da empresa (<http://dna.macrogen.com>).

Depois de sequenciados, foi realizada a análise dos eletroferogramas das sequências através do *Software BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.0.9.0). A sequência obtida foi então depositada na página do MLST para obtenção do valor alélico de cada um dos sete *loci*, que então fornece a Sequência Tipo (ST, do inglês “*Sequence Type*”) correspondente.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

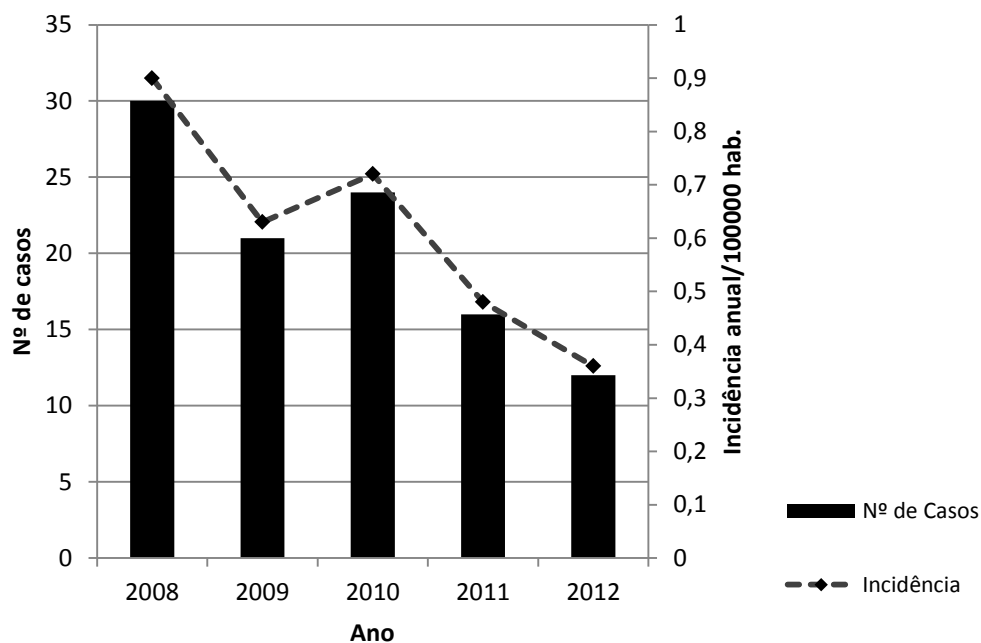
Todas as informações dos pacientes foram armazenadas num banco de dados no Programa *Epi-Info v 3.5.2 (Centers for Disease Control and Prevention)*, onde também foram feitas as análises estatísticas. As frequências das variáveis categóricas foram avaliadas em percentagens e análise de características de subgrupos comparadas usando o teste do qui-quadrado, teste exato de Fischer quando valores < 5 . A incidência de meningite pneumocócica estimada para Salvador foi calculada pela razão entre o número de casos novos por cem mil habitantes da região metropolitana de Salvador, anualmente. Os dados populacionais, para a realização do cálculo de incidência, foram extraídos do Censo 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). A letalidade da meningite pneumocócica foi calculada pela razão entre o número de óbitos e o

número de pessoas acometidas pela doença multiplicada por 100, a cada ano. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes e os dados foram apresentados em gráficos e em tabelas.

7 RESULTADOS

Durante o período de janeiro de 2008 a dezembro de 2012 foram identificados 170 casos de meningite pneumocócica no Hospital Couto Maia (HCM). Considerando que 103 desses pacientes são oriundos da Região Metropolitana de Salvador, a incidência anual da meningite pneumocócica reduziu de 0,9/100.000 habitantes (2008) para 0,36/100.000 habitantes (2012) ($p < 0,0087$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Distribuição do número de casos e incidência da meningite pneumocócica na Região Metropolitana de Salvador durante o período de janeiro de 2008 a dezembro de 2012.



Dos 170 pacientes com meningite pneumocócica identificados, 148 apresentaram cultura positiva para *S. pneumoniae* a partir do líquido e/ou hemocultura.

A tipagem capsular realizada nos 148 isolados de *S.pneumoniae* permitiu a identificação de 36 sorotipos diferentes. Considerando todo o período de estudo, os sorotipos mais frequentes foram: 14 ($n = 16$; 10,8%), 6B ($n = 12$; 8,1%), 23F ($n=12$, 8,1%), 18C ($n = 10$; 6,7%), 12F ($n = 9$; 6,1%), 19F ($n = 9$; 6,1%), 3 ($n = 7$; 4,7%) , 4 ($n = 6$; 4,0%) e 18B ($n=5$; 3.4%) .

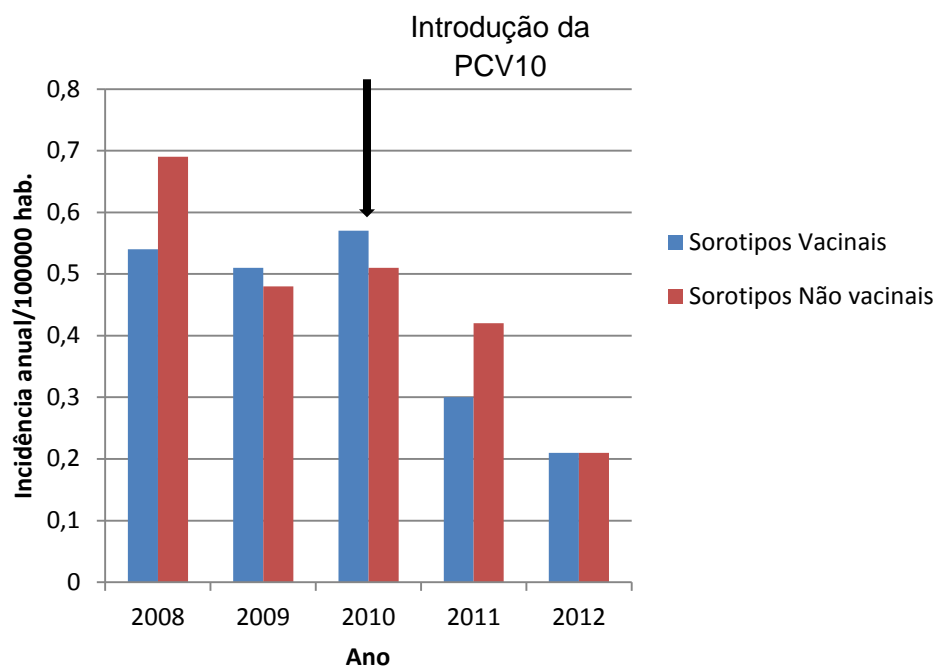
Para efeito de comparação, os sorotipos foram divididos em dois períodos: 1) **período pré-vacinal** (de janeiro de 2008 a junho de 2010), contabilizando 96 (64,8%) isolados de *S.pneumoniae* e, 2) **período pós-vacinal** (de julho de 2010 a dezembro de 2012), com 52 (33,8%) isolados. Os sorotipos não vacinais (SNVT) representaram 52,1% (50/96) e 52% (27/52) dos isolados de *S. pneumoniae* identificados nos períodos pré e pós-vacinal, respectivamente.

No período pré-vacinal, os SNVT mais frequentes foram: 3 ($n=6$; 12%), 19A ($n=4$; 8%), 6A ($n=4$; 8%) e no período pós-vacinal os SNVT 12F ($n=6$; 22,2%), 10A ($n=3$; 11,1%), 15B ($n=2$; 7,4%) e 18B ($n=2$; 7,4%), foram os mais frequentes.

O Gráfico 2 mostra a incidência anual dos casos de meningite pneumocócica causados por sorotipos vacinais (SVT) e não-vacinais (SNVT) durante o período de estudo. De modo geral, ocorreu uma diminuição na incidência tanto dos SVT quanto dos SNVT durante o período estudado. Em particular, para os SNVT, a incidência reduziu de 0,69/100.000 habitantes ano (2008) para 0,21/100.000 habitantes ano (2012) ($p < 0,7619$), porém sem significância estatística. Com relação aos SVT, a incidência teve uma redução de 0,57/100.000 habitantes ano (2010) para

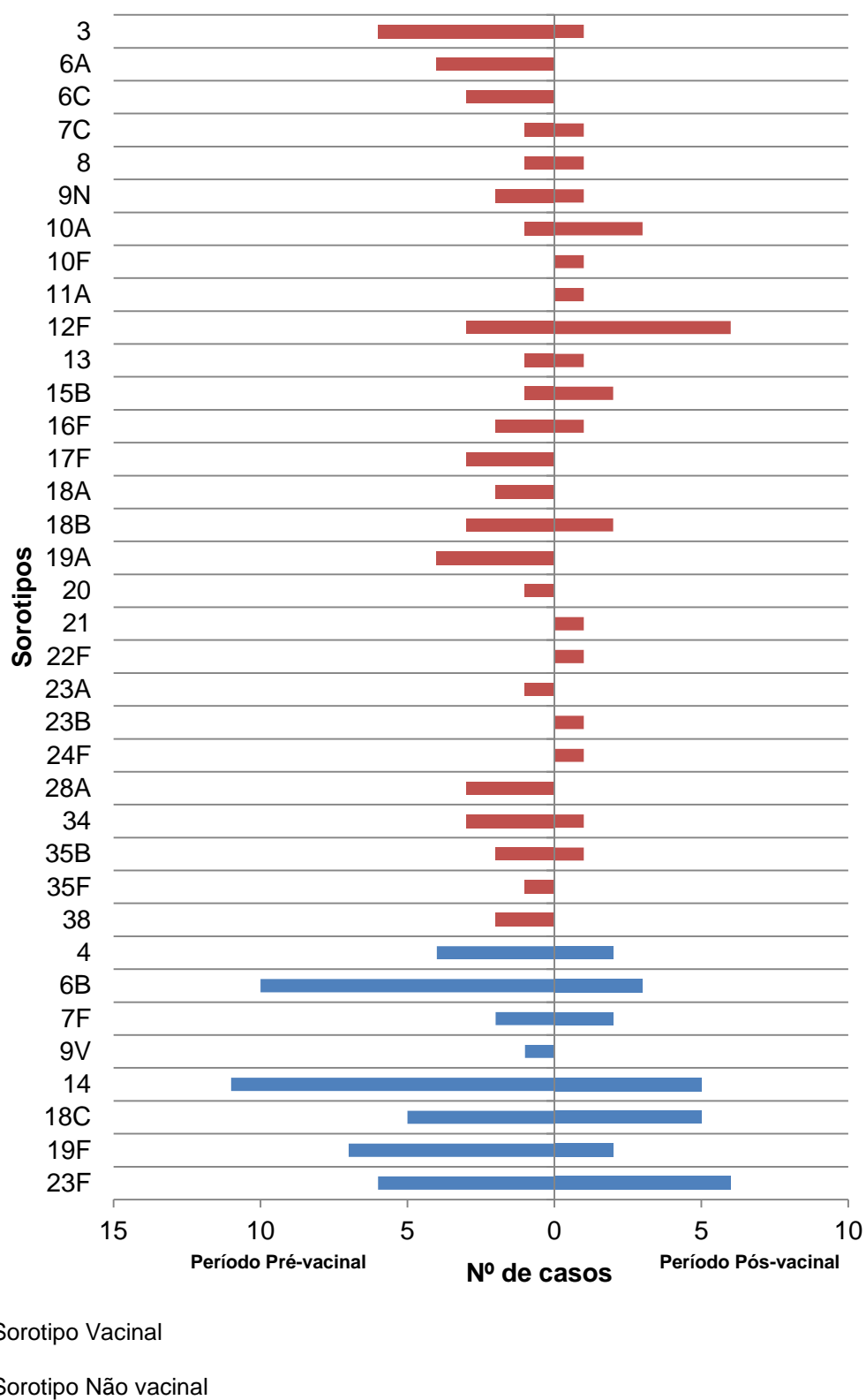
0,21/100.000 habitantes ano (2012) ($p < 1,0$) após a introdução da vacina PCV10 em junho de 2010.

Gráfico 2 – Incidência anual dos casos de meningite pneumocócica causados por sorotipos vacinais e não vacinais de *S. pneumoniae* de janeiro de 2008 a dezembro de 2012.



Dos 28 SNVT diferentes identificados, seis ocorreram apenas no período pós-vacinal (10F, 11A, 21, 22F, 23B e 24F). Por outro lado, os sorotipos 6A, 6C, 17F, 18A, 19A, 20, 23A, 35F e 38 foram encontrados apenas no período pré-vacinal. Destaca-se também o ligeiro aumento no número de casos do sorotipo 12F no período pós-vacinal (Gráfico 3).

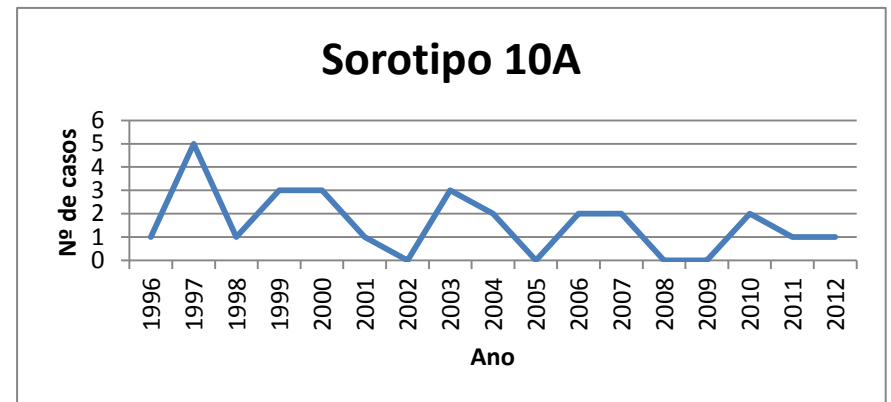
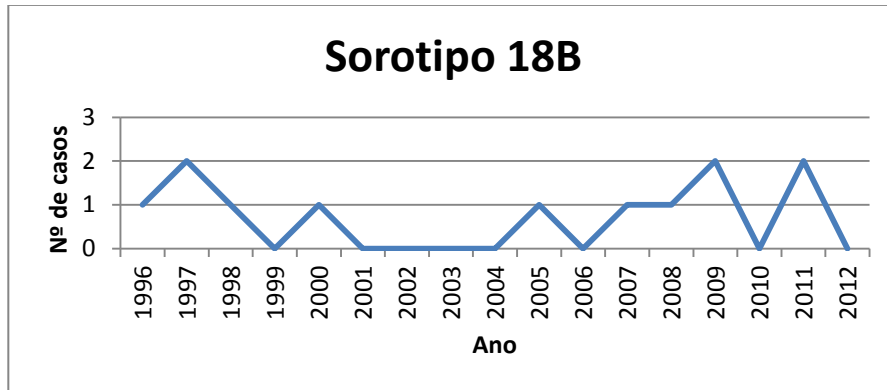
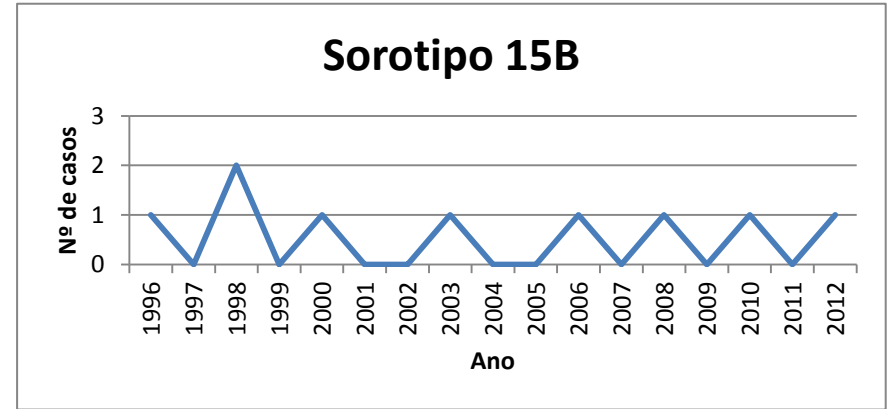
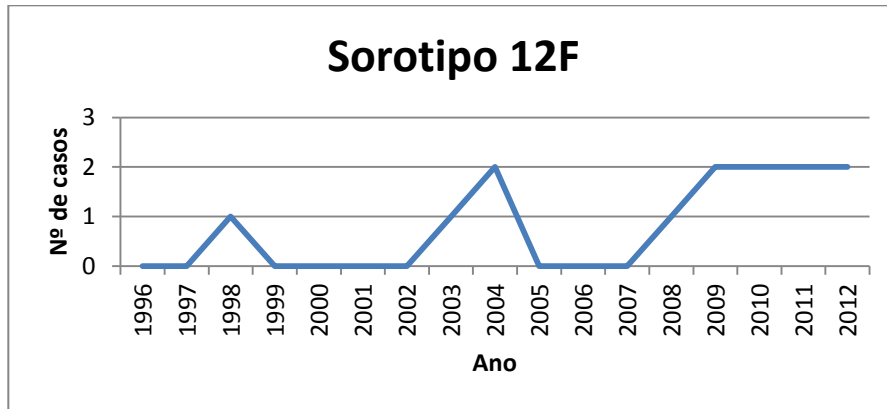
Gráfico 3 – Distribuição do número de casos por sorotipos vacinais e não vacinais identificados nos períodos pré e pós-vacinal.



Os SNVT mais frequentes do período pós-vacinal (12F, 18B, 15B e 10A) foram comparados com os dados incluídos no banco de amostras da vigilância

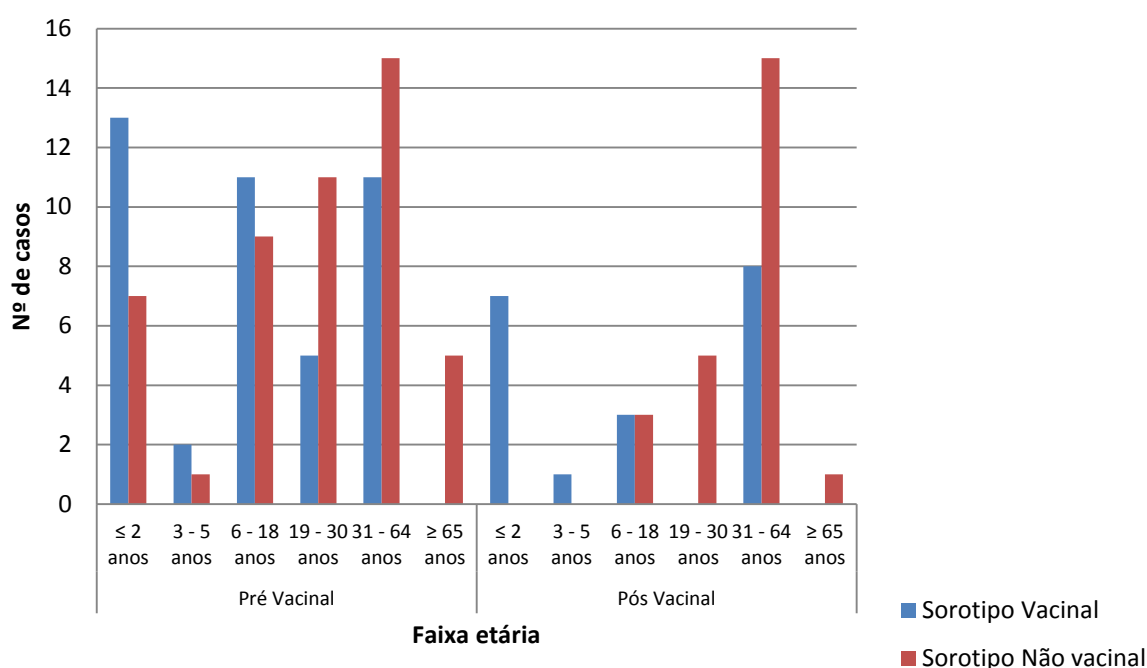
epidemiológica das meningites bacterianas, realizada no Hospital Couto Maia desde o ano de 1996. O Gráfico 4 mostra a flutuação do número de casos relacionados a esses sorotipos durante todo o período de vigilância.

Gráfico 4 – Distribuição do número de casos de meningite pneumocócica ocasionados pelos sorotipos 12F, 18B, 15B e 10A durante o todo período de vigilância epidemiológica realizada no Hospital Couto Maia (1996-2012).



De modo geral, os SNVT foram os mais frequentemente isolados dos pacientes de 19 a 66 anos de idade, tanto no período pré quanto no período pós-vacinal (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Distribuição do número de casos de meningite pneumocócica identificados no período pré e pós-vacinal, de acordo com a faixa etária dos pacientes.



Na Tabela 1 são apresentados os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com meningite pneumocócica causada por SNVT de *S. pneumoniae*, de acordo com o período pré e pós-vacinal. De modo geral, ocorreu um maior número de casos entre os pacientes do sexo masculino, tanto no período pré, quanto no período pós-vacinal. Entretanto, não foi observada nenhuma diferença estatística com relação a todas as variáveis estudadas.

Tabela 1 – Características clínicas e epidemiológicas dos 77 pacientes com meningite pneumocócica causada por sorotipos não vacinais de *S. pneumoniae*, de acordo com os períodos pré e pós-vacinal.

Características clínicas e epidemiológicas	Período		Valor de <i>p</i>
	Pré-vacinal <i>n</i> =50*	Pós-vacinal <i>n</i> =27*	
Dados Demográficos			
Sexo masculino	34 (68%)	18 (69%)	1,0000
Idade, mediana	25 (10,5 - 46,5)	36 (27 – 53)	
≤ 2 anos	7 (14%)	-	0,0481
3 – 5 anos	1 (2%)	-	1,0000
6 – 18 anos	9 (18%)	3 (11,5%)	0,5242
19 – 30 anos	11 (22%)	5 (19,2%)	0,7776
31 – 64 anos	15 (30%)	14 (53,8%)	0,0845
≥ 65 anos	5 (10%)	1 (3,8%)	0,4173
Sinais e Sintomas			
Condições neurológicas com alteração na admissão**	33 (66%)	18 (69%)	-
Dias de sintomas, mediana	3 (1 – 4,5)	2 (1 – 3)	-
Internados HCM, mediana	14 (11 – 20)	22 (15 – 32)	-
Internados UTI, média	4 dias	5 dias	-
Letalidade	18%	15%	-
Aspecto do Líquor			
Contagem de células (cel/mm ³), mediana	4150 (627 – 10000)	3840 (1100 – 10000)	-
Proteínas (mg/dL), mediana	300 (300 – 500)	500 (350 – 565)	-
Glicose (mg/dL), mediana	20 (20 – 40)	20 (20 – 32)	-
Doenças que precedem a meningite			
Pneumonia	6(12%)	-	-
Otite média	4(8%)	2(7,7%)	1,0000
Trauma craniano	6(12%)	1(3,9%)	0,4106
I.V.A.S.***	12(24%)	3(11,5%)	0,2338
Comorbidade			
Hipertensão	4 (8%)	1(3,9%)	0,6518
Alcoolismo	4(8%)	1(3,9%)	0,6518
Diabetes	2(4%)	1(3,9%)	1,0000
HIV	1(2%)	-	-

coma ou alterado; *Infecção das vias aéreas superiores

Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Os 77 isolados de *S. pneumoniae* SNVT foram submetidos aos testes de susceptibilidade através do método de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Centers Institute* (CLSI, 2010), empregando-se os seguintes antimicrobianos: cefotaxima, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, penicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina, levofloxacina e vancomicina.

Dos 28 SNVT caracterizados durante o estudo, 22 (78,6%) apresentaram resistência a um ou mais antibióticos. Todos os isolados foram susceptíveis à cefotaxima, cloranfenicol, clindamicina, levofloxacina e vancomicina. Um total de 30 (39%) e 16 (20,8%) isolados apresentaram resistência à sulfametoxazol-trimetoprim e à tetraciclina, respectivamente (Tabela 2). A não-susceptibilidade à penicilina foi observada em 5 (6,5%) isolados, dos sorotipos 19A (3 amostras), 9N (1 amostra) e 12F (1 amostra) (Tabelas 2 e 3). A resistência à eritromicina foi observada em 1 (1,3%) isolado do sorotipo 21, proveniente do período pós-vacinal (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Perfil de não-susceptibilidade aos antimicrobianos dos 77 isolados não-vacinais de *S. pneumoniae*, de acordo com os períodos pré e pós-vacinal.

Antibiótico	Período		Total (n=77)
	Pré vacinal (n=50)	Pós vacinal (n=27)	
STX/TMP*	19 (38%)	11(48%)	30 (39%)
Tetraciclina	13 (26%)	3 (11%)	16 (21%)
Penicilina	4 (8%)	1 (4%)	5 (7%)
Eritromicina	-	1 (4%)	1 (1%)

*STX/TMP = sulfametoxazol-trimetoprim

Tabela 3 – Perfil de não-susceptibilidade aos antimicrobianos dos sorotipos não-vacinas de *S. pneumoniae*.

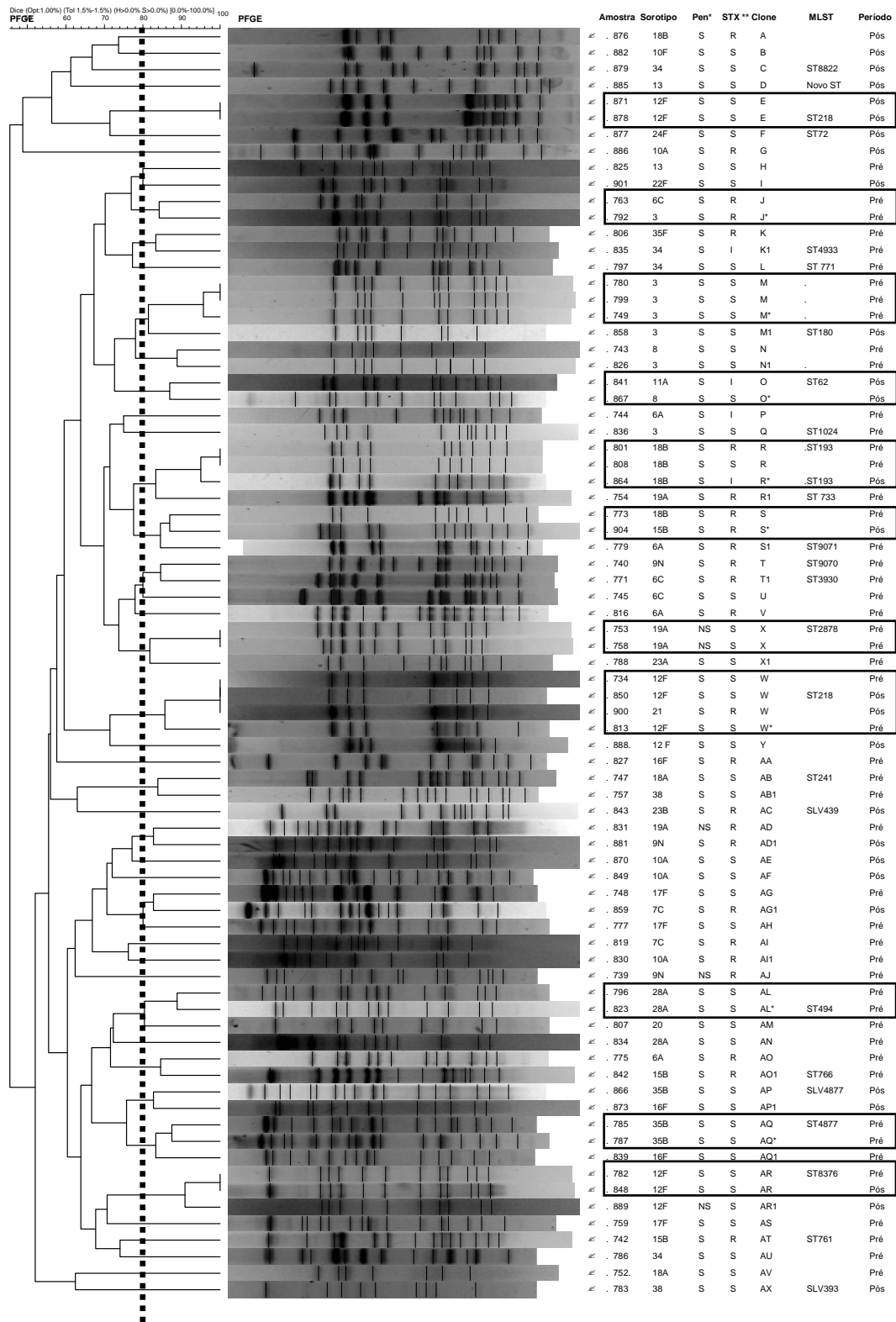
Sorotipo	Total de isolados	Nº de isolados resistente a:			
		Penicilina	STX/TMP	Tetraciclina	Eritromicina
3	7	-	1	-	-
6A	4	-	4	1	-
6C	3	-	2	-	-
7C	2	-	2	1	-
8	2	-	-	2	-
9N	3	1	3	1	-
10A	4	-	2	3	-
10F	1	-	-	-	-
11A	1	-	1	-	-
12F	9	1	-	-	-
13	2	-	1	-	-
15B	3	-	3	1	-
16F	3	-	1	-	-
17F	3	-	-	3	-
18A	2	-	-	1	-
18B	5	-	4	-	-
19A	4	3	2	-	-
20	1	-	-	1	-
21	1	-	1	-	1
22F	1	-	-	-	-
23A	1	-	-	-	-
23B	1	-	1	-	-
24F	1	-	-	-	-
28A	3	-	-	2	-
34	4	-	1	-	-
35B	3	-	-	-	-
35F	1	-	1	-	-
38	2	-	-	-	-
Total	77	5	30	16	1

Na Figura 3 é apresentado o dendrograma mostrando a relação genética dos 77 SNVT, com a identificação de 11 grupos clonais e 51 grupos não clonais. De modo geral, os grupos clonais foram formados por apenas um sorotipo, com exceção dos grupos J, O e W que apresentaram dois sorotipos em sua composição (Tabela 4).

Tabela4 – Distribuição dos grupos clonais identificados entre os sorotipos não-vacinais de *S. pneumoniae*.

Padrão Eletroforético	No. de amostras	Sorotipo (no. de amostras)	Período de isolamento
Grupo clonal			
AL	2	28A (2)	Pré
AQ	2	35B (2)	Pré
AR	2	12F (2)	Pré / Pós
E	2	12F (2)	Pós
J	2	6C (1); 3 (1)	Pré
M	3	3 (3)	Pré
O	2	11A (1); 8 (1)	Pós
R	3	18B (3)	Pré / Pós
S	2	18B (1); 15B (1)	Pré / Pós
W	4	12F (3); 21 (1)	Pré / Pós
X	2	19A	Pré

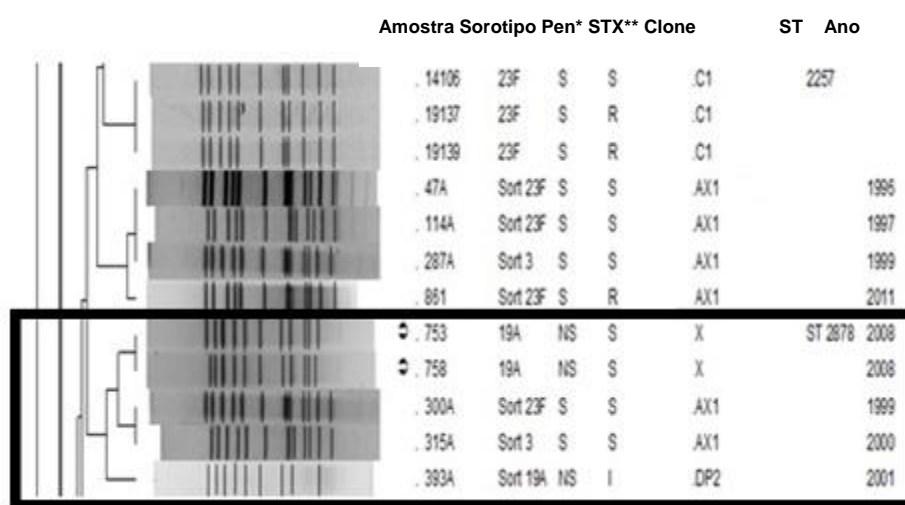
Os grupos clonais AL, AQ, J, M e X foram identificados exclusivamente no período pré-vacinal, enquanto que no período pós-vacinal foram observados os grupos clonais E e O.



*Penicilina ** sulfametoxazol/trimetropim

Figura 4 – Dendrograma ilustrando a relação genética dos isolados não-vacinais de *S. pneumoniae* obtida através da técnica de PFGE.

O padrão eletroforético do grupo clonal X, contendo 2 isolados de 19A, apresentou 91% de similaridade com os isolados de meningite dos sorotipos 23F e 3, do banco de isolados obtidos durante a vigilância epidemiológica das meningites pneumocócicas realizada no Hospital Couto Maia, durante o período de 1996 a 2008 (Figura 5).



*Penicilina ** sulfametoxazol/trimetropim

Figura 5 - Similaridade genética do grupo clonal X (sorotipo 19A) com os isolados de meningite do banco da vigilância epidemiológica realizada no Hospital Couto Maia (1996-2012).

A identificação da Sequência Tipo (ST), através da técnica de MLST, foi realizada em 26 isolados, sendo 15 do período pré-vacinal e 11 do período pós-vacinal. Durante o estudo, quatro isolados foram identificados como pertencentes a novas Sequências Tipo (STs), sendo três pertencentes ao período pré-vacinal (ST8376 - sorotipo 12F; ST9070 - sorotipo 9N e ST9071 - sorotipo 6A) e um isolado do período pós-vacinal (sorotipo 13) ainda não caracterizado.

Tabela 5 – Distribuição das Sequências Tipo identificadas em relação ao sorotipo, padrão eletroforético por PFGE, resistência a antimicrobianos, período de isolamento e sua comparação com os clones disseminados mundialmente.

Sequência Tipo (ST)	Sorotipo	Padrão eletroforético por PFGE	Padrão de resistência	Período de isolamento	Clones Mundiais**
62	11A	O	Stx/TMP	Pós-vacinal	
72	24F	F	-	Pós-vacinal	
180	3	M1	-	Pós-vacinal	Netherlands ³ -31
193	18B*	R	Stx/TMP	Pré e pós-vacinal	Greece ²¹ -30
218	12F*	E e W	-	Pós-vacinal	Denmark ^{12F} -34
241	18A	AB	-	Pré-vacinal	
SLV393	38	AX	-	Pré-vacinal	
SLV439	23B	AC	Stx/TMP	Pós-vacinal	
494	28A	AL	-	Pré-vacinal	
733	19A	R1	Stx/TMP	Pré-vacinal	
766	15B	AO1	Stx/TMP	Pós-vacinal	
771	34	L	-	Pré-vacinal	
1024	3	Q	-	Pré-vacinal	
2878	19A	X	Pe	Pré-vacinal	
3930	6C	T1	Stx/TMP	Pré-vacinal	
4877	35B	AQ	-	Pré-vacinal	
SLV4877	35B	AP	-	Pós-vacinal	
4933	34	K1	Stx/TMP	Pré-vacinal	
8822	34	C	-	Pós-vacinal	
761	15B	AT	Stx/TMP	Pré-vacinal	
8376	12F	AR	-	Pré-vacinal	
9070	9N	T	Sxt/TMP	Pré-vacinal	
9071	6A	S1	Stx/TMP	Pré-vacinal	
ST novo	13	D	-	pós-vacinal	

* dois isolados

**descritos no *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN)*

Destaca-se, nesta Tabela, fato dos ST180 (sorotipo 3), ST193 (sorotipo 18B) e ST218 (sorotipo 12F) apresentarem-se genotipicamente semelhantes aos clones mundiais *Netherlands*³-31, *Greece*²¹-30 e *Denmark*^{12F}-34, descritos no *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN)* (<http://web1.sph.emory.edu/PMEN/>). De modo global, na Tabela 6, os STs identificados neste estudo são comparados com aqueles descritos no banco do MLST (<http://www.mlst.net>).

Tabela 6 – Comparação das Sequências Tipo identificadas nestes estudo com aquelas descritas no banco do MLST

Este Estudo ST, Sorotipo	Registros de STs e sorotipos respectivos documentados no banco do MLST (http://www.mlst.net)			
	Total de registros	Sorotipo (%) mais frequente	Outros Sorotipos	País
ST62, 11A	79	11A (79,7)	10A, 11E, 11, 19A, NT	Brasil , Espanha, Itália, Rússia, Alemanha, Estados Unidos, Suécia, França, República Tcheca
ST66, 9N	57	9N (66,7)	14,19A,19F,23F,4,9L,9L/N,9V,NT	Brasil , Suécia, Inglaterra, Austrália, Polônia, Alemanha, Coréia do Sul, Itália, França, Turquia, Chile.
ST72, 24F	36	24F (66,7)	1, 14, 24, 3, 6A, 6B, NT	Espanha, Hungria, Polônia, Marrocos, França, Inglaterra, Alemanha, Itália, Grécia, Chile
ST180, 3	227	3 (95,5) (Netherlands³-31)	6A, 15A, 19F, NT	Inglaterra, Dinamarca, Holanda, Canadá, Espanha, Tailândia, Itália, Portugal, Polônia, Brasil , Noruega, Alemanha, Bélgica, Suécia, Coréia do Sul, República Checa, Rússia, Gâmbia, França, China
ST193, 18B	96	19A (92,9) (Greece²¹-30)	14,15B,15C,18C,19F,21,39,23F,NT	Inglaterra, Grécia, Vietnam, Brasil , Itália, Finlândia, Estados Unidos, Espanha, Alemanha, África do Sul.
ST218, 12F	61	12F (78,7) (Denmark^{12F}-34)	7F, 12B	Dinamarca, Inglaterra, Uruguai, Canadá, Espanha, Polônia, Inglaterra, Estados Unidos, Suécia, Nova Zelândia, Alemanha, África do Sul, França, Chile, Nova Caledônia.

Tabela 6 – Continuação

Este Estudo ST, Sorotipo	Registros de STs e sorotipos respectivos documentados no banco do MLST (http://www.mlst.net)			
	Total de Registros	Sorotipo (%) mais frequente	Outros Sorotipos	País
ST241, 18A	5	18A (80,0)	23F	Espanha, China, Estados Unidos, Gâmbia, Alemanha
ST393, 38	18	38 (83,3)	25A, NT	Inglaterra, Polônia, Suíça, Alemanha, Estados Unidos, Itália, República Tcheca, Japão, Espanha
SLV439, 23B	26 (ST439)	23B (76,9)	23F, 23A, 19F	Inglaterra, Alemanha, Estados Unidos, Holanda, Grécia
ST494, 28A	3	28A (66,7)	28	Finlândia, Brasil , Alemanha
ST733, 19A	3	19A (66,7)	19F	Brasil , Alemanha
ST761, 15B	1	13 (100,0)		Brasil
ST766, 15B	2	15B (100,0)		Brasil
ST771, 34	4	34 (75,0)	19A	Brasil , Malásia
ST1024, 3	2	3 (100,0)		Polônia, Brasil
ST2878, 19A	3	19A (100,0)		Brasil
ST3930, 6C	1	6C (100,0)		Brasil

Tabela 6 – Continuação

Este Estudo ST, Sorotipo	Registros de STs e sorotipos respectivos documentados no banco do MLST (http://www.mlst.net)			País
	Total de Registros	Sorotipo (%) mais frequente	Outros Sorotipos	
ST4877, 35B	1	35B (100,0)		Brasil
ST4933, 34	2	34 (100,0)		Brasil
ST8376, 12F	1	12F (100,0)		Brasil
ST8822, 34	1	34 (100,0)		África do Sul

O ST193, do grupo clonal R, foi composto por dois isolados do sorotipo 18B, sendo um do período pré-vacinal e o outro do período pós-vacinal. Os grupos clonais AQ e AP, caracterizados em períodos diferentes e formados pelo sorotipo 35B corresponderam ao ST4877 e seu SLV4877 (“*Single Locus Variant*”), diferindo em um único alelo do gene *spi*. Dois isolados do sorotipo 12F do período pós-vacinal foram identificados em dois grupos clonais diferentes (E e W), porém, apresentaram o mesmo ST (ST218). Por outro lado, outro isolado do sorotipo 12F, do período pré-vacinal, foi caracterizado como pertencente ao ST8376. Destaca-se, ainda, o ST2878, com o sorotipo 19A não suscetível à penicilina.

8 Discussão

A vigilância epidemiológica da meningite pneumocócica realizada no Hospital Couto Maia, em Salvador, mostrou que durante os 5 anos de estudo ocorreram 170 casos da doença na região, sendo que em 148 destes, obteve-se a identificação de *S. pneumoniae* através da cultura de líquido. Ocorreu uma redução significativa na incidência da meningite pneumocócica, decaindo de 0,9 para 0,36 casos /100.000 habitantes entre 2008 e 2012, respectivamente. Esta tendência já tinha sido observada anteriormente nessa mesma região, antes mesmo da introdução da vacina PCV10, mostrando um declínio de 1,12 para 0,83 casos/100.000 habitantes durante o período de 2000-2007(MENEZES *et al.*, 2011).

É importante salientar que a vacina PCV10 foi introduzida no programa nacional de imunização a partir de março de 2010 e mais particularmente em Salvador, em julho do mesmo ano, possuindo como população alvo as crianças < 2 anos de idade (BAHIA, 2013). Segundo a Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, foram aplicadas 43.640 doses da vacina na região metropolitana de Salvador no ano de 2012, com uma cobertura vacinal estimada de 81,55%, ainda não considerada ideal pelo Ministério da Saúde cuja meta é atingir mais de 90% de cobertura (BAHIA, 2012).

Em função da sua recente introdução no PNI, é impossível afirmar que a redução da incidência da meningite pneumocócica observada neste estudo esteja associada exclusivamente ao emprego da PVC10. Esses achados podem estar relacionados também a outros fatores, tais como a melhoria do atendimento primário à saúde, melhor acesso aos serviços de saúde, das condições sócio-econômicas da população e a disponibilidade da vacina PCV7 em clínicas privadas desde 2002. Por outro lado, segundo o Ministério da Saúde, após a inclusão da vacina pneumocócica

no calendário vacinal da criança, em 2010, houve uma redução de 30% no número de casos da meningite pneumocócicas (BRASIL, 2013).

Além disto, resultados preliminares de outros estudos no Brasil também indicam que está ocorrendo uma diminuição no número de casos de meningite causado pelo *S. pneumoniae* no período pós PCV10.

Afonso *et al.* (2013), analisaram recentemente o efeito da PCV10 na doença pneumocócica em crianças < 2 anos de idade de cinco capitais brasileiras, imediatamente após o primeiro ano de vacinação. As taxas de hospitalização por pneumonia e outras doenças não respiratórias causadas pelo pneumococo, incluindo a meningite, foram reduzidas em todas as cidades no período pós-vacinal.

Em um estudo realizado no Hospital Universitário de São Paulo no período de janeiro de 2006 a setembro de 2012, Dos Santos *et al.* (2013) mostraram que a incidência da doença pneumocócica invasiva em crianças <2 anos de idade reduziu significativamente após a introdução da PCV10.

Berezin *et al.*(2012), observaram uma tendência de redução de cerca de 65% na proporção de casos de doenças pneumocócicas invasivas atribuídas por sorotipos vacinais, em um estudo realizado em São Paulo e Uberlândia.

Na comparação do período pré e pós-vacinal em pacientes adultos com DPI na cidade de Porto Alegre (CAIERÃO *et al.*,2012), evidenciou-se uma diminuição na proporção de sorotipos vacinais (56,4% para 40,5%) no período pós-vacina, com um aumento significativo do sorotipo 20.

Ao longo do estudo podemos observar que os sorotipos não vacinais foram mais prevalentes na faixa etária acima de 19 anos, tanto no pré como no período pós-vacinal. Nos Estados Unidos, enquanto a incidência de DPI diminuiu consideravelmente em crianças e em adultos após a introdução da vacina PCV7

(TAN, 2012), em outras áreas geográficas, essas alterações não foram tão marcantes. Em países como França, Holanda e Espanha, a incidência de DPI aumentou significativamente em adultos após a introdução da PCV7 (LEPOUTRE *et al.*, 2008; RODENBURG *et al.*, 2010; ARDANUY *et al.*, 2012). Essas diferenças podem estar relacionadas, em parte, à cobertura vacinal nos diferentes países.

De modo geral, quando é analisada a distribuição dos sorotipos observada durante todo o período de estudo, observa-se que os sorotipos vacinas 14, 6B, 18C e 23F foram os mais frequentemente encontrados, não ocorrendo, até o momento, um aumento de sorotipos não-vacinais. Estes achados podem estar relacionados ao curto período de implementação da vacina. Os dados do Sistema Regional de Vacinas (SIREVA) de 2012, da Organização Panamericana de Saúde, mostram que os sorotipos 14 e 6B continuam sendo os mais prevalentes em toda a América Latina (CASTAÑEDA *et al.*, 2012).

Segundo informações do Centro de Referência Nacional para Infecções Pneumocócicas, Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, o número de casos de DPI em crianças <2 anos de idade no Brasil, nos períodos pré (2001-2009) e pós (2011-2012) a introdução da PCV10, mostrou uma redução de 77% dos sorotipos contidos na vacina (M.C. Brandileone, comunicação pessoal).

Nos Estados Unidos, a introdução da vacina conjugada PCV7, em 2000, resultou uma mudança dramática na carga da doença pneumocócica ocasionada pelos sorotipos cobertos pela vacina, não só em crianças <2 anos, como também em crianças mais velhas não vacinadas, adultos e idosos, em função do fenômeno de imunidade de rebanho (PILISHVILI *et al.*, 2010). Por outro lado, as taxas anuais de DPI devido a sorotipos não vacinais aumentaram consideravelmente, com os sorotipos 19A, 1, 5, 7F, 33F e 15 sendo responsáveis pelos aumentos mais

significantes de DPI e com o predomínio do sorotipo 19A(GONZALEZ *et al.*, 2006; HAUSDORFF, 2007; HICKS *et al.*, 2007; MOORE *et al.*, 2008; KAPLAN *et al.*, 2010). A prevalência do sorotipo 19A foi ocasionada não só pela expansão de clones pré-existentes (ST199), como também pelo fenômeno de substituição capsular, que ocorreu entre um isolado presente na vacina PCV7 e o sorotipo não vacinal 19A(PAI *et al.*, 2005; WEINBERGER *et al.*, 2011). Esses acontecimentos fizeram com que os EUA introduzissem a PCV13 em 2010.

No presente estudo, o fato de ter sido identificada uma maior frequência dos sorotipos não vacinais 12F (22,2%), 10A (11,1%), 15B (7,4%) e 18B (7,4%) no período pós-vacinal deve ser analisado com cautela. Além do número reduzido de isolados estudados, é bom lembrar que a vacina PCV10 foi introduzida apenas recentemente. O ano de 2010 foi um ano de transição e só a continuidade da vigilância epidemiológica ao longo tempo é que poderá realmente avaliar o real impacto da introdução da vacina em nossa região. Além disto, quando é comparada a distribuição dos SNVT 12F, 10A, 15B e 18B com a de anos anteriores, identificada durante todo o período de vigilância realizado no hospital Couto Maia, verifica-se uma flutuação desses sorotipos ao longo dos anos, sem o registro da emergência específica de um determinado sorotipo (Gráfico 4). Flutuações na prevalência de um determinado sorotipo podem ocorrer naturalmente na população de pneumococos, mesmo na ausência da pressão seletiva imposta pelo uso de vacinas conjugadas (LAGOS *et al.*, 2008; RUCKINGER *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2012).

Particularmente em relação ao sorotipo 22F, um estudo da Universidade de Utah, nos Estados Unidos, realizado entre 1997-2010, mostrou que a frequência desse sorotipo aumentou no período de janeiro de 2005 a dezembro 2010. Cerca de 22% do isolados de 22F eram provenientes de pacientes com meningite, em

comparação com 12% para todos os outros isolados ($p < 0,001$) (AMPOFO *et al.*, 2012).

No presente trabalho, destaca-se, também, o fato do sorotipo 19A ter sido identificado apenas no período pré-vacinal, com 4 isolados. Esses achados estão de acordo com o estudo de Dos Santos *et al.* (2013) em São Paulo, que não evidenciaram um aumento na incidência deste sorotipo naquela cidade no período pós-vacinal. É importante salientar, também, o estudo de Castañeda *et al.* (2012) mostrando que a incidência do sorotipo 19A tem se mantido baixa e estável na América Latina e Caribe por cerca de 20 anos. Esses resultados são contrastantes com aqueles evidenciados nos Estados Unidos, com a expansão e emergência de linhagens do sorotipo 19A após a introdução da vacina PCV7 (PAI *et al.*, 2005; WEINBERGER *et al.*, 2011).

Neste estudo, o sorotipo 6A foi incluído no grupo dos sorotipos não vacinais. Estudos da imunogenicidade da vacina PCV10 mostram que apesar dela ser ativa contra o sorotipo 6A, esta atividade é cerca de 33% - 50% inferior àquela observada com a PCV7, não estando claro, portanto, que a PCV10 induz uma proteção cruzada contra o sorotipo 6A (VESIKARI *et al.*, 2009; FARKOUH *et al.*, 2012).

Dos 77 isolados caracterizados ao longo deste estudo, 52 (67,5%) apresentaram resistência antimicrobiana, sendo que 13,5% dos isolados ($n=7$) mostraram resistência a dois ou mais antibióticos. A multirresistência a antibióticos em *S.pneumoniae* é, sem dúvida, um motivo de preocupação. Nos Estados Unidos, por exemplo, em 30% dos casos severos de doença pneumocócica, a bactéria é resistente a um ou mais antibióticos clinicamente relevantes, levando a cerca de 1.2000.000 casos de doença e 7.000 óbitos ao ano. Os casos de pneumonia pneumocócica resistentes resultam em cerca de 32.000 visitas médicas e cerca de

19.000 hospitalizações ao ano e os custos associados a esses casos atingem a cifra de 96 milhões de dólares (CDC, 2013).

Particularmente em relação à penicilina, três dos quatro isolados do sorotipo 19A identificados no período pré-vacinal apresentaram não-susceptibilidade a este antibiótico. Nos Estados Unidos, isolados do sorotipo 19A identificados após a introdução da PCV7 apresentavam, em sua maioria, resistência múltipla aos antibióticos, inclusive à penicilina (MOORE *et al.*, 2008; REINERT *et al.*, 2010).

Do mesmo modo, a evidência da não-susceptibilidade à penicilina em um isolado do sorotipo 12F do período pós-vacinal pode ser um alerta para o sistema de vigilância epidemiológica em nossa região, principalmente se essa linhagem se estabelecer como a mais prevalente ao longo do tempo, após a introdução da PCV10, conforme os resultados deste trabalho parecem indicar.

A resistência à sulfametoxazol-trimetoprim (39%) e à tetraciclina (20,8%) observada neste estudo está de acordo com o trabalho anterior realizado por Menezes e *et al.* (2011) na nossa região e com outros estudos nacionais (KOETH *et al.*, 2004; BRANDILEONE *et al.*, 2006), podendo estar, em parte, associada ao consumo indiscriminado de antimicrobianos (GOOSSENS, 2009; CORNICK e BENTLEY, 2012).

Quanto à resistência à eritromicina observada em 1 isolado (sorotipo 21) do período pós-vacinal é importante salientar que em algumas regiões do mundo, a resistência aos macrolídeos está ultrapassando a resistência à penicilina, a partir da disseminação de clones resistentes (WOLTER *et al.*, 2008). Se o mesmo vai ocorrer em nossa região, apenas um estudo prospectivo com um período mais longo de vigilância poderá fornecer informações mais conclusivas.

A caracterização genotípica dos isolados de *S. pneumoniae* através da técnica de PFGE mostrou que existe uma grande diversidade genética entre os sorotipos de *S. pneumoniae* não vacinais, com a maioria dos isolados (66,2%) fazendo parte de grupos não clonais.

Dentre os clones identificados, destaca-se o grupo clonal X, composto por dois isolados do sorotipo 19A do período pré-vacinal, não susceptível à penicilina e pertencente ao ST2878. Considerando o banco de dados do MLST (<http://www.mlst.net>) esta Sequência Tipo foi descrita apenas no Brasil. Por outro lado, quando comparamos o grupo X com os padrões eletroforéticos de *S. pneumoniae* obtidos durante a vigilância epidemiológica das meningites pneumocócicas realizado no Hospital Couto Maia, durante o período de 1996 a 2008, verifica-se que este grupo X apresenta 91% de similaridade com isolados de meningite dos sorotipos 23F e 3. É importante lembrar que nos Estados Unidos, o aumento na incidência de isolamento do sorotipo 19A deu-se, em parte, à expansão clonal do ST199 (PAI *et al.*, 2005; WEINBERGER *et al.*, 2011).

Clones internacionais de *S. pneumoniae* foram identificados neste estudo. Assim, o grupo clonal R (ST193), com isolados do sorotipo 18B, foram geneticamente relacionados ao clone mundial Greece²¹-30, bem como os grupos E e W (ST218 – sorotipo 12F), semelhante ao clone Denmark^{12F}-34 e o grupo não clonal M1 (ST180 - sorotipo 3) associado ao clone Netherlands³-31. Esses achados são importantes, principalmente com a continuidade da vigilância e a possível expansão desses clones ao longo do tempo. Com relação ao sorotipo 12F pode ocorrer a expansão do ST218 e/ou do ST8376 (grupo clonal AR), geneticamente semelhante ao grupo AR*, com um isolado de 12F não susceptível à penicilina.

Um isolado do sorotipo 9N foi identificado como pertencente ao ST66. É importante ressaltar que este ST, associado ao sorotipo 14, tem sido considerado como um dos principais e mais prevalentes clones isolados de doença invasiva em Salvador e no Brasil (BRANDILEONE *et al.*, 1998; SOGSTAD *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2008).

Um dos impactos da era das vacinas conjugadas tem sido o fenômeno da troca capsular (*capsular switching*), contribuindo para a ocorrência de doenças causadas por sorotipos que “escapam” da vacina e, conseqüentemente, reduzem o seu efeito (COFFEY *et al.*, 1998; BRUEGGEMANN *et al.*, 2007; WEINBERGER *et al.*, 2011). Os resultados obtidos neste trabalho não permitem sugerir que essa troca capsular tenha ocorrido durante o período estudado. Em primeiro lugar, além da amostragem ser reduzida e corresponder aos anos iniciais pós-implementação da vacina PCV10, não foi possível a caracterização do ST de todos os isolados estudados. Além disto, como o banco de *S. pneumoniae* obtido através da vigilância epidemiológica realizada no Hospital Couto Maia desde 1996 também não possui muitos isolados com seus STs caracterizados, fica difícil uma comparação mais aprofundada.

Sem dúvida nenhuma, o número reduzido de STs caracterizados constitui uma das limitações deste trabalho. Seria ideal se tivesse sido possível, pelo menos, a caracterização dos STs de todos os grupos clonais identificados. Este fato ocorreu alheio a nossa vontade, em função de problemas técnicos com a quebra de aparelhos e/ou de sequências ruins obtidas que tiveram que ser repetidas inúmeras vezes, não permitindo o fechamento total da sequência de alelos que definem o ST.

Por outro lado, esta etapa será finalizada antes da submissão do manuscrito para publicação.

Outro aspecto a ser levantado refere-se à cobertura vacinal. De acordo com o Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações (SI-PNI) que compete ao Ministério da Saúde, a cobertura vacinal da PCV10 em Salvador foi de 78,9% e na Bahia de 81,5% até o ano de 2012, ainda não considerada ideal pelo ministério cuja meta é atingir > de 95% de cobertura (BAHIA, 2012). Além disso, alguns estudos mostram que esses dados percentuais de cobertura não correspondem ao de cobertura vacinal real e que acaba ocorrendo uma superestimação dos valores. Segundo os trabalhos isso acontece por diversos fatores como a falta de uma correta relação entre as doses aplicadas e a idade e intervalos, entre outros (CASSIO *et al.*, 2003).

Apesar dos pacientes serem provenientes de um mesmo hospital, isso não representa uma limitação do estudo já que o Hospital Couto Maia (HCM) é a unidade de saúde terciária de referência do estado da Bahia para doenças infectocontagiosas, responsável por mais de 90% das notificações dos casos de meningite (BAHIA, 2008)

Conforme foi salientado por Afonso *et al.* (2013), qualquer estudo que utiliza um método temporal para determinar os efeitos iniciais de uma vacina pode sofrer variações em função da cobertura vacinal e pelo período *lag* natural entre a vacinação e a proteção (AFONSO *et al.*, 2013). O presente estudo foi realizado nos estágios iniciais pós-implementação da vacina PCV10 em Salvador e qualquer conclusão que possa ser tirada dos resultados aqui obtidos devem ser considerados apenas como uma tendência quanto à distribuição dos sorotipos causadores de meningite em nossa região no período pós-vacinal e sua caracterização molecular.

Este panorama pode ser alterado a medida que o emprego da vacina PCV10 seja ampliada e que um número maior de isolados possa ser estudado. De qualquer maneira, os resultados aqui obtidos servirão de base para as análises futuras em relação aos efeitos da vacinação, sendo esta outra justificativa para a manutenção da vigilância epidemiológica das meningites bacterianas realizada no HCM na cidade de Salvador.

9 CONCLUSÕES

1. Durante os cinco anos de estudo ocorreu uma importante redução da incidência da meningite pneumocócica em Salvador;
2. Foi observada uma redução tanto no número do sorotipos vacinais quanto dos não vacinais;
3. A distribuição de sorotipos não vacinais apresentou uma flutuação, sem o registro da emergência específica de um determinado sorotipo;
4. A maioria dos isolados não-vacinais de *S. pneumoniae* apresentou resistência a um ou mais antibióticos; a não-susceptibilidade à penicilina permanece baixa (6,5%);
5. Os sorotipos não-vacinais de *S. pneumoniae* apresentaram uma grande diversidade genética, com a maioria dos isolados (66,2%) pertencendo a grupos não clonais.
6. A técnica de MLST permitiu a identificação de quatro novos STs e a presença de clones genotipicamente semelhantes aos clones mundiais *Netherlands*³⁻³¹, *Greece*²¹⁻³⁰ e *Denmark*^{12F-34}.
7. É necessária a continuidade da vigilância epidemiológica da meningite pneumocócica, visando avaliar os efeitos benéficos da vacinação e a dinâmica da distribuição de sorotipos em nossa região.

REFERÊNCIAS

ADAM, H. J. et al. Baseline epidemiology of streptococcus pneumoniae serotypes in canada prior to the introduction of the 13-valent pneumococcal vaccine. **Microb. Drug Resist.**, v. 18, n. 2, apr, p. 176-182, 2012.

AFONSO, E. T. et al. Effect of 10-valent pneumococcal vaccine on pneumonia among children, brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 19, n. 4, apr, p. 589-597, 2013.

AMPOFO, K. et al. The changing epidemiology of invasive pneumococcal disease at a tertiary children's hospital through the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine era: A case for continuous surveillance. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 31, n. 3, mar, p. 228-234, 2012.

ANDRADE, A. L. et al. Population-based surveillance for invasive pneumococcal disease and pneumonia in infants and young children in goiania, brazil. **Vaccine**, v. 30, n. 10, feb 27, p. 1901-1909, 2012.

ARDANUY, C. et al. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in older people in spain (2007-2009): Implications for future vaccination strategies. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43619, 2012.

AUSTRIAN, R. Polysaccharide vaccines. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, v. 136B, n. 3, nov-dec, p. 295-307, 1985.

AVERY, O. T.; MACLEOD, C. M.; MCCARTY, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. **J. Exp. Med.**, v. 79, n. 2, feb 1, p. 137-158, 1944.

BAGNOLI, F. et al. A second pilus type in streptococcus pneumoniae is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. **J.Bacteriol.**, v. 190, n. 15, p. 5480-5492, 2008.

BAHIA. Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. Casos Notificados de Meningite – Bahia. [homepage na internet] 2008. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/dqi/deftohtm>. Acesso em: 20 jan 2013.

BAHIA, Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. A vacina pneumocócica 10 valente já está disponível nos 417 municípios. Fonte: http://www1.saude.ba.gov.br/noticias/noticia_imprime.asp?NOTICIA=13857. 2013

BAHIA. Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Situação Epidemiológica das meningites na Bahia**, 2012. DIVEPE e SUVISA. Boletim, v. 6, n. 5, dez. 2012.

BAHIA. Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Situação Epidemiológica das meningites na Bahia**. 2012. DIVEPE e SUVISA. Boletim, v. 7, n. 1, mar. 2013.

BEALL, B. Vaccination with the pneumococcal 7-valent conjugate: A successful experiment but the species is adapting. **Expert. Rev Vaccines**, v. 6, n. 3, Jun, p. 297-300, 2007.

BEALL, B. et al. Pre- and postvaccination clonal compositions of invasive pneumococcal serotypes for isolates collected in the united states in 1999, 2001, and 2002. **J. of Clinical Microbiol.**, v. 44, n. 3, p. 999-1017, 2006.

BENTLEY, S. D. et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. **PLoS Genet.**, v. 2, n. 3, mar, p. e31, 2006.

BEREZIN, E.N. et al. Pneumococcal invasive disease among children <5 years in São Paulo and Uberlândia Brazil in a transition year after imunization. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PNEUMOCOCCI AND PNEUMOCOCCAL DISEASES (ISPPD)**, 2012, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. Poster nº217, p. 248

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. Streptococcus pneumoniae colonisation: The key to pneumococcal disease. **Lancet Infect. Dis.**, v. 4, n. 3, mar, p. 144-154, 2004.

BOWEN, M. K. et al. The optochin sensitivity test: A reliable method for identification of pneumococci. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 49, n. 4, apr, p. 641-642, 1957.

BRANDILEONE, M. C. et al. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive streptococcus pneumoniae in brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, n. Pt 5, may, p. 567-574, 2006.

BRANDILEONE, M. C. et al. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in brazil: Potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. **J. Infect. Dis.**, v. 187, n. 8, apr 15, p. 1206-1212, 2003.

BRANDILEONE, M. C. et al. Geographic distribution of penicillin resistance of streptococcus pneumoniae in brazil: Genetic relatedness. **Microb. Drug Resist.**, v. 4, n. 3, Fall, p. 209-217, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/7732/162/vacinas-ajudam-a-reduzir-casos-de-meningites.html>. Acesso em: 2013.

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 Suppl, jul, p. S67-74, 2006.

BRUEGGEMANN, A. B. et al. Clonal relationships between invasive and carriage streptococcus pneumoniae and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. **J. Infect. Dis.**, v. 187, n. 9, may 1, p. 1424-1432, 2003.

BRUEGGEMANN, A. B. et al. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the united states. **PLoS Patho.**, v. 3, n. 11, p. e168, 2007.

BURGOS, J. et al. The spectrum of pneumococcal empyema in adults in the early 21st century. **Clin. Infect. Dis.**, v. 53, n. 3, aug 1, p. 254-261, 2011.

CAIERÃO, J. et al. Distribution of pneumococcal serotypes after introduction of 10-valent conjugate vaccine: A study involving adults with invasive disease, Porto Alegre, Brazil. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PNEUMOCOCCI AND PNEUMOCOCCAL DISEASES** (ISPPD), 2012, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. Poster nº219, p. 250

CALIX, JUAN J.; NAHM, MOON H. A new pneumococcal serotype, 11e, has a variably inactivated wcj gene. **J. Infect. Dis.**, v. 202, n. 1, p. 29-38, 2010.

CALIX, J. J. et al. Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among streptococcus pneumoniae serotype 20 strains: Discovery of a new pneumococcal serotype. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 33, aug 10, p. 27885-27894, 2012.

CASTAÑEDA, E. et al. Laboratory-based surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin American countries, a SIREVA II project, 2000-2005. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 28, n. 9, p. e265-e270, 2009.

CASTAÑEDA, E. *et al.* Laboratory-based surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin American countries, a SIREVA II project, 2000-2005. **Pediat. Infect. Dis. J.**, 2010.

CASTAÑEDA, E. *et al.* Laboratory-based surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin American countries, a SIREVA II project, 2000-2005. **Pediat. Infect. Dis. J.**, 2012.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Pneumococcal Disease Among Infants and Children - Use of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR**, v. 59, 2010.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention Prevention of pneumococcal disease. **MMWR**, 46, n. RR-8, 1-20, 1997.

CDC. Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease-- united states, 1998-2003. **MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.**, v. 54, n. 36, sep 16, p. 893-897, 2005.

Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, fifteenth informational supplement, 15 th ed. M100-S15. **Clin. Lab. Standards Institute**, Wayne, PA, 2010.

COFFEY, T. J. *et al.* Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of streptococcus pneumoniae. **Mol. Microbiol.**, v. 27, n. 1, jan, p. 73-83, 1998.

CORNICK, J. E.; BENTLEY, S. D. Streptococcus pneumoniae: The evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. **Microbes. Infect.**, v. 14, n. 7-8, jul, p. 573-583, 2012.

CORSO, A. *et al.* Molecular characterization of penicillin-resistant streptococcus pneumoniae isolates causing respiratory disease in the united states. **Microb. Drug Resist.**, v. 4, n. 4, Winter, p. 325-337, 1998.

CROUCHER, N. J. *et al.* Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. **Science**, v. 331, n. 6016, jan 28, p. 430-434, 2011.

DAGAN, R. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant streptococcus pneumoniae. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 15 Suppl 3, n., apr, p. 16-20, 2009.

DOS SANTOS, S. R. et al. Serotype distribution of streptococcus pneumoniae isolated from patients with invasive pneumococcal disease in brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. **Vaccine**, jun 6, 2013.

ENRIGHT, M. C.; SPRATT, B. G. A multilocus sequence typing scheme for streptococcus pneumoniae: Identification of clones associated with serious invasive disease. **Microbiology**, v. 144 (Pt 11), nov, p. 3049-3060, 1998.

FARKOUH, R. A. et al. Cost-effectiveness models of pneumococcal conjugate vaccines: Variability and impact of modeling assumptions. **Expert Rev. Vaccines**, v. 11, n. 10, oct, p. 1235-1247, 2012.

GERTZ, R. E., JR. et al. Increased penicillin nonsusceptibility of nonvaccine-serotype invasive pneumococci other than serotypes 19a and 6a in post-7-valent conjugate vaccine era. **J. Infect. Dis.**, v. 201, n. 5, mar, p. 770-775, 2010.

GOLUBCHIK, T. et al. Pneumococcal genome sequencing tracks a vaccine escape variant formed through a multi-fragment recombination event. **Nat. Genet.**, v. 44, n. 3, mar, p. 352-355, 2012.

GONZALEZ, B. E. et al. Streptococcus pneumoniae serogroups 15 and 33: An increasing cause of pneumococcal infections in children in the united states after the introduction of the pneumococcal 7-valent conjugate vaccine. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, n. 4, apr, p. 301-305, 2006.

GOOSSENS, H. Antibiotic consumption and link to resistance. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 15 Suppl 3, n., apr, p. 12-15, 2009.

GRIFFITH, F. The significance of pneumococcal types. **J. Hyg (Lond)**, v. 27, n. 2, jan, p. 113-159, 1928.

HAUSDORFF, W. P. The roles of pneumococcal serotypes 1 and 5 in paediatric invasive disease. **Vaccine**, v. 25, n. 13, mar 22, p. 2406-2412, 2007.

HELFFERTY, M. et al. The epidemiology of invasive pneumococcal disease in the canadian north from 1999 to 2010. **Int. J. Circumpolar Health**, v. 72, 2013.

HENRICHSEN, J. Typing of streptococcus pneumoniae: Past, present, and future. **Am J. Med.**, v. 107, n. 1A, jul 26, p. 50S-54S, 1999.

HENRIQUES, B. et al. Molecular epidemiology of streptococcus pneumoniae causing invasive disease in 5 countries. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 3, Sep, p. 833-839, 2000.

HICKS, L. A. et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (pcv7) serotypes in the united states during the era of widespread pcv7 vaccination, 1998-2004. **J. Infect. Dis.**, v. 196, n. 9, nov 1, p. 1346-1354, 2007.

ISAACMAN, D. J.; MCINTOSH, E. D.; REINERT, R. R. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among streptococcus pneumoniae isolates in young children in europe: Impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 14, n. 3, mar, p. e197-209, 2010.

JEDRZEJAS, M. J. Pneumococcal virulence factors: Structure and function. **Microb. and Molecular Biol. Reviews**, v. 65, n. 2, p. 187-207, 2001.

JEFFERIES, J. M. et al. Genetic analysis of diverse disease-causing pneumococci indicates high levels of diversity within serotypes and capsule switching. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 12, dec, p. 5681-5688, 2004.

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

KAPLAN, S. L. et al. Serotype 19a is the most common serotype causing invasive pneumococcal infections in children. **Pediatrics**, v. 125, n. 3, mar, p. 429-436, 2010.

KLUGMAN, K. P. The successful clone: The vector of dissemination of resistance in streptococcus pneumoniae. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 50 suppl s2, n., dec, p. 1-5, 2002.

KOETH, L. M. et al. Antimicrobial resistance of streptococcus pneumoniae and haemophilus influenzae in sao paulo, brazil from 1996 to 2000. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 23, n. 4, apr, p. 356-361, 2004.

KONG, F. et al. A molecular-capsular-type prediction system for 90 streptococcus pneumoniae serotypes using partial cpsa-cpsb sequencing and wzy- or wzx-specific pcr. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, n. pt 4, apr, p. 351-356, 2005.

LAGOS, R. et al. Age- and serotype-specific pediatric invasive pneumococcal disease: Insights from systematic surveillance in Santiago, Chile, 1994-2007. **J. Infect. Dis.**, v. 198, n. 12, dec 15, p. 1809-1817, 2008.

LEPOUTRE, A. et al. Impact of infant pneumococcal vaccination on invasive pneumococcal diseases in France, 2001-2006. **Euro. Surveill.**, v. 13, n. 35, aug 28, p. 2008.

LLULL, D. et al. A single gene (tts) located outside the cap locus directs the formation of streptococcus pneumoniae type 37 capsular polysaccharide. Type 37 pneumococci are natural, genetically binary strains. **J. Exp. Med.**, v. 190, n. 2, Jul 19, p. 241-251. 1999.

LYNCH, J. P.; ZHANEL, G. G. Escalation of antimicrobial resistance among streptococcus pneumoniae: Implications for therapy. **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, v. 26, n. 6, dec, p. 575-616, 2005.

LYNCH, J. P.; ZHANEL, G. G. Streptococcus pneumoniae: Does antimicrobial resistance matter? **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, v. 30, n. 2, apr, p. 210-238, 2009.

LYNCH, J. P.; ZHANEL, G. G. Streptococcus pneumoniae: Epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 16, n. 3, may, p. 217-225, 2010.

MARTTINEN, P. et al. Detection of recombination events in bacterial genomes from large population samples. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, n. 1, jan, p. e6, 2012.

MARTYNOVA, A. V.; TURKUTIUKOV, V. B. Identification of the optochin-resistant streptococcus pneumoniae strains. **Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.**, v., n. 6, nov-dec, p. 65-69, 2005.

MCDANIEL, L. S. et al. Pspa, a surface protein of streptococcus pneumoniae, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 1, jan, p. 222-228, 1991.

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

MITCHELL, A. M.; MITCHELL, T. J. Streptococcus pneumoniae: Virulence factors and variation. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 16, n. 5, may, p. 411-418, 2010.

MOORE, MATTHEW R. et al. Population snapshot of emergent streptococcus pneumoniae serotype 19a in the united states, 2005. **J. of Infect. Dis.**, v. 197, n. 7, p. 1016-1027, 2008.

MOORE, M. R. et al. Population snapshot of emergent streptococcus pneumoniae serotype 19a in the united states, 2005. **J. Infect. Dis.**, v. 197, n. 7, apr 1, p. 1016-1027, 2008.

MUNOZ, R. et al. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23f streptococcus pneumoniae. **J. Infect. Dis.**, v. 164, n. 2, aug, p. 302-306, 1991.

NUORTI, J. P.; WHITNEY, C. G. Prevention of pneumococcal disease among infants and children - use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine - recommendations of the advisory committee on immunization practices (acip). **MMWR Recomm Rep.**, v. 59, n. RR-11, dec 10, p. 1-18, 2010.

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, sep 12, p. 893-902, 2009.

OBERT, C. et al. Identification of a candidate streptococcus pneumoniae core genome and regions of diversity correlated with invasive pneumococcal disease. **Infect. and Immunity**, v. 74, n. 8, p. 4766-4777, 2006.

PAI, R. et al. Postvaccine genetic structure of streptococcus pneumoniae serotype 19a from children in the united states. **J. Infect. Dis.**, v. 192, n. 11, dec 1, p. 1988-1995, 2005.

PANTOSTI, A. et al. Inferring the potential success of pneumococcal vaccination in italy: Serotypes and antibiotic resistance of streptococcus pneumoniae isolates from invasive diseases. **Microb. Drug Resist.**, v. 9 suppl 1, n., p. S61-68, 2003.

PILISHVILI, T. et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. **J. Infect. Dis.**, v. 201, n. 1, jan 1, p. 32-41, 2010.

PILISHVILI, T. et al. Risk factors for invasive pneumococcal disease in children in the era of conjugate vaccine use. **Pediatrics**, v. 126, n. 1, jul, p. e9-17, 2010.

PILLAI, D. R. et al. Genome-wide dissection of globally emergent multi-drug resistant serotype 19a streptococcus pneumoniae. **BMC Genomics**, v. 10, n., p. 642, 2009.

REINERT, R.; JACOBS, M. R.; KAPLAN, S. L. Pneumococcal disease caused by serotype 19a: Review of the literature and implications for future vaccine development. **Vaccine**, v. 28, n. 26, jun 11, p. 4249-4259, 2010.

REINERT, R. R.; PARADISO, P.; FRITZELL, B. Advances in pneumococcal vaccines: The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine received market authorization in europe. **Expert Rev. Vaccines**, v. 9, n. 3, mar, p. 229-236, 2010.

REIS, J. N. et al. Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of streptococcus pneumoniae from meningitis patients in salvador, brazil. **J. Clinical Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 275-277, 2002.

REIS, J. N. et al. Transmission of streptococcus pneumoniae in an urban slum community. **J Infect.**, v. 57, n. 3, Sep, p. 204-213. 2008.

RICHTER, S. S. et al. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant streptococcus pneumoniae in the united states, 2004-2005. **Clin. Infect. Dis.**, v. 48, n. 3, Feb 1, p. e23-33. 2009.

RICHTER, S. S. et al. Pneumococcal serotypes before and after introduction of conjugate vaccines, united states, 1999-2011(1.). **Emerg. Infect. Dis.**, v. 19, n. 7, jul, p. 1074-1083, 2013.

RODENBURG, G. D. et al. Effects of pneumococcal conjugate vaccine 2 years after its introduction, the netherlands. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 16, n. 5, may, p. 816-823, 2010.

RUCKINGER, S.; VAN DER LINDEN, M.; VON KRIES, R. Effect of heptavalent pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease in preterm born infants. **BMC Infect. Dis.**, v. 10, n., p. 12, 2010.

RUCKINGER, S. et al. Childhood invasive pneumococcal disease in germany between 1997 and 2003: Variability in incidence and serotype distribution in absence of general pneumococcal conjugate vaccination. **Vaccine**, v. 26, n. 32, jul 29, p. 3984-3986, 2008.

SHARMA, D. et al. Pneumococcal carriage and invasive disease in children before introduction of the 13-valent conjugate vaccine: Comparison with the era before 7-valent conjugate vaccine. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 32, n. 2, feb, p. e45-53, 2013.

SOGSTAD, M. K.; HOIBY, E. A.; CAUGANT, D. A. Molecular characterization of non-penicillin-susceptible streptococcus pneumoniae in norway. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 9, sep, p. 3225-3230, 2006.

SPRATT, B. G. Exploring the concept of clonality in bacteria. **Methods Mol. Biol.**, v. 266, n., p. 323-352, 2004.

TAN, T. Q. Pediatric invasive pneumococcal disease in the united states in the era of pneumococcal conjugate vaccines. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 25, n. 3, jul, p. 409-419, 2012.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 9, sep, p. 2233-2239, 1995.

TRABULSI, L.R., ALTETHUM, F. (Eds.) e cols. **Microbiologia**. 5ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

VANDERKOOI, O. G. et al. Predicting antimicrobial resistance in invasive pneumococcal infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, n. 9, may 1, p. 1288-1297, 2005.

VARVIO, S. L. et al. Evolution of the capsular regulatory genes in streptococcus pneumoniae. **J. Infect. Dis.**, v. 200, n. 7, oct 1, p. 1144-1151, 2009.

VESIKARI, T. et al. Immunogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable haemophilus influenzae protein d conjugate vaccine (phid-cv) compared to the licensed 7vcrm vaccine. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 28, n. 4 Suppl, apr, p. S66-76, 2009.

WEINBERGER, D. M.; MALLEY, R.; LIPSITCH, M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. **Lancet**, v. 378, n. 9807, dec 3, p. 1962-1973, 2011.

WHITNEY, C. G. et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, n. 18, may 1, p. 1737-1746, 2003.

WHO. Position paper: Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization. **Weekly Epidem. Record**. 2007; 82 (12): 93 – 104.

WHO. Progress in introduction of Pneumococcal Conjugate Vaccine-Worldwide, 2000-2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2013, 62: 308-11. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em 2013.

WHO. **Immunization surveillance, assessment and monitoring: Estimated Hib and pneumococcal deaths for children under 5 years of age, 2000.** Fonte: http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/Pneumo_hib_estimates_2000/en/index.html. Acesso em 2013.

WHO/IVB/11.09: **Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*.** Fonte: http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/WHO_IVB_11.09_eng.pdf. Acesso em: 2011

WOLTER, N. et al. Molecular basis and clonal nature of increasing pneumococcal macrolide resistance in south africa, 2000-2005. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 32, n. 1, jul, p. 62-67, 2008.

WYRES, K. L. et al. Pneumococcal capsular switching: A historical perspective. *J. Infect. Dis.*, v. 207, n. 3, feb 1, p. 439-449, 2013.

WYRES, K. L. et al. Evidence of antimicrobial resistance-conferring genetic elements among pneumococci isolated prior to 1974. *BMC Genomics*, v. 14, n., p. 500, 2013.

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

APÊNDICE I

Relação dos *primers* empregados para a sorotipagem dos isolados de *S. pneumoniae* através da técnica de Multiplex-PCR

Oligonucleotídeo	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)*
1-f	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA	280
1-r	CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C	
2-f	TAT CCC AGT TCA ATA TTT CTC CAC TAC ACC	290
2-r	ACA CAA AAT ATA GGC AGA GAG AGA CTA CT	
3-f	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G	371
3-r	CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G	
4-f	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G	430
4-r	GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G	
5-f	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG	362
5-r	GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG	
6A/6B/6C/6D-f	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG	250
6A/6B/6C/6D-r	TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA	
6C/6D-f	CAT TTT AGT GAA GTT GGC GGT GGA GTT	727
6C/6D-r	AGC TTC GAA GCC CAT ACT CTT CAA TTA	
7C/(7B/40)-f	CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC	260
7C/(7B/40)-r	GGG A GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC	
7F/7A-f	TCC AAA CTA TTA CAG TGG GAA TTA CGG	599
7F/7A-r	ATA GGA ATT GAG ATT GCC AAA GCG AC	
8-f	GAA GAA ACG AAA CTG TCA GAG CAT TTA CAT	201
8-r	CTA TAG ATA CTA GTA GAG CTG TTC TAG TCT	
9N/9L-f	GAA CTG AAT AAG TCA GAT TTA ATC AGC	516
9N/9L-r	ACC AAG ATC TGA CGG GCT AAT CAA T	
9V/9A-f	GGG TTC AAA G TC AGA CAG TG A ATC TTA A	816
9V/9A-r	CCA TGA ATG A AA TCA ACA TT G TCA GTA GC	
10A- f	GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC	628
10A-r	GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C	

* pb = pares de bases

APÊNDICE I - CONTINUAÇÃO

Oligonucleotídeo	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)*
10F/(10C/33C)- f	GGA GTT TAT CGG TAG TGC TCA TTT TAG CA	248
10F/(10C/33C)-r	CTA ACA AAT TCG CAA CAC GAG GCA ACA	
11A/11D-f	GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G	463
11A/11D-r	GAT TAT GAG TGT AAT TTA TTC CAA CTT CTC CC	
12F/(12A/44/46)-f	GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G	376
12F/(12A/44/46)-r	CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC	
13-f	TAC TAA GGT AAT CTC TGG AAA TCG AAA GG	655
13-r	CTC ATG CAT TTT ATT AAC CG C TTT TTG TTC	
14-f	GAA ATG TTA CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT	189
14-r	GCC AAT ACT TCT TAG TCT CTC AGA TGA AT	
15A/15F-f	ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C	434
15A/15F-r	GAT CTA GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC	
15B/15C-f	TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA	496
15B/15C-r	CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C	
16F-f	GAA TTT TTC AGG CGT GGG TGT TAA AAG	717
16F-r	CAG CAT ATA GCA CCG CTA AGC AAA TA	
17F-f	TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG	693
17F-r	GAT GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC	
18/(18A/18B/18C/18F)-f	CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC	573
18/(18A/18B/18C/18F)-r	TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC	
19A-f	GAG AGA TTC ATA ATC TTG CAC TTA GCC A	566
19A-r	CAT AAT AGC TAC AAA TGA CTC ATC GCC	
19F-f	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C	304
19F-r	GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG	
20-f	GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G	514
20-r	CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC	

* pb = pares de bases

APÊNDICE I - CONTINUAÇÃO

Oligonucleotídeo	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)*
21-f	CTA TGG TTA TTT CAA CTC AAT CGT CAC C	192
21-r	GGC AAA CTC AGA CAT AGT ATA GCA TAG	
22F/22A-f	GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA TTG TC	643
22F/22A-r	CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC	
23A-f	TAT TCT AGC AAG TGA CGA AGA TGC G	722
23A-r	CCA ACA TGC TTA AAA ACG CTG CTT TAC	
23B-f	CCA CAA TTA G CG CTA TAT TCA TTC AAT CG	199
23B-r	GTC CAC GCT GAA TAA AAT GAA GCT CCG	
23F-f	GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC	384
23F-r	CAC AAC ACC TAA CAC TCG ATG GCT ATA TGA TTC	
24/(24A, 24B, 24F)-f	GCT CCC TGC TAT TGT AAT CTT TAA AGA G	99
24/(24A, 24B, 24F)-r	GTG TCT TTT ATT GAC TTT ATC ATA GGT CGG	
31-f	GGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGT GC	701
31-r	CCG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC	
33F/(33A/37)-f	GAA GGC AAT CAA TGT GAT TGT GTC GCG	338
33F/(33A/37)-r	CTT CAA AAT GAA GAT TAT AGT ACC CTT CTA C	
34-f	GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC	408
34-r	CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC	
35A/(35C/42)-f	ATT ACG ACT CCT TAT GTG ACG CGC ATA	280
35A/(35C/42)-r	CCA ATC CCA AGA TAT ATG CAA CTA GGT T	
35B-f	GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG	677
35B-r	CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G	
35F/47F-f	GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A	517
35F/47F-r	GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC	
38/25F/25A-f	CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG	574
38/25F/25A-r	ATG TTT GAA TTA AAG CTA ACG TAA CAA TCC	
39-f	TCA TTG TAT TAA CCC TAT GCT TTA TTG GTG	98
39-r	GAG TAT CTC CAT TGT ATT GAA ATC TAC CAA	
cpsA-f	GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC	160
cpsA-r	GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	

* pb = pares de bases

ANEXO I

Relação das concentrações mínimas inibitórias para os diferentes antimicrobianos, de acordo com as recomendações do CLSI, 2010.

	Concentração Mínima Inibitória ($\mu\text{g/mL}$)			<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619
	R*	I	S	
Cefotaxima	≥ 2	1	$\leq 0,5$	0,03 – 0,125
Clindamicina	≥ 1		$\leq 0,25$	0,03 – 0,125
Cloranfenicol	≥ 8		≤ 4	2 – 8
Eritromicina	≥ 1	0,5	$\leq 0,25$	0,03 – 0,125
penicilina (meningite)**	≥ 0.125		$\leq 0,06$	0,25 – 1
Levofloxacina	≥ 8		≤ 2	0,5 – 2
Rifampicina	≥ 4		≤ 1	0,015 – 0,06
Tetraciclina	≥ 8	4	≤ 2	0,06 – 0,5
trimetoprim- sulfametoxazol	$\geq 4/76$		$\leq 0,5/9,5$	0,125/2,4 - 1/19
Vancomicina	-	-	≤ 1	0,125 – 0,5

*R= resistente, I= intermediário, S= sensível

** pontos de corte para amostras de meningite