

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

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

**TESE DE DOUTORADO**

**IMPACTO DA VACINA PNEUMOCÓCICA CONJUGADA  
10-VALENTE NA MENINGITE PNEUMOCÓCICA NA REGIÃO  
METROPOLITANA DE SALVADOR, BAHIA**

**JAILTON DE AZEVEDO SILVA JÚNIOR**

**Salvador - Bahia**

**2015**

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

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

**IMPACTO DA VACINA PNEUMOCÓCICA CONJUGADA  
10-VALENTE NA MENINGITE PNEUMOCÓCICA NA REGIÃO  
METROPOLITANA DE SALVADOR, BAHIA**

**JAILTON DE AZEVEDO SILVA JÚNIOR**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Joice Neves Reis Pedreira

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Doutor.

**Salvador - Bahia**

**2015**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S586a Silva Junior, Jailton de Azevedo  
Impacto da vacina pneumocócica conjugada 10-valente na meningite pneumocócica na região metropolitana de Salvador, Bahia / Jailton de Azevedo Silva Junior . - 2015.  
119 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Profª. Dra. Joice Neves Reis Pedreira, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

Tese (Doutorado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015.

1. *Streptococcus pneumoniae*. 2. Meningite. 2. Vacina Pneumocócica. I. Título.

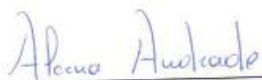
CDU 616.981.21(813.8)

“IMPACTO DA VACINA PNEUMOCÓCICA CONJUGADA 10-VALENTE NA MENINGITE  
PNEUMOCÓCICA NA REGIÃO METROPOLITANA DE SALVADOR, BAHIA”

**JAILTON DE AZEVEDO SILVA JÚNIOR**

FOLHA DE APROVAÇÃO

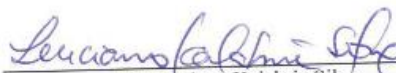
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Alcina Marta de Souza Andrade  
Professora Adjunta  
EBMSP



Dra. Paula Carvalhal Lage Von Buettner Ristow  
Professora adjunta  
UFBA



Dr. Luciano Kalabric Silva  
Pesquisador  
CPqGM/FIOCRUZ

*A Sara Menezes Reis de Azevedo, obrigado  
pelo seu imenso amor e suporte.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar e sempre. Por meio Dele e para Ele todas as coisas.

À minha orientadora e amiga, Dra. Joice Neves Reis Pedreira, por ter me acolhido, confiado em mim e me “adotado” nesta trajetória de formação científica durante tantos anos. Nunca conseguirei retribuir tamanha gratidão que há em mim.

Aos meus pais, Jailton Azevedo e Norma Dias, por todo o zelo e cuidado comigo na formação do meu caráter.

Aos meus irmãos Patrick e Peter Souza e suas respectivas esposas, pela amizade e companheirismo sempre.

Aos colegas de equipe FIOCRUZ, Milena Soares, Ana Paula Menezes, Cristiane Cardoso, Soraia Machado, Maíra Silva pela colaboração durante as etapas metodológicas de execução deste trabalho; Éder dos Anjos e Leila Campos pela valiosa colaboração durante as análises e o preparo dos manuscritos.

A todos os estudantes de iniciação científica que executaram atividades tão importantes durante a coleta e processamento dos dados.

Aos colegas e o chefe do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, prof. Mitermayer Galvão dos Reis, que vivenciaram todas as etapas do estudo e que de alguma forma colaboraram neste processo.

Aos parceiros do Hospital Couto Maia, Marcelo Bastos e Ronaldo Ribeiro, bem como toda a sua equipe, pela colaboração que permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pais dos pacientes e os mesmos, os quais, sem esta cooperação, este estudo não poderia ser realizado.

Aos funcionários da Biblioteca do CPqGM, em especial à Ana Maria Fiscina, pelo suporte dado na confecção da versão final.

Às instituições que fomentaram com recursos financeiros todo o processo de execução e todas as etapas do estudo: a FAPESB (PP-SUS0001/2009) e o CNPq (482755/2010-5).

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pela oportunidade de realização do doutorado e a CAPES pelo financiamento da minha bolsa.

“É Ele quem muda o tempo,  
muda as estações, remove e estabelece reis,  
dá sabedoria as sábios e entendimento aos entendidos.”

*Profeta Daniel*

SILVA JUNIOR, Jailton de Azevedo Silva. Impacto da vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV10) na meningite pneumocócica na região metropolitana de Salvador, Bahia. 119 f. il. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Em 2010, a vacina conjugada 10-valente (PCV10) foi incorporada ao programa nacional de imunizações (PNI) brasileiro. Este imunobiológico confere imunização contra os dez principais tipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*, patógeno responsável por diversas manifestações clínicas e com elevada contribuição nas taxas de incidência e mortalidade por meningite, que é a condição clínica mais grave. **OBJETIVO:** O presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto da PCV10 na epidemiologia da meningite pneumocócica na região metropolitana de Salvador (RMS) Bahia, comparando o período anterior (2008-2010) e posterior (2011-2013) a sua utilização, bem como realizar uma caracterização molecular minuciosa a partir de uma série histórica (1996-2012) entre os isolados resistentes a penicilina (PNSSP com CIM $\geq$  0,125  $\mu$ g/mL) e para os sorotipos não-vacinais (2008-2012). **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram incluídos todos casos de meningite pneumocócica confirmados laboratorialmente no período entre 1996 a 2013. Taxas de incidência para a Salvador e RMS foram calculadas com base nos dados populacionais do IBGE/2010. A determinação do tipo capsular foi realizada através da técnica de Multiplex-PCR e/ou reação de Quellung. A sensibilidade a nove antimicrobianos foi testada através das técnicas disco-difusão, microdiluição e E-test. Para caracterizar o perfil molecular foram aplicadas as técnicas de genotipagem de PFGE e MLST. **RESULTADOS:** Um total de 939 casos de meningite pneumocócica foram identificados no período de 1996-2013, sendo que 70 casos ocorrem entre 2011 a 2013 (período pós-vacinal). A incidência de meningite pneumocócica em todas as faixas etárias na RMS reduziu de 0,70 casos/100.000 habitantes para 0,59 casos/100.000 habitantes considerando o período de três anos antes e após a vacinação com PCV10 [ $p < 0,05$ ; RR IC 95%: 1,46 (1,03-2,05)]. Esta redução foi significativa na faixa etária de 0-2 anos e nos casos por sorotipos relacionados à PCV10. Não houve aumento significativo de casos por sorotipos não vacinais nesta casuística, apesar do surgimento de casos por sorotipos não-vacinais não detectados anteriormente na série histórica de MP (10F, 21, 22F, 15A e 24F). Os isolados resistentes à penicilina analisados na série histórica se restringiram a 13 sorotipos, entre os quais: 14 (45,1 %; 78/173), 23F (19,1%; 33/173), 6B (14,4 %; 25/173), 19F (9,2 %; 16/173) e 19A (5,2 %; 9/173). 94% dos casos não-susceptíveis à penicilina (PNSSP) foram de sorotipos vacinais. Os grupos clonais caracterizados pelo PFGE/MLST predominantes ao longo dos anos foram representados pelo sorotipo 14, denominado grupo A/ST 66 [35,3 % (61/173)] e grupo GK/ST 156 [4,6 % (8/173)], este último associado com níveis elevados de resistência a penicilina e ceftriaxona. Não foram detectados grupos clonais emergentes associados a tipos capsulares não-vacinais. **CONCLUSÕES:** Estes achados sugerem que a introdução da PCV10 modificou a epidemiologia da meningite pneumocócica na população estudada.

**Palavras-chave:** *Streptococcus pneumoniae*, meningite, vacina pneumocócica.



SILVA JUNIOR, Jailton de Azevedo Silva. Impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV10) on pneumococcal meningitis in the metropolitan region of Salvador, Bahia. 119 f. il. Thesis (PhD) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** In 2010, the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV10) was introduced into the Brazilian national immunization program (NIP). This immunobiological provides immunization against the main ten capsular types of *Streptococcus pneumoniae*, the pathogen responsible for different clinical manifestations and high contribution in the incidence and mortality from meningitis, which is the most severe clinical condition. **OBJECTIVE:** This study aimed to evaluate the impact of PCV10 in the epidemiology of pneumococcal meningitis in the metropolitan area of Salvador (RMS) Bahia, comparing the previous (2008-2010) and after (2011-2013) periods its use, as well as conduct a thorough molecular characterization from a historical series (1996-2012) among isolates resistant to penicillin (PNSSP with CIM $\geq$  0.125 g / ml) and non-vaccine serotypes (2008-2012). **MATERIAL AND METHODS:** We included all cases of pneumococcal meningitis laboratory confirmed for the period 1996 to 2013. Incidence rates for Salvador and RMS were calculated based on population data from IBGE/2010. The capsular type determination was performed by multiplex PCR and/or Quellung reaction. Isolates Nine antibiotics were tested by disk-diffusion test, broth micro-dilution and E-test. To characterize the molecular profiling techniques were applied genotyping PFGE and MLST. **RESULTS:** A total of 939 cases of pneumococcal meningitis were identified during 1996-2013 period, with 70 cases occurring between 2011-2013 (post-vaccination period). The incidence of pneumococcal meningitis in all age groups in the RMS decreased from 0.70 cases / 100,000 inhabitants to 0.59 cases / 100,000 inhabitants considering the three-year period before and after vaccination with PCV10 [p <0.05; RR 95% CI: 1.46 (1.03 to 2.05)]. This reduction was significant in the age group 0-2 years and in cases by serotypes related to PCV10. There was no significant increase in cases by serotypes not vaccine in this series, despite the emergence of cases by serotypes not-vaccine previously undetected in the historical series of MP (10F, 21, 22F, 15A and 24F). The penicillin resistant isolates analyzed the historical series were restricted to 13 serotypes, including: 14 (45.1%; 78/173), 23F (19.1%; 33/173), 6B (14.4%; 25/173), 19F (9.2%, 16/173) and 19A (5.2%, 9/173). 94% of non-susceptible to penicillin cases (PNSSP) were vaccine serotypes. Clonal groups characterized by PFGE / MLST predominant over the years have been represented by serotype 14, group called A / ST 66 [35.3% (61/173)] and Group GK / TS 156 [4.6% (8/173) ], the latter associated with elevated levels of penicillin and ceftriaxone resistance. Not were detected emerging clonal groups associated with capsular types non-vaccination. **CONCLUSIONS:** These findings suggest that the introduction of PCV10 changed the epidemiology of pneumococcal meningitis in the population studied.

**Key-words:** *Streptococcus pneumoniae*, meningitis, pneumococcal vaccine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

**Figura 1.** Principais fatores de virulência em *S. pneumoniae*. **14**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                    |  |
|--------------------|--|
| CLSI               | “Clinical and Laboratory Standards Institute” (Instituto de Padronização de Laboratório Clínico) |
| CDC                | “Centers for Diseases Control Prevention” (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)            |
| CIM                | Concentração Inibitória Mínima   |
| CRM <sub>197</sub> | “Cross-Reactive Material” (Variante não Tóxica da Toxina Diftérica)                              |
| Datp               | Deoxiadenosina trifosfato  |
| dCTP               | Deoxicitidina trifosfato   |
| dGTP               | Deoxiguanosina trifosfato  |
| DPI                | Doença pneumocócica invasiva   |
| Dntp               | Deoxirribonucleotídeo trifosfato   |
| dTTP               | Deoxitimidina trifosfato   |
| EDTA               | Ácido etilenodiamina tetracético   |
| HCM                | Hospital Couto Maia  |
| IBGE               | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  |
| IPD                | “Pneumococcal invasive disease” (Doença pneumocócica invasiva)                                   |
| LACEN              | Laboratório Central de Saúde Pública   |
| LCR                | Líquido Cefalorraquidiano  |
| LEMB               | Laboratório de Epidemiologia Molecular e Bioestatística  |
| LPBM               | Laboratório de Patologia e Biologia Molecular  |
| MenC               | Vacina Meningocócica C Conjugada   |
| MLST               | “Multilocus Sequence Typing” (Tipagem por Sequenciamento de Multilocus)                          |
| NEB                | Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística   |
| NS                 | Não-susceptível  |
| NT                 | Não-tipável  |
| NVT                | “Non-Vaccine Type” (Tipo não-vacinal)  |

|         |   |
|---------|---|
| OMS     | Organização Mundial de Saúde  |
| PCR     | “Polimerase Chain Reaction” (Reação da Polimerase em Cadeia)        |
| PCV10   | Vacina Pneumocócica Conjugada 10-Valente                            |
| PCV13   | Vacina Pneumocócica Conjugada 13-Valente                            |
| PCV7    | Vacina Pneumocócica Conjugada 7-Valente                             |
| PFGE    | “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (Eletroforese em Campo Pulsátil) |
| PNI     | Programa Nacional de Imunizações                                    |
| PNSSP   | “Penicilin Non-Susctible Streptococcus pneumoniae”                  |
| PPV     | Vacina Pneumocócica Polissacarídica (23-Valente)                    |
| RR      | Risco Relativo  |
| S       | Sensível  |
| SESAB   | Secretaria de Saúde do Estado da Bahia                              |
| SLV     | “Single Locus Variant” ( <i>Locus variante simples</i> )            |
| ST      | Sequência Tipo  |
| STX-TMP | Sulfametoxazol-trimetoprim  |
| TE      | Tris-EDTA   |
| TSA     | Ágar Trypticato de Soja   |

## SUMÁRIO

|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                       | 12 |
| 1.1      | HISTÓRICO E DESCOBERTA: PNEUMOCOCO.....       | 12 |
| 1.2      | O PATÓGENO: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS.....   | 13 |
| 1.3      | MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....                   | 16 |
| 1.4      | VACINAS PNEUMOCÓCICAS: MEDIDAS DE PREVENÇÃO.. | 16 |
| 1.5      | RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....          | 18 |
| 1.6      | EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA PNEUMOCÓCICA.....     | 19 |
| <b>2</b> | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....                    | 22 |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....                        | 25 |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL.....                           | 25 |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                    | 25 |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b> .....                       | 26 |
| 4.1      | CAPÍTULO 1.....                               | 26 |
| 4.1.1    | Prefácio do Artigo 1.....                     | 26 |
| 4.2      | CAPÍTULO 2.....                               | 42 |
| 4.2.1    | Prefácio do Artigo 2.....                     | 42 |
| 4.3      | CAPÍTULO 3.....                               | 53 |
| 4.3.1    | Prefácio do Artigo 3.....                     | 53 |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....                        | 68 |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....                       | 77 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                      | 78 |
|          | <b>APÊNDICE</b> .....                         |    |
|          | <b>ANEXOS</b> .....                           |    |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRICO E DESCOBERTA: PNEUMOCOCO

*Streptococcus pneumoniae*, patógeno também conhecido como pneumococo, foi descoberto por dois pesquisadores quase que simultaneamente, Sternberg em setembro de 1880 nos Estados Unidos da América e Pauster em dezembro do mesmo ano na França, através do isolamento do microorganismo em ratos inoculados com saliva humana. A princípio, a nova espécie descoberta foi denominada de “*Micrococcus Pasteuri, Sternberg*”. No decorrer de alguns anos, passou a ser chamada de *Streptococcus pneumoniae*, “*Streptococcus*” por apresentar pelo método de coloração do Gram a mesma estrutura dos estreptococos (cocos organizados em cadeias) e “*pneumoniae*” por ser considerado agente etiológico da pneumonia. Carl Friedländer relacionou este patógeno à pneumonia em 1882 quando examinava cortes histológicos de pulmões de oito pacientes; depois outros pesquisadores relacionaram esse patógeno com outras doenças como a meningite, artrite, sepse e sinusite (AUSTRIAN, 1985).

A introdução da penicilina na década de 40 foi um grande avanço no tratamento das doenças causadas por *S. pneumoniae*. Entretanto, o aumento da resistência do pneumococo à penicilina e a outros antimicrobianos mundialmente, que foi observado nos anos 90, ocasionou a busca de vacinas específicas contra este patógeno. Com isso, a prevenção foi a estratégia mais indicada para redução das taxas de incidência e mortalidade das doenças pneumocócicas.

## 1.2. O PATÓGENO: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

*S. pneumoniae*, com relação às características morfo-tintoriais, são cocos Gram positivos encapsulados com um diâmetro de 0,5-1,25  $\mu\text{m}$ , dispendo-se aos pares ou em cadeias curtas, com as bordas circunvizinhas achatadas e às vezes com extremidades lanceoladas, forma reconhecida como “chama de vela” ou “lanceta”.

Similar às demais espécies do gênero *Streptococcus*, são bactérias anaeróbias facultativas, não produzem catalase e crescem bem em ágar sangue em atmosfera enriquecida com dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). O aspecto macroscópico das colônias quando crescidas em ágar sangue apresenta uma cor esverdeada, possuindo a capacidade de hemolisar parcialmente o meio de cultivo, o que é denominado  $\alpha$ -hemólise (KADIOGLU et al., 2008). A estrutura celular do *S. pneumoniae* consiste em uma membrana com dupla camada lipídica envolvida por uma parede bacteriana, formada de peptidoglicano associado ao polissacarídeo C, sendo este último idêntico a todos os sorotipos da bactéria (OBARO; ADEGBOLA, 2002; KADIOGLU et al., 2008).

*S. pneumoniae* possui vários determinantes de virulência, entre estes estão a capsula polissacarídica, pneumolisinas, moléculas de superfície tais como neuraminidases, autolisinas, proteínas ligadoras de colina, entre outros fatores que favorecem a invasão (Figura 1) (KADIOGLU et al., 2008). A cápsula polissacarídica é considerada o principal fator de virulência e a sua perda resulta em avirulência da bactéria. De acordo com a estrutura molecular da cápsula, os pneumococos podem ser classificados em diversos tipos

antigênicos e até o momento, foram descritos 48 sorogrupos e 94 sorotipos (BRATCHER et al., 2010).

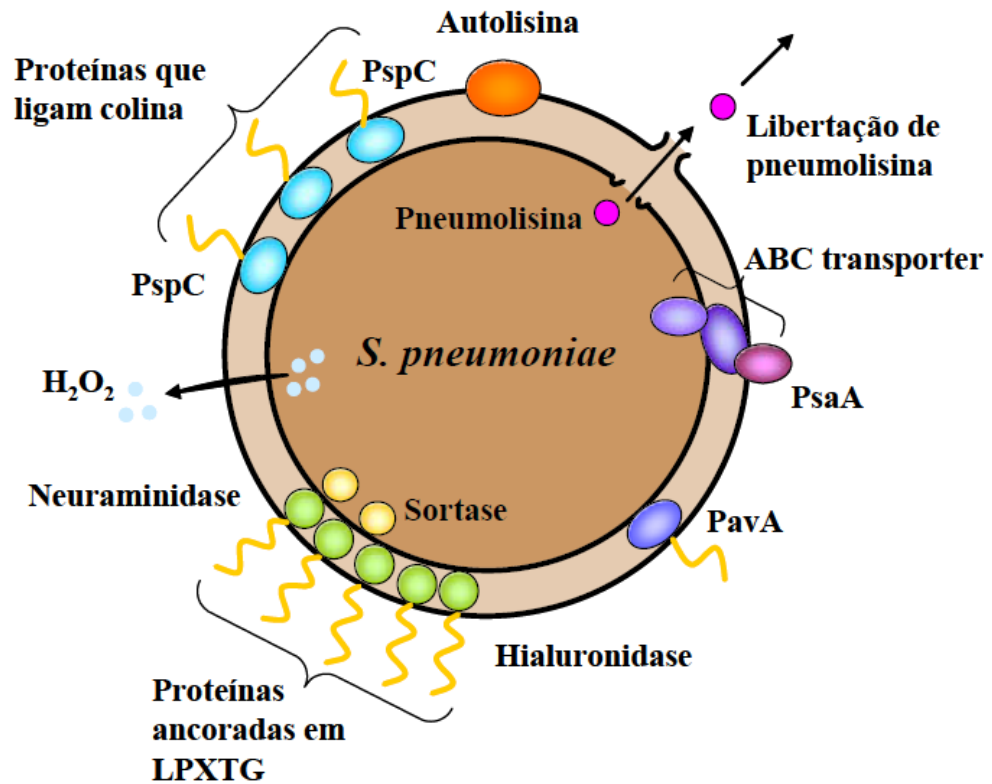


Figura 1. Principais fatores de virulência em *S. pneumoniae*.  
(Adaptado de Mitchell, T.J Nat Rev Microbiol 1 219-30- 2003)

Esta grande variedade de sorogrupos e sorotipos é distinguida por características de virulência, potencial de invasibilidade, entre outros fatores (ROBINSON et al., 2001). A prevalência dos tipos capsulares varia com a idade, tempo e região geográfica. De modo geral, cerca de 20 sorotipos estão associados com mais de 80% dos casos de doença pneumocócica invasiva que ocorrem em todas as faixas etárias (HAUSDORFF et al., 2000; WHITNEY et al., 2003). Na América Latina, 13 sorotipos mais frequentes são



responsáveis por cerca de 86% das doenças invasivas sendo o 14 predominante, seguido por 19F, 23F, 6B, 1, 3, 4 5, 7F, 6B, 19A e 18C (DI FABIO et al., 2001; GARCIA et al., 2006; LAVAL et al., 2006).

AHL et al. (2013) estudou retrospectivamente casos de doença pneumocócica invasiva na Suécia e demonstrou que os tipos capsulares considerados com menor potencial invasivo, em especial o sorotipo 3, podem causar significativamente doença grave em idosos, principalmente entre aqueles indivíduos acometidos por uma ou mais doenças de base. Neste contexto, esses tipos capsulares seriam considerados como oportunistas. Além disso, neste estudo, os tipos capsulares de *S. pneumoniae* com maior potencial invasivo foram mais associados com indivíduos saudáveis e mais jovens, sendo considerados como patógenos primários (AHL et al., 2013).

Em função da alta imunogenicidade e dos seus atributos bioquímicos, a cápsula polissacarídica do *S. pneumoniae*, além de ser considerada como fator de virulência primário, é também explorada como principal alvo nas reações sorológicas para identificação e distinção do grande número de sorotipos através de reações com antisoros específicos. Uma das técnicas mais utilizadas é a de intumescimento capsular ou reação de Quellung, a qual é considerada como padrão ouro na sorotipagem do *S. pneumoniae*. O polissacarídeo presente na cápsula é altamente reativo e é utilizado no preparo de vacinas, uma vez que sabidamente induz o desenvolvimento de anticorpos específicos que conferem proteção contra todos os tipos de infecção pneumocócica invasiva (PLETZ et al., 2008).

### 1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Pneumococos é um patógeno que pode causar infecções mais localizadas ou não invasivas, como otite média, sinusite, pneumonia sem bacteremia, até infecções e doenças graves, como as pneumonias com bacteremia, sepse e meningites, sendo estas classificadas como doenças pneumocócicas invasivas (DPI) (OBARO; ADEGBOLA, 2002).

As infecções não invasivas são mais prevalentes que as invasivas, entretanto, as taxas de mortalidade são maiores nas manifestações invasivas, por serem mais graves clinicamente (O'BRIEN et al., 2009).

### 1.4 VACINAS PNEUMOCÓCICAS: MEDIDAS DE PREVENÇÃO

Atualmente, existem duas classes de vacinas pneumocócicas que têm sido amplamente utilizadas: as polissacarídicas e as conjugadas. A vacina polissacarídica pneumocócica 23-valente (PPV) compreende 23 sorotipos de *S. pneumoniae* e foi disponibilizada nos Estados Unidos a partir de 1983. No ano de 2003, a cobertura alcançada para esta vacina no grupo alvo – indivíduos maiores que dois anos com alguma doença de base ou com idade  $\geq 65$  anos – foi de 64% para os idosos e 37% para pessoas com 18 a 64 anos com diabetes (CDC, 1997). No Brasil, a PPV vem sendo utilizada desde 1999 pelo PNI para indivíduos com 60 anos ou mais, sendo estimada a proteção de 86,2% em todo o país e 85% para a meningite pneumocócica na cidade de Salvador (REIS et al., 2002).

As vacinas conjugadas têm como base na sua formulação os sorotipos considerados mais frequentes em doença invasiva, particularmente aqueles

associados à resistência às drogas comumente utilizadas na terapêutica. Além disso, esta classe de vacinas possui atributos que, ao contrário das vacinas polissacarídicas, induzem a memória imunológica do sistema de defesa humano pela presença, na sua formulação, de moléculas com propriedades imunogênicas já estabelecidas que contribuem para este processo, como por exemplo, a proteína CRM<sub>197</sub>, conjugada à PCV7 (PILISHVILI et al., 2010).

A vacina pneumocócica conjugada 7-valente ou Prevenar (PCV7), foi formulada com os sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F conjugados à proteína CRM<sub>197</sub>, a qual atua como um agente estimulante na ativação do sistema imune e consequente produção de anticorpos (Pfizer). Esta vacina foi introduzida nos Estados Unidos em 2000 e apresentou excelentes resultados (WHITNEY et al., 2006; PILISHVILI et al., 2010). Posteriormente, em 2010, esta vacina foi substituída pela Prevenar 13 (PCV13), cuja formulação, além de conter os tipos capsulares presentes na PCV7, fora acrescida dos sorotipos 1, 3, 5, 6A, 7F e 19A (Pfizer) (CDC, 2013).

No Brasil, em função dos esforços do Ministério da Saúde, a implantação da vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV10) no Programa Nacional de Imunizações (PNI) ocorreu no ano de 2010 (DATASUS, 2015). Esta vacina foi desenvolvida pela empresa GSK (Glasko-Smith-Kline) e sua formulação inclui os mesmos tipos capsulares presentes na PCV7 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) acrescidos dos sorotipos 1, 5 e 7F conjugada à proteína D do *Haemophilus influenzae*, proteína CRM<sub>197</sub> e ao toxóide tetânico (TT) (PRYMULA; SCHUERMAN, 2009). Outros países, como Quênia e Chile implementaram, a PCV10 quase que simultaneamente ao Brasil (AYIEKO et al., 2013).

A escolha da PCV10 para o PNI foi baseada em custo-benefício quando comparada a PCV13, uma vez que a formulação da mesma teria uma ampla cobertura nas diferentes regiões brasileiras. Além disto, evidências de estudos pré-clínicos demonstraram que a PCV10 teve excelente proteção contra os episódios de otite média causados por *S. pneumoniae* e *H. influenzae* não-encapsulado (PRYMULA et al., 2011).

### 1.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A partir dos anos 60, pneumococos resistentes à penicilina tem sido reportados com relativa frequência em várias localidades geográficas. Nos últimos anos, a importância do *S. pneumoniae* tem aumentado devido ao surgimento de cepas multirresistentes aos principais grupos de antimicrobianos de uso para tratamento de infecções adquiridas na comunidade, como os  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos e sulfonamidas (KO et al., 2000; MONACO et al., 2005; BRANDILEONE et al., 2006). O aumento da incidência de infecções pneumocócicas causadas por cepas resistentes aos antimicrobianos tem sido atribuído a um limitado número de sorotipos, entre eles o 14, 6B, 19F, 23F e 19A, sendo responsáveis por quase todos os casos (>90%). (KO et al., 2000; MCGEE et al., 2001; KLUGMAN, 2002). De modo geral, as cepas resistentes aos antimicrobianos estão restritas a poucos sorotipos comumente associados com colonização nasofaringeana em crianças (CORSO et al., 1998). Estas evidências enfatizam a importância da prevenção da doença pneumocócica através da imunização.

## 1.6 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA PNEUMOCÓCICA

*Streptococcus pneumoniae* é considerado uma das principais causas entre as doenças invasivas e infecções do trato respiratório em todo o mundo, causando maior impacto na saúde pública dos países em desenvolvimento (OBARO; ADEGBOLA, 2002). Esta bactéria é responsável por altas taxas de mortalidade no mundo inteiro, principalmente em grupos populacionais caracterizados como de risco – isto é, crianças menores que cinco anos, indivíduos com idade acima de 60 anos, pacientes imunodeprimidos e indivíduos mal nutridos. Estima-se que *S. pneumoniae* seja responsável por 2,5 milhões de casos anuais de pneumonia em todo o globo, além de 32,7% das mortes anuais por este agravo, o que corresponde a aproximadamente 400.000 mil mortes anuais (WALKER et al., 2013).

Dados do CDC revelam que, até dezembro de 2012, 86 países membros da Organização Mundial de Saúde (OMS) já haviam implementado em seus programas nacionais de imunização algumas das vacinas pneumocócicas conjugadas, o que corresponde a 44% dos países membros da OMS e representando 31% da população de crianças entre os membros da OMS. Entre estes, cerca de um terço dos países foram auxiliados financeiramente por organizações como a “GAVI Alliance Support”. A maior parte desses países localiza-se nas Américas e no Oeste da Ásia (CDC, 2013).

Muitos estudos epidemiológicos objetivaram avaliar a efetividade das vacinas conjugadas licenciadas nos países desenvolvidos e o que usualmente se têm observado é o aumento da incidência de DPI por sorotipos que não estão contidos nas vacinas PCV7 e PCV10, principalmente o 19A (TECHASAENSIRI et al., 2010; ANSALDI et al., 2011; TARRAGO et al., 2011).

WHITNEY et al. (2006) nos Estados Unidos relatou uma efetividade de 96% para a PCV7 para casos de DPI entre os indivíduos que receberam uma ou mais doses. Neste estudo, foi observado que a PCV7 era efetiva contra o tipo 6A, não incluído na PCV7, mas com semelhança antigênica com o 6B. Outro estudo, realizado por PILISHVILI et. al (2010) nos Estados Unidos revelou, a partir de um sistema de vigilância para DPI, uma redução geral de 94% na incidência entre os tipos capsulares da PCV7, bem como o aumento de casos por tipos capsulares não-vacinais, principalmente o 19A. Estes achados levaram os EUA a substituir a PCV7 pela PCV13 no ano de 2010, que inclui os principais tipos capsulares responsáveis pelos casos de DPI após a implementação da PCV7, principalmente o 19A (CDC, 2013).

PILISHVILI e cols. também identificou o efeito de rebanho, onde as populações não vacinadas são indiretamente beneficiadas pela vacinação. Neste caso, os adultos com idade superior a 65 anos, onde foi observado o mesmo efeito de redução da incidência ocorrido na população alvo da vacina (menores que cinco anos). No México a PCV7 foi implementada no ano de 2008, resultando também numa redução nos casos de DPI por tipos vacinais e o aumento por tipos não vacinais; um estudo de dez anos evidenciou a PCV13 como melhor alternativa para prevenção de casos no México (ECHANIZ-AVILES et al., 2015). No Quênia, a PCV10 foi introduzida em 2010 com suporte financeiro do GAVI e estimou-se uma redução de 42,7% nos episódios de DPI, representando neste país uma redução da mortalidade infantil de 6,1% e uma economia 1,97 milhões de dólares com medidas terapêuticas e manejo clínico da DPI (AYIEKO et al., 2013).

Algumas evidências científicas já foram apresentadas em estudos que avaliaram o impacto da doença pneumocócica invasiva em períodos antes e após a implementação da PCV10 no Brasil, em curto e em médio prazo: o primeiro trabalho foi realizado por AFONSO et al. (2013), através da análise de internações por pneumonia em grandes centros urbanos brasileiros em pacientes de 2-24 meses de idade – faixa etária alvo para o esquema completo da PCV10; esta análise verificou que, após um ano de introdução da PCV10 as taxas de internamento hospitalar reduziram nas cidades de Belo Horizonte (28,7%), Curitiba (23,3%) e Recife (27,4%), e este desfecho esteve diretamente relacionado com a cobertura vacinal satisfatória nas populações estudadas. SANTOS et al. (2013) caracterizou a epidemiologia da DPI no hospital da Universidade de São Paulo, revelando que a incidência de internamentos por DPI entre os indivíduos menores que dois anos reduziu de 20,30 casos/1.000 internamentos no período pré-vacinal para 3,97 casos/1.000 internamentos ( $p < 0.0012$ ) no período pós-vacinal (S. R. DOS SANTOS et al., 2013). Outro estudo sobre DPI, realizado por CAIERÃO et al. (2014) no sul do Brasil, caracterizou através de técnicas de biologia molecular isolados de DPI, no qual mudanças significativas no perfil de sorotipos incluídos na vacina não foram encontradas nos períodos pré e pós vacinal; as explicações para os achados incluíram a baixa cobertura vacinal (abaixo de 80%) e o atraso no início da vacinação (CAIERAO et al., 2014).

Um estudo mais recente, realizado por DOMINGUES et al. (2014), avaliou a efetividade da PCV10 contra a doença pneumocócica no Brasil, através de um estudo do tipo caso-controle pareado, numa casuística que contemplou dez estados da federação, os quais representaram 66,3% da população brasileira.

Os resultados demonstraram uma efetividade de 83,8% para os casos de DPI por tipos vacinais, chegando a 96,4% para os indivíduos que completaram o esquema de três doses. O estudo também evidenciou uma efetividade de 77,9% para os casos de DPI por tipos “relacionados” (19A) – aqueles que não faziam parte da formulação e que poderia ser conferida imunidade cruzada pela PCV10; outro achado importante foi a ausência de efetividade para o sorotipo 23F, incluído na PCV10 (DOMINGUES et al., 2014a).

Dados sobre meningite pneumocócica no estado do Paraná foram fornecidos através do estudo conduzido por Hirose et al. (2015), no qual também foi demonstrada redução da incidência antes e após a introdução da vacina, principalmente no grupo alvo da campanha (crianças menores que dois anos), cuja incidência reduziu significativamente de 6,01 casos para 2,49 casos/100.000 habitantes-ano; os casos por tipos vacinais também sofreram redução na proporção, nos períodos pré e pós vacinal (80,7% vs 53,5%) (HIROSE; MALUF; RODRIGUES, 2015).

Neste contexto, em função do tamanho continental do Brasil, diferentes mudanças epidemiológicas podem ser observadas e mais estudos de vigilância em outras regiões geográficas são necessários para elucidar o real impacto da introdução da PCV10.

## **2 JUSTIFICATIVA**

A partir de 1996 foi implementada na cidade de Salvador um sistema de vigilância ativa para meningites bacterianas – entre elas – a meningite



pneumocócica, uma parceria entre a Secretaria Estadual de Saúde (SESAB), Hospital Couto Maia e o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Uma parceria com o LACEN (SESAB) também foi montada para ampliar o monitoramento da doença pneumocócica na região metropolitana de Salvador. Esta vigilância gerou informações sobre a epidemiologia descritiva do *S. pneumoniae* na cidade de Salvador no período considerado pré-vacinal (REIS et al., 2002; REIS et al., 2008; DE et al., 2011; MENEZES et al., 2011). Desta forma, estas informações obtidas ao longo dos anos de estudo permitiram o entendimento de fatores determinantes desta doença na população de Salvador, além da caracterização molecular dos isolados ao longo dos anos.

Estudos de colonização também foram conduzidos nesta população, principalmente oriundas naqueles grupos de risco que compreendem as crianças menores que cinco anos. Estas abordagens, por sua vez, demonstraram o perfil das cepas que circulam com frequência nas comunidades de Nordeste de Amaralina e associadas à resistência aos antimicrobianos de uso pediátrico (REIS et al., 2008). Com a intervenção por parte do PNI em 2010, através da introdução da vacina pneumocócica PCV10 no calendário nacional, faz-se necessário avaliar a conseqüente mudança na epidemiologia da doença. Além disto, um estudo de caráter epidemiológico e de base populacional no período pós-vacinal poderá elucidar também qual a influência não só da imunização, mas também de outros fatores inerentes ao patógeno (perfil genético, sorotipos, resistência a antimicrobianos) e como eles contribuem na perpetuação das cepas ao longo do tempo ou qual a sua associação com os desfechos epidemiológicos (morte vs. cura) dos pacientes. Uma vez que o sistema de vigilância já está bem estabelecido para este

agravo, algumas perguntas relacionadas às mudanças epidemiológicas que podem ocorrer com relação à introdução da PCV10 podem ser respondidas, como por exemplo: A introdução da PCV10 afetará a epidemiologia da meningite pneumocócica na RMS, em aspectos como a incidência, mortalidade e distribuição dos tipos capsulares?

A partir da estrutura de vigilância de base populacional montada e um banco de espécimes clínicos – contendo em torno de 1000 cepas – do *S. pneumoniae* caracterizados na cidade de Salvador, tornou-se oportuno o planejamento de um estudo que buscasse descrever a infecção pneumocócica no período imediatamente após a introdução da PCV10 nesta população, comparando-a com os dados anteriores. É importante ressaltar que não existem estudos similares em outras capitais do Nordeste brasileiro, o que torna mais importante a realização desta análise para agregar dados e melhorar a visão nacional da epidemiologia na DPI.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da vacina PCV10 na epidemiologia da meningite pneumocócica na região metropolitana de Salvador, Bahia.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar a incidência e a letalidade da meningite pneumocócica na região metropolitana de Salvador, nos períodos pré (2008-2010) e pós-vacinal (2011-2013);
2. Descrever o perfil de apresentação clínica e laboratorial dos casos de meningite pneumocócica atendidos no Hospital Couto Maia, nos períodos pré (2008-2010) e pós-vacinal (2011-2013);
3. Identificar a frequência dos tipos capsulares circulantes, o perfil de sensibilidade e perfil genotípico dos isolados de *S. pneumoniae* das meningites, comparando os períodos pré e pós-vacinal;
4. Comparar a epidemiologia e a estrutura genética dos casos por isolados não susceptíveis à penicilina (CIM  $\geq 0,125$   $\mu\text{g/mL}$ ) obtidos entre os anos anteriores da vigilância (1996-2010) e imediatamente após a introdução da PCV10 (2011-2012).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CAPÍTULO 1

#### 4.1.1 Prefácio do Artigo 1

*Artigo a ser submetido para publicação.*

Visando atender aos objetivos previstos na tese, foi realizada uma análise sobre as mudanças no perfil epidemiológico da meningite pneumocócica na região metropolitana de Salvador, comparando as incidências desta doença três anos antes e três anos após a introdução da vacina PCV10, além de comparar o perfil de tipos capsulares que ocorreram nestes dois períodos distintos. As informações sobre os casos foram obtidas a partir de uma vigilância de base hospitalar para meningite pneumocócica montada desde 1996 no Hospital Couto Maia aliada a colaboração de casos oriundos de outros hospitais em parceria com o LACEN. Foram utilizados os casos que ocorreram nos anos 2008-2010, considerado período pré-vacinal, e 2011-2013, considerado período pós-vacinal. A partir destes dados a taxa de incidência para a região metropolitana de Salvador foi calculada com base no censo IBGE 2010. Três anos após a introdução da PCV10, observamos uma redução nos casos de meningite pneumocócica na população estudada, principalmente entre as faixas etárias alvo da vacinação e entre os casos ocorridos por tipos capsulares presentes na formulação da PCV10. Estes achados sugerem que a introdução da PCV10 modificou a epidemiologia da meningite pneumocócica na população estudada.

Epidemiological changes in pneumococcal meningitis in a large urban center in Brazil  
after 10-valent conjugate vaccine introduction

Jailton Azevedo<sup>1</sup>; Ana Paula de Oliveira Menezes<sup>2</sup>; Paulo Rocha Lôbo<sup>1</sup>, Carolina Regis Leite<sup>1</sup>; Mayara Pedrosa<sup>1</sup>; Soraia Machado Cordeiro<sup>3</sup>, Milena Soares dos Santos<sup>1,4</sup>; Marcelo Bastos Teles<sup>5</sup>, Maria da Glória Carvalho<sup>6</sup>; Albert Ickzang Ko<sup>1,7</sup>, Mitermayer Galvão dos Reis<sup>1</sup>, Joice Neves Reis\*<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde, Salvador, Bahia, 40296-710, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, Bahia, 45206-190, Brasil.

<sup>3</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 40170-115, Brasil.

<sup>4</sup>Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, 45029-094, Brasil.

<sup>5</sup>Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, Salvador, Bahia, 40.296-710, Brasil.

<sup>6</sup>Centers for Disease Control and Prevention. Streptococcus Laboratory, Atlanta, 30333, USA.

<sup>7</sup>Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, New Haven, CT, 06520, USA.

\*Correspondent author: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170115 Salvador, BA, Brazil. Tel.: +55 71 32836934.

**Abstract:**

**Background:** PCV10 vaccine was recently introduced in Brazil using 3+1 schedule and catch-up program until 2 years of age. The purpose of this study was to evaluate impact of PCV10 vaccination on epidemiology of pneumococcal meningitis accessing data from a regional surveillance.

**Methods:** Prospective hospital-based surveillance for pneumococcal meningitis identified cases confirmed by positive cultures from Cerebrospinal fluid (CSF) and/or blood and latex agglutination for *S. pneumoniae*. Capsular serotype was determined by multiplex PCR and/or Quellung reaction. Incidence rate was calculated among cases that occurred before (2008-2010) and after (2011-2013) vaccine introduction using data from IBGE 2010 census.

**Results:** Active surveillance for pneumococcal meningitis consecutively identified 150 patients who resided within Metropolitan region of Salvador. Incidence of pneumococcal meningitis cases decreased 25.3% from 0.79 to 0.59/100,000 inhabitants after vaccine introduction. Among those aged 0-2 years-old the overall incidence decreased 47.7% from 4.93 to 2.58 cases/100,000 inhabitants in pre and post-PCV10 period. The incidence of PCV10 serotypes among children aged 0-2 years-old reduced by 77% from 3.05 to 0.70 per 100,000/inhabitants in the post-PCV10 period. Into post-PCV10 period the following serotypes presented reduction in frequencies: 14 [from 12.3% to 3.8%], 19F [from 4.9% to 1.9%], 6B [from 6.2% to 3.8%]. Comparing the pre and post-PCV10 periods, the proportion among isolation of vaccine serotypes decreased from 51.9% (42/81) to 26.9% (14/52), respectively. We didn't observe any increasing among the non-PCV10 serotypes causing pneumococcal meningitis in the period following vaccine implementation.

**Conclusion:** Our data showed progressive changes in pneumococcal meningitis following PCV10 implementation. These surveillance data confirms the findings of the effectivity of nation-wide PCV10 case-control study.

**Keywords:** Pneumococcal meningitis, PCV10 vaccine, surveillance.

## Introduction

*Streptococcus pneumoniae* is a common bacterium that colonizes the human nasopharynx. It is considered an opportunistic pathogen that can cause different illness manifestations in terms of severity, as acute otitis media, pneumonia, septicaemia and pneumococcal meningitis (PnM) (OBARO; ADEGBOLA, 2002; BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004; O'BRIEN et al., 2009). It has a polysaccharide capsule, which can be distinguished by chemical and immunologically differences in 94 types (PARK et al., 2007; KADIOGLU et al., 2008; CALIX; NAHM, 2010). The most frequent types that cause disease have been applied into conjugate pneumococcal vaccines formulation, actually PCV10 and PCV13 (PLOSKER, 2014).

Pneumococcal conjugate 7-valent vaccine (PCV7) was available in United States in 2000 and has the serotypes 4, 6B, 9V,14, 18C, 19F and 23F. The vaccination with PCV7 affects the epidemiology of invasive pneumococcal disease (IPD), revealing a herd immunity phenomenon (WHITNEY et al., 2006). However, non-vaccine serotypes, especially 19A, increased before the PCV7 introduction (PILISHVILI et al., 2010). These new epidemiological profile among IPD led the USA police makers to replace these vaccine and the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) was implemented in 2010, that contains the PCV7 serotypes plus 1, 3, 5, 6A, 7F and 19A (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010; CDC, 2013). In same period, Brazilian government, using 3+1 schedule and catch-up program until 2 years of age, introduced for the first time the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PCV10 or PHiD-CV; GSK Biologicals, Rixensart, Belgium), that includes PCV7 serotypes plus 1, 5 and 7F (PRYMULA; SCHUERMAN, 2009).

The licensure and consequent introduction of pneumococcal conjugate vaccines now is a reality in several countries, including those categorized as low-incoming economies (CDC, 2013). Although the vaccine effectiveness and its impact on these populations have been demonstrated in classic analyses (WHITNEY et al., 2006; DOMINGUES et al., 2014a), the long term impact of these programs have not been evaluated. In Salvador, the third largest city in Brazil, sustained reductions in pneumococcal

meningitis have been reported in the conjugated vaccine era (DE et al., 2011; M. S. DOS SANTOS et al., 2015). Nevertheless, population-based evidence of the impact of PCV10 use has not been reported yet. Here, we had the opportunity to examine the incidence of pneumococcal meningitis before and after introduction of routine vaccination with PCV10, particularly on serotype distribution.

## **Material and Methods**

### Study Site

A population-based surveillance was conducted into the main referral hospital for infectious diseases at metropolitan region of Salvador (RMS), according previously published (SESAB; REIS et al., 2002). This large urban setting accounts a population of 3,573,973 (IBGE, 2010) inhabitants and formed by thirteen cities, that are situated in Northeast Brazil. To improve the powerful of this study, cases admitted to other health units of the RMS were also included in the final incidence analysis. From January 1<sup>st</sup> 2008 to December 31<sup>nd</sup> 2013, technicians accounted weekly data from pneumococcal meningitis cases confirmed by positive cultures from Cerebrospinal fluid (CSF) and/or blood and latex agglutination for *S. pneumoniae*.

### Epidemiological data collection

For all patients with pneumococcal meningitis who were admitted to the surveillance hospital, a standardized data entry form was used to extract demographic and clinical information from their medical records. Patients were interviewed to obtain information regarding potential risk factors for acquiring meningitis, such as acute illness preceding meningitis and co-morbidities.

### Laboratory procedures

Pneumococcal strains collected from CSF and/or blood in this surveillance was sent to Laboratory of Pathology and Molecular Biology at the Gonçalo Moniz Research Center CPqGM/FIOCRUZ for species confirmation. The isolates were identified as *S. pneumoniae* using conventional microbiological methods including susceptibility to ethylhydrocupreine disc (optochin) and bile solubility (WERNO; MURDOCH, 2008).



### Serotyping

Serotyping was performed using sequential multiplex PCR method as described previously (MENEZES et al., 2013; CDC, 2014). Isolates with negative or equivocal multiplex PCR results were subjected to Quellung reaction testing for capsular type definition at the CDC (CDC, 2014).

### Statistical analyses

Epi-Info Version 3.5.1 (CDC, Atlanta, GA) was used for data entry and statistical analysis. Due to the delay in the introduction of the vaccine in the immunization program in Salvador, we consider the year 2010 as a pre-vaccine period, because in this year the vaccine coverage was less than 10% of the eligible population (DATASUS, 2015). The pre and post-vaccine period were defined as the 3-year interval before (2008-2010) and 3-year interval following vaccine licensure in Brazilian NIP (2011-2013), respectively. Overall and stratified by age groups (0-2; 3-4; 5-59;  $\geq 60$ ) incidence was calculated based on the number of cases from Metropolitan Salvador and population counts from the 2010 national census (IBGE, 2010). Relative risk (RR) with 95% of confidence interval (CI) for pneumococcal meningitis was calculated to estimate the exposure during pre-PCV10 and post-PCV10 period. Fisher's exact test and Wilcoxon rank-sum test were performed to compare proportions. Differences were defined to be significant if the two-tailed P-value was  $<0.05$ .

### Ethics

Informed consent procedures were applied to all patients and/or guardians included in the study, approved by the National Committee for Research Ethics (CONEP) and FIOCRUZ Institutional Review Board, Brazilian Ministry of Health (no. 044/2013).

## **Results**

Active surveillance for pneumococcal meningitis from 2008 to 2013 consecutively identified 150 patients who resided within Metropolitan region of Salvador (population

in 2010 3,573,973 inhabitants). The annual incidence of pneumococcal meningitis was 0.69 per 100,000 person-years for all age groups. The incidence was higher among children aging two years or younger (3.76 cases/100,000 person-years) and adult aging 60 years or older (1.29 cases/100,000 person-years). Male sex represented 57% for all cases (85/150). The overall case-fatality among hospitalized patients with pneumococcal meningitis was 19.6%. Mortality was higher in the pre-vaccine period (23% cases vs. 13.2%, respectively;  $p=0.04$ ) and in patients aged 25-59 years, 45.5% (10/22) [median of 40 (IQR: 33 to 48);  $p<0.0004$ ].

Of 150 patients with pneumococcal meningitis included in the final analysis, 133 (88.7%) had positive CSF cultures and 17 cases (8.3%) were diagnosed by latex agglutination. Of the 133 isolates available for serotyping, 35 different capsular types were identified. The predominant serotypes were 23F (n= 14; 10.5%), 14 (n= 12; 9.0%), 12F (n= 11; 8.3%), 18C (n= 7; 5.3%), 6A (n= 7; 5.3%), 6B (n= 7; 5.3%), 3 (n=7; 5.3%), and 4 (n=6; 4.5%). The remaining serotypes were: 19F (n= 5; 3.8%), 9N (n= 5; 3.8%), 19A (n= 4; 3%), 28A (n= 4; 3%), 7F (n= 4; 3%), 15A (n= 3; 2.3%), 15B (n= 3; 2.3%), 7C (n= 3; 2.3%), 10A (n= 2; 1.5%), 13 (n= 2; 1.5%), 17F (n= 2; 1.5%), 18A (n= 2; 1.5%), 18B (n= 2; 1.5%), 20 (n= 2; 1.5%), 34 (n= 2; 1.5%), 38 (n= 2; 1.5%), 6C (n= 2; 1.5%), 10F, 11A, 21, 22F, 23A, 23B, 24F, 8 and 9V accounted for one isolate each. Two isolates (1.5%) were non-typeable and were identified after the PCV-10 implementation. The proportion of capsular types included in the PCV10 vaccine was 41.1% (56/133). Comparing the pre and post-PCV10 periods, the proportion of vaccine serotypes decreased from 51.9% (42/81) to 26.9% (14/52), respectively [(RR: 0.67 (CI: 0.52-0.88);  $P<0.05$ ) (Figure 1).

The incidence of PnM among residents within Metropolitan Salvador declined by 25.3% from 0.79 to 0.59 cases/100,000 inhabitants ( $P=0.08$ ). These reduction in cases occurred mainly by vaccine serotypes [ $P>0.01$  RR: 0.34 95% CI 0.19-0.63] and in children less than 2 years (47.7%) [ $P=0.08$  RR: 0.52 95% CI 0.25-1.09] (Table 1). Meningitis cases due to vaccine serotypes decreased significantly from 0.38 to 0.13 cases/100,000 inhabitants [RR: 0.34 (CI: 0.19-0.63);  $P<0.01$ ], mostly among children less than 2 years (77%) from 3.05 to 0.70 cases/100,000 inhabitants [RR: 0.23 (CI: 0.06-0.80);  $P<0.01$ ]. In the post-vaccine period, incidence due to serotypes not represented in PCV10-vaccine had a slight increase (33%) from 0.22 to 0.33

cases/100,000 inhabitants [RR: 1.5 (CI: 0.85-2.64); P=0.16] in patients older than four years of age (Table 1).

Almost all PCV10 serotypes presented reduction in frequencies into post-PCV10 period: 14 [from 12.3% (n=10) to 3.8% (n=2);  $p=0.08$ ], 19F [from 4.9% (n=4) to 1.9% (n=1);  $p=0.35$ ], 6B [from 6.2% (n=5) to 3.8% (n=2);  $p=0.44$ ]. In the post-PCV10 period, serotypes 18C and 9V were not identified in this study population. Non-PCV10 serotypes causing pneumococcal meningitis in the period following PCV10-vaccine implementation were: 12F (n=7; 13.5%;  $p=0.07$ ), 15A (n=3; 5.8%) and 3 (n=3; 5.8%) (Figure 2). In this analysis we did not observe any increase among particular non-PCV10 serotype causing pneumococcal meningitis.

## Discussion

In Metropolitan region of Salvador, the PCV10 introduction to the childhood immunization schedule in 2010, resulted in a reduction of more than 70% of cases of pneumococcal meningitis due to vaccine types, especially among those aged 0-2 years. Despite the delay in the distribution of PCV10 doses to the metropolitan area of Salvador, resulting in an insignificant vaccination coverage rate in 2010, with the distribution of just 2,503 doses of the vaccine and reaching 4.8% of the target population. In the years after vaccination coverage rates were reaching the best levels with 38,035 doses applied in 2011 (73% of the target population) and 42,415 doses applied in 2012 (81.5% of the target population) levels considered satisfactory (DATASUS, 2015).

Furthermore, in the site of the present study, the incidence of pneumococcal meningitis has declined over the years since 2000 (DE et al., 2011; M. S. DOS SANTOS et al., 2015), an impact that can be explained by a number of measures that have occurred since then: 1) licensing of pneumococcal conjugate vaccine 7-valent in 2001, and its availability in private clinics for the people who could afford its cost and as well as, its incorporated at the special immunobiologicals centers (CRIEs) located at all Brazilian states, for groups with special clinical conditions considered at high risk of IPD, as immunodeficiency, asplenia and severe cardio-pulmonary diseases; 2) Brazilian society has experienced socioeconomic changes, especially regarding the implementation of cash transfer programs, which led to improvements in child health, the main risk group for the occurrence of pneumococcal meningitis and other infectious diseases; these

actions may also have influenced the reduction of disease rates over the years, and consequently impacted on reducing child mortality (RASELLA et al., 2013; DATASUS, 2015) .

Several epidemiological studies have been performed in other regions of the country, using hospital-based surveillance systems or well-established populations. Regarding the incidence rates estimated in these analyzes, the results obtained in this study were similar to those found in studies conducted at others states. Dos Santos et al. (2011), described a reduction in the incidence of hospitalization for DPI at the Hospital of São Paulo, from 20.30 to 3.97 cases / 1,000 admissions [ $p < 0.0012$ ] considering two years after the release of PCV10 in PNI (S. R. DOS SANTOS et al., 2013). In the State of Paraná, Hirose et al. (2015), using surveillance data for pneumococcal meningitis, also found a decline in incidence after the introduction of the vaccine, especially in the target group of the campaign (children under two years), the incidence decreased from 6.01 to 2.49 cases/100,000 inhabitants-year. Cases per vaccine types have declined in the proportion of occurrence in the post-vaccination period (80.7% vs. 53.5%) in the same manner as we observed in our analysis (51.9% vs. 26.9%) (HIROSE; MALUF; RODRIGUES, 2015).

Most studies of effectiveness of PCV7 against IPD have demonstrated herd effect (PILISHVILI et al., 2010; KLUGMAN; BENTLEY; MCGEE, 2014). Although, we did see a decline in incidence of pneumococcal meningitis cases by vaccine types on both children in adults, it was not statistically significant. It may be too early after the introduction of PCV10 to see the full decrease that might occur for incidences of pneumococcal meningitis in older groups, who has not received PCV10.

Domingues et al. (2014) recently assessed the effectiveness of PCV10 against invasive pneumococcal disease in Brazil, throughout a paired case-control study and demonstrated 83.8% efficiency for IPD cases by vaccine types, reaching 96.4% for individuals who completed the three-dose schedule (DOMINGUES et al., 2014b). Serotype effectiveness was shown against the two more common serotypes 14, 6B and for vaccine related serotype 19A, which is not included in the vaccine. Contrary to our expectations, PCV10 did not show effectiveness against IPD cases due to serotype 23F. The results of this surveillance show no changes in serotype 23F distribution in the period post vaccine introduction (8 vs 6 cases). There is still controversy about the

actual protection that PCV10 may exercise around the serotype 23F (HAUSDORFF; HOET; ADEGBOLA, 2015).

In this study we did not observed any increase among particular non-PCV10 serotype causing pneumococcal meningitis. Also, we did not observe emergence of cases by serotype 19A in the post-vaccine period, the first to be shown with greater magnitude in the US after the introduction of PCV7 (MOORE et al., 2008). These findings have already been observed in the study in the country conducted by Santos et al. (2014) and Latin America, where cases of IPD by serotype 19A has reduced over 20 years (CASTANEDA et al., 2012).

Our results indicate that the use of PCV10 vaccine has benefited the general population, with reduced incidence of pneumococcal meningitis in all age groups, despite the problems that occurred with the vaccination coverage in the first year in metropolitan area of Salvador and short period post-vaccine evaluated. This context may be different in the long term, with a probable increase in cases among non-vaccine serotypes, especially with a more comprehensive analysis from other forms of IPD than meningitis.

**Acknowledgments:** We thank Éder Silva dos Anjos and Maíra dos Santos Silva for their help in laboratory procedures assays. This study had a financial support from from the Brazilian National Research Council (482755/2010-5), the Bahia State Foundation for the support of research (PP-SUS0001/2009), Strategic program to support health research – PAPES (#407551/2012-3) and the National Institute of Health (R01 TW007303, D43 TW00919).

## References

- Bogaert, D., R. De Groot, et al. (2004). "Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease." Lancet Infect Dis **4**(3): 144-154.
- Calix, J. J. and M. H. Nahm (2010). "A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated wcjE gene." J Infect Dis **202**(1): 29-38.
- Castaneda, E., C. I. Agudelo, et al. (2012). "Streptococcus pneumoniae serotype 19A in Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis, 1990-2010." BMC Infect Dis **12**: 124.

- CDC (2010). "Invasive pneumococcal disease in young children before licensure of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine - United States, 2007." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **59**(9): 253-257.
- CDC (2013). "Progress in introduction of pneumococcal conjugate vaccine - worldwide, 2000-2012." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **62**(16): 308-311.
- CDC. (2014). "PCR deduction of pneumococcal serotypes." Retrieved 06/06/15, 2015, from <http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html>.
- DATASUS. (2015). "Tecnologia da Informação a Serviço do SUS - Informações da Saúde." Retrieved 06/06/15, 2015, from <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?pni/CNV/CPNIBA.def>.
- de, O. M. A. P., L. C. Campos, et al. (2011). "Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007." Vaccine **29**(6): 1139-1144.
- Domingues, C. M., J. R. Verani, et al. (2014). "Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study." Lancet Respir Med.
- Domingues, C. M., J. R. Verani, et al. (2014). "Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study." Lancet Respir Med **2**(6): 464-471.
- dos Santos, M. S., J. Azevedo, et al. (2015). "Temporal trends and clonal diversity of penicillin non-susceptible pneumococci from meningitis cases from 1996 to 2012, in Salvador, Brazil." BMC Infect Dis **15**: 302.
- dos Santos, S. R., L. F. Passadore, et al. (2013). "Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation." Vaccine **31**(51): 6150-6154.
- Hausdorff, W. P., B. Hoet, et al. (2015). "Predicting the impact of new pneumococcal conjugate vaccines: serotype composition is not enough." Expert Rev Vaccines **14**(3): 413-428.
- Hirose, T. E., E. M. Maluf, et al. (2015). "Pneumococcal meningitis: epidemiological profile pre- and post-introduction of the pneumococcal 10-valent conjugate vaccine." J Pediatr (Rio J) **91**(2): 130-135.

- IBGE, I. B. d. G. e. E. (2010). "Resultado do censo populacional de Salvador e cidades na área metropolitana, Bahia." Retrieved 10/06/2015, 2015.
- Kadioglu, A., J. N. Weiser, et al. (2008). "The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease." Nat Rev Microbiol **6**(4): 288-301.
- Klugman, K. P., S. D. Bentley, et al. (2014). "Determinants of invasiveness beneath the capsule of the pneumococcus." J Infect Dis **209**(3): 321-322.
- Menezes, A. P., J. N. Reis, et al. (2013). "Update of pneumococcal PCR serotyping assay for detection of a commonly occurring type 19F wzy variant in Brazil." J Clin Microbiol **51**(7): 2470-2471.
- Moore, M. R., R. E. Gertz, Jr., et al. (2008). "Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005." J Infect Dis **197**(7): 1016-1027.
- O'Brien, K. L., L. J. Wolfson, et al. (2009). "Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates." Lancet **374**(9693): 893-902.
- Obaro, S. and R. Adegbola (2002). "The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines." J Med Microbiol **51**(2): 98-104.
- Park, I. H., D. G. Pritchard, et al. (2007). "Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*." J Clin Microbiol **45**(4): 1225-1233.
- Pilishvili, T., C. Lexau, et al. (2010). "Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine." J Infect Dis **201**(1): 32-41.
- Plosker, G. L. (2014). "10-Valent pneumococcal non-typeable haemophilus influenzae protein D-conjugate vaccine: a review in infants and children." Paediatr Drugs **16**(5): 425-444.
- Prymula, R. and L. Schuerman (2009). "10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* PD conjugate vaccine: Synflorix." Expert Rev Vaccines **8**(11): 1479-1500.
- Rasella, D., R. Aquino, et al. (2013). "Effect of a conditional cash transfer programme on childhood mortality: a nationwide analysis of Brazilian municipalities." Lancet **382**(9886): 57-64.

- Reis, J. N., S. M. Cordeiro, et al. (2002). "Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador, Brazil." *J Clin Microbiol* **40**(1): 275-277.
- SESAB, S. d. S. d. E. d. B. "Boletins Epidemiológicos." Retrieved 06/06/2015, 2015, from [http://www.suvisa.ba.gov.br/vigilancia\\_epidemiologica/consulta\\_boletim\\_epidemiologico/](http://www.suvisa.ba.gov.br/vigilancia_epidemiologica/consulta_boletim_epidemiologico/).
- Werno, A. M. and D. R. Murdoch (2008). "Medical microbiology: laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease." *Clin Infect Dis* **46**(6): 926-932.
- Whitney, C. G., T. Pilishvili, et al. (2006). "Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case-control study." *Lancet* **368**(9546): 1495-1502.



**Table 1.** Incidence of pneumococcal meningitis in Metropolitan region of Salvador, before (2008-2010) and after (2011-2013) introduction of routine PCV10 immunization.

| <b>Incidence by age group (years)</b><br>Cases/100,000 inhabitants    | <b>Pre-vaccine Period (2008-2010)</b> | <b>Post-vaccine Period (2011-2013)</b> | <b>RR (95% CI)</b> | <b>p*</b> |
|---|---------------------------------------|--|--------------------|-----------|
| <b>Pneumococcal meningitis cases, overall (n=148)<sup>&amp;</sup></b> |                                       |  |                    |           |
| ≤ 2   | 4.93 (21)                             | 2.58 (11)                              | 0.52 (0.25-1.09)   | 0.08      |
| 3-4   | 1.06 (3)                              | 0.00 (0)                               | NC                 | 0.13      |
| 5-59  | 0.53 (48)                             | 0.45 (41)                              | 0.85 (0.56-1.30)   | 0.46      |
| ≥ 60  | 1.40 (13)                             | 1.18 (11)                              | 0.85 (0.38-1.89)   | 0.69      |
| Total   | 0.79 (85)                             | 0.59 (63)                              | 0.74 (0.54-1.03)   | 0.07      |
| <b>Cases due to vaccine types (n= 55) **</b>                          |                                       |  |                    |           |
| ≤ 2   | 3.05 (13)                             | 0.70 (3)                               | 0.23 (0.06-0.80)   | 0.01      |
| 3-4   | 0.71 (2)                              | 0.00 (0)                               | NC                 | 0.25      |
| 5-59  | 0.26 (24)                             | 0.08 (7)                               | 0.30 (0.13-0.68)   | >0.01     |
| ≥ 60  | 0.21 (2)                              | 0.43 (4)                               | 2.00 (0.37-10.92)  | 0.45      |
| Total   | 0.38 (41)                             | 0.13 (14)                              | 0.34 (0.19-0.63)   | >0.01     |
| <b>Cases due to non-vaccine types (n= 76) **</b>                      |                                       |  |                    |           |
| ≤ 2   | 1.64 (7)                              | 0.94 (4)                               | 0.57 (0.17-1.95)   | 0.39      |
| 3-4   | 0.35 (1)                              | 0.00 (0)                               | NC                 | 0.50      |
| 5-59  | 0.22 (20)                             | 0.33 (30)                              | 1.5 (0.852-2.64)   | 0.16      |
| ≥ 60  | 1.07 (10)                             | 0.43 (4)                               | 0.40 (0.13-1.28)   | 0.12      |
| Total   | 0.35 (38)                             | 0.35 (38)                              | 1.00 (0.64-1.57)   | 1.00      |

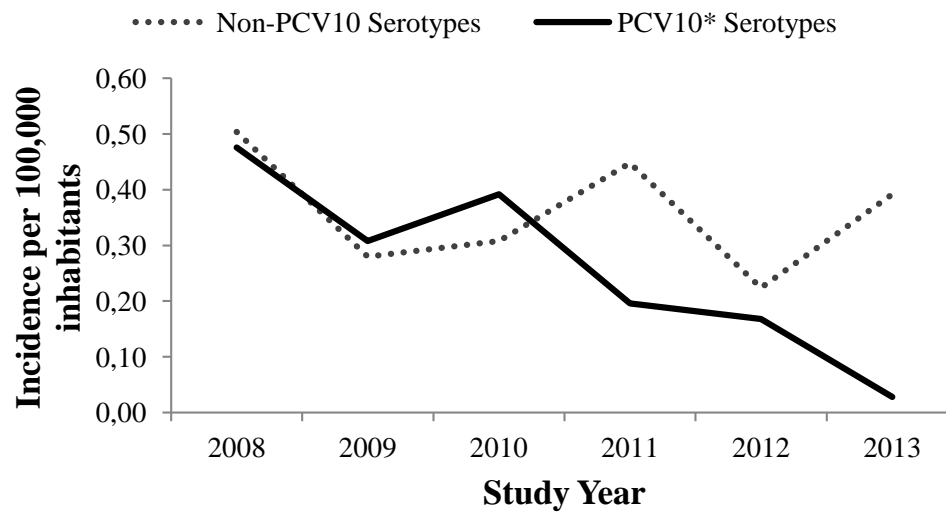
CI, confidence interval; RR, Relative risk

<sup>&</sup>Incidence per age group was calculated for 148 patients with available age information

\*\*Excluded 17 cases that was identified by latex agglutination and were culture negative for *S. pneumoniae*

\* Exact Mild-P test

NC: Non-calculated



\*PCV10 Serotypes: 1, 5, 7F, 4, 6B, 9V, 14, 19F, 23F and 18C.

Figure 1 – Incidence of pneumococcal meningitis in Metropolitan region of Salvador, Brazil, stratified by PCV10 and non-PCV10 serotypes, 2008-2013.

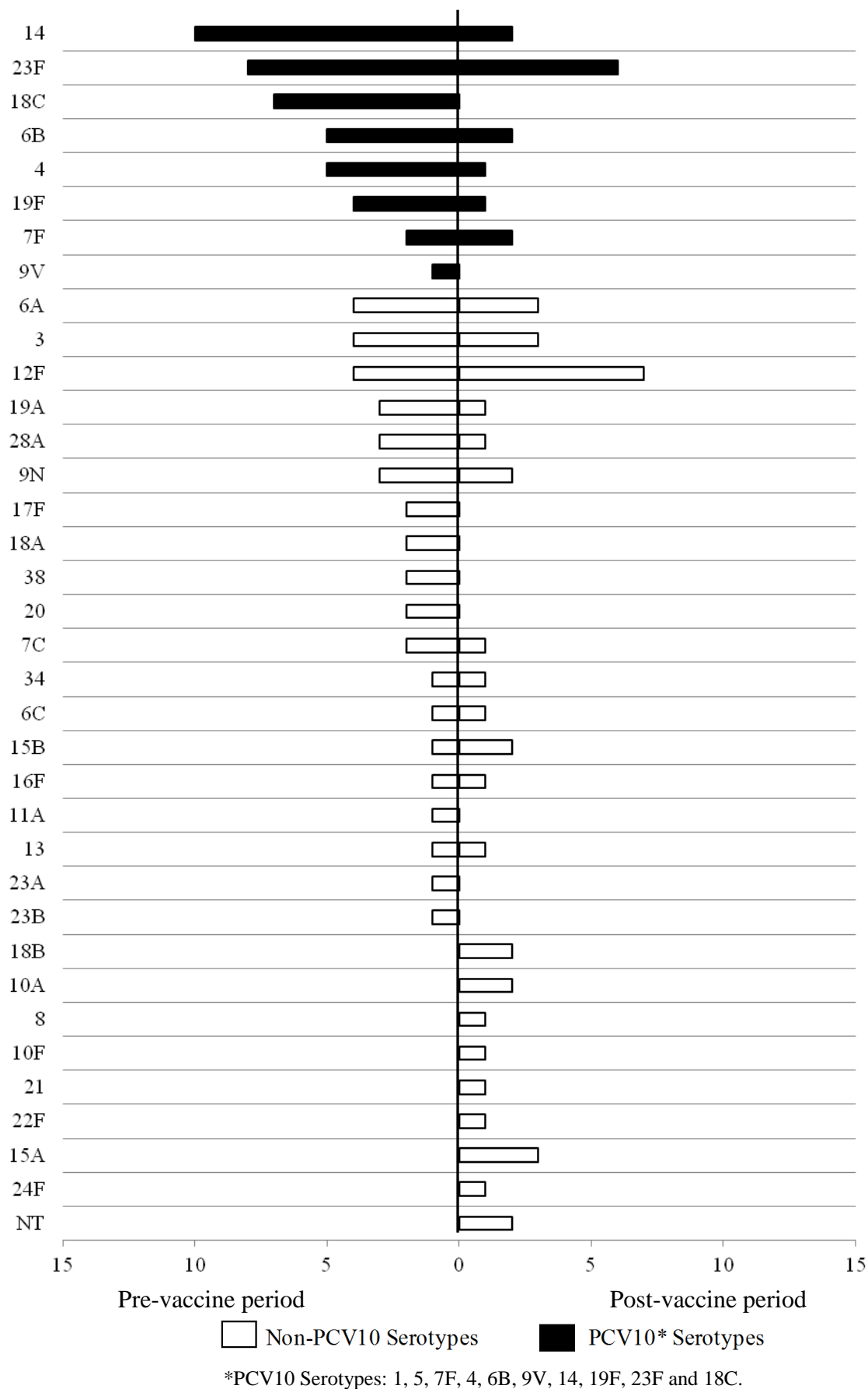


Figure 2 – Serotype distribution of pneumococcal meningitis cases in the Metropolitan region of Salvador from 2008 to 2013 ( $n= 133$ )

## 4.2 CAPÍTULO 2

### 4.2.1 Prefácio do artigo 2

Este artigo visou atender aos objetivos da tese identificando o cenário epidemiológico da meningite pneumocócica em Salvador, através do estudo da série histórica das incidências desta doença no período de 1996 a 2012 com foco nos isolados resistentes à penicilina (PNSSP), caracterizando-os quanto ao perfil fenotípico (sorotipo) e genotípico (PFGE/MLST). A partir dos dados obtidos, verificou-se que desde 1996 houve redução nos casos de meningite pneumocócica, inclusive aqueles resistentes à penicilina (redução de 82%). Entre os PNSSP, os tipos capsulares mais comuns foram 14, 19F, 23F, 6B e 19A. Nas análises moleculares foram descritos dois clones prevalentes ao longo dos anos estudados, ambos relacionados ao sorotipo 14, sendo os ST's 66 e 156.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Temporal trends and clonal diversity of penicillin non-susceptible pneumococci from meningitis cases from 1996 to 2012, in Salvador, Brazil

Milena Soares dos Santos<sup>1,3</sup>, Jailton Azevedo<sup>1</sup>, Ana Paula de Oliveria Menezes<sup>1,4</sup>, Soraia Machado Cordeiro<sup>2</sup>, Eliane Cunegundes Escobar<sup>1</sup>, Josilene Borges Lima<sup>5</sup>, Leila Carvalho Campos<sup>1</sup>, Maria da Glória S. Carvalho<sup>7</sup>, Mitermayer G. Reis<sup>1</sup>, Albert I. Ko<sup>1,6</sup> and Joice Neves Reis<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Hospital-based surveillance for pneumococcal meningitis has been conducted since January 1996 in the city of Salvador, Brazil. The purpose of this study was to describe the temporal evolution of Penicillin Non-Susceptible *Streptococcus pneumoniae* (PNSSP) in regards to serotype distributions and clonal diversity recovered from meningitis cases over 17 years.

**Methods:** Broth microdilution was used to identify pneumococcal isolates that were PNSSP (Minimum Inhibitory Concentration > 0.12 µg/ml). The annual incidence rate of meningitis cases was calculated. Serotyping was defined using multiplex polymerase chain reaction assays and quellung reaction. Genetic diversity of PNSSP isolates was assessed using both pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST) analyses.

**Results:** A total of 854 cerebrospinal fluid (CSF) culture pneumococcal isolates were tested by broth microdilution method and serotyped. A total of 173 (20.3 %) were penicillin non-susceptible (PNSSP) (Minimum Inhibitory concentration ≥ 0.12 µg/ml). The annual incidence of meningitis cases declined from 1.65/100,000 population (1996) to 0.2/100,000 population in 2012 and the rate due to PNSSP declined 82 % over the 17-years of surveillance. PNSSP isolates were restricted to 13 serotypes, being the most common ones serotypes 14 (45.1 %; 78/173), 23 F (19.1 %; 33/173), 6B (14.4 %; 25/173), 19 F (9.2 %; 16/173) and 19A (5.2 %; 9/173). Among the PNSSP isolates, 94 % had serotypes represented in the 10-valent conjugate vaccine (PCV10). The predominant serotype 14 clonal groups were identified as PFGE group A/multilocus sequence type 66 (ST66) [35.3 % (61/173)] and PFGE group GK/ST156 [4.6 % (8/173)], the latter one associated with high level resistance to penicillin and ceftriaxone.

**Conclusions:** Our results show sustained reductions in pneumococcal meningitis cases in the Metropolitan region of Salvador from 1996 to 2012. This might reflect a beneficial impact of conjugate vaccines. Continued surveillance and further studies need to be conducted to better understanding on PCV10 vaccine impact.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, Antibiotic resistance, Genotype, Surveillance

\* Correspondence: [joice@ufba.br](mailto:joice@ufba.br)

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz/ Ministério da Saúde, Salvador, Bahia 40296-710, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170115 Salvador, BA, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

## Background

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) often resides asymptotically as part of human upper respiratory tract microbiota. It is an opportunistic pathogen that causes infections leading to otitis media, pneumonia, sepsis and meningitis [1]. The World Health Organization estimated that this agent caused 476,000 deaths among children less than 5 years in 2008; most of these deaths occur in developing countries [2]. Furthermore, antibiotic resistance which has been shown to be associated with a limited spectrum of serotypes, commonly responsible for invasive disease, may have adverse impact on the epidemiology of pneumococcal disease [3]. Resistant pneumococci have been isolated in all continents. In several settings over 40 % of clinical isolates exhibit multidrug-resistance [4].

The emergence of *S.pneumoniae* with reduced susceptibility to penicillin has been observed in Brazil [5] and in many parts of the world. In addition, reduced susceptibility to extended-spectrum cephalosporins such as ceftriaxone has become a serious problem because it limits the available treatment options for pneumococcal invasive diseases [6]. Penicillin-non-susceptible isolates have been identified among 15 % of the pneumococcal meningitis isolates reported in Salvador, Bahia since 1996 [7]. These isolates are restricted to five serotypes (14, 19A, 19 F, 23 F and 6B). Serotype 14 was the main penicillin-non-susceptible serotype within this area, as it was in the U.S. prior to PCV7 implementation [8], and has disseminated to widely separate geographic areas [3].

Widespread use of PCV7 dramatically affect the epidemiology of invasive pneumococcal disease (IPD) and carriage reservoir [9, 10]. The Ministry of Health incorporated PCV7 in Brazil in 2001 for groups with special clinical conditions considered at high risk of IPD, as immunodeficiency, asplenia and severe cardio-pulmonary diseases, who received vaccination at special immunobiological reference center and at private clinics. In 2010, nationwide PCV10 vaccination started for children less than 2 years of age through the national immunization program [11].

Pneumococcal clones have been shown to switch their capsular serotype by exchanging genetic material with other pneumococci; such changes could affect the ability of conjugate vaccines to control disease and could alter the relationship between antimicrobial resistance and serotype [1, 3]. Pneumococcal strain surveillance over time is essential to determine the relative importance of established and emerging antimicrobial-resistant clonal complexes [8]. So far, few publications have addressed the distribution of pneumococcal penicillin non-susceptible clonal complexes in Latin America [7]. Here we describe the temporal incidence, serotype distributions and genotype diversity of penicillin-nonsusceptible *S.pneumoniae*

(PNSSP) strains recovered from meningitis cases from 1996 through 2012.

## Methods

### Study population and surveillance system

Active surveillance for pneumococcal meningitis was established at the Hospital Couto Maia, a state infectious disease hospital with 120 beds, which serves as the reference center for meningitis in the Salvador Metropolitan region (3,573,973 inhabitants). The state health department requires that all suspected meningitis cases from inside the metropolitan region are referred to that hospital, and more than 95 % of the meningitis reports from the region are reported from that site [12]. From January 1996 to December 2012, our study team reviewed the daily clinical laboratory records at the hospital to identify all patients for whom cerebrospinal fluid cultures yielded *S.pneumoniae*.

### Clinical and epidemiological data collection

For all identified pneumococcal meningitis patients who were admitted to the surveillance hospital, a standardized data entry form was used to extract demographic and clinical information from their medical records. After their cases were identified, patients were interviewed to obtain information regarding potential risk factors for acquiring penicillin-non-susceptible pneumococci, such as acute illness preceding meningitis and comorbidities.

### Laboratory procedures

#### Identification and susceptibility testing

The pneumococcal isolates identified in this hospital were sent to the Laboratory of Pathology and Molecular Biology at the Gonçalo Moniz Research Center CPqGM/FIOCRUZ for confirmation. The microbiological testing to confirm the *S.pneumoniae* isolates were performed by standard methods, including Gram stain, colony morphology on agar media with 5 % of sheep blood, optochin susceptibility (5 µg Oxoid disks) and bile solubility. The broth microdilution method was performed according to Clinical and Laboratory Standard Institute recommendations to determine the susceptibility of the isolates to penicillin, ofloxacin, cefotaxime, clindamycin, chloramphenicol, erythromycin, tetracycline, rifampicin, TMP-SXZ, and vancomycin (Sigma–Aldrich, Germany). Quality control was performed by testing the *S. pneumoniae* ATCC 49619 isolate. The current CLSI criteria were applied for susceptibility interpretation. According to the CLSI breakpoints for parenteral penicillin (meningitis), all isolates with MIC value  $\geq 0.12$  µg/mL were defined as PNSSP [13].

#### Determination of capsular serotypes

From 1996 to 2005, pneumococcal strains were serotyped by the Quellung reaction with capsular type-specific anti-

pneumococcal sera at the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). After 2006, capsular serogroups/serotypes were deduced using multiplex-PCR as described elsewhere [14, 15]. All isolates identified as serogroup 6 in the multiplex-PCR were subjected to *wciN6C*-specific PCR, as previously described, for the identification of potential serotype 6C and 6D isolates [16]. Isolates with negative or equivocal multiplex PCR results were subjected to Quellung reaction testing for capsular type definition at the CDC.

### Molecular typing

Briefly, total DNA was extracted and digested with *Sma*I, and the DNA fragments were resolved by PFGE as described previously [17]. The Gel Compar software package (version 4.0; Applied Maths, Bionumerics) was used to compare the band patterns. PFGE patterns were clustered by the unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA), and a dendrogram was generated from a similarity matrix calculated using the Dice similarity coefficient, with an optimization of 1.0 % and a tolerance of 1.5 %. PFGE patterns were defined as isolates with a similarity of 80 % or higher in the dendrogram.

MLST was performed as previously described [18] on representative isolates according to the following criteria: (i) a minimum of two isolates from each PFGE pattern containing 10 or more isolates were selected, (ii) a minimum of one isolate from each PFGE pattern containing two to nine isolates was selected and, (iii) for a randomly selected group of 23 isolates with unrelated PFGE patterns.

The sequence types (STs) were obtained with reference at the MLST database (<http://pubmlst.org/spneumoniae/>) and the alternatives primers recommended by CDC (<http://www.cdc.gov/streplab/alt-MLST-primers.html>). New allelic profiles have been submitted to the MLST database for ST assignment.

Clonal Complex (CC) are groups of STs which share a recent common ancestor. *goeBURST* was used to estimate the relationships among the different STs. *goeBURST* is a java implementation of the *eBURST* algorithm rules proposed by Feil et al, 2004 [19] that uses a graphic matrix approach to ensure an optimal solution for the placement of links between STs. Version 1.2.1 of the software was used (<http://goeburst.phyloviz.net>).

### Data analysis

A clinical and epidemiological database was created and analyzed with Epi-Info Version 3.5.1 (CDC, Atlanta, GA). We calculated annual incidence rates (cases per 100,000 population) by dividing the number of cases among residents of the Metropolitan Region of Salvador (MRS) by the estimated population, using 2000 census

bureau (3,021,572 population) to calculate rates for 1996 through 2007; for 2008 through 2012, we used the 2010 census estimate of the population (3,573,973 population) [20]. Fisher's exact or chi-square tests were used to compare differences between proportions for dichotomous variables, and odds ratio (OR) and 95 % confidence interval (CIs) were calculated as measure of association. The chi-square test for linear trends was applied to compare the fluctuations in incidence rates per year and for comparison of PNSSP proportions. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . Univariate and multivariate logistic regression models were constructed to identify risk factors for invasive diseases caused by PNSSP. Multivariate analysis was calculated using unconditional logistic regression. To be included in this model, a variable was considered when presented a  $p$  value less than 0.05 in univariate analysis.

### Ethics statement

The study was approved by the Institutional Review Board of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Brazilian Ministry of Health and Hospital Couto Maia. Patients were enrolled in the study according to informed consent procedures. All patients or legal guardian gave written informed consent prior to enrolling in the study.

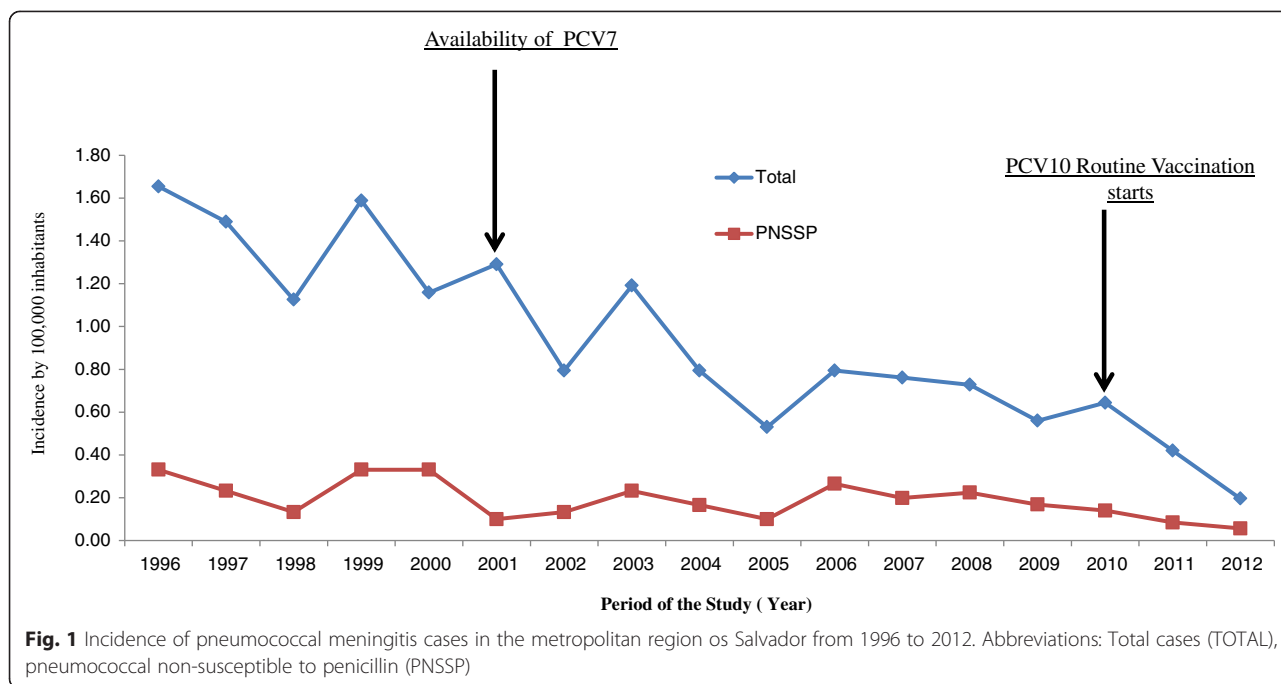
### Results

#### Surveillance for penicillin nonsusceptible pneumococcal meningitis

A total of 917 patients with *S. pneumoniae* meningitis were consecutively identified at the surveillance hospital during 17 years of laboratory-based active surveillance. Pneumococcal isolates were available for characterization for 854/917 (93.1 %) cases. Considering that 489 patients resided within the Metropolitan Salvador, the annual incidence of pneumococcal meningitis declined from 1.65/100,000 population (1996) to 0.2/100,000 population in 2012. We identified 173/854 (20.3 %) isolates as PNSSP. On the basis of 101 (58 %) cases that occurred in patients who resided in MRS and had isolates with penicillin MIC  $\geq 0.12$   $\mu\text{g/mL}$ , the annual incidence for PNSSP was estimated to be 0.3 case per 100,000 population (1996) declined by 82 % in 17-years of surveillance, ranging from 0.3 to 0.06 cases per 100,000 population [ $p < 0.001$ ] (Fig. 1).

#### Patient characteristics

Of the 844 patients for whom demographic information was available, 317 (37.6 %) were children aged  $< 5$  years and 542 (64.2 %) were male. Of the 173 cases that were penicillin non-susceptible, 61.1 % occurred in children less than 5 years of age ( $p < 0.05$ ) (Table 1) and 49.1 % occurred in children aged  $< 2$  years. A clinical presentation of meningitis preceded by pneumonia was associated



with isolates non-susceptible to penicillin ( $p = 0.03$ ) in univariate analysis (Table 1). The overall case fatality ratio was 30.3 %. After adjusting in multivariate analyses, risk factor for having meningitis due to PNSSP was age less than five years old (OR, 4.2; 95 % CI, 2.1-8.4).

**Antibiotic susceptibility and serotype distribution**

All 854 isolates were submitted for antibiotic susceptibility testing and serotyping. All isolates were

susceptible to vancomycin, and  $\geq 98$  % of isolates were susceptible to ofloxacin, cefotaxime, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol, and rifampicin. Overall, 20.3 % ( $n = 173$ ) of isolates were PNSSP, 48 % ( $n = 410$ ) to TMP-SXZ, and 27 % ( $n = 230$ ) to tetracycline. The PNSSP isolates were commonly non-susceptible to TMP-SXZ (138/173, 79.8 %) and tetracycline (27/173, 15.6 %) and less commonly non-susceptible to cefotaxime (7/173, 4.0 %), ofloxacin (3/173, 1.7 %) and erythromycin (1/173,

**Table 1** Characteristics of patients with pneumococcal meningitis, stratified by penicillin susceptibility

| Characteristics                                  | Penicillin non-susceptible( $n = 173$ ) |              | Penicillin Susceptible( $n = 681$ ) |              | OR 95 % CI                 | $p$ value |
|--|---|--------------|-------------------------------------|--------------|----------------------------|-----------|
|  | N° of cases with information            | N° (%) cases | N° of cases with information        | N° (%) cases |                            |           |
| Male   | 170                                     | 118 (69.4 %) | 671                                 | 424 (63.2 %) | 1.32 [0.92–1.90]           | 0.13      |
| Age  | 162                                     |              | 651                                 |              |                            |           |
| <5 years   |   | 99 (61.1 %)  |                                     | 218 (33.5 %) | 4.2 [2.1–8.4] <sup>2</sup> | <0.05     |
| $\geq 5$ years                                   |   | 63 (38.9 %)  |                                     |              |                            |           |
| Neurological condition at admission <sup>1</sup> | 104                                     | 81 (77.9 %)  | 356                                 | 289 (81.2 %) | 0.82 [0.47–1.40]           | 0.45      |
| Acute illness preceding meningitis               | 61                                      |              | 177                                 |              |                            |           |
| Pneumonia  |   | 7 (11.5 %)   |                                     | 7 (3.9 %)    | 3.15 [1.05–9.37]           | 0.03      |
| AOM  |   | 9 (14.8 %)   |                                     | 31 (17.5 %)  | 0.81 [0.36–1.82]           | 0.61      |
| URTI   |   | 13 (21.3 %)  |                                     | 38 (21.5 %)  | 0.99 [0.48–2.01]           | 0.97      |
| ICU admission                                    | 86                                      | 38 (44.2 %)  | 282                                 | 137 (48.6 %) | 0.84 [0.50–1.36]           | 0.47      |
| >10 days of hospitalization                      | 157                                     | 94 (59.9 %)  | 643                                 | 413 (64.2 %) | 0.83 [0.58–1.18]           | 0.30      |
| Death  | 160                                     | 64 (40 %)    | 645                                 | 195 (30.2 %) | 1.54 [1.07–2.20]           | 0.01      |

Note. Data are no. (%) of patients for whom information were obtained, ICU intensive care unit, AOM Acute Otitis Media, URTI Upper Respiratory Tract Infection  
<sup>1</sup>Coma/Altered mental status. <sup>2</sup> Adjusted odds ratio



**Table 2** Characteristics of penicillin non-susceptible pneumococcal isolates from meningitis cases identified from 1996 through 2012

| Serotype | Antibiotic resistance | N° of isolates    | PFGE profile | ST   |      |
|----------|-----------------------|-------------------|--------------|------|------|
| VT       | 14                    | TMP-SXZ, TET      | 60           | A    | 66   |
|          |                       | CEF               | 7            | GK   | 156  |
|          | 6B                    | TMP-SXZ, CLI, TET | 8            | AV   | 751  |
|          |                       | ERI, RIF          | 3            | N    | 4980 |
|          | 19 F                  | TMP-SXZ, TET      | 2            | DM   | 177  |
|          |                       | TMP-SXZ           | 1            | GK   | 156  |
|          | 23 F                  | TMP-SXZ, TET, CLI | 10           | GA   | 338  |
|          |                       | TET, CLO          | 5            | BZ   | 8080 |
|          | 9 N                   | TMP-SXZ           | 1            | GA   | 737  |
|          | 7C                    | TMP-SXZ           | 1            | A    | 66   |
| NVT      | 19A                   | TMP-SXZ           | 1            | DP   | 1118 |
|          |                       |                   | 1            | N    | 4926 |
|          |                       | 1                 | CI           | 8098 |      |
|          |                       | 1                 | BQ           | 2408 |      |
|          | 6C                    | TMP-SXZ           | 1            | FV   | 2777 |
|          | 23B                   | TMP-SXZ           | 1            | AK   | 3536 |
|          |                       |                   | 1            | FP   | 8089 |
|          | 13                    | TMP-SXZ           | 1            | GD   | 8094 |

Note: VT –PCV10 Vaccine Type; NVT –Non PCV10 Vaccine Type; cefotaxime (CEF), clindamycin (CLI), chloramphenicol (CLO), erythromycin (ERI), tetracycline (TET), rifampicin (RIF), trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SXZ)

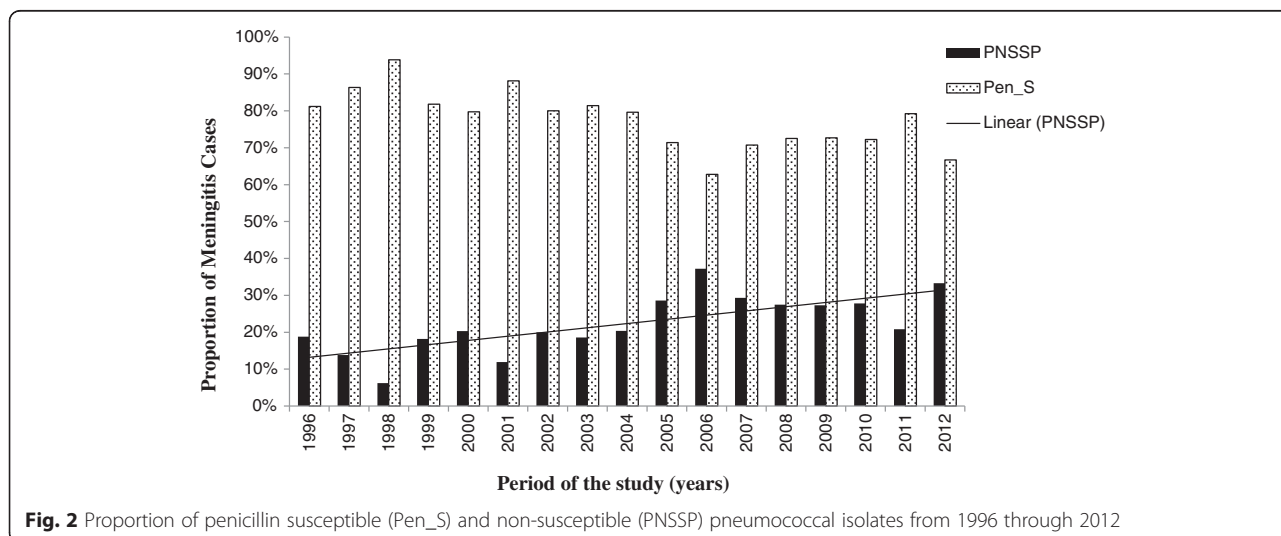
0.6 %). Resistance to ≥ 3 antibiotics was found in four different serotypes (14, 6B, 23 F and 19 F) (Table 2). Only ten isolates (5.8 %, 10/173) had a high level of resistance to penicillin (three isolates had MIC = 2 µg/mL and seven isolates had MIC ≥ 4 µg/mL). Six of these penicillin resistant strains were also resistant to cefotaxime (MIC ≥ 1 µg/mL). The prevalence of PNSSP isolates increased

from 18.8 % in 1996 to 33.3 % in 2012 (chi-square for linear trend = 14.5; p < 0.001) (Fig. 2).

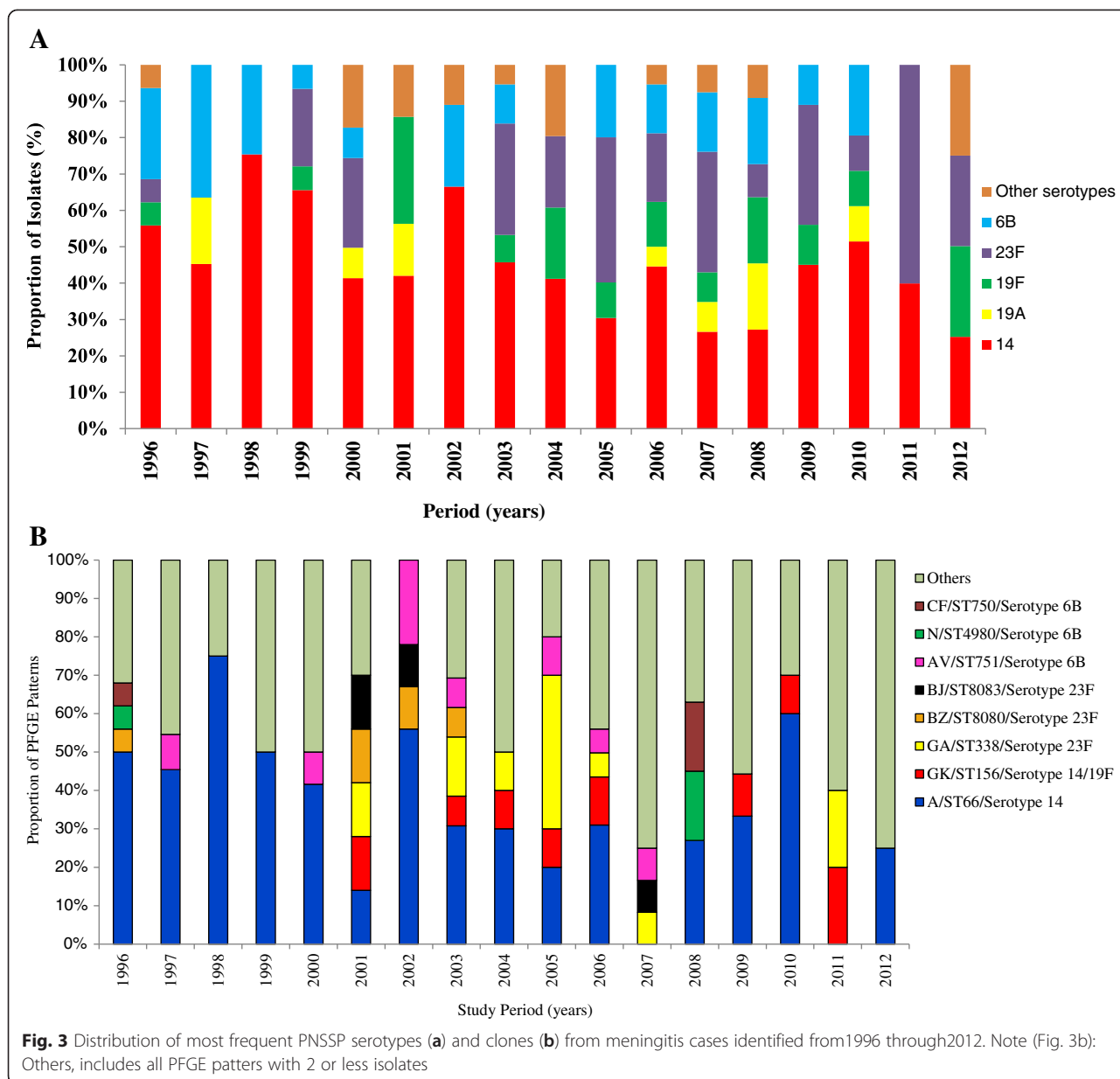
Fifty six capsular serotypes were found among the pneumococcal isolates identified during surveillance. Prevalent serotypes included 14 (12 %), 3 (7.7 %), 6B (7.4 %), 19 F (7.3 %), 23 F (6.6 %), 18C (5.3 %), 4 (4.4 %), 6A (3.4 %), 10A (2.9 %), and 8 (2.4 %). Together, these 10 serotypes represented 512 (60 %) of the isolates. The overall percentage of capsular types included in the PCV10 vaccine accounted for 50.5 %. A total of 13 different serotypes were identified among the PNSSP isolates. The most frequent were 14 (45.1 %; 78/173), 23 F (19.1 %; 33/173), 6B (14.4 %; 25/173), 19 F (9.3 %; 16/173) and 19A (5.2 %; 9/173) (Fig. 3a). With the exception of 19 F, all of these serotypes were significantly associated with penicillin non-susceptibility: 14 (OR, 14.14; 95 % CI, 9.05–22.09), 23 F (OR, 5.49; 95 % CI, 3.20–9.32), 6B (OR, 2.49; 95 % CI, 1.47–4.20) and 19A (OR, 4.07; 95 % CI, 1.60–10.42). Only three serotypes identified among the PNSSP isolates (19A, 12 F and 13) are not represented in the PCV10. The proportions of PCV10 serotypes among the PNSSP isolates were 94 % (163/173). PCV10 projected coverage was 47.9 % (78/163) and 55.2 % (90/163) of PNSSP isolated from patients <2 and < 5 years of age, respectively.

**Molecular typing**

A total of 173 PNSSP isolates were analyzed by PFGE and 138 were analyzed by MLST. We identified 19 PFGE groups that ranged in isolate number from 2 to 61. A total of 16.8 % (28/173) of the isolates had a single electrophoretic profile. The distribution of the major PFGE clonal groups (composed of 3 or more isolates) is presented in Fig. 3b. Among these, clonal group A was the largest group with 35.3 % (61/173) of the



**Fig. 2** Proportion of penicillin susceptible (Pen\_S) and non-susceptible (PNSSP) pneumococcal isolates from meningitis cases from 1996 through 2012



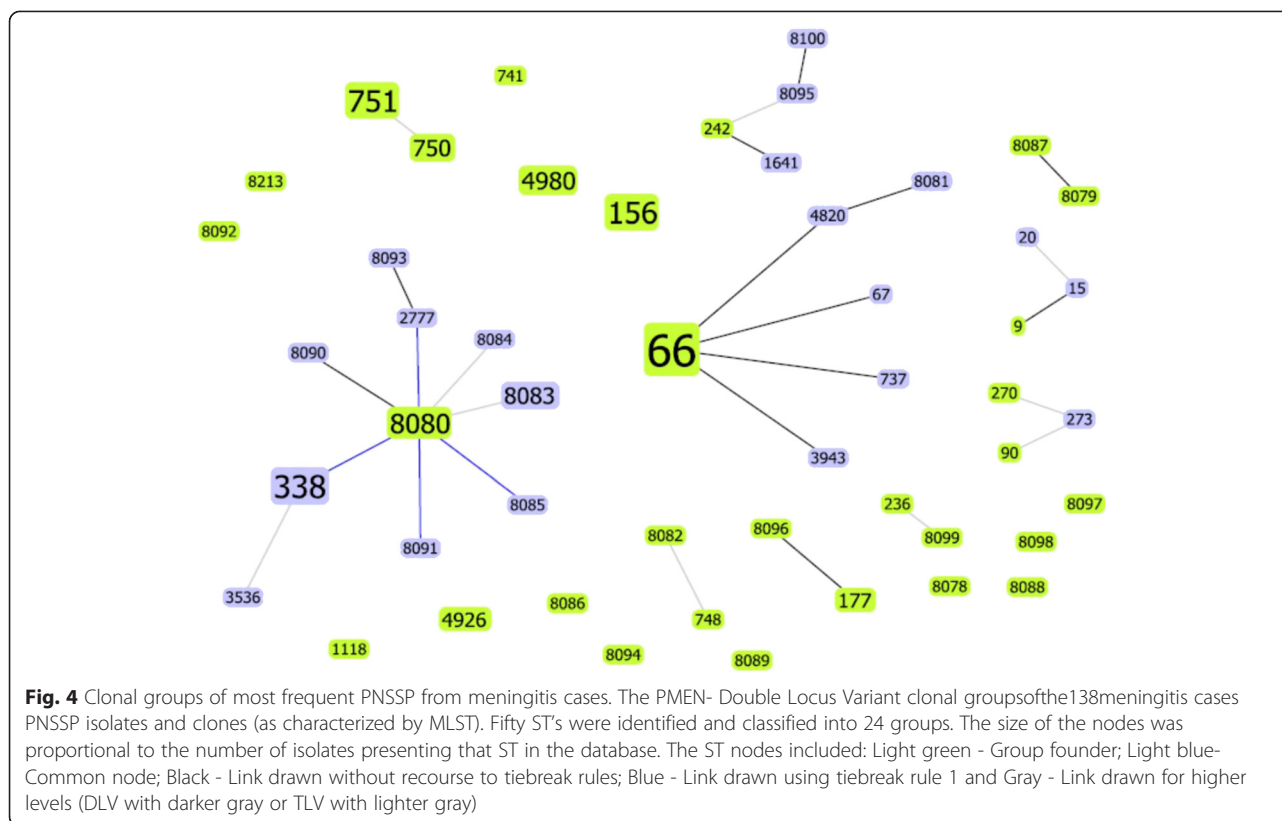
isolates. This clonal group was comprised primarily of serotype 14 isolates and classified as ST66; the second most common group was PFGE type GK /ST 156 with eight isolates, which were mainly serotype 14 (7) and 19 F(1) and resistant to penicillin (MIC range from 2 to 8 µg/mL) and cefotaxime (MIC range 1 to 4 µg/mL). Serotype 23 F also was commonly associated with resistance and was compounded by PFGE type GA/ST 338(10 isolates) followed by PFGE type BZ/ST 8080 (5 isolates) and PFGE type BJ/ST 8083 (3 isolates). Serotype 6B clustered in three mainly PFGE/MLST types, being PFGE type AV/ST 751 (8 isolates), PFGE type CF/ST4980 (4 isolates) and PFGE type N/ST750 (3 isolates) (Table 1). Additionally, no new genotype was identified within a 2-year period after

PCV-10 introduction into the childhood immunization program, at least among PNSSP from meningitis cases.

The diversity of the 138 PNSSP isolates and the 8 PMEN international clones was visualized with the goeBURST analysis (Fig. 4). As shown in Fig. 4, the STs found in the population of PNSSP isolates were highly diverse and grouped into 24 clusters. The most frequent sequence type among the PNSSP isolates was ST66 serotype 14. This clonal group was also persistent over the 17 years of surveillance.

**Discussion**

Since the identification of the first penicillin non-susceptible *S. pneumoniae* case in Brazil in 1988 [21],



surveys have reported that up to 20 % of pneumococcal meningitis isolates with decreased penicillin susceptibility [22, 23]. Our data indicate that the proportion of PNSSP in meningitis cases has been fairly stable, with an average of 20.3 % of pneumococcal isolates being non-susceptible to penicillin. In contrast, the pneumococcal meningitis epidemiology continuously changed during the past 17 years in Salvador Metropolitan area. One of the most important changes was the sustained decrease in the incidence rate observed from 1996 to 2012.

In Brazilian nationwide surveillance from 1993 to 2004, an increase of penicillin non-susceptibility was observed (10 % to 28 %), with 6 % of the isolates displaying a high level of resistance [24]. According to Brandileone MCC et al (2006), there are geographic differences between PNSSP isolates in this country. Between 2000 and 2005, in the northeastern region, the proportion of PNSSP isolates was 20 %. The southern and southeastern regions had a higher percentage of PNSSP isolates (28 %) and the lowest rate in the north region was 8 % [24].

The penicillin resistance rate in Brazil was lower than other Latin America countries, including Colombia, Bolivia, Mexico and Venezuela, which reported rates above 30 % [25]. In contrast, Japan have reported even higher proportion of PNSSP (76.6 %) [26].

Additionally, we observed that a high proportion of isolates were non-susceptible to antibiotics commonly used in outpatient settings for acute respiratory infection treatments in Brazil. For example, the proportion of TMP-SXZ non-susceptible isolates reached 72 % in 2006 and keep a rate around 50 % until 2012. In Asian countries invasive pneumococcal isolates remained highly resistant to macrolides, tetracycline, and TMP-SXZ each year [27]. In this study setting, we found a lower proportion (0.6 %) of isolates resistant to erythromycin in comparison with developed countries [28, 29] other Latin American countries [30] and wealthier regions within Brazil [31]. This may be due to the relatively high cost of macrolides, which limits its use in clinical practice in low income population settings.

Serotype distribution information is essential in evaluating the potential benefits of pneumococcal conjugate vaccines, particularly in developing countries where the cost of newly available polysaccharide capsule-protein conjugate vaccines is high relative to the available health-care resources. Our findings regarding serotype distributions confirm those from national surveys that indicated that a limited spectrum of serotypes were responsible for the majority of meningitis cases due to PNSSP isolates in Brazil. In general, serotypes 14, 23 F, 6B, 19 F and 19A were the most frequent among the PNSSP isolates observed in our study. These results are similar to those reported in

other regions in Brazil [32, 33] and in other Latin American countries [6]. Serotype 14 was the most common serotype, which accounted for 44.8 % of the total PNSSP isolates. Additionally, serotypes 23 F, 6B and 19 F are important reservoirs of PNSSP in this setting.

In 2010, PCV10 was introduced country wide for children less than 2 years of age in as part of Brazil's national immunization program. Recently, the effectiveness of PCV10 in Brazil was evaluating by a case-control study, which demonstrated that PCV10 prevents invasive disease caused by vaccine serotypes, in agreement with our finds in this study [34]. However, evaluation of the serotype distribution showed that serotypes 14, 6B, 23 F, 18C and 19 F remain among the most frequent serotypes causing invasive disease two years after vaccine introduction. As only two years post-vaccination was evaluated (and considering the lower vaccine uptake observed in some places), there may not have been sufficient time to observe the protection effect in all population.

The largest represented clonal group (PFGE pattern A) comprised 35 % of the penicillin non-susceptible isolates. This group mainly included serotype 14 (ST66), which is a single locus variant of the ST67, Tennessee<sup>14</sup>-18 clone. ST66 is predominant throughout Brazil and is an important factor for maintaining the penicillin resistance rate [33]. Another important clonal group of serotype 14 is ST156, which emerged in 2001 and had an elevated MIC to penicillin and cefotaxime, this clonal group is a serotype switch variant of clone Spain<sup>9V</sup> - 3. ST156 has been associated with a broad variety of serotypes including 6B, 9A, 11A, 14, 15B/15C, 19A, 19 F, 23 F, and 24 F, suggesting a high propensity for recombination events [35]. This clonal complex associated with serotype 14 has been encountered in multiple countries including Norway, France, Spain, and the United States [1, 3, 8]. It is also very important to point out the circulation of Colombia<sup>23F</sup>-26 clone, ST338. This clonal group has also been reported in several countries [30, 36, 37]. Apart from these three clonal groups, the specific clonal structure of the PNSSP isolates was dominated by a few other clones (Fig. 4), highlighting 24 new STs. Such a high genetic diversity seems to be a characteristic of PNSSP clonal complexes in general [1].

Serotype and genotype prevalence fluctuations can occur naturally in pneumococcal populations in the absence of pressure exerted by conjugate vaccines. In the United States, clonal expansion (the increase in the number of previously rare clones that express non-vaccine serotypes) has been documented since the introduction of the heptavalent conjugate vaccine (PCV-7). Non-vaccine serotypes were increasingly a cause of disease in the United States in the post-PCV7 era, most frequently serotype 19A, which is associated with

antimicrobial resistance [37]. In Salvador, similar to the findings of others, a relatively small number of serotypes accounted for the majority of the PNSSP isolates, which resulted in an estimated PCV10 coverage of 94 % among those infected with PNSSP.

One of the main limitations of this study is the fact that all *S. pneumoniae* were isolated from meningitis cases. Information regarding other IPD manifestations in our region is often limited or unavailable. Although all of the pneumococcal isolates included in this study originated from only one hospital, Hospital Couto Maia is the state reference hospital in the city of Salvador, with about 95 % of the meningitis reports from the region originating from that site [12].

## Conclusions

Our results show sustained reductions in pneumococcal meningitis cases in the Metropolitan region of Salvador from 1996 to 2012, with a decrease of 82 % in the incidence of cases due to penicillin nonsusceptible pneumococci. In this setting, 94 % of PNSSP isolates were serotypes represented in the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine. Although nationwide PCV10 vaccination just started in 2010, PCV7 has been available in private clinics and CRIEs nationwide since 2001, which may have contributed to the observed reductions on the incidence of pneumococcal meningitis cases. Furthermore no new serotype or genotype was observed after PCV10 implementation. However, the circulation of non-vaccine PNSSP types as well as capsule switching may compromise the effect of the conjugate vaccine in the future and highlights the need for the constant surveillance of circulating PNSSP isolates.

## Abbreviations

PCV10: Pneumococcal conjugate vaccine ten valent; PCV7: Pneumococcal conjugate vaccine seven valent; PCV13: Pneumococcal conjugate vaccine thirteenvalent; PNSSP: Penicillin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae*; MIC: Minimal Inhibitory Concentration; PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis; MLST: Multi Locus Sequence Typing; CSF: Cerebrospinal Fluid; CRIE: Special Immunobiological Reference Center.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

MSS, JA and JNR conceptualized and designed the study, drafted the initial manuscript and approved the final manuscript as submitted. MSS, JA, APOM, ECE, SMC and JBTLM participated in study design, and acquired and analyzed majority of data. LCC, MGC, MGR, AIK and JNR participated in the design and coordination of the study, and helped draft and revise the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

We thank the study patients and their families and the Hospital Couto Maia clinical, laboratory and administrative staff. We especially thank Neide Oliveira, Marcelo Teles Bastos Ribeiro and Ronaldo José Ribeiro Santos for their immensurable laboratory surveillance help, Éder Silva and Silvana Paz for PCR and sequencing support and Tainara Q. Oliveira and Renan Cardoso Nery Santos for their participation in data collection and processing.

### Funding source

This work was supported by grants from the Brazilian National Research Council (482755/2010-5), the Bahia State Foundation for the support of research (PP-SUS0001/2009), Strategic program to support health research – PAPES (#407551/2012-3), and the National Institute of Health (R01 TW007303,D43 TW00919).

### Author details

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz/ Ministério da Saúde, Salvador, Bahia 40296-710, Brazil. <sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170115 Salvador, BA, Brazil. <sup>3</sup>Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia 45029-094, Brazil. <sup>4</sup>Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, Bahia 45206-190, Brazil. <sup>5</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia 40110-902, Brazil. <sup>6</sup>Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, New Haven, CT 06520, USA. <sup>7</sup>Centers for Disease Control and Prevention, Streptococcus Laboratory, Atlanta, GA 30333, USA.

Received: 13 January 2015 Accepted: 21 July 2015

Published online: 30 July 2015

### References

- Jefferies JM, Smith AJ, Edwards GF, McMenamin J, Mitchell TJ, Clarke SC. Temporal analysis of invasive pneumococcal clones from Scotland illustrates fluctuations in diversity of serotype and genotype in the absence of pneumococcal conjugate vaccine. *J Clin Microbiol*. 2010;48(1):87–96. doi:10.1128/JCM.01485-09.
- World Health Organization (WHO). Pneumococcal vaccines, 2012. [http://www.who.int/wer/2012/wer8714/en] Accessed January 5, 2015
- Hackel M, Lascols C, Bouchillon S, Hilton B, Morgenstern D, Purdy J. Serotype prevalence and antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates among global populations. *Vaccine*. 2013;31(42):4881–7. doi:10.1016/j.vaccine.2013.07.054.
- Reinert RR. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15 Suppl 3:7–11. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02724.x.
- Alvares JR, Mantese OC, Paula A, Wolkers PC, Almeida W, Almeida SC, et al. Prevalence of pneumococcal serotypes and resistance to antimicrobial agents in patients with meningitis: ten-year analysis. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(1):22–7.
- Castaneda E, Agudelo CI, Regueira M, Corso A, Brandileone MC, Brandao AP, 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*. 2009;28(9):e265–70. doi:10.1097/INF.0b013e3181a74b22.
- Ko AI, Reis JN, Coppola SJ, Gouveia EL, Cordeiro SM, Lobo TS, et al. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil. *Clin Infect Dis*. 2000;30(1):78–86.
- Beall B, McEllistrem MC, Gertz Jr RE, Wedel S, Boxrud DJ, Gonzalez AL, et al. Pre- and post-vaccination clonal compositions of invasive pneumococcal serotypes for isolates collected in the United States in 1999, 2001, and 2002. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):999–1017.
- Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis*. 2010;201:32–41. doi:10.1086/648593.
- Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis*. 2010;3:e197–209. doi:10.1016/j.ijid.2009.05.010.
- Ministério da Saúde Brasil. Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário básico de vacinação da criança; 2010. Available at: http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq\_723\_infotec.pdf. Accessed January 5, 2015.
- Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB). Boletins Epidemiológicos. http://www.suvisa.ba.gov.br/vigilancia\_epidemiologica/consulta\_boletim\_epidemiologico/. Accessed January 5, 2015.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In: Seventeenth Informational Supplement. CLSI document M100-S21, v. 31, n. 1. Wayne, PA: NCCLS; 2011.
- da Gloria Carvalho M, Pimenta FC, Jackson D, Roundtree A, Ahmad Y, Millar EV, et al. Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1611–8. doi:10.1128/JCM.02243-09.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). PCR deduction of pneumococcal serotypes (2014) [http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html]
- Carvalho Mda G, Pimenta FC, Gertz Jr RE, Joshi HH, Trujillo AA, Keys LE, et al. PCR-based quantitation and clonal diversity of the current prevalent invasive serogroup 6 pneumococcal serotype, 6C, in the United States in 1999 and 2006 to 2007. *J Clin Microbiol*. 2009;47(3):554–9. doi:10.1128/JCM.01919-08.
- McEllistrem MC, Stout JE, Harrison LH. Simplified protocol for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2000;38:351–3.
- Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*. 1998;144(Pt 11):3049–60.
- Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol*. 2004;186(5):1518–30.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Resultado do censo populacional de Salvador e cidades na área metropolitana, Bahia. [http://www.ibge.gov.br/home/]. Accessed January 5, 2015.
- de Sousa Marques HH, Yamamoto M, Sakane PT, Caiaffa-Filho HH, Figueiredo Mendes CM. Relatively penicillin-resistant pneumococcal meningitis in a Brazilian infant. *Pediatr Infect Dis J*. 1988;7(6):433–4.
- Reis JN, Cordeiro SM, Coppola SJ, Salgado K, Carvalho MG, Teixeira LM, et al. Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2002;40(1):275–7.
- De OMenezes AP, Campos LC, Dos Santos MS, Azevedo J, Dos Santos RC, Carvalho MDA G, 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*. 2011;29(6):1139–44. doi:10.1016/j.vaccine.2010.12.021.
- Brandileone MC, Casagrande ST, Guerra ML, Zanella RC, Andrade AL, Di Fabio JL. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 5):567–74.
- Pan American Health Organization Sistema de Redes de Vigilância dos agentes Responsáveis por pneumonias e Meningites Bacterianas. Available at [http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\_content&view=article&id=2398:informe-regional-rede-sireva-ii-2010&Itemid=777]. Accessed 2014
- Imai S, Ito Y, Ishida T, Hirai T, Ito I, Maekawa K, et al. High prevalence of multidrug-resistant pneumococcal molecular epidemiology network clones among *Streptococcus pneumoniae* isolates from adult patients with community-acquired pneumonia in Japan. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(11):1039. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02935.x. -1045, 2009.
- Zhao C, Zhang F, Chu Y, Liu Y, Cao B, Chen M, et al. Phenotypic and genotypic characteristic of invasive pneumococcal isolates from both children and adult patients from a multicenter surveillance in China 2005–2011. *PLoS One*. 2013;8(12), e82361. doi:10.1371/journal.pone.0082361.
- Liu Z, Nachamkin I, Edelstein PH, Lautenbach E, Metlay JP. Serotype emergence and genotype distribution among macrolide-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in the postconjugate vaccine (PCV-7) era. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(2):743–50. doi:10.1128/AAC.05122-11.
- Ardanuy C, Tubau F, Pallares R, Calatayud L, Dominguez MA, Rolo D, et al. Epidemiology of invasive pneumococcal disease among adult patients in Barcelona before and after pediatric 7-valent pneumococcal conjugate vaccine introduction, 1997–2007. *Clin Infect Dis*. 2009;48(1):57–64. doi:10.1086/594125.
- Parrá EL, Ramos V, Sanabria O, Moreno J. Serotype and genotype distribution among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Colombia, 2005–2010. *PLoS One*. 2014;9(1), e84993. doi:10.1371/journal.pone.0084993. eCollection 2014.
- Andrade AL, Oliveira R, Vieira MA, Minamisava R, Pessoa Jr V, Brandileone MC, et al. Population-based surveillance for invasive pneumococcal disease and pneumonia in infants and young children in Goiania, Brazil. *Vaccine*. 2012;30(10):1901–9. doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.012.
- Yoshioka CR, Martinez MB, Brandileone MC, Ragazzi SB, Guerra ML, Santos SR, et al. Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87(1):70–5. doi:10.2223/JPED2063.

33. Brandileone MC, Di Fabio JL, Vieira VS, Zanella RC, Casagrande ST, Pignatari AC, et al. Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. *Microb Drug Resist.* 1998;4(3):209–17.
34. Domingues CM, Verani JR, Montenegro Renoier E, De Cunto Brandileone MC, Flannery B, et al. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. *Lancet Respir Med.* 2014;2:464–47.
35. Sjostrom K, Blomberg C, Fernebro J, Dagerhamn J, Morfeldt E, Barocchi MA, et al. Clonal success of penicillin nonsusceptible pneumococci. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(31):12907–12.
36. Beall W, Gertz RE, Hulkower RL, Whitney CG, Moore MR, Brueggemann AB. Shifting genetic structure of invasive serotype 19A pneumococci in the United States. *J Infect Dis.* 2011;203(10):1360–8. doi:10.1093/infdis/jir052.
37. Pai R, Moore MR, Plishvili T, Gertz RE, Whitney CG, Beall B. Postvaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. *J Infect Dis.* 2005;192(11):1988–95.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## 4.3 CAPÍTULO 3

### 4.3.1 Prefácio do artigo 3

Artigo a ser submetido para publicação.

Buscando construir uma base de dados que desse suporte a estudos posteriores sobre substituição e/ou troca de capsula entre sorotipos vacinais e não-vacinais (SNVTs), realizou-se uma caracterização genotípica de todos os SNVTs isolados dos casos de meningite pneumocócica ocorridos no período de 2008 a 2012. A partir dos resultados obtidos, não foi identificado nenhum sorotipo ou clone emergente após o período vacinal. Apenas o sorotipo 12F demonstrou um leve aumento no período pós-vacinal. Os perfis genéticos (PFGE/MLST) encontrados demonstram diversidade genética entre os isolados analisados, através de padrões eletroforéticos distintos, antes e após a introdução da PCV10. Os resultados sugerem que, mesmo entre novos clones encontrados entre os SNVTs no período pós-vacinal, não houve nenhum aumento em particular associado a estes padrões clonais.

Genetic profile and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* Non-PCV10 Serotypes Isolated from meningitis cases in Salvador, Brazil

Éder Silva dos Anjos<sup>1</sup>, Jailton Azevedo<sup>1</sup>, Soraia Machado Cordeiro<sup>2</sup>, Milena Soares dos Santos<sup>3</sup>, Eliane Cunegundes Escobar<sup>1</sup>, Paulo Rocha Lôbo<sup>1</sup>, Maria da Glória Carvalho<sup>4</sup>, Bernard W. Beall<sup>4</sup>, Mitermayer Galvão dos Reis<sup>1</sup>, Joice Neves Reis<sup>1, 2</sup>, Leila Carvalho Campos<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde, Salvador, Bahia, 40296-710, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 40170-115, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, 45029-094, Brasil.

<sup>4</sup>Centers for Disease Control and Prevention. Streptococcus Laboratory, Atlanta, 30333, USA.



\*Correspondent author: Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 40296-710 Salvador, BA, Brazil. Tel.: +55 71 31762350.

**Abstract:**

**Background:** In May 2010, 10-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV10) was introduced in the Brazilian childhood vaccination program. However, replacement by non-vaccine type (NVT) serotypes can reduce vaccine several benefits. We examined the distribution, antimicrobial susceptibility and genetic relationship among NVT pneumococcal serotypes isolated from meningitis patients during pre (January 2008 to May 2010) and post-vaccine (June 2010 to December 2012) periods.

**Methods:** Surveillance for pneumococcal meningitis was established at Reference Couto Maia Hospital of Infectious Diseases in Salvador, Brazil. The serotype was defined by multiplex PCR or Quellung reaction. Antimicrobial susceptibility was determined by E-test and MIC. Genetic relationship was accessed by PFGE and MLST techniques. **Results:** A total of 148 cases of meningitis were identified from January-2008 to December 2012, among that, NVT serotypes accounted for 77 (52%) isolates. In the post-vaccine period, the non-PCV10 serotypes 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. Among isolate's resistance findings, 43 (55.8%) were non-susceptible to one or more antibiotics. The non-susceptibility to penicillin was found among serotypes 19A (3 isolates), 9N (1 isolate) and 12F (1 isolate). The genotypic profile assessed by PFGE and MSLT showed a wide genetic diversity with an identification of 48 (62.3%) different genotypic profiles in both pre-vaccine period and post-vaccine period. The ST180 (serotypes 3 and 35B), ST193 (serotype 18B), and ST8376 (serotype 12F) were found in both pre-vaccine and post-vaccine periods. Seven STs were newly assigned in our study, of which five were from the pre-vaccine period, one from the post-vaccine period (ST9681), and one detected in both periods (ST8376). **Conclusion:** During the period of study, considered as a transition period following PCV10 introduction, no obvious serotype replacement or capsular switching by a new emerging clone among NVTs was observed.

## Introduction

*Streptococcus pneumoniae*, commonly known as the pneumococcus, is a major cause of morbidity and mortality worldwide, causing diseases that range in severity from meningitis, septicaemia, and pneumonia to sinusitis and acute otitis media (O'BRIEN et al., 2009). Almost all isolates that cause infection are encapsulated, and to date over 94 different pneumococcal serotypes are distinguished, expressing structurally and antigenically different capsular polysaccharides (PARK et al., 2007; KADIOGLU et al., 2008; CALIX; NAHM, 2010; MENEZES et al., 2013). The capsule is the target of all licensed vaccine formulations (FELDMAN; ANDERSON, 2014).

The licensure and subsequent widespread use of pneumococcal conjugate vaccines has contributed for the reduction in the overall incidence of invasive pneumococcal disease (IPD) worldwide, thereby also reducing carrier rates of vaccine-type strains and increasing herd immunity (PILISHVILI et al., 2010; CENTERS FOR DISEASE CONTROL PREVENTION, 2013). However, concerns have been raised that non-vaccine serotypes could increase in prevalence and reduce the benefits of vaccination (PILISHVILI et al., 2010).

The epidemiological effect of use of conjugate vaccines in new settings can be difficult to predict, so careful monitoring the epidemiology and understanding the dynamics of the pneumococcal population is needed to assess the initial and long-term effects of vaccination in each region. In 2010, Brazil introduced the 10-valent non-typable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PCV10 or PHiD-CV; GSK Biologicals, Rixensart, Belgium) into its routine National Immunization Program, in a three-dose scheme (2, 4 and 6 months) plus a booster at 12 months. This vaccine contains antigens designed to protect against the most prevalent serotypes (serotypes 4, 9V, 14, 19F, 23F, 18C, and 6B) and additionally the serotypes 1, 5, and 7F (PRYMULA; SCHUERMAN, 2009). Whether serotype replacement will overcome the benefits of PCV10 use over time is unknown.

Since 1996, a hospital-based surveillance of pneumococcal antibiotic resistance and capsular serotypes associated with pneumococcal meningitis has been conducted in

Salvador, Bahia (REIS et al., 2002; DE et al., 2011; M. S. DOS SANTOS et al., 2015). The aim of this study was to describe the genetic diversity and the antimicrobial susceptibility of *S. pneumoniae* non-PCV10 serotypes isolated from patients with meningitis before (January 2008 – May 2010) and after (June 2010 – December 2012) the introduction of PCV10 in Salvador, Bahia.

## **Methodology**

### ***S. pneumoniae non-PCV10 isolates***

From a total of 148 *S. pneumoniae* isolates collected from January 2008 through December 2012 as part of a hospital-based pneumococcal meningitis surveillance programme (M. S. DOS SANTOS et al., 2015), and 77 (52%) were non-PCV10 serotypes. The identification of the isolates was confirmed by standard methods (WERNER; MURDOCH, 2008). Serotypes were determined by multiplex-PCR and/or Quellung reaction (DIAS et al., 2007). Antimicrobial susceptibility was determined using the broth microdilution method to penicillin (PEN), cefotaxime (CEF), clindamycin (CLIN), chloramphenicol (CLO), erythromycin (ERI), levofloxacin (LEV), tetracycline (TET), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) and vancomycin (VAN) (Sigma-Aldrich, Germany), according to the CLSI guidelines (CLSI, 2014). The reference strain *S. pneumoniae* ATCC 49619 was used for quality control.

For comparison purposes, the non-PCV10 serotypes were separated into two periods: 1) pre-vaccine period (January 2008 to June 2010), accounting for 50 (52.1%) isolates, and 2) post-vaccine (July 2010 to December 2012), with 27 (52%) isolates.

### ***Molecular characterization***

All 77 non-PCV10 isolates were characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Chromosomal digests generated by *Sma*I were prepared and analyzed as described elsewhere (MCELLISTREM; STOUT; HARRISON, 2000). The fragments were separated by PFGE in 2% agarose gels using a CHEF-DRII apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) with pulse times of 2 to 30s for 19h at 14°C and 6 V/cm. The restriction profiles were analyzed by using the GelCompar II (Applied Maths, St. Martens, Belgium). A dendrogram was created using the unweighted pair-group with arithmetic mean (UPGMA) method and the Dice similarity coefficient, with a position

tolerance coefficient of 1.5%, in accordance with published interpretive criteria (TENOVER et al., 1995). Isolates with  $\geq 80\%$  relatedness were considered a cluster.

A random sample of half of isolates from the pre-PCV10 period (14/27 isolates) and post-PCV10 period (26/50 isolates) were selected for MLST analysis. Internal fragments of seven house-keeping genes (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* and *ddl*) were amplified by PCR method (ENRIGHT; SPRATT, 1998). DNA sequencing was performed using the Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an ABI Prism 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequences were edited and aligned using the BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9 and compared with sequences on the global MLST database website (<http://spneumoniae.mlst.net/>) to assign allele numbers and sequence type (ST). New alleles and allelic profile were also submitted to the curator for assignment of a ST.

## Results

### *Serotype distribution and antimicrobial susceptibility*

In the pre-vaccine period, the most frequent non-PCV10 serotypes were: 3 ( $n=6$ , 12%), 19A ( $n=4$ , 8%), and 6A ( $n=4$ , 8%). In the post-vaccine period, the non-PCV10 serotypes 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. Overall, of the 28 different non-PCV10 serotypes identified, six occurred only in the post-vaccine period (10F, 11A, 21, 22F, 23B and 24F), whereas the serotypes 6A, 6C, 17F, 18A, 19A, 20, 23A, 28A, 35F and 38 were found only in pre-vaccine period. A slight increase in the number of 12F serotype cases were detected in the post-vaccine period (Figure 1).

From 77 non-PCV10 isolates characterized, 43 (55.8%) were non-susceptible to one or more antibiotics. All the isolates were susceptible to cefotaxime, clindamycin, chloramphenicol, levofloxacin, and vancomycin. A total of 28 (36.4%) and 16 (20.8%) isolates were resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracyclin, respectively. The non-susceptibility to penicillin was found among serotypes 19A (3 isolates), 9N (1 isolate) and 12F (1 isolate). One isolate (serotype 21) from the post-vaccine period showed resistance to erythromycin (Figure 2).

### *PFGE and MLST analysis*

The genotypic profile assessed by PFGE showed a wide genetic diversity with an identification of 48 (62.3%) different genotypic profiles in both pre-vaccine period and post-vaccine period (Figure 2). MLST assay performed in 26 isolates from the pre-vaccine period allowed the identification of 22 different STs. In the post-vaccine period, 13 of 14 unique STs were detected. The ST180 (serotypes 3 and 35B), ST193 (serotype 18B), and ST8376 (serotype 12F) were found in both pre-vaccine and post-vaccine periods. Seven STs were newly assigned in our study, of which five were from the pre-vaccine period (ST9678, ST9679, ST9680, ST9070 and ST9071), one from the post-vaccine period (ST9681), and one detected in both periods (ST8376).

### **Discussion**

Comparing the distribution of the non-PCV10 serotypes in the pre-vaccine and post-vaccine periods, there was no emergence of a particular serotype in the period of study. Even the slight increase of serotype 12F in the post-vaccine period should be analyzed with caution. Besides the small number of isolates detected, it is worth considering that the PCV10 vaccine was introduced only recently in the studied region and 2010 was a year of transition. Furthermore, when we compare the number of the isolates of the serotypes 12F, 10A, 15B and 18B found in the post-vaccine period with those obtained in past years, during the surveillance (data not shown), a normal fluctuation of these serotypes was detected over the years without record of any specific emergence of a particular serotype. Fluctuations in the prevalence of a particular serotype may occur naturally in the population of pneumococci, even in the absence of selective pressure imposed by the use of conjugate vaccines (FINLAND; BARNES, 1977; LAGOS et al., 2008; RUCKINGER et al., 2008). Only the continuity of surveillance over time will can really assess the real impact of the introduction of the vaccine in our region.

In this work the serotype 19A was identified only in the pre-vaccine period, with 4 isolates. These findings are in agreement with the study of Dos Santos et al. (2013) in

São Paulo, which did not show an increased incidence of this serotype in that city during the post-vaccine period (S. R. DOS SANTOS et al., 2013). Furthermore, Castañeda et al. (2012) showed that the incidence of serotype 19A has remained low and stable in Latin America and the Caribbean for 20 years (CASTANEDA et al., 2012). These results contrast with those disclosed in the United States, with the expansion and emergence of strains of serotype 19A after the introduction of PCV7 vaccine (PAI et al., 2005; PILISHVILI et al., 2010; WEINBERGER; MALLEY; LIPSITCH, 2011).

In regard to serotype 6A, studies of the immunogenicity of PCV10 vaccine show that although it is active against this serotype, this activity is about 33% - 50% lower than that observed with PCV7, it is not clear, therefore, that PCV10 induces cross-protection against serotype 6A (VESIKARI et al., 2011; FARKOUH et al., 2012). In this study, the serotype 6A was found only in the pre-vaccine period.

Of the 77 isolates characterized during this study, 43 (55.8%) had antimicrobial resistance, and 13.5% of the isolates ( $n = 7$ ) showed resistance to two or more antibiotics. Multidrug resistance to antibiotics in *S. pneumoniae* is undoubtedly a cause for concern. In the United States, for example, within 30% of cases of severe pneumococcal disease, the bacteria is resistant to one or more clinically relevant antibiotics, leading to about 1,200,000 disease cases and 7,000 deaths per year (CDC, 2010).

Particularly in respect to penicillin, three of four serotype 19A isolates identified in the pre-vaccine period presented non-susceptibility to this antibiotic. In the United States, after PCV7 vaccination, serotype 19A has emerged as an important cause of invasive pneumococcal diseases which was also associated with increasing prevalence of multiple resistance to antibiotics, including penicillin (MOONEY et al., 2008; REINERT, 2009). Likewise, evidence of non-susceptibility to penicillin in the serotype 12F isolate of the post-vaccination period can be a warning for the epidemiological surveillance system in our region, especially if this lineage be established as the most prevalent over time after the introduction of PCV10, according to the results of this study seem to indicate.

The resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole (39%) and tetracycline (20.8%) observed in this study is consistent with previous work in our region (DE et al., 2011)

and with other national studies (KOETH et al., 2004; BRANDILEONE et al., 2006) and, may be partly associated with the indiscriminate use of antimicrobial (CORNICK; BENTLEY, 2012; GOOSSENS; CATRY; VERHAEGEN, 2013).

For the resistance to erythromycin observed in one isolate (serotype 21) of the post-vaccine period it is important to point out that macrolide resistance is overcoming resistance to penicillin in some regions of the world, from the spread of resistant clones (WOLTER et al., 2008). If the same will occur in our region, only a prospective study with a longer period of monitoring may provide more conclusive information.

The genotypic characterization of the *S. pneumoniae* isolates by PFGE and MLST showed that there is great genetic diversity among the non-PCV10 serotypes. One 9N isolate was identified as belonging to the ST66. It is important to note that this ST, associated with serotype 14, has been considered as one of the leading and most prevalent clones isolated from invasive disease in Salvador and Brazil (BRANDILEONE et al., 1997; SOGSTAD; HOIBY; CAUGANT, 2006; REIS et al., 2008). The ST180 (serotype 3), ST193 (serotype 18B) and ST218 (serotype 12F) were, respectively, related to globally disseminated clones Netherlands<sup>3</sup>-31, Greece<sup>21</sup>-30 and Denmark<sup>12F</sup>-34 described in the *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN)* (<http://web1.sph.emory.edu/PMEN/>).

As pointed out by Afonso et al. (2013), any study that uses a temporal method to determine the initial effects of a vaccine can be varied depending on vaccination coverage and the natural lag period between vaccination and protection (AFONSO et al., 2013). This study was conducted in the pre and early post-implementation of the PCV10 vaccine stages in Salvador, Bahia, Brazil and any conclusions that can be drawn from the results obtained here should be considered only as a trend regarding the distribution and molecular characterization of the non-PCV10 serotypes in our region in the post-vaccine period. This scenario can be changed as the use of PCV10 vaccine is expanded and a larger number of isolates can be studied. However, the results of our study can provide the basis for future analyzes regarding the effects of vaccination in the years following its introduction and monitoring population biology changes associated with vaccine introduction.

**Acknowledgments:** We thank Ana Paula de Oliveira Menezes for her help in PCR assays. We are also grateful to Silvana Paz for her help to providing sequencing data. This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (# 483674/2010-9), Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (PAPES #407551/2012-3) and Fundação Oswaldo Cruz.

## References

- Afonso, E. T., R. Minamisava, et al. (2013). "Effect of 10-valent pneumococcal vaccine on pneumonia among children, Brazil." *Emerg Infect Dis* **19**(4): 589-597.
- Brandileone, M. C., S. T. Casagrande, et al. (2006). "Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage." *J Med Microbiol* **55**(Pt 5): 567-574.
- Brandileone, M. C., V. S. Vieira, et al. (1997). "Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of streptococcus pneumoniae strains isolated from Brazilian children with invasive infections. Pneumococcal Study Group in Brazil for the SIREVA Project. Regional System for Vaccines in Latin America." *Microb Drug Resist* **3**(2): 141-146.
- Calix, J. J. and M. H. Nahm (2010). "A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene." *J Infect Dis* **202**(1): 29-38.
- Castaneda, E., C. I. Agudelo, et al. (2012). "Streptococcus pneumoniae serotype 19A in Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis, 1990-2010." *BMC Infect Dis* **12**: 124.
- CDC (2010). "Invasive pneumococcal disease in young children before licensure of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine - United States, 2007." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **59**(9): 253-257.
- CDC (2013). "Progress in introduction of pneumococcal conjugate vaccine - worldwide, 2000-2012." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **62**(16): 308-311.
- CLSI (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fourth informational supplement. C. D. M100-S24. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute.



- Cornick, J. E. and S. D. Bentley (2012). "Streptococcus pneumoniae: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides." Microbes Infect **14**(7-8): 573-583.
- de, O. M. A. P., L. C. Campos, et al. (2011). "Serotype distribution and antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007." Vaccine **29**(6): 1139-1144.
- Dias, C. A., L. M. Teixeira, et al. (2007). "Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children." J Med Microbiol **56**(Pt 9): 1185-1188.
- dos Santos, M. S., J. Azevedo, et al. (2015). "Temporal trends and clonal diversity of penicillin non-susceptible pneumococci from meningitis cases from 1996 to 2012, in Salvador, Brazil." BMC Infect Dis **15**: 302.
- dos Santos, S. R., L. F. Passadore, et al. (2013). "Serotype distribution of Streptococcus pneumoniae isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation." Vaccine **31**(51): 6150-6154.
- Enright, M. C. and B. G. Spratt (1998). "A multilocus sequence typing scheme for Streptococcus pneumoniae: identification of clones associated with serious invasive disease." Microbiology **144** ( Pt 11): 3049-3060.
- Farkouh, R. A., R. M. Klok, et al. (2012). "Cost-effectiveness models of pneumococcal conjugate vaccines: variability and impact of modeling assumptions." Expert Rev Vaccines **11**(10): 1235-1247.
- Feldman, C. and R. Anderson (2014). "Review: current and new generation pneumococcal vaccines." J Infect **69**(4): 309-325.
- Finland, M. and M. W. Barnes (1977). "Changes in occurrence of capsular serotypes of Streptococcus pneumoniae at Boston City Hospital during selected years between 1935 and 1974." J Clin Microbiol **5**(2): 154-166.
- Goossens, M. C., B. Catry, et al. (2013). "Antimicrobial resistance to benzylpenicillin in invasive pneumococcal disease in Belgium, 2003-2010: the effect of altering clinical breakpoints." Epidemiol Infect **141**(3): 490-495.
- Kadioglu, A., J. N. Weiser, et al. (2008). "The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease." Nat Rev Microbiol **6**(4): 288-301.

- Koeth, L. M., D. Felmingham, et al. (2004). "Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in Sao Paulo, Brazil from 1996 to 2000." *Int J Antimicrob Agents* **23**(4): 356-361.
- Lagos, R., A. Munoz, et al. (2008). "Age- and serotype-specific pediatric invasive pneumococcal disease: insights from systematic surveillance in Santiago, Chile, 1994--2007." *J Infect Dis* **198**(12): 1809-1817.
- McEllistrem, M. C., J. E. Stout, et al. (2000). "Simplified protocol for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Streptococcus pneumoniae*." *J Clin Microbiol* **38**(1): 351-353.
- Menezes, A. P., J. N. Reis, et al. (2013). "Update of pneumococcal PCR serotyping assay for detection of a commonly occurring type 19F wzy variant in Brazil." *J Clin Microbiol* **51**(7): 2470-2471.
- Mooney, J. D., A. Weir, et al. (2008). "The impact and effectiveness of pneumococcal vaccination in Scotland for those aged 65 and over during winter 2003/2004." *BMC Infect Dis* **8**: 53.
- O'Brien, K. L., L. J. Wolfson, et al. (2009). "Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates." *Lancet* **374**(9693): 893-902.
- Pai, R., M. R. Moore, et al. (2005). "Postvaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States." *J Infect Dis* **192**(11): 1988-1995.
- Park, I. H., D. G. Pritchard, et al. (2007). "Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*." *J Clin Microbiol* **45**(4): 1225-1233.
- Pilishvili, T., C. Lexau, et al. (2010). "Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine." *J Infect Dis* **201**(1): 32-41.
- Prymula, R. and L. Schuerman (2009). "10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* PD conjugate vaccine: Synflorix." *Expert Rev Vaccines* **8**(11): 1479-1500.
- Reinert, R. R. (2009). "The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*." *Clin Microbiol Infect* **15 Suppl 3**: 7-11.
- Reis, J. N., S. M. Cordeiro, et al. (2002). "Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador, Brazil." *J Clin Microbiol* **40**(1): 275-277.

- Reis, J. N., T. Palma, et al. (2008). "Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an urban slum community." J Infect **57**(3): 204-213.
- Ruckinger, S., R. von Kries, et al. (2008). "Childhood invasive pneumococcal disease in Germany between 1997 and 2003: variability in incidence and serotype distribution in absence of general pneumococcal conjugate vaccination." Vaccine **26**(32): 3984-3986.
- Sogstad, M. K., E. A. Hoiby, et al. (2006). "Molecular characterization of non-penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Norway." J Clin Microbiol **44**(9): 3225-3230.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, et al. (1995). "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." J Clin Microbiol **33**(9): 2233-2239.
- Vesikari, T., A. Karvonen, et al. (2011). "Immunogenicity of 10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus Influenzae* Protein D Conjugate Vaccine when administered as catch-up vaccination to children 7 months to 5 years of age." Pediatr Infect Dis J **30**(8): e130-141.
- Weinberger, D. M., R. Malley, et al. (2011). "Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination." Lancet **378**(9807): 1962-1973.
- Werno, A. M. and D. R. Murdoch (2008). "Medical microbiology: laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease." Clin Infect Dis **46**(6): 926-932.
- Wolter, N., A. von Gottberg, et al. (2008). "Molecular basis and clonal nature of increasing pneumococcal macrolide resistance in South Africa, 2000-2005." Int J Antimicrob Agents **32**(1): 62-67.

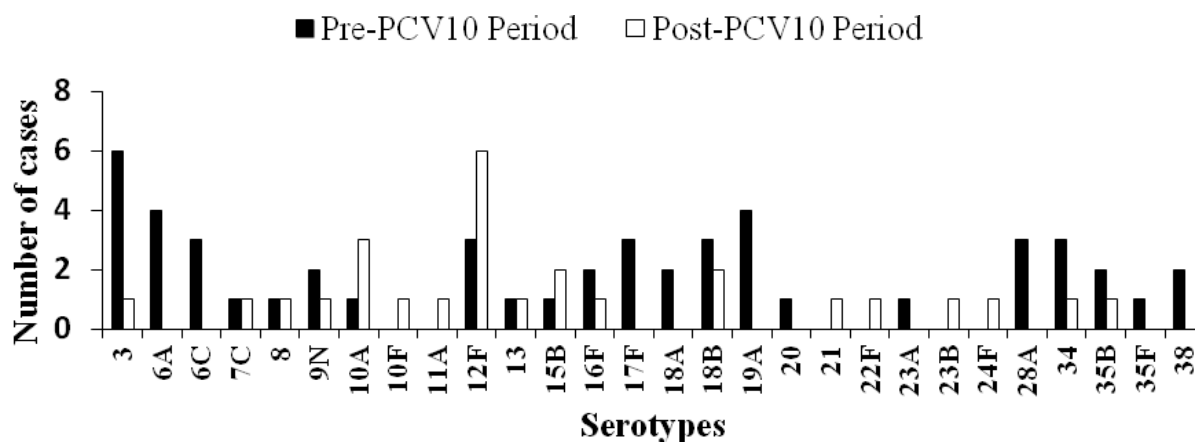


Figure 1 - NVTs serotype distribution among pneumococcal meningitis cases from metropolitan Salvador area, 2010-2012, stratified by pre-vaccine and post-vaccine periods ( $n=77$ ).

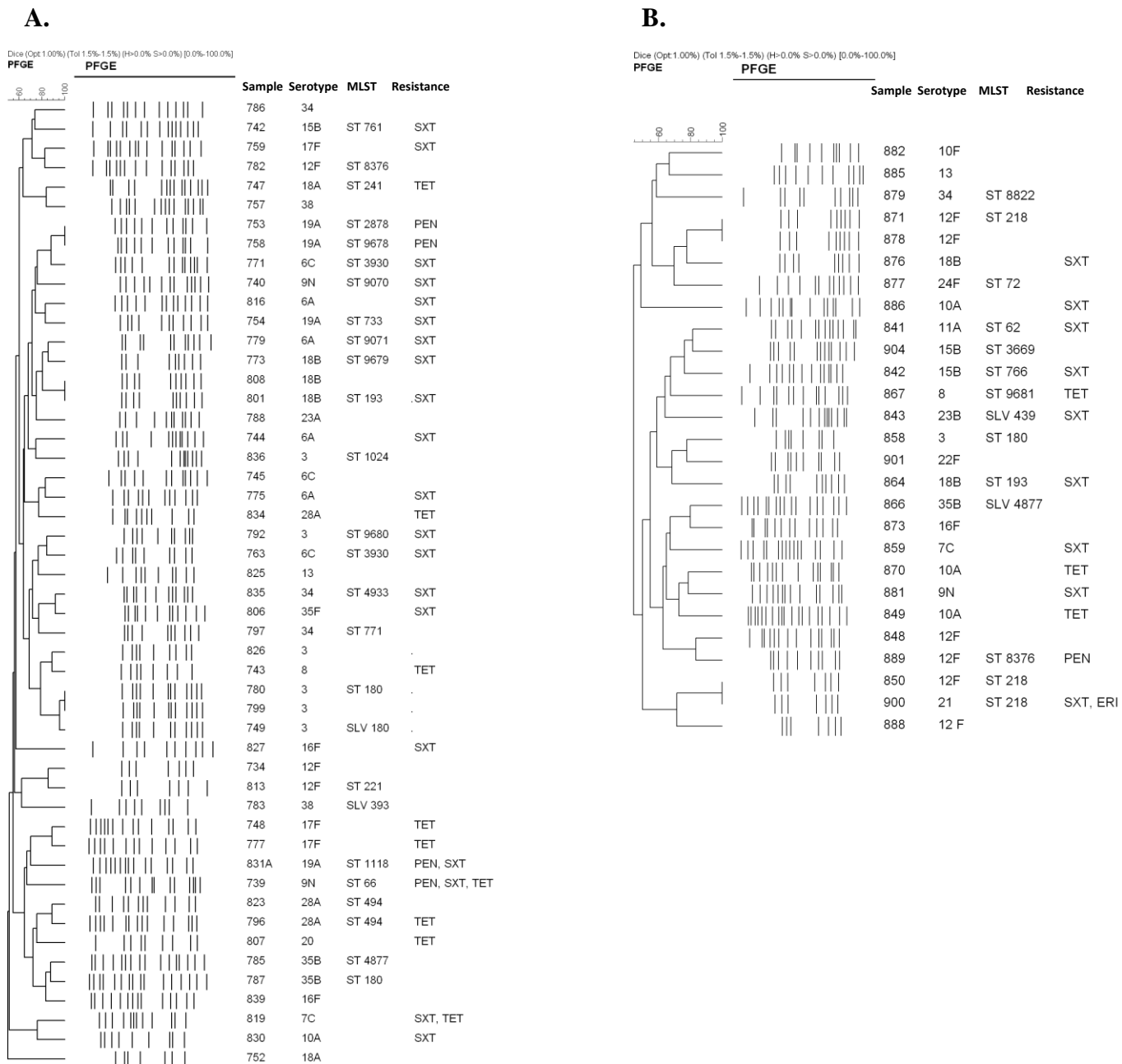


Figure 2. Dendrogram with molecular profile by PFGE among NVTs isolated from pneumococcal meningitis in metropolitan Salvador area. **A:** Pre-vaccine period ( $n=50$ ); **B:** Post-vaccine period ( $n=27$ ).

## 5 DISCUSSÃO

No ano de 2010, o programa nacional de imunizações promoveu a introdução da vacina pneumocócica PCV10 no seu calendário, tendo como alvo as crianças menores de dois anos. Com a larga experiência que a Bahia possui na condução de estudos populacionais e de avaliação do impacto de vacinas (RIBEIRO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2007; CARDOSO et al., 2012; CARDOSO et al., 2015) e os dados obtidos ao longo de 15 anos de estudos de vigilância para meningite pneumocócica (REIS et al., 2002; DE et al., 2011), a avaliação do impacto da PCV10 na epidemiologia da meningite pneumocócica tornou-se um objetivo factível de ser alcançado.

Embora não seja um estudo de efetividade da PCV10, as informações geradas no estudo de impacto são relevantes para monitorar e esclarecer as mudanças epidemiológicas ocorridas com a introdução da PCV10, e ainda contribui com informações detalhadas em médio e longo prazo sobre o agravo, o que não seria obtido na maioria dos estudos de efetividade.

Estudos epidemiológicos desta natureza já foram realizados em outras regiões do país, utilizando sistemas de vigilância de base hospitalar e/ou populacionais bem estabelecidos. Em relação às taxas de incidência estimadas nestas análises, os resultados obtidos no presente estudo foram similares aos encontrados nos estudos realizados por SANTOS et al. (2011), que descreveu uma redução da incidência de internação por DPI no Hospital das Clínicas de São Paulo, de 20,30 para 3,97 casos/1.000 admissões [ $p < 0.0012$ ] após dois anos após a disponibilização da PCV10 no PNI; HIROSE et al. (2015), que

utilizou dados de vigilância para meningite pneumocócica, também identificou uma redução da incidência após a introdução da vacina no Paraná, principalmente no grupo alvo da campanha (crianças menores que dois anos), cuja incidência reduziu de 6,01 para 2,49 casos/100.000 habitantes-ano; os casos por tipos vacinais também sofreram redução na proporção de ocorrência, no período pós-vacinal (80,7% vs 53,5%), da mesma maneira que foi observado nesta análise (51.9% vs 26.9%).

Já outro estudo que utilizou dados de vigilância sobre DPI conduzido por CAIERÃO et al. (2014) na região sul (Porto Alegre) e que caracterizou molecularmente isolados de DPI, não encontrou mudanças significativas no perfil de casos ocorridos por sorotipos incluídos na vacina, quando comparados os períodos pré e pós vacinal; as explicações para os achados incluíram a baixa proporção de casos em crianças menores que dois anos – faixa alvo da PCV10 – e a alta proporção de casos em adultos na análise, o que pode ter comprometido o seu desempenho.

Outro estudo realizado por AFONSO et al. (2013), utilizando casos de pneumonia oriundos desta região, relatou sobre o atraso no início da campanha e a cobertura vacinal ter sido menor (~80%) em Porto Alegre, quando comparada com outras cidades brasileiras (>90%) (AFONSO et al., 2013). Na Bahia também houve atrasos na distribuição das doses para a região metropolitana de Salvador, resultando numa cobertura no ano de 2010 de 4,8% (2.503 doses administradas) segundo dados da SESAB (DATASUS, 2015). Porém, de maneira geral, foi observada uma queda na incidência de casos por sorotipos vacinais, principalmente na faixa etária alvo da campanha de vacinação da PCV10. Em 2011, a cobertura vacinal pela PCV10 na RMS

chegou a 73%, com 38.035 doses aplicadas. Os níveis considerados satisfatórios para a cobertura vacinal foram atingidos em 2012 (81,5%), com 42.415 doses distribuídas. Outro estudo epidemiológico realizado nesta população após a introdução da vacina conjugada contra o meningococo tipo C (MMC) também evidenciou a influência da cobertura vacinal no impacto epidemiológico da vacinação em diferentes faixas etárias (CARDOSO et al., 2012).

Estes achados demonstram mudanças epidemiológicas em diferentes regiões do território brasileiro, revelando que, apesar do tamanho continental do Brasil e a influência de outras variáveis como cobertura vacinal e características peculiares das populações urbanas, a introdução da PCV10 tem apresentado mudanças no perfil da DPI que já estão sendo evidenciadas.

Além disso, deve-se considerar que a taxa de incidência da meningite pneumocócica tem reduzido ao longo dos anos nesta série histórica, desde 2000, resultado este que pode ser explicado por uma série de eventos que ocorreram ao longo dos anos: 1) o licenciamento da vacina pneumocócica conjugada 7-valente no ano de 2001, e sua disponibilidade em clínicas privadas para as populações que podiam arcar com os custos da mesma. Adicionalmente, o PNI disponibilizou a PCV7 nos centros de imunobiológicos especiais (CRIEs), presentes em todos os estados da Federação, o que sugere ter influenciado nas taxas de ocorrência de doença (DATASUS, 2015); 2) as mudanças socioeconômicas na sociedade brasileira que ocorreram ao longo dos anos, principalmente com relação à implementação dos programas de distribuição e transferência de renda, o que levou a um melhor monitoramento das condições de saúde de crianças, principal grupo de risco para ocorrência



de meningite pneumocócica e também outras enfermidades infecciosas; isto pode também ter influenciado no controle da doença ao longo dos anos, bem como a redução da mortalidade infantil (RASELLA et al., 2013).

Outro aspecto a ser observado em dados epidemiológicos após a introdução às vacinas pneumocócicas conjugadas é com relação à queda das taxas de incidência de doença em faixas etárias de risco que não foram vacinadas (acima de 60 anos), fenômeno já evidenciado cientificamente e conhecido como imunidade de rebanho ou efeito rebanho (PILISHVILI et al., 2010; KLUGMAN; BENTLEY; MCGEE, 2014). No nosso estudo não observamos redução significativa nas taxas de incidência em adultos com idade igual ou superior a 60 anos. Quando estratificadas por casos ocorridos entre sorotipos incluídos e não incluídos na vacina, observamos um número estável entre os mesmos (Tabela 1 – artigo 1). A dificuldade de se observar este fenômeno na casuística analisada pode ter sido pelo baixo número de indivíduos incluídos no estudo ou até mesmo pelo curto período de análise após a introdução da vacina no PNI (três anos), quando comparado com estudo que detectou claramente este fenômeno, o qual foi realizado através de uma série histórica de mais de cinco anos após a introdução da PCV7 e com todos os casos de DPI em nível nacional (PILISHVILI et al., 2010; DE SERRES et al., 2012).

Domingues et al. (2014) mais recentemente avaliou a efetividade da PCV10 contra a doença pneumocócica no Brasil, através do desenho caso-controle pareado, numa casuística que correspondeu a dez estados da federação e 66,3% da população brasileira. Demonstrando 83,8% de efetividade para os casos de DPI por tipos vacinais e chegando a 96,4% para

os indivíduos que completaram o esquema de três doses. Ao contrário do esperado, não foi observado redução de casos no período pós-vacinal ocorridos pelo sorotipo 23F, o que também não apresentou achados de efetividade na PCV10 – sorotipo este que faz parte da formulação da vacina – no estudo supracitado. Ainda existem controvérsias sobre a real proteção que a PCV10 possa exercer em torno do sorotipo 23F (KLUGMAN, 2011; DOMINGUES et al., 2014b).

A meningite pneumocócica é um agravo de notificação compulsória no território brasileiro e, por isso, informações obtidas a partir de sistemas de vigilância são muito próximas da realidade neste agravo. Além do mais, este agravo quando ocorre, em geral, requer cuidados médico-hospitalares o mais breve possível. Entretanto, é importante lembrar que a meningite é a manifestação mais grave da DPI, mas outras manifestações como pneumonia e otite média são responsáveis pela maior proporção de casos de DPI. Aliando esta característica ao presente estudo, podemos sugerir que analisar somente os dados de meningite pneumocócica poderia subestimar o real impacto da introdução da PCV10 na população estudada. Entretanto, poucos são os estudos de base populacional que conseguiram obter dados precisos sobre DPI no território brasileiro nos períodos pós-vacinal e por isto esta análise pode ser de grande valia para clarificar as mudanças epidemiológicas ocorridas neste agravo após a intervenção com a PCV10 (S. R. DOS SANTOS et al., 2013; CAIERAO et al., 2014).

Com relação aos perfis de resistência à penicilina, desde a identificação do primeiro caso de PNSSP no Brasil em 1988, dados obtidos a partir de sistemas de vigilância têm trazido taxas de PNSSP em torno de 20%

(BRANDILEONE et al., 1995). Os dados retrospectivos coletados nesta vigilância demonstram que os casos PNSSP têm se apresentado de maneira estável (20,3%) ao longo dos anos, em contraste às características epidemiológicas deste agravo na casuística estudada, que têm mudado ao longo dos anos da vigilância (CASTANHEIRA et al., 2004). Como principal mudança nesta série histórica temos, por exemplo, as reduções nas taxas de incidência da meningite, que têm ocorrido desde 1996 até 2013.

Comparando a distribuição dos sorotipos não vacinais entre os períodos pré e pós-vacinal, não observamos um aumento significativo de nenhum em particular, apenas um discreto aumento de casos pelo sorotipo 12F. Para avaliar em longo prazo a frequência dos sorotipos não vacinais mais prevalentes no período pós-vacinal, comparamos as prevalências dos sorotipos com a série histórica desta vigilância hospitalar e observamos que a flutuação dos casos ao longo dos anos é considerada estável, sem a emergência de casos por nenhum sorotipo individualmente. Evidências em outras análises já demonstraram que estas flutuações na DPI podem ocorrer ao longo dos anos, mesmo sem nenhuma interferência de pressões seletivas, como vacinas ou uso de antibióticos (FINLAND; BARNES, 1977). A continuidade desta vigilância poderá esclarecer de maneira mais sólida o impacto real da introdução da PCV10 nestes sorotipos não-vacinais.

Ainda discutindo sobre os sorotipos não-vacinais, nesta casuística, não foram observados surgimento de casos pelo sorotipo 19A no período pós-vacinal, o primeiro a ser evidenciado com maior magnitude nos EUA após a introdução da PCV7. Estes achados também foram observados no estudo no país realizados por Santos et al. (2014) e na América Latina, onde os casos de

DPI por sorotipo 19A têm reduzido ao longo de 20 anos (CASTANEDA et al., 2012).

No estudo de Domingues curiosamente foi demonstrada efetividade para o 19A, corroborando com os achados do presente estudo. A provável explicação para este achado seria a capacidade de produção de anticorpos a partir da estrutura química do polissacarídeo 19F – presente na formulação da PCV10 – que causam um fenômeno conhecido como “imunidade cruzada”. Este fenômeno já foi experimentalmente demonstrado em cobaias, inclusive também foi descrito na formulação da PCV7, só que envolvendo os sorotipos 6B (presente) e 6A (ausente na composição da PCV7). Apesar da PCV10 apresentar em sua composição o sorotipo 6B, não há evidências científicas que demonstrem reatividade cruzada da PCV10 em relação ao sorotipo 6A (WHITNEY et al., 2006; CLARKE; HAUSDORFF, 2014; DOMINGUES et al., 2014b)

Dos 77 isolados obtidos entre 2008-2012 (artigo 3) caracterizados molecularmente, 43 (55,8%) apresentaram não susceptibilidade aos antimicrobianos testados, e 13,5% (n=7) a dois ou mais antimicrobianos. Além da multirresistência ser um problema de saúde pública – como por exemplo nos EUA, em que 30% dos casos graves de DPI são multirresistentes e causando 7.000 mortes ao ano (CDC, 2013) – como se tratam de isolados não-vacinais, é necessário um monitoramento destes casos, para que possíveis aumentos de casos sorotipo-específico seja rapidamente notado e medidas possam ser adotadas.

A caracterização dos 77 isolados não vacinais (2008-2012) através das técnicas de PFGE e MLST demonstraram uma grande diversidade genética,

onde nenhum padrão clonal específico foi considerado emergente. Apenas um sorotipo 9N foi identificado como parte do ST66, o qual tem sido associado com sorotipo 14 e é considerado o mais importante clone caracterizado em Salvador e no Brasil (KO et al., 2000; REIS et al., 2002; BRANDILEONE et al., 2006; M. S. DOS SANTOS et al., 2015). As sequências-tipo (ST's) encontradas também na presente análise – ST180 (sorotipo 3), ST193 (sorotipo 18B) e ST218 (sorotipo 12F) – já foram respectivamente associados com clones globalmente disseminados – Netherlands<sup>3-31</sup>, Greece<sup>21-30</sup> e Denmark<sup>12F-34</sup> – e já descritos na rede de vigilância mundial “Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN)” (<http://web1.sph.emory.edu/PMEN/>).

Qualquer estudo de vigilância que tenha por objetivo avaliar temporalmente os efeitos iniciais de uma determinada vacina pode ter seus achados influenciados pela cobertura vacinal e pelo tempo dedicado à vacinação aliado ao surgimento do fenômeno de imunização real (AFONSO et al., 2013). O presente estudo apresentou uma análise temporal a partir de uma série histórica (1996-2012) e uma avaliação epidemiológica e molecular ao longo da introdução da PCV10 (2008-2013), três anos após a introdução desta vacina. Os resultados encontrados nas análises deste trabalho sugerem uma tendência de comportamento epidemiológico e molecular nos casos de meningite pneumocócica ocorridos na RMS em um longo período antes e em um curto período após a intervenção da vacina supracitada. Este contexto pode ser diferente em longo prazo, e também com uma análise mais abrangente a partir de outros isolados e casos de manifestações diversas de DPI. Entretanto, os resultados destas análises puderam relatar uma sólida base para estudos que poderão ser conduzidos mais tardiamente e envolvendo outras casuísticas,

uma vez que o sistema de vigilância instaurado irá continuar monitorando os casos e as mudanças epidemiológicas que porventura possam ocorrer no futuro.

## 7 CONCLUSÕES

A partir das análises realizadas nesta casuística, pode-se concluir que:

1. Durante os anos do estudo na série histórica (1996-2012), os dados revelam uma queda na incidência de meningite pneumocócica na região metropolitana de Salvador (1,65 para 0,2 casos/100.000 habitantes/ano) e uma conseqüente mudança no perfil epidemiológico na população estudada com predominância de casos na população adulta;
2. No grupo de crianças com dois anos ou menos houve redução geral de 47% nas taxas de incidência entre os períodos estudados, principalmente entre os casos por sorotipos vacinais (redução de 77%);
3. Na casuística estudada, ainda não foi possível sugerir o fenômeno de imunidade de rebanho no grupo de idosos, apesar da redução da incidência nesta faixa etária;
4. Entre os tipos capsulares identificados no período pós-vacinal, houve um decréscimo de casos entre aqueles considerados vacinais de 51.9% para 26.9%;
5. Não houve aumento significativo de sorotipos não-vacinais, apenas um discreto aumento no número de casos pelo sorotipo 12F;
6. É necessário um contínuo monitoramento do perfil epidemiológico e a conseqüente distribuição de tipos capsulares na meningite por *S. pneumoniae* no período pós-vacinal por um maior período de tempo, para avaliar alterações advindas do programa de imunização, além de uma eventual substituição de tipos capsulares.

## REFERÊNCIAS

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

AHL, J. et al. High incidence of septic shock caused by streptococcus pneumoniae serotype 3--a retrospective epidemiological study. **BMC Infect. Dis.**, v. 13, p. 492, 2013.

ANSALDI, F. et al. Increasing incidence of streptococcus pneumoniae serotype 19a and emergence of two vaccine escape recombinant st695 strains in liguria, italy, 7 years after implementation of the 7-valent conjugated vaccine. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 18, n. 2, p. 343-345, 2011.

AUSTRIAN, R. **Life with the pneumococcus**. Philadelphia: University of Pennsylvania Press, 1985.

AYIEKO, P. et al. Assessment of health benefits and cost-effectiveness of 10-valent and 13-valent pneumococcal conjugate vaccination in kenyan children. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e67324, 2013.

Bahia: Secretaria de Saúde do Estado. Boletins epidemiológicos. [http://www.suvisa.ba.gov.br/vigilancia\\_epidemiologica/consulta\\_boletim\\_epidemiologico/](http://www.suvisa.ba.gov.br/vigilancia_epidemiologica/consulta_boletim_epidemiologico/). Acesso em Janeiro 5, 2015.

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

BRANDILEONE, M. C. et al. Distribution of serotypes of streptococcus pneumoniae isolated from invasive infections over a 16-year period in the greater sao paulo area, brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 10, p. 2789-2791, 1995.

\_\_\_\_\_. 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, p. 567-574, 2006.

\_\_\_\_\_. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of streptococcus pneumoniae strains isolated from brazilian children with invasive infections. Pneumococcal study group in brazil for the sireva project. Regional system for vaccines in latin america. **Microb. Drug Resist.**, v. 3, n. 2, p. 141-146, 1997

BRATCHER, P. E. et al. Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6d by genetic, biochemical and serological characterization. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 2, p. 555-560, 2010.

CAIERAO, J. et al. Serotypes and genotypes of invasive streptococcus pneumoniae before and after pcv10 implementation in southern brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e111129, 2014.

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



CARDOSO, C. W. et al. Impact of vaccination during an epidemic of serogroup c meningococcal disease in salvador, brazil. **Vaccine**, v. 30, n. 37, p. 5541-5546, 2012.

\_\_\_\_\_. Effectiveness of meningococcal c conjugate vaccine in salvador, brazil: A case-control study. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123734, 2015.

CASTANEDA, E. et al. Streptococcus pneumoniae serotype 19a in latin america and the caribbean: A systematic review and meta-analysis, 1990-2010. **BMC Infect. Dis.**, v. 12, n., p. 124, 2012.

CASTANHEIRA, M. et al. Antimicrobial susceptibility of streptococcus pneumoniae in latin america: Results from five years of the sentry antimicrobial surveillance program. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, n. 7, p. 645-651, 2004.

CENTERS for disease control and prevention. Invasive pneumococcal disease in young children before licensure of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine - united states, 2007. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 59, n. 9, Mar 12, p. 253-257. 2010.

\_\_\_\_\_. **Pcr deduction of pneumococcal serotypes**. Atlanta: Centers for Disease Control Prevention, 2015 2014.

\_\_\_\_\_. Progress in introduction of pneumococcal conjugate vaccine - worldwide, 2000-2012. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 62, n. 16, p. 308-311, 2013.

\_\_\_\_\_. Invasive pneumococcal disease in young children before licensure of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine - united states, 2007. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 59, n. 9, p. 253-257, 2010.

\_\_\_\_\_. Progress in introduction of pneumococcal conjugate vaccine - worldwide, 2000-2012. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 62, n. 16, p. 308-311, 2013.

CLARKE, C. J.; HAUSDORFF, W. P. Further evidence for the effectiveness of pcv10 against streptococcus pneumoniae serotype 19a. **Lancet Respir. Med.**, v. 2, n. 6, p. e7, 2014.

CLINICAL and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI M100-S24**, C. D. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.

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, 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, p. 325-337, 1998.

DATASUS. **Tecnologia da informação a serviço do sus - informações da saúde**. Brasília: Ministério da Saúde. 2015.

DE SERRES, G. et al. Use of surveillance data to estimate the effectiveness of the 7-valent conjugate pneumococcal vaccine in children less than 5 years of age over a 9 year period. **Vaccine**, v. 30, n. 27, p. 4067-4072, 2012.

DI FABIO, J. L. et al. Evolution of streptococcus pneumoniae serotypes and penicillin susceptibility in latin america, sireva-vigia group, 1993 to 1999. Paho sireva-vigia study group. Pan american health organization. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 20, n. 10, p. 959-967, 2001.

DIAS, C. A. et al. Sequential multiplex pcr for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from brazilian children. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, n. Pt 9, p. 1185-1188, 2007.

DOMINGUES, C. M. et al. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in brazil: A matched case-control study. **Lancet Respir. Med.**, p. 2014a.

DOS SANTOS, M. S. et al. Temporal trends and clonal diversity of penicillin non-susceptible pneumococci from meningitis cases from 1996 to 2012, in Salvador, Brazil. **BMC Infect. Dis.**, v. 15, p. 302. 2015.

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**, v. 31, n. 51, p. 6150-6154, 2013.

ECHANIZ-AVILES, G. et al. Streptococcus pneumoniae serotypes identified in mexican children with invasive disease before and after the introduction of pcv7 (1993-2012). **Arch. Med. Res.**, v. 46, n. 2, p. 149-153, 2015.

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), 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, p. 1235-1247, 2012.

FELDMAN, C.; ANDERSON, R. Review: Current and new generation pneumococcal vaccines. **J. Infect.**, v. 69, n. 4, p. 309-325, 2014.

FINLAND, M.; BARNES, M. W. Changes in occurrence of capsular serotypes of streptococcus pneumoniae at boston city hospital during selected years between 1935 and 1974. **J. Clin. Microbiol.**, v. 5, n. 2, p. 154-166, 1977.

GARCIA, S. et al. Pneumococcal disease and vaccination in the americas: An agenda for accelerated vaccine introduction. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 19, n. 5, p. 340-348, 2006.

GOOSSENS, M. C.; CATRY, B.; VERHAEGEN, J. Antimicrobial resistance to benzylpenicillin in invasive pneumococcal disease in belgium, 2003-2010: The effect of altering clinical breakpoints. **Epidemiol. Infect.**, v. 141, n. 3, p. 490-495, 2013.

HAUSDORFF, W. P. et al. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: Implications for conjugate vaccine formulation and use, part i. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, n. 1, p. 100-121, 2000.

HAUSDORFF, W. P.; HOET, B.; ADEGBOLA, R. A. Predicting the impact of new pneumococcal conjugate vaccines: Serotype composition is not enough. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 14, n. 3, p. 413-428, 2015.

HIROSE, T. E.; MALUF, E. M.; RODRIGUES, C. O. Pneumococcal meningitis: Epidemiological profile pre- and post-introduction of the pneumococcal 10-valent conjugate vaccine. **J. Pediatr.**, v. 91, n. 2, p. 130-135, 2015.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Resultado do censo populacional de salvador e cidades na área metropolitana, Bahia**. IBGE. Brasília. 2015.

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

KLUGMAN, K. P. Contribution of vaccines to our understanding of pneumococcal disease. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 366, n. 1579, p. 2790-2798, 2011.

\_\_\_\_\_. The successful clone: The vector of dissemination of resistance in streptococcus pneumoniae. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50 Suppl S2, p. 1-5, 2002.

KLUGMAN, K. P.; BENTLEY, S. D.; MCGEE, L. Determinants of invasiveness beneath the capsule of the pneumococcus. **J. Infect. Dis.**, v. 209, n. 3, p. 321-322, 2014.

KO, A. I. et al. Clonally related penicillin-nonsusceptible streptococcus pneumoniae serotype 14 from cases of meningitis in salvador, brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, n. 1, p. 78-86, 2000.

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, p. 356-361, 2004.

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, p. 1809-1817, 2008.

LAVAL, C. B. et al. Serotypes of carriage and invasive isolates of streptococcus pneumoniae in brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 12, n. 1, p. 50-55, 2006.

MCELLISTREM, M. C.; STOUT, J. E.; HARRISON, L. H. Simplified protocol for pulsed-field gel electrophoresis analysis of streptococcus pneumoniae. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 351-353, 2000.

MCGEE, L. et al. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of streptococcus pneumoniae defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 7, p. 2565-2571, 2001.

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

\_\_\_\_\_. Update of pneumococcal pcr serotyping assay for detection of a commonly occurring type 19f wzy variant in brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, n. 7, p. 2470-2471, 2013.

- MONACO, M. et al. Evolution of erythromycin resistance in streptococcus pneumoniae in italy. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 55, n. 2, p. 256-259, 2005.
- MOONEY, J. D. et al. The impact and effectiveness of pneumococcal vaccination in scotland for those aged 65 and over during winter 2003/2004. **BMC Infect. Dis.**, v. 8, p. 53, 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, p. 1016-1027, 2008.
- O'BRIEN, K. L. et al. Burden of disease caused by streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: Global estimates. **Lancet**, v. 374, n. 9693, p. 893-902, 2009.
- OBARO, S.; ADEGBOLA, R. The pneumococcus: Carriage, disease and conjugate vaccines. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, n. 2, p. 98-104, 2002.
- 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, p. 1988-1995, 2005.
- PARK, I. H. et al. Discovery of a new capsular serotype (6c) within serogroup 6 of streptococcus pneumoniae. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1225-1233, 2007.
- PILISHVILI, T. et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. **J. Infect. Dis.**, v. 201, n. 1, p. 32-41, 2010.
- PLETZ, M. W. et al. Pneumococcal vaccines: Mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 32, n. 3, p. 199-206, 2008.
- PLOSKER, G. L. 10-valent pneumococcal non-typeable haemophilus influenzae protein d-conjugate vaccine: A review in infants and children. **Paediatr. Drugs**, v. 16, n. 5, p. 425-444, 2014.
- PRYMULA, R. et al. Impact of the 10-valent pneumococcal non-typeable haemophilus influenzae protein d conjugate vaccine (phid-cv) on bacterial nasopharyngeal carriage. **Vaccine**, v. 29, n. 10, p. 1959-1967, 2011.
- PRYMULA, R.; SCHUERMAN, L. 10-valent pneumococcal nontypeable haemophilus influenzae pd conjugate vaccine: Synflorix. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 8, n. 11, p. 1479-1500, 2009.
- RASELLA, D. et al. Effect of a conditional cash transfer programme on childhood mortality: A nationwide analysis of brazilian municipalities. **Lancet**, v. 382, n. 9886, p. 57-64, 2013.
- REINERT, R. R. The antimicrobial resistance profile of streptococcus pneumoniae. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 15 Suppl 3, p. 7-11, 2009.
- REIS, J. N. et al. Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of streptococcus pneumoniae from meningitis patients in salvador, brazil. **J. Clin. 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, p. 204-213, 2008.

RIBEIRO, G. S. et al. Haemophilus influenzae meningitis 5 years after introduction of the haemophilus influenzae type b conjugate vaccine in brazil. **Vaccine**, v. 25, n. 22, p. 4420-4428, 2007.

\_\_\_\_\_. Prevention of haemophilus influenzae type b (hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of hib immunization in brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 187, n. 1, p. 109-116, 2003.

ROBINSON, D. A. et al. Clones of streptococcus pneumoniae isolated from nasopharyngeal carriage and invasive disease in young children in central tennessee. **J. Infect. Dis.**, v. 183, n. 10, p. 1501-1507, 2001.

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, p. 3984-3986, 2008.

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, p. 3225-3230, 2006.

TARRAGO, D. et al. Evolution of clonal and susceptibility profiles of serotype 19a streptococcus pneumoniae among invasive isolates from children in spain, 1990 to 2008. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 5, p. 2297-2302, 2011.

TECHASAENSIRI, C. et al. Epidemiology and evolution of invasive pneumococcal disease caused by multidrug resistant serotypes of 19a in the 8 years after implementation of pneumococcal conjugate vaccine immunization in dallas, texas. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 29, n. 4, p. 294-300, 2010.

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, p. 2233-2239, 1995.

VESIKARI, T. et al. Immunogenicity of 10-valent pneumococcal nontypeable haemophilus influenzae protein d conjugate vaccine when administered as catch-up vaccination to children 7 months to 5 years of age. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 30, n. 8, p. e130-141, 2011.

WALKER, C. L. et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **Lancet**, v. 381, n. 9875, p. 1405-1416, 2013.

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

WERNO, A. M.; MURDOCH, D. R. Medical microbiology: Laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 6, p. 926-932, 2008.

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, p. 1737-1746, 2003.

WHITNEY, C. G. et al. Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: A matched case-control study. **Lancet**, v. 368, n. 9546, p. 1495-1502, 2006.

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, p. 62-67, 2008.

# APÊNDICE

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **TIPO E LOCAL DO ESTUDO**

O estudo foi conduzido a partir de uma vigilância de base hospitalar, caracterizado como um desenho do tipo corte transversal e ambispectivo. Foram participantes do presente estudo todos os pacientes admitidos com diagnóstico de meningite por *S. pneumoniae* e referenciados para o Hospital Couto Maia (HCM), centro de referência para doenças infecciosas em Salvador, responsável por 80% da notificação de meningites bacterianas na região metropolitana de Salvador (RMS) entre os anos de 2008 a 2013, segundo o Sistema de Notificação de Agravos - SINAN (DATASUS, 2015). Uma parceria com o Laboratório Central de Saúde Pública da Secretaria de Saúde do Estado da Bahia foi montada com o objetivo de ampliar o poder do presente estudo **(ANEXO I)**. Nesta colaboração, as informações dos casos de meningite notificados em outras unidades de saúde (hospitais públicos e privados) da RMS foram compartilhados, bem como os isolados para análise laboratorial. A etapa experimental do estudo foi realizada no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) e no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Bioestatística (LEMB), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em Salvador, Bahia.

### **População estudada**

Foram incluídos neste estudo todos os pacientes atendidos no Hospital Couto Maia com diagnóstico microbiológico de meningite pneumocócica – cultura (padrão ouro) e ou látex para *S. pneumoniae* – nos períodos de: janeiro



de 1996 a dezembro de 2013, além dos casos de meningite pneumocócica identificados pelo LACEN (2008-2013).

### **Coleta de dados epidemiológicos**

Os dados epidemiológicos foram coletados por estudantes de iniciação científica, através de entrevista e revisão de prontuários, utilizando um questionário padrão. As informações obtidas foram referentes ao sexo, idade, procedência, dados laboratoriais sobre os exames bioquímico, citológico e microbiológico do líquido e do sangue, além de informações sobre comorbidades e evolução clínica. Este questionário foi composto de quatro páginas, subdivididas em nove seções com variáveis que foram preenchidas utilizando informações da entrevista, do cartão vacinal do paciente e da revisão dos prontuários médicos. Foi realizado treinamento para os entrevistadores quanto ao preenchimento dos formulários. Cada entrevista percorreu um tempo médio aproximado de 10 minutos **(ANEXO II)**.

### **Critérios de Inclusão**

Foram incluídos no estudo todo paciente com diagnóstico confirmado laboratorialmente através dos seguintes exames: cultura do líquido cefalorraquidiano (LCR) positiva para *S. pneumoniae* e/ou látex positivo para *S. pneumoniae*; hemocultura positiva para *S. pneumoniae* nos pacientes com meningite bacteriana definida pela análise do LCR, como contagem celular acima de 100 células/mm<sup>3</sup> e/ou dosagem de glicose  $\leq$  45 mg/dL ou proteínas  $\geq$  65 mg/dL. Os pacientes foram identificados através de revisão diária do

caderno de registro de exames de LCR do laboratório clínico do Hospital Couto Maia.

## **CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA**

### **ISOLAMENTO PRIMÁRIO**

O isolamento do *S. pneumoniae* realizou-se no setor de microbiologia do laboratório de análises clínicas situado no Hospital Couto Maia. A partir da cultura do líquido, em placas divididas de 90 x 15 mm em ágar sangue e ágar chocolate, preparado com a base Tryptic Soy Agar (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado em faixas de temperatura apropriadas para cada meio de cultivo. Confirmada a presença de diplococos lanceolados Gram positivos na cultura, a placa foi adequadamente acondicionada e transportada ao LPBM (CPqGM –FIOCRUZ) para continuidade dos testes de identificação e de susceptibilidade antimicrobiana. O processamento das culturas, os procedimentos microbiológicos de identificação, os testes de tipagem capsular e os ensaios de sensibilidade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular - LPBM. Um banco de dados foi criado e mantido no programa EpiInfo, o qual foi utilizado nas análises, no Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística (NEB).

### **TESTE DE SENSIBILIDADE À OPTOQUINA**

Para a execução do teste de sensibilidade à optoquina, as colônias  $\alpha$ -hemolíticas foram semeadas em placa de ágar sangue, em três direções e em

seguida, foi colocado de forma estéril sobre a sementeira, um disco de 5µg de optoquina (BD – BBL Sensi – Disc, Becton Dickinson and Company, USA), com posterior incubação a 35° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (WERNO; MURDOCH, 2008). 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, identificando-os como *S. pneumoniae*. Os isolados mostrando zonas de inibição à optoquina entre 8 e 14 mm foram submetidos ao teste de solubilidade em bile para confirmação da espécie.

#### TESTE DE SOLUBILIDADE EM BILE

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 AS foram suspensas em 2 mL de solução salina a 0,9%, com turvação ajustada para o padrão 1,0 da escala de “McFarland” (1016 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 duas horas quanto ao desaparecimento ou não da turvação no tubo teste (lise dos pneumococos no tubo contendo sal biliar). O desaparecimento da turvação é caracterizado como teste positivo, o que caracteriza o isolado como *S. pneumoniae*.

## CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Após as etapas de confirmação da espécie os isolados foram mantidos a -70° C em meio líquido contendo 40% de soro de cavalo, 50% de caldo Tryptic Soy Broth (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) e 10% de glicerol.

## TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Após a identificação, os isolados de *Streptococcus pneumoniae* foram submetidos aos testes de susceptibilidade pelo método de difusão em ágar e E-test (CLSI, 2014). Os resultados foram imediatamente enviados ao laboratório de microbiologia do HCM para serem utilizados na orientação da terapia antimicrobiana indicada ao paciente.

### **Teste de difusão em Agar**

O teste de difusão em ágar realizou-se seguindo as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2014), utilizando os seguintes antimicrobianos: clindamicina (2µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), oxacilina (1µg), rifampicina (5µg), sulfametazol/trimetoprima (1,25/23,75µg), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg) (Oxoid, USA).

A partir de um crescimento bacteriano de 18 a 24 horas fez-se uma suspensão bacteriana em cloreto de sódio a 0,9% com turvação padronizada com a escala 0,5 de “McFarland”. Esta suspensão foi semeada em três direções com o auxílio de um “swab” estéril no meio de Agar Mueller - Hinton (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado, colocando-se os discos de antimicrobianos e incubando-

se a 35° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. A leitura foi realizada medindo o diâmetro dos halos de inibição e interpretada pela padronização do CLSI (2014). A cepa padrão utilizada como controle foi a ATCC 49619.

### ***E-test***

As amostras que apresentaram diâmetros da zona de inibição menor que 20 mm, segundo o CLSI (2014), em volta do disco de oxacilina foram submetidas ao método do E – teste para determinar as concentrações inibitórias mínimas de penicilina e cefotaxima. A partir de um crescimento bacteriano de 18 a 24 horas foi realizada uma suspensão bacteriana em cloreto de sódio a 0,9% com turvação padronizada com a escala 0,5 de “McFarland”. Esta suspensão foi disseminada com o auxílio de um “swab” estéril no Meio de Ágar Mueller-Hinton (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Sob a superfície da placa foram depositadas as fitas de penicilina e cefotaxima com um espectro de concentrações de 0,002 a 32 µg/mL, as placas foram em seguida incubadas a 35 ° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

A leitura realizou-se através da observação do ponto de interseção do crescimento bacteriano com a fita, o qual identifica a menor concentração do antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano. A cepa padrão utilizada como controle foi a ATCC 49619.

### **Microdiluição em Caldo**

As amostras de *S. pneumoniae* foram submetidas aos testes de susceptibilidade através do método de microdiluição em caldo, de acordo com

as recomendações do CLSI (2014), empregando-se os seguintes antimicrobianos: cefotaxima (0,062 – 64µg/mL), clindamicina (0,016 – 32µg/mL), eritromicina (0,016 – 32µg/mL), penicilina (0,031 – 64µg/mL), sulfametoxazol/trimetoprim (0,125/2,375 – 64/1216µg/mL), tetraciclina (0,062 - 64µg/mL) e levofloxacina (0,016 - 32µg/mL) (SIGMA – ALDRICH, Germany).

Os testes foram realizados em placas com 96 orifícios e fundo em forma de “U” (Corning, New York, USA). Placas foram preparadas contendo o meio de Mueller-Hinton Broth (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) com ajuste de cátions e acrescido de 5% de sangue de cavalo lisado. Os antimicrobianos foram diluídos em cada poço da placa em ordem crescente de concentração. Uma vez preparadas, as placas foram estocadas por até dois meses em freezer a – 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 Agar Mueller - Hinton com adição de cátions e acrescido de 5% de sangue de cavalo lisado, obtendo-se uma concentração equivalente a  $1 \times 10^6$  UFC / mL. Adicionou-se 50 µL desta suspensão ao poço da placa contendo 50µL da solução antibiótica, obtendo-se uma concentração final da bactéria de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL. As placas foram incubadas a 35°C por 20-24 horas. A cepa padrão ATCC 49619 também foi utilizada como controle em todos os testes realizados.

A leitura para indicar a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento do microorganismo foi realizada visualmente a partir da detecção de turvação do meio de cultivo no poço ou formação de um

botão de 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” . Para a análise da sensibilidade à penicilina foram utilizados os breakpoints definidos para isolados de liquor (CLSI, 2014).

#### DETERMINAÇÃO DO TIPO CAPSULAR

A determinação do tipo capsular de *S. pneumoniae* foi realizada através da técnica de Multiplex PCR, padronizada e implementada pelo laboratório de *Streptococcus*, *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC), Atlanta, EUA (CDC, 2014). Esta metodologia pode definir 41 sorotipos/sorogrupos em dez reações de PCR Multiplex com iniciadores específicos para cada sorotipo/sorogrupo.

Para obtenção do DNA bacteriano, todo o crescimento de cada amostra de *S. pneumoniae* em placa de AS foi suspenso em 300 µL de salina a 0,85% estéril, sendo logo após aquecido em banho-maria a 70°C por 30 minutos. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas por 5 minutos a 12.000 rpm a 4°C, descartando-se o sobrenadante com micropipeta e ponteiros de 200-1.000 µL. Ao sedimento, 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 horas. 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.

Para cada reação de PCR foram utilizados os seguintes componentes: mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Biolabs Inc., New England, USA) – 200 µM; tampão de reação (Promega®, USA) – 1X; Taq-DNA-polimerase (Promega®, USA) (2U); cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub> – Promega®, USA) – 3,5 mM, iniciador direto e iniciador reverso (Prodimol®, Chile) – 25 µM de cada, de acordo com o conjunto de iniciadores utilizados por reação descritos pelo CDC (2014); 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. Estes controles positivos são os isolados com sorotipo previamente conhecido através da reação de Quellung. Paralelamente, em cada reação de PCR e eletroforese, foram utilizados os respectivos controles positivos de cada sorotipo/sorogrupo, além um volume total de 25 µL sem adição do DNA molde, como controle negativo. Todas as reações contêm o iniciador *cpsA*, que identifica 97% dos isolados de *S. pneumoniae* (CDC, 2014). Esta sequência foi utilizada como controle interno da reação.

As reações foram realizadas em termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®, USA), com os seguintes ciclos de amplificação: 1 ciclo de 94°C por 4 minutos, 30 ciclos de 94°C por 45 segundos e 54°C por 45 segundos e 1 ciclo final de 65°C por 2:30 minutos.

O volume de 10 µL 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) sob voltagem constante de 100 volts em tampão TAE durante 1:15 h. Os tamanhos dos produtos de PCR foram determinados através de análise comparativa utilizando-se como padrão de peso molecular o “50 pb DNA Ladder” (New England, USA), além da comparação com os respectivos sorotipos. O gel foi corado em banho de 400 mL de TAE acrescido com 40 µL de solução de brometo de etídio a 10 mg/mL por 10-15 min; logo após 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. A melhor imagem foi salva em formato de arquivo JPEG para cópia de segurança dos experimentos de PCR multiplex.

As amostras que apresentaram resultados negativos 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.

## CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

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

A caracterização dos padrões clonais dos isolados de *S. pneumoniae* considerados mais frequentes e/ou comumente invasivos foi realizada através de eletroforese em campo pulsátil, onde fragmentos de DNA cromossômicos,

gerados após digestão com a enzima *Sma*I (Promega®, USA), foram preparados e analisados conforme descrito por Tenover e cols. (TENOVER et al., 1995). Para realização da eletroforese, foi empregado o equipamento CHEF DR II (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, USA). A interpretação dos isolados geneticamente relacionados foi realizada seguindo os critérios de Tenover e colaboradores (TENOVER et al., 1995). Uma amostragem de cada clone identificado pelo PFGE foi submetida à técnica de tipagem por *Multilocus Sequence Typing* (ENRIGHT; SPRATT, 1998).

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 2013, em especial os isolados com CIM para penicilina  $\geq 0,125 \mu\text{g/mL}$ .

#### *Preparo do DNA em Blocos de Agarose e Digestão*

Os isolados de *S. pneumoniae* congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  foram reativados para o preparo dos blocos de agarose. Para isto, as amostras passaram por dois cultivos consecutivos em ágar sangue a  $35^{\circ}\text{C}$ , por 18 horas cada um, em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, com o auxílio de uma alça bacteriológica de  $1 \mu\text{L}$ , a bactéria foi inoculada em um tubo cônico contendo 5 mL de meio líquido “Brain-heart infusion” – BHI (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) acrescido de 40% de soro de cavalo e  $50 \mu\text{L}$  de solução estéril de glicose a 20%. Esta suspensão foi incubada em *shaker* com rotação constante (200 rpm) por 4-5 horas para obtenção de crescimento bacteriano. Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 10 minutos x 3.000 rpm, a

4°C e lavada em 5 mL de tampão PIV (Tris 10mM, pH 8,0; 1M NaCl). Esta etapa foi realizada mais uma vez e, em seguida, o *pellet* lavado foi ressuspenso em 1 mL de PIV. Após esta etapa, uma alíquota de 300 µL foi adicionada a mais 300 µL de agarose *Low melting point* (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, USA) a 2,0%, preparada em tampão TE (Tris 1M, pH 8,0; EDTA 0,5M pH 8,0) e mantida a 65°C em banho-maria. Após cuidadosa agitação, a suspensão foi dispensada em moldes para formação dos blocos com DNA bacteriano. Os blocos foram então incubados com solução de lise (tampão EC) contendo 1 mg/mL de lisozima e 5.000 U/mL de mutanolisina a 37°C por 2 horas; e depois de quatro lavagens consecutivas com TE por 30 minutos, novamente incubadas em outra solução de lise (tampão ES) acrescido de 20 µL de proteinase K (Sigma Aldrich, Germany) a 25 mg/mL a 56°C por 24 horas. Após a lise do DNA, os blocos foram incubados à temperatura ambiente sob leve homogeneização com 5 mL de tampão TE, 30 minutos para cada etapa de lavagem. As lavagens foram repetidas em torno de 20 vezes.

#### *Tratamento Enzimático*

Um bloco de agarose foi separado em um tubo e tratado com uma solução enzimática contendo 30µL de tampão específico da enzima *SmaI* concentrado 10X, 3 µL de BSA (soro albumina bovina) a 100µg/mL, 1µL de enzima *SmaI* (20U) e completada com água DNase e RNase free para o volume final de 304 µL; sendo a preparação mantida a 25°C em banho-maria por 18 horas.

### *Eletroforese*

Os fragmentos de DNA foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando o sistema CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, USA). A eletroforese foi processada em TBE 0,5% (Tris - borato 0,045M, EDTA 0,001M, pH 8,0), a 14°C em corrente 200 volts, com pulsos de tempo inicial de 1 segundo e tempo final de 20 segundos por 21 horas. Em cada gel foi utilizado um marcador externo de pares de bases de 50-1,000 Kb (Pulse Marker - Sigma), aplicado nas extremidades. Após eletroforese os géis foram corados com brometo de etídio (10mg/mL) e as imagens digitalizadas pelo sistema de captura de imagem Eagle Eye II (Stratagene) e arquivadas como imagens em arquivos do tipo TIFF.

### *Análise dos Padrões Eletroforéticos e Determinação dos Clones*

Os padrões eletroforéticos do PFGE obtidos a partir do corte enzimático com a enzima de restrição *Sma*I foram analisados e comparados tendo por base os critérios de TENOVER e cols. (1995), através da posição e número de bandas. O software GelCompar II (Applied Maths, St. Martens, Belgium) foi utilizado para comparação dos perfis de eletrofores em adição aos critérios de Tenover, 1996: **isolados clonais** - Quando possuem o mesmo número e posição de bandas; **isolados clonalmente relacionados** - Quando possuem três bandas ou menos de diferença, consistente como um único evento genético; **isolados possivelmente relacionados** – Quando possuem de quatro a seis bandas de diferença, o que consiste com dois eventos genéticos

independentes; **isolados não relacionados** – Quando possuírem mais de seis bandas de diferença, consistente com mais de três eventos genéticos.

## ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo é uma parte do projeto intitulado “Impacto dos programas de vacinação na meningite bacteriana em Salvador-BA”, de maneira que a sua execução foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM/FIOCRUZ e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa Envolvendo os seres humanos, sob o parecer consubstanciado nº 044/2013 (**ANEXO III**). Os pacientes e/ou seus responsáveis legais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participação na pesquisa (**ANEXO IV**).

## PROPOSTA DE ANÁLISE

O programa Epi Info v.3.5.3 *for Windows* (2011) foi utilizado para o armazenamento e a análise dos dados. Um sistema de gerenciamento da informação obtida foi montado para minimizar a entrada de erros nos bancos de dados durante o processo de alimentação dos mesmos. A partir dos instrumentos de coleta (questionários individuais, clínico-epidemiológicos e de dados laboratoriais), o modelo de dupla digitação e validação de dados recomendado pelo *National Institute of Health* (NIH) foi utilizado (14). Dois estudantes diferentes devidamente treinados realizaram a digitação do mesmo questionário em duas máscaras digitais distintas. A partir desta digitação, os bancos de dados foram submetidos ao processo de validação, para verificação de eventuais erros na entrada de dados. Esta etapa foi realizada no pacote *Data compare* do Epi Info. A versão digital foi utilizada a partir do questionário

original em um sistema de buscas em HTML, no qual todos os erros encontrados na validação eram corrigidos imediatamente.

Em função da data de implementação da vacina pneumocócica decavalente na Região Metropolitana de Salvador e dos dados de cobertura vacinal fornecidos pela Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (DATASUS, 2015), os períodos considerados pré e pós-vacinal no presente estudo foram, respectivamente, conforme cada análise nos manuscritos produzidos: 2008-2010 (pré-vacinal) e 2011-2013 (pós-vacinal) – Artigo 1; (1996-2010) e imediatamente após a introdução da PCV10 (2011-2012) – Artigo 2; 2008-Jun/2010 (pré-vacinal) e Julho/2010-2012 (pós-vacinal) – Artigo 3. Os casos foram estratificados nestes dois grupos nas análises demográficas, clínicas e epidemiológicas. Os casos também foram estratificados a partir da determinação do tipo capsular dos isolados, quando possível (apenas casos com cultura positiva para *S. pneumoniae*): casos com sorotipos incluídos na vacina PCV10 (1, 5, 7F, 4, 6B, 9V, 14, 19F, 23F e 18C) incluídos no grupo de casos por sorotipos vacinais; todos os demais casos com sorotipos não incluídos na vacina foram considerados como casos por sorotipos não-vacinais.

Para os cálculos de incidência, foi utilizado o censo populacional do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística do ano de 2010 (IBGE, 2010), com a população total dos 13 municípios que integram a região metropolitana de Salvador: Camaçari, Candeias, Dias D'Ávila, Itaparica, Lauro de Freitas, Madre de Deus, São Francisco do Conde, Simões Filho, Vera Cruz, Mata de São João, São Sebastião do Passé, Pojuca e Salvador. Os dados populacionais estratificados por faixa etária também foram obtidos e utilizado no cálculo das taxas de incidência. As taxas de letalidade foram calculadas

utilizando um valor percentual a partir da divisão entre número de óbitos/número de casos.

Nas análises estatísticas, as medidas de tendência central e de dispersão, a depender do tipo de distribuição dos dados, foram calculadas. Frequências relativas e absolutas das variáveis categóricas foram determinadas. Testes paramétricos e não paramétricos foram utilizados para avaliar a significância estatística dentre as associações. O qui-quadrado de tendências foi utilizado para avaliação significância estatística da flutuação nas taxas de incidência ao longo do tempo. A medida de associação Risco Relativo (RR) foi utilizada para comparar mudanças nos desfechos entre os períodos pré e pós-vacinal, em relação à vacina. Nas análises univariadas, o valor de “p” menor que 0,05 foi considerado como indicativo de significância estatística. O intervalo de confiança (IC) de 95% também foi calculado nestas análises.

# **ANEXOS**



## ANEXO I – Carta de colaboração LACEN



**GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA**  
Secretaria da Saúde do Estado da Bahia  
Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde  
LACEN – Lab. Central de Saúde Pública Profº Gonçalo Moniz

### CARTA DE AUTORIZAÇÃO

O Laboratório Central da Bahia – LACEN, unidade integrante do Sistema Único de Saúde (SUS) e de referência para o Estado, vem por meio desta expressar o interesse na execução do Projeto intitulado “Impacto dos Programas de vacinação na meningite bacteriana em Salvador-Ba”, desenvolvido pela pesquisadora Joice Neves Reis Pedreira, com previsão de término para fevereiro de 2018.

Ressaltamos que os técnicos do LACEN/BA envolvidos neste projeto deverão participar das publicações dos dados gerados, tais como: resumos/ansis de eventos científicos, bem como periódicos.

Salvador, 13 de fevereiro de 2014.

**Rosane Mª Magalhães Will**  
Diretora





### III. USO PRÉVIO DE ANTIBIÓTICOS:

Obs. Se a pergunta 3.1 for não sabe (9) ou não (0), preencher as outras perguntas com não se aplica (8 ou 88, no caso de resposta escrita).

|     |  |                                   |
|-----|--|-----------------------------------|
| 3.1 | <p>O paciente usou antibióticos no último mês: (Resposta do Paciente)</p> <p>Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> Não sabe <input type="text" value="9"/></p>   | AM3<br><input type="text"/>       |
| 3.2 | Se usou, por quantos dias o paciente fez uso?  | TEMPDIAS2<br><input type="text"/> |
| 3.3 | Se usou, qual a data da última dose?   | DAANT2<br>____/____/____          |
| 3.4 | <p>Qual a via de administração?</p> <p>Oral <input type="text" value="1"/> Injetável <input type="text" value="0"/> Não se aplica <input type="text" value="8"/> Não sabe <input type="text" value="9"/></p>   | ADM2<br><input type="text"/>      |
| 3.5 | <p>Se fez uso de antibióticos, onde adquiriu?</p> <p>Hospital <input type="text" value="1"/> Posto de Saúde <input type="text" value="2"/> Consultório médico <input type="text" value="3"/><br/>         Farmácia <input type="text" value="4"/> Família <input type="text" value="5"/> Outros <input type="text" value="6"/><br/>         NSA <input type="text" value="8"/></p> | LAM2<br><input type="text"/>      |
| 3.6 | <p>Qual(is) antibióticos que o paciente usou no último mês (QA2):</p> <p>_____</p> <p>_____</p>  |                                   |
| 3.7 | <p>Paciente tomou bactrim ou similares nos últimos 6 meses:</p> <p>Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> Não se aplica <input type="text" value="8"/> Não sabe <input type="text" value="9"/></p>  | BCT2<br><input type="text"/>      |
| 3.8 | <p>Qual a classe do antibiótico?</p> <p>Penicilinas <input type="text" value="1"/> SULFAS <input type="text" value="2"/> Cefalosporinas <input type="text" value="3"/><br/>         Quinolonas <input type="text" value="4"/> Macrolídeos <input type="text" value="5"/> Outro _____ <input type="text" value="6"/><br/>         NSA <input type="text" value="8"/></p>            | QANT2<br><input type="text"/>     |

**Impacto dos programas de vacinação na meningite bacteriana em Salvador**

**Questionário Epidemiológico – preenchido para todos os pctes**

|  | Etiqueta                   | 1ª Digitação |        | 2ª Digitação |         |                         |
|--|----------------------------|--------------|--------|--------------|---------|-------------------------|
|  |                            | DGIND        | DDGIND | DG2IND       | DDG2IND |                         |
|  | Data do Preenchimento:     |              |        |              |         | DEEPI<br>____/____/____ |
|  | Iniciais do Entrevistador: |              |        |              |         | EEPI<br> _ _ _ _        |

**I. IDENTIFICAÇÃO:**

|     |   |   |
|-----|---|---|
| 1.1 | Data de admissão no HCM:  | DA ____/____/____                                 |
| 1.2 | Nº de registro no HCM:<br><br>Obs. 99 999 (não sabe PA) e 88 888 (outro hospital)   | IDR<br><br> _ _ _ _                               |
| 1.3 | Idade em anos (se <1ano, coloque 0):<br><br>Obs. 99 (não sabe PA) e 88 (outro hospital). Para RN preencher 0 para idade em anos, 0 para idade em meses e 99 para idade em dias.<br><br>Se <2 anos, idade do paciente em meses:<br><br>Se <1 mês, idade do paciente em dias: | ANO<br><br> _ _ <br><br>MÊS  _ _ <br><br>DIA  _ _ |
| 1.4 | Sexo:<br><br>Masculino <input type="text" value="1"/> Feminino <input type="text" value="0"/> Não sabe <input type="text" value="9"/>   | SX<br><br> _                                      |
| 1.5 | Grupo Racial:<br><br>Branco <input type="text" value="1"/> Mulato <input type="text" value="0"/> Negro <input type="text" value="3"/>   | RACE<br><br> _                                    |
| 1.6 | Procedência:<br><br>Salvador <input type="text" value="1"/> Interior <input type="text" value="0"/> Não sabe <input type="text" value="9"/>   | SAL<br><br> _                                     |

Obs. Para Sexo, grupo racial e procedência, preencher com 8 (não se aplica) para paciente de outro hospital e 9 (não sabe) para Pronto Atendimento.

**II. DADOS DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL:**

|     |   |                  |
|-----|---|------------------|
| 2.1 | <b>Aspecto do líquido:</b><br><br>Límpido <input type="text" value="1"/> Opalescente <input type="text" value="2"/> Purulento <input type="text" value="3"/><br>Hemorrágico <input type="text" value="4"/> Levemente hemorrágico <input type="text" value="5"/> | LIQASP<br><br> _ |
|-----|---|------------------|

|  |  |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
|--|--|---|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|--|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------|---------------------------------|----------|---------------------------------|
|  | Não sabe <input type="text" value="9"/>  | Xantocrômico <input type="text" value="7"/> | Outro <input type="text" value="6"/> |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| 2.2  | <b>Dados liquóricos prejudicados:</b> Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/>  |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| 2.3  | <b>Contagem de leucócitos:</b> (88888=não se aplica)   |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| 2.4  | <b>Presença de hemácias:</b><br>Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> Não se aplica <input type="text" value="8"/>   |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| 2.5  | <b>Predominância de PMNs (&gt;50%):</b><br>Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> Não se aplica <input type="text" value="8"/>  |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| 2.6  | <b>Glicose:</b> (888 =não sabe)  |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| 2.7  | <b>Proteínas:</b> (888 =não sabe)  |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| 2.8  | <b>Resultado da Coloração pelo Gram:</b><br>Não observou bactérias <input type="text" value="0"/> Observou bactérias <input type="text" value="1"/><br>Não realizado <input type="text" value="8"/> Não sabe <input type="text" value="9"/>  |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| 2.9  | <b>Exame Direto pelo Gram:</b><br><table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>não foram observadas bactérias</td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="0"/></td></tr> <tr><td>cocos Gram positivos em cadeia</td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="1"/></td></tr> <tr><td>cocos Gram positivos aglomerados</td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="2"/></td></tr> <tr><td>cocos Gram positivos</td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="3"/></td></tr> <tr><td>diplococos Gram positivos</td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="4"/></td></tr> <tr><td>diplococos Gram negativos</td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="5"/></td></tr> <tr><td>bacilos Gram negativos tipo <i>Haemophilus</i></td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="6"/></td></tr> <tr><td>bacilos Gram negativos</td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="7"/></td></tr> <tr><td>bacilos Gram positivos</td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="8"/></td></tr> <tr><td>outro _____</td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="10"/></td></tr> <tr><td>não sabe</td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="99"/></td></tr> </table> |   |                                      | não foram observadas bactérias | <input type="text" value="0"/> | cocos Gram positivos em cadeia | <input type="text" value="1"/> | cocos Gram positivos aglomerados | <input type="text" value="2"/> | cocos Gram positivos   | <input type="text" value="3"/> | diplococos Gram positivos | <input type="text" value="4"/> | diplococos Gram negativos | <input type="text" value="5"/> | bacilos Gram negativos tipo <i>Haemophilus</i> | <input type="text" value="6"/> | bacilos Gram negativos | <input type="text" value="7"/> | bacilos Gram positivos | <input type="text" value="8"/> | outro _____ | <input type="text" value="10"/> | não sabe | <input type="text" value="99"/> |
| não foram observadas bactérias                 | <input type="text" value="0"/>   |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| cocos Gram positivos em cadeia                 | <input type="text" value="1"/>   |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| cocos Gram positivos aglomerados               | <input type="text" value="2"/>   |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| cocos Gram positivos                           | <input type="text" value="3"/>   |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| diplococos Gram positivos                      | <input type="text" value="4"/>   |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| diplococos Gram negativos                      | <input type="text" value="5"/>   |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| bacilos Gram negativos tipo <i>Haemophilus</i> | <input type="text" value="6"/>   |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| bacilos Gram negativos                         | <input type="text" value="7"/>   |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| bacilos Gram positivos                         | <input type="text" value="8"/>   |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| outro _____                                    | <input type="text" value="10"/>  |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| não sabe                                       | <input type="text" value="99"/>  |   |                                      |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| 2.9.1  | <b>Cultura do Líquor:</b><br><table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Negativo após 48h</td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="0"/></td><td><i>N. meningitidis</i></td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="1"/></td></tr> <tr><td><i>S. pneumoniae</i></td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="2"/></td><td><i>Haemophilus sp.</i></td><td style="text-align: center;"><input type="text" value="3"/></td></tr> </table>  |   |                                      | Negativo após 48h              | <input type="text" value="0"/> | <i>N. meningitidis</i>         | <input type="text" value="1"/> | <i>S. pneumoniae</i>             | <input type="text" value="2"/> | <i>Haemophilus sp.</i> | <input type="text" value="3"/> |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| Negativo após 48h                              | <input type="text" value="0"/>   | <i>N. meningitidis</i>                      | <input type="text" value="1"/>       |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |
| <i>S. pneumoniae</i>                           | <input type="text" value="2"/>   | <i>Haemophilus sp.</i>                      | <input type="text" value="3"/>       |                                |                                |                                |                                |                                  |                                |                        |                                |                           |                                |                           |                                |  |                                |                        |                                |                        |                                |             |                                 |          |                                 |

|                                       |
|---------------------------------------|
| PREJ <input type="text" value=""/>    |
| LLEU<br><input type="text" value=""/> |
| LHEM<br><input type="text" value=""/> |
| LPMN<br><input type="text" value=""/> |
| GLI <input type="text" value=""/>     |
| PROT <input type="text" value=""/>    |
| DGC<br><input type="text" value=""/>  |
| GRAM<br><input type="text" value=""/> |
| CULT                                  |

|   |   |                          |  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
|---|---|--------------------------|--|--------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------|----------------|------------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------|---------------------------|-------------|----------------|----------|-----------------------------------|---------------|-----------------------|----|---------------------|----|-------------|----|----------|----|---------------|----|----------------------------------|
|   | <table border="1"> <tbody> <tr> <td><i>S. agalactiae</i></td> <td>4</td> <td><i>Streptococcus sp.</i></td> <td>5</td> </tr> <tr> <td><i>Staphylococcus sp.</i></td> <td>6</td> <td><i>E. coli</i></td> <td>7</td> </tr> <tr> <td><i>L. monocytogenes</i></td> <td>10</td> <td><i>Salmonella sp.</i></td> <td>11</td> </tr> <tr> <td><i>Shigella sp.</i></td> <td>12</td> <td>Outro _____</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>não sabe</td> <td>99</td> <td>não se aplica</td> <td>88</td> </tr> </tbody> </table>   | <i>S. agalactiae</i>     | 4  | <i>Streptococcus sp.</i> | 5                      | <i>Staphylococcus sp.</i> | 6                    | <i>E. coli</i> | 7                      | <i>L. monocytogenes</i> | 10                              | <i>Salmonella sp.</i> | 11                       | <i>Shigella sp.</i> | 12                        | Outro _____ | 13             | não sabe | 99                                | não se aplica | 88                    |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| <i>S. agalactiae</i>                    | 4   | <i>Streptococcus sp.</i> | 5  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| <i>Staphylococcus sp.</i>               | 6   | <i>E. coli</i>           | 7  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| <i>L. monocytogenes</i>                 | 10  | <i>Salmonella sp.</i>    | 11   |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| <i>Shigella sp.</i>                     | 12  | Outro _____              | 13   |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| não sabe                                | 99  | não se aplica            | 88   |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| 2.9.2                                   | <b>Resultado da Hemocultura:</b> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Negativa</td> <td>0</td> <td>Positiva</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Não realizado</td> <td>8</td> <td>Não sabe</td> <td>9</td> </tr> </tbody> </table>  |                          | Negativa   | 0                        | Positiva               | 1                         | Não realizado        | 8              | Não sabe               | 9                       | HP<br><input type="checkbox"/>  |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| Negativa                                | 0   | Positiva                 | 1  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| Não realizado                           | 8   | Não sabe                 | 9  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| 2.9.3                                   | <b>Se Hemocultura foi positiva, bactéria identificada:</b> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Negativo após 48h</td> <td>0</td> <td><i>N. meningitidis</i></td> <td>1</td> </tr> <tr> <td><i>S. pneumoniae</i></td> <td>2</td> <td><i>Haemophilus sp.</i></td> <td>3</td> </tr> <tr> <td><i>S. agalactiae</i></td> <td>4</td> <td><i>Streptococcus sp.</i></td> <td>5</td> </tr> <tr> <td><i>Staphylococcus sp.</i></td> <td>6</td> <td><i>E. coli</i></td> <td>7</td> </tr> <tr> <td><i>L. monocytogenes</i></td> <td>10</td> <td><i>Salmonella sp.</i></td> <td>11</td> </tr> <tr> <td><i>Shigella sp.</i></td> <td>12</td> <td>Outro _____</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>não sabe</td> <td>99</td> <td>não se aplica</td> <td>88</td> </tr> </tbody> </table> |                          | Negativo após 48h  | 0                        | <i>N. meningitidis</i> | 1                         | <i>S. pneumoniae</i> | 2              | <i>Haemophilus sp.</i> | 3                       | <i>S. agalactiae</i>            | 4                     | <i>Streptococcus sp.</i> | 5                   | <i>Staphylococcus sp.</i> | 6           | <i>E. coli</i> | 7        | <i>L. monocytogenes</i>           | 10            | <i>Salmonella sp.</i> | 11 | <i>Shigella sp.</i> | 12 | Outro _____ | 13 | não sabe | 99 | não se aplica | 88 | HEMO<br><input type="checkbox"/> |
| Negativo após 48h                       | 0   | <i>N. meningitidis</i>   | 1  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| <i>S. pneumoniae</i>                    | 2   | <i>Haemophilus sp.</i>   | 3  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| <i>S. agalactiae</i>                    | 4   | <i>Streptococcus sp.</i> | 5  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| <i>Staphylococcus sp.</i>               | 6   | <i>E. coli</i>           | 7  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| <i>L. monocytogenes</i>                 | 10  | <i>Salmonella sp.</i>    | 11   |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| <i>Shigella sp.</i>                     | 12  | Outro _____              | 13   |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| não sabe                                | 99  | não se aplica            | 88   |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| 2.9.4                                   | <b>Aglutinação com Látex:</b> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Negativo</td> <td>0</td> <td><i>N. meningitidis</i></td> <td>1</td> </tr> <tr> <td><i>S. pneumoniae</i></td> <td>2</td> <td><i>H. influenzae</i></td> <td>3</td> </tr> <tr> <td><i>Streptococcus</i> do grupo B</td> <td>4</td> <td><i>E.coli</i></td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Não sabe</td> <td>9</td> <td>Não realizada</td> <td>8</td> </tr> </tbody> </table>   |                          | Negativo   | 0                        | <i>N. meningitidis</i> | 1                         | <i>S. pneumoniae</i> | 2              | <i>H. influenzae</i>   | 3                       | <i>Streptococcus</i> do grupo B | 4                     | <i>E.coli</i>            | 5                   | Não sabe                  | 9           | Não realizada  | 8        | LATEX<br><input type="checkbox"/> |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| Negativo                                | 0   | <i>N. meningitidis</i>   | 1  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| <i>S. pneumoniae</i>                    | 2   | <i>H. influenzae</i>     | 3  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| <i>Streptococcus</i> do grupo B         | 4   | <i>E.coli</i>            | 5  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| Não sabe                                | 9   | Não realizada            | 8  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| <b>III. INCLUSÃO EM OUTROS ESTUDOS:</b> |   |                          |  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| 3.1                                     | Participa de outro estudo do grupo?<br>Sim : <input type="checkbox"/> 1 Não : <input type="checkbox"/> 0  |                          | ESTUDO1<br><input type="checkbox"/>  |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| 3.2                                     | Participa do estudo de pneumococos?<br>Sim : <input type="checkbox"/> 1 Não : <input type="checkbox"/> 0  |                          | SPN1<br><input type="checkbox"/>   |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| 3.3                                     | Nº no estudo de pneumococos?  |                          | SP1 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |
| 3.4                                     | Participa do estudo de meningococos?<br>Sim : <input type="checkbox"/> 1 Não : <input type="checkbox"/> 0   |                          | SNM1<br><input type="checkbox"/>   |                          |                        |                           |                      |                |                        |                         |                                 |                       |                          |                     |                           |             |                |          |                                   |               |                       |    |                     |    |             |    |          |    |               |    |                                  |

|       |   |
|-------|---|
| 3.5   | Nº no estudo de Meningiococos?  |
| 3.6   | Participa do estudo de Haemofilos?<br>Sim : <input type="text" value="1"/> Não : <input type="text" value="0"/>       |
| 3.7   | Nº no estudo de Haemofilos?   |
| 3.8   | Participa no estudo de Outras Bactérias?<br>Sim : <input type="text" value="1"/> Não : <input type="text" value="0"/> |
| 3.9   | Nº no estudo de outras bactérias?   |
| 3.9.1 | O liquor foi armazenado?<br>Sim : <input type="text" value="1"/> Não : <input type="text" value="0"/>                 |

|        |  |
|--------|--|
| NM1    | <input type="text" value=" _ _ _ _ "/> |
| SHI1   | <input type="text" value=" _ "/>       |
| HI1    | <input type="text" value=" _ _ _ _ "/> |
| SBAC1  | <input type="text" value=" _ "/>       |
| NOBAC1 | <input type="text" value=" _ _ _ _ "/> |
| ALCR   | <input type="text" value=" _ "/>       |







**VIII. QUADRO CLÍNICO NA ADMISSÃO:**

|     |  |                |
|-----|--|----------------|
| 8.1 | Nº de dias com sintomas:<br><br>Obs. Não sabe preencher 99 (PA); não se aplica preencher 88 (outro hospital)   | QCD     __ __  |
| 8.2 | Quadro neurológico na admissão:<br><br>normal <input type="text" value="1"/> alterado <input type="text" value="2"/> coma <input type="text" value="3"/> não sabe <input type="text" value="9"/><br>NSA <input type="text" value="8"/> | PCO         __ |

Obs. Paciente de outro hospital preencher o quadro neurológico com 8 (não se aplica)

**IX. ALTA FINAL: (999=não sabe, 888=não se aplica)**

|     |  |  |
|-----|--|--|
| 9.1 | Tipo de alta:<br><br>Curado <input type="text" value="1"/> Transferido <input type="text" value="2"/> Outro diagnóstico <input type="text" value="3"/> Óbito <input type="text" value="4"/><br>NSA <input type="text" value="8"/><br><br>Obs. Paciente de outro hospital preencher com 8 ( não se aplica)<br><br>Data da alta: | FTAL<br><br> __                          |
| 9.2 | Quantos dias foi internado no HCMaia:<br><br>Obs. Não sabe preencher 999 (PA); não se aplica preencher 888 (outro hospital)  | FDAL<br>__/__/__<br><br>FDI<br> __ __ __ |
| 9.3 | Quantos dias foi internado na UTI do HCMaia:<br><br>Obs. Não sabe preencher 999 (PA); não se aplica preencher 888 (outro hospital)   | FUTI<br> __ __ __                        |
| 9.4 | Diagnóstico Final:<br><br>Obs. Não sabe preencher 99 (PA); não se aplica preencher 88 (outro hospital)   | DGF<br><br> __ __                        |

## ANEXO III – Parecer consubstanciado CONEP



### CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER.CONEP 044/2013

**Registro CONEP 16732** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

**Folha de Rosto – 420661**

**Processo nº 25000.228426/2012-07**

**Projeto de Pesquisa:** *“Impacto dos programas de vacinação na meningite bacteriana em Salvador, Bahia”.*

**Pesquisador Responsável:** Joice Neves Reis Pedreira

**Instituição:** Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ - BA (1º CENTRO)

**CEP de origem:** Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Área Temática Especial:** Pesquisa com Cooperação Estrangeira

**Patrocinador:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

**Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº. 034/2013, relativo ao projeto de pesquisa em questão:**

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado

Brasília, 27 de Maio de 2013

  
Anibal Gil Lopes  
Coordenador Adjunto da COONEP/CNS/MS

**ANEXO IV – Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado no estudo**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto:** Impacto dos programas de vacinação na meningite bacteriana em Salvador, Bahia.

**Pesquisador Responsável:** Dra. Joice Neves Reis Pedreira  
(071) 3176 2302

**Telefone:**

**Paciente:** \_\_\_\_\_ **No. de estudo:** \_\_\_\_\_

**Para ser lido a todos os pacientes adultos e responsáveis legais dos pacientes menores:** As informações que se seguem descrevem o estudo de pesquisa e o seu papel como participante. O entrevistador responderá a quaisquer perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo de pesquisa. Por favor, ouça com atenção e não hesite em fazer qualquer pergunta sobre a informação que está sendo fornecida.

Objetivo do Estudo de Pesquisa:

Você/Sua criança está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisas que estamos realizando no Hospital Couto Maia sobre meningites bacterianas. Nós convidamos você a participar deste estudo porque os seus sintomas e os seus resultados de exames laboratoriais indicam que você tem esta doença. A meningite é uma infecção dos tecidos e do fluido que cercam o cérebro. Para identificar o agente causador da doença, seu médico fará alguns exames de rotina e uma parte de sua amostra de líquido será testada para um novo método de diagnóstico. Você não sofrerá nenhum desconforto e não haverá nenhum risco para sua saúde. Nenhuma amostra será coletada só para o estudo, as amostras serão coletadas somente se o médico solicitar, e o estudo não vai interferir no seu tratamento. O objetivo de nosso estudo é conhecer mais esta doença na nossa população, estudando a forma como elas são transmitidas; quais são os fatores que fazem com que algumas pessoas apresentem um quadro mais grave que outras, quais as melhores formas de tratamento, e os testes de diagnóstico. Obtendo estas

informações teremos condições, no futuro de implantar medidas para diminuir o número de pessoas com meningite.

Procedimento:

Se você voluntariamente decidir participar deste estudo de pesquisas após ter lido este formulário de consentimento, o investigador lhe fará perguntas relacionadas ao local onde você mora, sua ocupação (trabalho) e sua história médica. Irá ainda ler seu prontuário médico para obter os resultados de seus exames no hospital. Não há nenhum risco na participação desse estudo de pesquisas.

Sigilo:

As respostas feitas durante a entrevista, as informações do seu prontuário médico ou dos seus exames serão confidenciais e apenas você e o investigador terão acesso a elas. Você não será identificado (a) em qualquer relatório ou publicação resultante deste estudo de pesquisas.

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo de pesquisas é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir de participar em qualquer momento do estudo de pesquisas se você quiser. Você não precisa responder a qualquer pergunta durante a entrevista ou avaliação diária. Sua recusa em participar no estudo de pesquisas ou em parte do mesmo, ou sua decisão de interromper sua participação, não afetará seu cuidado futuro de nenhuma forma, nem prejudicará suas relações com o Hospital Couto Maia no presente ou no futuro. Uma cópia deste formulário lhe será dada para você. Você não será responsável por nenhuma despesa associada a este estudo de pesquisas, nem receberá compensação financeira.

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

Com quem contatar:

Se você tiver qualquer pergunta futura sobre sua participação neste estudo, ou sobre seus direitos como participante desta pesquisa, por favor, entre em contato com a Comissão de ética do Hospital Couto Maia, pelo telefone: (071) 316-3084 ou diretamente no Hospital Couto Maia cujo endereço é Rua São Francisco, s/n, Monte Serrat, no. 40, CEP 40.425-001, Salvador, Bahia ou o Comitê de Ética do Centro de pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710. Caso você tenha alguma

pergunta no que se refere a você como indivíduo pesquisado, por favor, entre em contato com a Dra. Joice Pedreira, Pesquisadora responsável por este estudo no Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 3176-2302.

**Consentimento:**

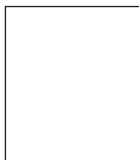
Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos riscos, desconfortos e benefícios todos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

---

Assinatura do paciente

Data

Hora



Impressão datiloscopia do paciente

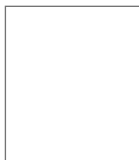
Eu ouvi e entendi este formulário de consentimento. Minhas dúvidas foram respondidas. Eu voluntariamente consinto que o paciente do qual eu sou pai ou mãe ou responsável legal participe deste estudo de pesquisas.

---

Assinatura do pai ou mãe ou responsável legal

Data

hora



Impressão datiloscopia do pai ou mãe ou guardião legal

---

Assinatura do Investigador

Data

Hora

---

Assinatura da testemunha

Data

Hora