

Samanta Cristine Grassi Almeida

Distribuição de sorotipos, perfil de suscetibilidade antimicrobiana e caracterização molecular de cepas de *Streptococcus pneumoniae* isoladas de doença pneumocócica invasiva nos períodos pré e pós a introdução da vacina pneumocócica 10-valente no Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Dra. Maria Cristina de Cunto Brandileone

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Almeida, Samanta Cristine Grassi

Distribuição de sorotipos, perfil de suscetibilidade antimicrobiana e caracterização molecular de cepas de *Streptococcus pneumoniae* isoladas de doenças pneumocócica invasiva nos períodos pré e pós a introdução da vacina pneumocócica 10-valente no Brasil / Samanta Cristine Grassi Almeida, São Paulo. – 2018.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof^o Dr.^o Maria Cristina de Cunto Brandileone

1. *Streptococcus pneumoniae*/Isolamento e purificação.
2. Sorotipagem/Classificação.
3. Resistência Microbiana a Antibióticos.
4. Vacinas pneumocócicas.
5. Tipagem de sequência multilocus/classificação.

SES/CCD/CD-377/2018

**Ao Giles por nunca me impedir de voar.
Ao pequeno Rumi por me divertir horrores.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Cristina de Cunto Brandileone, por todos os anos de companheirismo e constantes ensinamentos.

Às Dras. Maria da Glória Carvalho e Lesley McGee pelos ensinamentos nas metodologias fenotípicas e, principalmente, moleculares.

A todos os membros do Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, em particular a Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Pires, que sempre me auxiliou em todos os momentos que precisei.

Às Dras. Maria Cecília Outeiro Gorla e Ana Paula Silva de Lemos pelo constante apoio no desenvolvimento deste e de outros projetos.

Aos meus pais, Carmen e Fernando, por todo o empenho no desenvolvimento da minha educação e formação profissional.

À Ana Paula Cassiolato pelo constante apoio técnico, cumplicidade e coleguismo que ultrapassam em muito esse trabalho.

À querida amiga Angela Pires Brandão que, entre outros ensinamentos, me apresentou o mundo do gerenciamento de dados e sempre tem um ombro amigo a minha espera.

A Gabriela Rodrigues Francisco, obrigada por sua amizade e auxílio em solucionar todas as minhas dúvidas e dificuldades.

Aos colegas de bancada Lincoln Spinazola do Prado, Maria Luiza Leopoldo Silva e Guerra e Ueslei José Dias pelo apoio técnico na vigilância laboratorial do *S. pneumoniae*.

Aos colegas Carolina Sorgatto Amorim e Cleiton Eduardo Fiório pela participação em parte deste trabalho.

A Fabiola Dergovics e Antônio Erculani Junior pela realização das corridas nas reações de sequenciamento.

Às mais que queridas irmãs de profissão, Daniela Leite e Rosangela Siqueira de Oliveira, sem o apoio incondicional de vocês este trabalho não teria acontecido.

Aos colegas pesquisadores membros da CPRTI, principalmente, o colega Orlando Garcia Ribeiro Filho, pelos “puxões de orelhas” sempre que necessários.

Aos colegas do Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas, Rosemeire Cobo Zanella, Sérgio Bokermann, Marta Galhardo, Maria Helena Costa Cavalcante, Maria Vaneide de Paiva Batista dos Santos e Rosemeire Capoani Almendros, que me auxiliam incondicionalmente no dia a dia de trabalho.

As unidades de vigilância, funcionários dos hospitais e equipes dos Laboratórios de Saúde Pública (LACENs) nos níveis local, estadual e federal por enviar os isolados de pneumococos para o IAL.

A Secretaria de Vigilância em Saúde (COVER, CGLAB, SVS), do Ministério da Saúde, para coordenação da rede de laboratórios.

A todos os colegas do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, afinal são mais de 20 anos de relação entre iniciação científica, bolsas de projetos, pós-graduação e carreira como funcionária.

Aos, mais que queridos amigos, Georgia e Ricardo, por todos os momentos de apoio e descontração ao longo dos anos de nossa amizade.

Aos meus irmãos, Samara e Marcos, pelo apoio sempre que necessário e pelos momentos de descontração, que incluem as “brigas”.

A toda equipe da WellGym, obrigada por manter a minha saúde física e mental durante esta trajetória.

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho e que, por descuido, eu tenha me esquecido de agradecer.

Apoio financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Instituto Adolfo Lutz

Este estudo foi desenvolvido no Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz

RESUMO

A doença pneumocócica invasiva (DPI) é uma das principais causas de morbidade e letalidade afetando especialmente crianças e idosos, resultando em um problema de saúde pública. O Brasil introduziu a vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV10) no programa nacional de imunização infantil em 2010. Os estudos de efetividade e de impacto da PCV10 no Brasil foram realizados 3 a 5 anos após a introdução da vacina e mostraram redução nos casos de DPI causada pelos sorotipos vacinais e aumento de sorotipos não incluídos na vacina. Portanto, estudos realizados em um período de tempo mais longo após vacinação são fundamentais para se observar a sustentabilidade do aumento dos sorotipos não vacinais ao longo dos anos. O objetivo deste estudo foi investigar as características de *S.pneumoniae* (distribuição de sorotipos, perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e identificação das linhagens genéticas dos sorotipos prevalentes) nos períodos pré-PCV10 (2005-2009), pós-PCV10-imediato (2010-2013) e pós-PCV10-tardio (2014-2017), sendo o período pós-PCV10 composto de 7 anos de avaliação. Isolados de DPI foram obtidos através da vigilância laboratorial nacional para *S. pneumoniae*. Os isolados foram encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz pelos LACENs e por outras instituições públicas e privadas. Os isolados foram sorotipados por Quellung, o perfil de suscetibilidade antimicrobiana foi determinado pelos testes de disco-difusão e concentração inibitória mínima por microdiluição e a caracterização molecular foi realizada por MLST. A %*change* foi utilizada para calcular as diferenças na prevalência dos sorotipos e da resistência antimicrobiana por período de estudo. As sequências-tipo foram determinadas na página da web MLST e os complexos clonais pelo programa eBURST. Um total de 11.136 isolados invasivos foi estudado fenotipicamente. Uma amostragem de 688 isolados foi selecionada para a identificação das linhagens genéticas. No período pós-PCV10-tardio foi observada uma redução de 69,6% de DPI pelos sorotipos vacinais e, em paralelo, um aumento de 105,8% dos sorotipos não incluídos na PCV10. O aumento dos sorotipos não-PCV10 foi relacionado principalmente aos sorotipos 3, 6C, 8, 12F e 19A. Detectamos uma elevação de 304,6% na resistência à eritromicina no período pós-PCV10-tardio. O estudo molecular identificou 33 CC e 182 STs. No período pós-PCV10, clones internacionalmente disseminados foram identificados ST180 (Clone Holanda³-31), ST53-12574 (Clone Holanda⁸-33) e ST218 (Clone Dinamarca^{12F}-34)], e duas principais STs foram relacionadas à resistência aos antimicrobianos, a citar a ST320/19A, presente desde o pré-PCV10 e a ST386/6C detectada no pós-PCV10. O monitoramento das características de *S. pneumoniae* em um período de tempo longo após a introdução da PCV10 confirmou a proteção da vacina contra a DPI pelos sorotipos vacinais e detectou a alta prevalência de sorotipos não incluídos na PCV10. O estudo molecular identificou uma disseminação de clones internacionais no Brasil.

ABSTRACT

Invasive pneumococcal disease (IPD) is one of the leading causes of morbidity and lethality affecting especially children and the elderly, resulting in a public health problem. Brazil introduced the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV10) in the national program of childhood immunization in 2010. The effectiveness and impact studies of PCV10 in Brazil were carried out 3 to 5 years after the introduction of the vaccine and showed a reduction in cases of IPD caused by vaccine serotypes and increase in non-vaccine serotypes. Therefore, studies conducted over a longer period of time after vaccination is essential to observe the sustainability of the increase in non-vaccine serotypes over the years. The aim of this study was to investigate the characteristics of *S. pneumoniae* (distribution of serotypes, antimicrobial susceptibility profile and genetic lineages identification of prevalent serotypes) in the pre-PCV10 (2005-2009), immediate-post-PCV10 (2010-2013) and late-post-PCV10 (2014-2017) periods, the post-PCV10 period being composed of 7 years of evaluation. Isolated of DPI were obtained through national laboratory surveillance for *S. pneumoniae*. The isolates were sent to the Institute Adolfo Lutz by LACENs and other public and private institutions. The isolates were serotype by Quellung, the antimicrobial susceptibility profile was determined by disc-diffusion and minimum inhibitory concentration microdilution assays and the molecular characterization were performed by MLST. %change was used to calculate differences in the prevalence of serotypes and antimicrobial resistance per study period. The sequences-type were determined at MLST website and clonal complexes were defined by the program eBURST. A total of 11,136 invasive isolates were phenotypically studied. A sample of 688 isolates was selected for the identification of the genetic lineages. In the late-post-PCV10 period, a 69.6% reduction in IPD was observed by vaccine serotypes and, in parallel, a 105.8% increase in non-PCV10 serotypes. The increase in non-PCV10 serotypes was mainly related to serotypes 3, 6C, 8, 12F and 19A. We detected a 304.6% increase in resistance to erythromycin in the late-post-PCV10 period. The molecular study identified 33 CC and 182 STs. In the post-PCV10 period, internationally disseminated clones were identified [ST180 (Clone Netherlands3-31), ST53-12574 (Clone Netherlands8-33) and ST218 (Clone Denmark12F-34)], and two major STs were related to antimicrobial resistance, to be cited the ST320/19A, present since the pre-PCV10 and the ST386/6C detected post-PCV10. Monitoring the characteristics of *S. pneumoniae* a long-term period after the introduction of PCV10 confirmed the protection of the vaccine against IPD by the vaccine serotypes and detected the high prevalence of non-PCV10 serotypes. The molecular study identified the great spread of international clones in Brazil.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a-anos

aroE-sikimate dehydrogenase

ATCC[®]-*American Type Culture Collection*

CC-complexo clonal

CDC-Centers for Disease Control and Prevention

CEF-ceftriaxona

CGLab-Coordenação Geral de Laboratórios, Ministério da Saúde

CIM-Concentração Inibitória Mínima

CLO-cloranfenicol

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute

°C-graus Celsius

CO₂-gás carbônico

COMPAS- *Clinical Otitis Media and Pneumonia Study*

CRIEs-Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais

ddl-D-alanine-D-alanine ligase

DLV-variante de *locus duplo*

DNA-Ácido desoxirribonucleico

DPI-Doença Pneumocócica Invasiva

ERI-eritromicina

EUA-Estados Unidos da América

EUCAST-European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

gdh-glucose-6-phosphate dehydrogenase

g-força centrífuga, gravidade

gki-glucose kinase

GPS- projeto *Global Pneumococcal Sequencing*

IAL-Instituto Adolfo Lutz

I-resistência intermediária

LACENs-Laboratórios Central dos Estados

m-meses

mg-miligramas

mL-mililitro

MLST-*Multilocus Sequence Typing*

mM-micromolar

mm-milímetros

M-molar

NGS-*New Generation Sequence*

NMPI-Núcleo de Meningite, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas

NT-*S. pneumoniae* não tipável

PBPs-*penicilin binding proteins*

PCR-Reação em Cadeia da Polimerase

PCV-Vacina Pneumocócica Conjugada

PCV7-Vacina Pneumocócica Conjugada 7-valente

PCV10-Vacina Pneumocócica Conjugada 10-valente

PCV13-Vacina Pneumocócica Conjugada 13-valente

PEN-penicilina

PMEN-*Pneumococcal Molecular Epidemiology Network*

%*change*-porcentagem de *change*

Pós-PCV10-período posterior a introdução da PCV10 (2010-2017)

Pós-PCV10-imediatos-período de até três anos da introdução da PCV10 (2010-2013)

Pós-PCV10-tardio-período após quatro anos da introdução da PCV10 (2014-2017)

PPV-Vacina Pneumocócica Polissacarídea

PPV23-Vacina Pneumocócica Polissacarídea 23-valente

Pré-PCV10-período anterior a introdução da PCV10 (2005-2009)

recP-transketolase

rpm-rotações por minuto

R-resistente

SLV-variante de *locus* único

SINAN-Sistema de Informação de Agravos de Notificação Nacional

SNV-sorotipo não vacinal não incluído nas PCV10 ou PCV13

spi-signal peptidase I

S-suscetível

ST-sequência-tipo

SXT-trimetoprim-sulfametoxazol

U-unidades

µg-micrograma

µL-microlitro

VAN-vancomicina

wgMLST-*whole genome Multilocus Sequence Typing*

xpt-xanthine phosphoribosyl transferase

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Distribuição do número de isolados de *Streptococcus pneumoniae*, por ano de isolamento e por período de estudo 43
- Tabela 2 – Distribuição dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* caracterizadas molecularmente pela metodologia de MLST por período vacinal..... 44
- Tabela 3 - Distribuição do número de isolados de *Streptococcus pneumoniae* por diagnóstico clínico e período de estudo 56
- Tabela 4 - Distribuição do número de isolados de *Streptococcus pneumoniae* por espécime clínico de isolamento e período de estudo 56
- Tabela 5 - Distribuição do número de isolados de *Streptococcus pneumoniae* por faixa etária e período de estudo..... 57
- Tabela 6 - Sorotipos PCV10, PCV13 e sorotipos não vacinais (SNV) de *Streptococcus pneumoniae* nos períodos de estudo..... 61
- Tabela 7 - Distribuição dos sorotipos PCV10, PCV13 e sorotipos não vacinais (SNV) de *Streptococcus pneumoniae* por faixa etária, diagnóstico clínico por período de estudo..... 64
- Tabela 8 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana do *Streptococcus pneumoniae* nos períodos de estudo..... 69
- Tabela 9 - Perfil de multirresistência aos antimicrobianos do *Streptococcus pneumoniae* nos períodos de estudo..... 70

Tabela 10 - Caracterização molecular de *Streptococcus pneumoniae* por sorotipos PCV10, PCV13 ou SNV por período pré e pós-PCV10 75

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição dos sorotipos PCV10, PCV13 e SNV de *Streptococcus pneumoniae* nos períodos pré-PCV10 (2005-2009), pós-PCV10-imediato (2010-2013) e pós-PCV10-tardio (2014-2017)..... 60
- Figura 2 – Representação gráfica dos %*change* para os sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* nos períodos vacinais pós-PCV10..... 63
- Figura 3 - Distribuição dos sorotipos PCV10 4, 5 e 7F de *Streptococcus pneumoniae* por faixa etária nos períodos de estudo. 65
- Figura 4 - Distribuição dos sorotipos PCV13 3, 6A e 19A de *Streptococcus pneumoniae* por faixa etária nos períodos de estudo. . 66
- Figura 5 - Distribuição dos SNV 6C, 8 e 12F de *Streptococcus pneumoniae* por faixa etária nos períodos de estudo. 67
- Figura 6 - Distribuição dos sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* relacionados à resistência aos antimicrobianos ao longo dos anos no período pós-PCV10 (2010-2017)..... 72
- Figura 7 - Distribuição dos complexos clonais de *Streptococcus pneumoniae* isolados de DPI nos períodos pré-PCV10 (2005-2009) e pós-PCV10 (2011-2015)..... 77
- Figura 8 - Distribuição dos complexos clonais de *Streptococcus pneumoniae* isolados de DPI relacionados ao perfil de suscetibilidade a penicilina..... 78

Figura 9 - Distribuição dos complexos clonais de *Streptococcus pneumoniae* isolados de DPI relacionados ao perfil de suscetibilidade a eritromicina..... 79

**Figura 10 - Distribuição dos complexos clonais de *Streptococcus pneumoniae* isolados de DPI relacionados ao perfil de multirresistência.
..... 80**

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Epidemiologia das infecções por <i>Streptococcus pneumoniae</i>	19
1.2 Aspectos gerais da microbiologia de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	22
1.3 Vacinas pneumocócicas	25
1.3.1 Vacinas polissacarídicas	25
1.3.2 Vacinas conjugadas	27
1.4 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos	31
1.5 Caracterização molecular de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	34
1.6 Justificativa do estudo	38
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo geral	40
2.2 Objetivos específicos	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 Amostragem.....	41
3.2 Identificação bacteriana e sorotipagem do <i>Streptococcus pneumoniae</i>	45
3.3 Testes de suscetibilidade antimicrobiana	45
3.4 Caracterização molecular	46
3.4.1 Crescimento bacteriano.....	47
3.4.2 Metodologia MLST por sequenciamento Sanger.....	47
3.4.2.1 Extração do DNA	47
3.4.2.2 Amplificação dos genes alvo	48
3.4.2.3 Purificações dos produtos da amplificação dos genes alvo	49
3.4.2.4 Reações de amplificação do Sequenciamento Sanger	49
3.4.2.5 Purificações dos produtos das reações de amplificação para o sequenciamento e reações de sequenciamento	50
3.4.3 Metodologia de MLST por sequenciamento total do genoma (wgMLST)	51
3.5 Análise de dados	51
3.6 Análise das sequências gênicas para caracterização molecular das amostras estudadas	52
3.6.1 Análise das sequências gênicas obtidas pela metodologia de MLST por Sequenciamento Sanger	52

3.6.2	Análise das sequências gênicas obtidas pela metodologia de wgMLST.....	53
3.6.3	Análises das sequências-tipo e complexos clonais no programa eBURST.....	53
3.6.4	Análises das sequências-tipo e complexos clonais no programa Bionumerics v7.6	54
4	RESULTADOS	55
4.1	Caracterização dos isolados estudados.....	55
4.2	Sorotipos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> nos períodos pré e pós-PCV10	57
4.3	Suscetibilidade antimicrobiana de <i>Streptococcus pneumoniae</i> ..	68
4.4	Sorotipos prevalentes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> associados à resistência à penicilina, eritromicina e a multirresistência no período pós-PCV10.....	71
4.5	Caracterização molecular dos sorotipos estudados de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	73
5	DISCUSSÃO	81
6	CONCLUSÕES	96
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
8	ANEXOS.....	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das infecções por *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae (pneumococo, Spn) é um micro-organismo bacteriano exclusivamente humano, presente na microbiota da nasofaringe, colonizador do trato respiratório superior (Althouse et al., 2017). Spn pode ocasionar desde doenças localizadas como conjuntivite, otite média aguda, sinusite e pneumonia não bacteriêmica até doença pneumocócica invasiva (DPI) como pneumonia bacteriêmica, bacteriemia, sepse e meningite (Bogaert; De Groot; Hermans, 2004). Globalmente, a DPI é definida como casos nos quais houve a identificação do *S. pneumoniae* em sítio normalmente estéril. Os principais grupos de idade acometidos pelas doenças pneumocócicas são crianças menores de 5 anos de idade, idosos e indivíduos imunocomprometidos (Mook-Kanamori et al., 2011; Weiser; Ferreira; Paton, 2018).

A transmissão do pneumococo na comunidade é realizada pelo contato pessoa-pessoa por meio de aerossóis originados do trato respiratório, sendo favorecida em ambientes com aglomeração de indivíduos, como em creches ou instituições de assistência aos idosos (Mook-Kanamori et al., 2011; Weiser; Ferreira; Paton, 2018).

A colonização do trato respiratório superior é pré-requisito para que o pneumococo possa se deslocar da nasofaringe e invadir sítios corpóreos normalmente estéreis, podendo causar doença (Bogaert; De Groot; Hernans, 2004; Devine et al., 2015). As taxas de colonização variam de acordo com a população estudada e a idade do portador. Estudos mostram que crianças possuem maiores taxas de colonização (30-70%) que os indivíduos adultos ou idosos (menores de 10%) (Almeida ST et al., 2014; Principi et al., 2015; Brandileone et al., 2016; Althouse et al., 2017). Os fatores de risco associados ao desenvolvimento das doenças dependem do estado imunológico do

portador, presença de co-morbidades ou doenças de base, infecção viral prévia entre outros fatores. Características da cepa colonizante, como a virulência e a carga bacteriana, também são fundamentais para estabelecimento da doença (Simell et al., 2012; Principi et al., 2015).

As principais intervenções utilizadas com o intuito de reduzir a morbidade e mortalidade da DPI foram a introdução das vacinas pneumocócicas conjugadas (PCVs) e as medidas terapêuticas, principalmente associadas ao uso de antimicrobianos (Bhutta et al., 2013).

Em 2000, as estimativas mundiais de mortalidade na era pré-introdução das PCVs eram de 826.000 mortes por doença pneumocócica invasiva em crianças menores de 5 anos de idade (O'Brien et al., 2009). A Organização Mundial de Saúde divulgou novo levantamento no ano de 2008, apresentando dados da era pós-introdução das PCVs, e estimou em 541.000 mortes mundiais causadas por doenças pneumocócicas em crianças menores de 5 anos (WHO, 2008).

A mortalidade por infecções das vias respiratórias inferiores em crianças menores de 5 anos atribuíveis ao pneumococo foi reduzida em regiões de alta renda, como na Europa Ocidental, América do Norte e Austrália, devido à ampla introdução e utilização das PCVs. Porém, essas doenças seguem como uma questão de saúde pública, devido às altas taxas de mortalidade na Europa Oriental e em regiões de médio ou reduzido desenvolvimento econômico (GBD 2013 Mortality and Causes of Death, 2015). Estudos globais registram que metade das mortes em crianças menores de 5 anos está concentrada em cinco países: Índia, Nigéria, República Democrática do Congo, Paquistão e China (Bhutta et al., 2013).

Entre os quadros de pneumonias graves, o *S. pneumoniae* é isolado em pelo menos 18% dos casos, com uma estimativa de 33% de mortes em todo o mundo (O'Brien et al., 2009; Novaes; Sartori; Soárez, 2011; Walker et al., 2013; Sgambatti et al., 2016).

A meningite pneumocócica também é um agravo de alto impacto em saúde pública dado pela frequência de sequelas e pela alta taxa letalidade. Aproximadamente 30-35% dos pacientes com meningite pneumocócica ficam com algum tipo de sequela como déficit motor, perda auditiva ou comprometimento cognitivo (Mook-Kanamori et al., 2011; Madhi, 2015). Dados do levantamento realizado pelo Grupo de Estudo Global da Carga de Doenças 2013, que compilou dados de mortalidade de 188 países entre os anos de 1990 a 2013, estimam que, entre 2000 e 2013, houve uma redução em 20% nas mortes associadas às meningites causadas por este agente (de 377.300 para 303.500 casos) (GBD 2013 Mortality and Causes of Death, 2015).

No Brasil, a vigilância da meningite é bem estabelecida, uma vez que a doença é categorizada, pelo Ministério da Saúde, como notificação compulsória pela portaria nº 204 de 17 de Fevereiro de 2016. Dados do Ministério da Saúde apontam para uma incidência de meningite pneumocócica de 0,5 casos/100.000 habitantes no ano 2013 (Ministério da Saúde, 2018b), com a ocorrência de cerca de 900 casos em 2017 em todo o país (Ministério da Saúde, 2018c).

Em estudo de dados secundários obtidos a partir do Sistema de Informação Hospitalar/Sistema Único de Saúde e do Sistema de Informação de Agravos de Notificação Nacional (SINAN), Sartori et al. (2013) estimaram que *S. pneumoniae* foi responsável por 34,1% e 27,4% dos casos de meningites bacterianas entre os patógenos identificados em crianças menores de 1 ano e entre 1-4 anos de idade, respectivamente.

No Brasil, não há uma vigilância para as pneumonias ou para a DPI, levando a uma subnotificação dos casos (Andrade et al., 2016; Sgambatti et al., 2016). Contudo, Novaes et al. (2011), em levantamento de hospitalizações na rede pública do Brasil, relatou que a síndrome clínica mais comumente associada a este agente foi a pneumonia, responsável por 64,8% de todas as hospitalizações por doença pneumocócica.

O estudo de Scotta et al. (2014) comparou os dados de internações de crianças de 0 a 4 anos no sistema público de saúde brasileiro com diagnóstico de pneumonia, independente do micro-organismo, nos períodos pré (2002-2009) e pós-vacinal (2011 a 2012) e concluiu que o uso da PCV10 teve importante impacto na redução das hospitalizações nesta faixa etária uma vez que a incidência de hospitalizações por pneumonia diminuiu em 12,65% quando comparado os períodos pré e pós-vacinação.

Portanto, mesmo com a ampla utilização das PCVs, a DPI permanece como causa importante de morbidade e mortalidade global, com a maior carga em crianças menores de 2 anos de idade e idosos (Andrade et al., 2016; Vila-Corcoles et al., 2016).

1.2 Aspectos gerais da microbiologia de *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae foi descoberto de forma independente por Pasteur e Sternberg em 1881. Logo após a sua descoberta, o pneumococo foi reconhecido como um dos principais patógenos responsáveis pela pneumonia e mais tarde foi identificado como responsável pela alta mortalidade durante a pandemia de influenza de 1918 (Spellerberg; Brandt, 2011; Geno et al., 2015).

Este micro-organismo pertence ao gênero *Streptococcus*, família *Streptococcaceae*; tem características morfo-tintoriais de cocos Gram positivos; bioquimicamente é anaeróbio facultativo, catalase e citocromo-oxidase negativa. Sua morfologia clássica é de diplococos lanceolados, vulgarmente denominados “chama de vela”, mas podem apresentar-se como cocos isolados ou dispostos em cadeias curtas, medindo entre 0,5 a 1,25 μm (Spellerberg; Brandt, 2011; WHO, 2011).

Trata-se de um micro-organismo com exigências nutricionais e, por isso, se desenvolve em meios contendo sangue, sendo dependente de CO_2 para seu isolamento inicial a partir de espécime clínico. Suas colônias em meios de cultura sólidos são puntiformes, com coloração

acinzentada, lisas, brilhantes, com um halo esverdeado de alfa-hemólise quando em agar sangue e, por vezes, possuem uma depressão central causada pela presença de enzimas autolíticas (Spellerberg; Brandt, 2011; WHO, 2011).

Outra característica do pneumococo é a capacidade de ser lisado frente a detergentes, a qual é utilizada para diferenciá-lo de outros estreptococos alfa-hemolíticos (Spellerberg; Brandt, 2011; WHO, 2011).

A identificação precisa deste micro-organismo se faz necessária para a correta definição da carga da doença pneumocócica e o impacto na determinação e definição da prevalência dos sorotipos. Atualmente, diversas metodologias fenotípicas e moleculares, como espectrometria de massa ou as reações em cadeia da polimerase (PCR) em diferentes formatos (convencional ou tempo real), têm sido utilizadas em espécimes clínicos ou isolados bacterianos para auxiliar na correta identificação do *S. pneumoniae*, principalmente quando o isolamento bacteriano a partir de espécimes clínicos não foi possível (Slotved; Facklam; Fursted, 2017; Varghese; Jayaraman; Veeraraghavan, 2017).

O pneumococo possui vários fatores de virulência, incluindo as cápsulas polissacarídicas, proteínas da superfície, proteínas excretadas e proteínas citoplasmáticas (Skovsted, 2017). Esses fatores definem o potencial de invasibilidade da bactéria. Estudos mostram que, alguns desses antígenos têm a capacidade de induzir resposta imunológica e proteção contra a infecção pneumocócica, tornando-os potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas pneumocócicas (Feldman; Anderson, 2014).

O pneumococo é classificado em mais de 94 sorotipos tendo como base as diferenças antigênicas de suas cápsulas polissacarídicas. A cápsula é o principal fator de virulência desta bactéria e é responsável por induzir no hospedeiro a imunidade sorotipo específica. Conseqüentemente, esses antígenos capsulares

são à base das formulações vacinais atualmente utilizadas no mundo para prevenir a doença pneumocócica (Wyres et al., 2013).

Os sorotipos de pneumococo variam quanto à sua capacidade invasiva, ou seja, de causar doença no homem. Alguns sorotipos estão mais relacionados com a colonização da nasofaringe, enquanto outros tendem a ser mais invasivos (Simell et al., 2012; Weiser, Ferreira, Paton, 2018). Os sorotipos incluídos nas PCVs foram os mais prevalentes como causa de DPI em crianças, sendo associados à resistência antimicrobiana no período anterior ao desenvolvimento das PCVs (Cornick; Bentley, 2012).

A identificação dos sorotipos circulantes não tem impacto direto no tratamento, porém é essencial para a vigilância epidemiológica das doenças pneumocócicas. Sem a determinação dos sorotipos, não seria possível formular as vacinas pneumocócicas nem avaliar o impacto do uso das mesmas. A identificação dos sorotipos pode ser realizada tanto por métodos imunológicos, quanto pelos métodos moleculares (Geno et al., 2015; Varghese; Jayaraman; Veeraraghavan, 2017).

A metodologia padrão-ouro para a definição do tipo capsular do pneumococo baseia-se na reação de Quellung, descrita por Neufeld e Etinger-Tulczynska em 1933, a qual continua a ser realizada essencialmente como determinada por Austrian, em 1976. O método é baseado nas reações entre antígenos dos polissacarídeos capsulares do pneumococo e anticorpos produzidos pela imunização de coelhos com os diferentes sorotipos de pneumococo. Alguns tipos capsulares são agrupados em sorogrupos por apresentarem antígenos em comum. É uma metodologia que se caracteriza por ser de alto custo, uma vez que os antissoros são produzidos e comercializados pelo *Staten Serum Institute* na Dinamarca e, devido à necessidade de expertise de leitura, restrita a execução nos laboratórios de referência (Geno et al., 2015; Skovsted, 2017).

A biologia molecular possui diferentes metodologias para análise dos tipos capsulares do pneumococo, a maioria tendo por base variações da PCR, podendo ser utilizada para a identificação de sorogrupos ou sorotipos diretamente no espécime clínico ou nos isolados bacterianos (WHO, 2011). A PCR para sorotipagem pode não resultar na definição final do tipo capsular, levando à necessidade de complementação pela metodologia de Quellung.

1.3 Vacinas pneumocócicas

O desenvolvimento das vacinas representou um grande passo para o controle de diversas doenças infecciosas. No caso do pneumococo, o foco das diferentes composições vacinais foi a indução de anticorpos protetores contra polissacarídeos capsulares dos sorotipos mais prevalentes. Atualmente, as vacinas disponíveis no mercado mundial são: a vacina polissacarídica 23-valente (PPV23) e duas vacinas conjugadas, 10-valente (PCV10) e a 13-valente (PCV13).

1.3.1 Vacinas polissacarídicas

Estudos realizados nas décadas de 1930 e 1940 levaram ao desenvolvimento e uso clínico das primeiras formulações de vacinas pneumocócicas polissacarídicas (Wang et al., 2018). Porém, os sucessos terapêuticos obtidos com o uso dos antimicrobianos no tratamento da pneumonia lobar resultaram na interrupção do uso e desenvolvimento destas vacinas (Pittet; Posfay-Barbe, 2012).

A retomada do interesse no desenvolvimento das vacinas ocorreu na década de 1970 com a emergência de isolados de pneumococo com reduzida suscetibilidade aos antimicrobianos (Pittet; Posfay-Barbe, 2012).

A PPV foi introduzida novamente em 1977 com uma formulação 14-valente e, em 1983, a sua cobertura foi expandida para a formulação final utilizada na atualidade de vacina polissacarídea 23-valente (PPV23). Em sua composição estão os 23 polissacarídeos dos sorotipos: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F (Geno et al., 2015; Falkenhorst et al., 2017). Atualmente, a PPV23 é a única vacina polissacarídica não conjugada disponível no mercado mundial.

No entanto, essa vacina PPV23 possui limitações que restringem sua utilização. Primeiro, é pouco imunogênica em lactentes menores de 2 anos de idade, uma vez que nesta idade o sistema imune ainda não está apto a produzir a resposta induzida diretamente por polissacarídeos livres. Segundo, os polissacarídeos não são capazes de induzir resposta imunológica T-dependente de longa duração e não geram memória imunológica (Falkenhorst et al., 2017). Terceiro, mostrou pouca eficácia contra pneumonia não bacteriêmica ou adquirida na comunidade (Tin Tin Htar et al., 2017) e contra DPI em pacientes com doenças crônicas (Wang et al., 2018). Quarto, não previne a colonização nasofaríngea (Devine et al., 2015) ou infecções da mucosa (pneumonia não bacteriêmica e otite média) (Geno et al., 2015). Finalmente, as concentrações de anticorpos após doses subsequentes de PPV23 parecem ser menores do que aquelas obtidas após a vacinação primária (Feldman; Anderson, 2014).

A PPV23 está disponível no Brasil, nos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIEs), para indivíduos acima de 2 anos de idade com doenças crônicas (cardiovasculares, pulmonares, renais, metabólicas, hepáticas e hemoglobinopatias) e imunodeprimidos (transplantados, com neoplasias ou infectados com HIV), e para os idosos com mais de 60 anos de idade institucionalizados ou hospitalizados, nestes sendo administrada em 1 dose e um reforço após 5 anos (Ministério da Saúde, 2014; SBIM, 2018).

1.3.2 Vacinas conjugadas

A primeira PCV desenvolvida para utilização em larga escala foi a 7-valente (PCV7), licenciada para a população infantil em 2000 nos Estados Unidos da América (EUA) (CDC/NCIRD, 2017). A base de sua composição era o polissacarídeo capsular de sete diferentes sorotipos de pneumococo prevalentes nas doenças pediátricas (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F), quimicamente ligados ou conjugados à toxina diftérica mutante não tóxica e altamente imunogênica, o CRM197 (Pittet; Posfay-Barbe, 2012). A PCV7 foi administrada nos EUA e em diferentes países da Europa, demonstrando ser altamente eficaz na prevenção de DPI em crianças, fornecendo proteção moderada contra otite média aguda pneumocócica e pneumonia não bacteriêmica (Hausdorff; Hoet; Adegbola, 2015).

A PCV7 foi retirada do mercado com o desenvolvimento, entre 2009 e 2010, de duas novas formulações de PCVs às quais se incluíram sorotipos globalmente importantes, principalmente na África, Ásia e América Latina (CDC/NCIRD, 2017; Whitney; Goldblatt; O'Brien, 2014).

A PCV10 possui os polissacarídeos presentes na PCV7 mais os sorotipos 1, 5 e 7F. Na PCV10, oito dos polissacarídeos (1, 5, 4, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F) são conjugados com a proteína-D presente no *Haemophilus influenzae* não-tipável e dois são conjugados com o toxóide tetânico (18C) ou toxóide diftérico (19F). A PCV13 tem em sua composição os sorotipos presentes na PCV10 acrescidos dos polissacarídeos dos sorotipos 3, 6A e 19A, sendo todos conjugados ao CRM197 (Pittet; Posfay-Barbe, 2012).

Essas novas vacinas foram licenciadas com base em seus perfis de imunogenicidade e reatogenicidade comparáveis aos observados aos da PCV7, e prontamente passaram a ser recomendadas pela Organização Mundial da Saúde para ampla introdução na rotina de imunização de países desenvolvidos e em desenvolvimento (Hausdorff; Hoet; Adegbola, 2015; WHO Advisory

Group, 2012). Atualmente, ambas estão licenciadas para uso em crianças com até 5 anos de idade. Em 2011, a PCV13 foi licenciada para uso em indivíduos com idade igual ou superior a 50 anos nos EUA (CDC/NCIRD, 2017), atualmente é licenciada para uso em todas as idades. Esquemas que combinam a vacinação com a PCV13 seguida da PPV23 têm sido recomendados para utilização na população de idosos, estabelecendo uma estratégia de promoção de uma resposta imunológica inicial mais robusta e duradora, com a ampliação do espectro de proteção atribuído à administração da PPV23 (Kobayashi et al., 2015).

Por terem em sua composição proteínas conjugadas aos polissacarídeos, as vacinas conjugadas, ao contrário da PPV23, induzem resposta imunológica T-dependente que é de longa duração e geram memória imunológica, podendo ser utilizadas em crianças a partir de 2 meses de idade. Também atuam na colonização da nasofaringe, eliminando os sorotipos vacinais de indivíduos portadores, interrompendo a cadeia de transmissão do *S. pneumoniae* e assim levando ao efeito indireto de rebanho, ou seja, à eliminação dos sorotipos vacinais na população não vacinada (Bogaert; De Groot; Hermans, 2004).

No Brasil, a vacina pneumocócica PCV7 foi licenciada em 2001 e esteve disponível nos CRIEs para os grupos de risco para DPI, como os imunodeficientes, pessoas com doença cardio-pulmonar grave ou asplenia e em clínicas privadas para crianças a partir dos 2 meses de idade. Em 2010, o Brasil, via Ministério da Saúde, tornou-se o primeiro país a introduzir a PCV10 no Programa Nacional de Imunização (PNI) (Ministério da Saúde, 2015) com a administração da vacina em crianças a partir dos 2 meses de idade, com o esquema vacinal de 3 doses (2, 4 e 6 meses de idade) mais 1 dose reforço até os 12 meses de idade (Andrade et al., 2014). As recomendações para campanha de recuperação (*catch-up*) no momento de introdução da PCV10 foram: para crianças entre 3 e 7 meses 3 doses mais 1 dose reforço; para

crianças com 8 a 9 meses 2 doses mais 1 dose reforço; para aqueles com idade entre 10 e 11 meses 1 dose mais 1 dose reforço e dose única para crianças de 12 a 23 meses de idade (Domingues et al., 2014). Em 2016, o Ministério da Saúde alterou o esquema vacinal da PCV10 para 2 doses (2 e 4 meses) mais 1 dose reforço até os 12 meses de idade (Ministério da Saúde, 2018a). Entre os anos pós-PCV10 (2011-2017) as coberturas vacinais para a PCV10 no Brasil estiveram entre 81,65 e 88,22% (Ministério da Saúde, 2018d).

1.3.2.1 Importância e efeitos do uso das PCVs no controle das infecções pneumocócicas

As PCVs demonstraram ser altamente efetivas contra a DPI e contra a pneumonia adquirida na comunidade (Tregnaghi et al., 2014; Azevedo et al., 2016; Cohen et al., 2017; Savulescu et al., 2017; Wahl et al., 2018). Além disso, o uso rotineiro das PCVs resultou em efeito direto na redução da colonização na nasofaringe pelos sorotipos vacinais na população vacinada (Devine et al., 2015; Cohen et al., 2017).

Alguns anos após a introdução das PCVs na vacinação infantil observou-se uma diminuição de DPI pelos sorotipos vacinais na população não vacinada, fenômeno conhecido como efeito indireto ou efeito rebanho (*herd effect*), decorrente da diminuição da transmissão dos sorotipos vacinais na população em geral (Whitney; Goldblatt; O'Brien, 2014).

Outro efeito importante observado com a utilização das PCVs foi à redução da resistência antimicrobiana em isolados de pneumococo de DPI e de portadores na nasofaringe (Kim et al., 2016; Domínguez-Alegría; Pintado; Barbolla, 2018).

Os estudos de efetividade com a PCV7 e, mais recentemente com a PCV10 e PCV13, contribuíram de forma significativa para o conhecimento do impacto das PCVs na população vacinada, como também em uma população não vacinada (Domingues et al., 2014;

Tregnaghi et al., 2014; Oliveira et al., 2016). O estudo COMPAS (*Clinical Otitis Media and Pneumonia Study*), realizado na Argentina, Colômbia e Panamá, mostrou que a efetividade da vacina PCV10 contra pneumonia comunitária, DPI causada por sorotipos vacinais e DPI de qualquer sorotipo foi de 25,7%, 100% e 65%, respectivamente (Tregnaghi et al., 2014).

Paralelamente, os estudos de efetividade das PCVs mostraram um aumento da colonização e de DPI por sorotipos não incluídos nas vacinas, efeito denominado de substituição de sorotipos (*serotype replacement*) (Hausdorff; Hanage, 2016). Este aumento na diversidade de sorotipos não vacinais como causa de DPI em crianças e adultos após a vacinação tem elevado a preocupação mundial com relação à prevenção da DPI (Balsells et al., 2018; Wang et al., 2018).

Estudos realizados após a introdução da PCVs na rotina de imunização pediátrica mostraram o impacto dessa vacina na redução da morbidade pela DPI, pneumonias e meningites (Madhi, 2015; Alicino et al., 2017). No estudo de impacto da PCV10 no Brasil, Grando et al. (2015) encontraram uma redução de 50% na taxa de incidência e de 69% na mortalidade por meningite pneumocócica em crianças menores de 2 anos.

Corroborando os estudos de efetividade e impacto da PCV10 no Brasil, que mostraram diminuição significativa da DPI associada aos sorotipos vacinais (Domingues et al., 2014; Verani et al., 2015), estudos sobre a distribuição de sorotipos isolados da DPI e de portadores na nasofaringe, realizados no Brasil, também mostraram a diminuição dos sorotipos vacinais no período pós-vacinação (Andrade et al., 2014; Brandileone et al., 2016, 2018).

Paralelamente, após cinco anos da introdução da PCV10, os sorotipos 3, 6C, 8, 12F e 19A têm sido os prevalentes no Brasil como causa de DPI (Brandileone et al., 2018).

Após a introdução da PCV7 em diferentes países, o sorotipo 19A com multirresistência a antimicrobianos foi consistentemente

identificado como o mais frequentemente associado a casos de DPI na infância, levando muitos países a mudarem a vacinação para a formulação PCV13, a qual inclui este sorotipo (Balsells et al., 2017).

O aumento da frequência de isolamento de pneumococos dos sorotipos 6C e 19A é preocupante, uma vez que estes sorotipos podem ser associados à multirresistência antimicrobiana (Gertz et al., 2010; Balsells et al., 2018).

Já o aumento do número de casos no Brasil pelo sorotipo 3 se resalta, pois, globalmente, este sorotipo tem sido associado a altas taxas de mortalidade em adultos com DPI (Horácio et al., 2016). A PCV13 inclui em sua formulação o sorotipo 3, porém os estudos realizados em países que utilizam essa vacina não têm mostrado um efeito satisfatório na redução da DPI por esse sorotipo (Hausdorff; Hanage, 2016).

1.4 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

Desde a introdução da penicilina em meados da década de 1940, o tratamento das doenças pneumocócicas tem se apoiado em sua administração e na utilização de outros antimicrobianos beta-lactâmicos eficazes contra o *S. pneumoniae* (Cornick; Bentley, 2012; Domínguez-Alegría; Pintado; Barbolla, 2018).

Isolados de *S. pneumoniae* com suscetibilidade reduzida aos beta-lactâmicos foram detectados pela primeira vez no final da década de 1960, apenas 20 anos após a introdução do seu uso na clínica terapêutica (Jansen; Anderson, 2018). Em 1939, a resistência à sulfonamida foi relatada em um caso de meningite pneumocócica (Kim et al., 2016). Durante as décadas de 1970 e 1980, os pneumococos multirresistentes, com resistência à penicilina, eritromicina e trimetoprim-sulfametoxazol disseminaram-se em todo o mundo (Domínguez-Alegría; Pintado; Barbolla, 2018). Resistências à tetraciclina e cloranfenicol também passaram a ser identificadas, com

diferentes taxas dependendo da região geográfica e população (Kim et al., 2016). Pneumococo com resistência às cefalosporinas de 3^a geração, antimicrobianos rotineiramente utilizados no tratamento das meningites bacterianas, foram identificadas pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) em meados dos anos 90 (Jansen; Anderson, 2018). Mais recentemente, a resistência a fluoroquinolonas também tem sido documentada, porém em níveis relativamente baixos quando comparados aos dos antimicrobianos acima mencionados (Cornick; Bentley, 2012).

Os métodos e interpretações usados para avaliar a resistência aos antimicrobianos em *S. pneumoniae* foram estabelecidos por normas e diretrizes definidas por comitês, como o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2015a, 2015b) e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (EUCAST, 2018). Para alguns antimicrobianos, como a penicilina, a definição da resistência é mais complexa e os pontos de corte são determinados pela combinação das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas associadas ao desfecho do uso do antimicrobiano no paciente, levando, muitas vezes, a diferentes pontos de corte relacionados principalmente ao sítio da infecção. Estes diferentes pontos de corte para penicilina em *S. pneumoniae* permitem aos clínicos definirem o uso de penicilina no lugar dos antimicrobianos de amplo espectro para tratar as infecções pneumocócicas não-meníngeas (Cornick; Bentley, 2012; Kim et al., 2016).

O mecanismo clássico de resistência à penicilina e aos outros beta-lactâmicos está relacionado à modificação das proteínas ligantes de penicilina (*penicilin binding proteins*, PBPs), enzimas envolvidas no passo final da síntese da parede bacteriana. O modo de ação dos beta-lactâmicos se dá pela sua ligação às PBPs prejudicando a síntese do peptidoglicano e a integridade da parede bacteriana, levando a inibição do crescimento ou lise da bactéria. *S. pneumoniae* possui seis PBPs: 1a, 1b, 2x, 2a, 2b e 3. A resistência aos beta-lactâmicos está associada

ao desenvolvimento de mosaico nos genes *pbp* que passam a codificar PBPs com afinidade reduzida por esses antimicrobianos (Cornick; Bentley, 2012). Um baixo nível de resistência aos beta-lactâmicos é observado quando existem alterações nas PBP2x e PBP2b conferindo resistência primária. Alterações na PBP1a em combinação com uma ou ambas das alterações nas PBPs primárias, acarretam níveis mais elevados de resistência (Kim et al., 2016).

Os macrolídeos atuam bloqueando a síntese proteica por meio de sua ligação na unidade 23S do ribossomo, interrompendo o alongamento da cadeia peptídica. A resistência aos macrolídeos se caracteriza por ser de baixo grau, quando associada a bomba de efluxo, codificada pelo gene *mef*, que elimina o antimicrobiano da célula bacteriana, ou de alto grau, codificada pelo gene *erm*, quando há uma alteração relacionada a RNA metilase que altera o alvo do antimicrobiano no ribossomo (Schroeder; Stephens, 2016).

Em *S. pneumoniae*, a resistência ao cloranfenicol é devida à inativação enzimática do antimicrobiano pela produção da enzima cloranfenicol acetiltransferase, codificada pelo gene *cat*. A resistência ao trimetoprim é resultado de uma única substituição de aminoácidos na proteína di-hidrofolato redutase, codificada pelo gene *folA*; mutações adicionais foram relatadas e podem afetar a afinidade da proteína di-hidrofolato redutase por seus substratos naturais e, assim, elevar os níveis de resistência. A resistência às sulfonamidas é mais frequentemente associada a mutações ligadas ao gene *folP* que codifica a di-hidropteroato sintase (Kim et al., 2016).

S. pneumoniae é conhecido por ser um micro-organismo naturalmente transformável, ou seja, possui uma competência natural para transferir horizontalmente genes para o seu cromossomo. Esta habilidade pode ser observada, por exemplo, na transferência dos genes que conferem resistência aos antimicrobianos e também na sua capacidade de trocar os genes capsulares com outros pneumococos (Cornick; Bentley, 2012; Kim et al., 2016; Schroeder; Stephens, 2016).

O desenvolvimento da resistência antimicrobiana, além de dificultar o tratamento da DPI, podendo elevar a taxa de mortalidade, resulta em custos adicionais relacionados à administração de diferentes antimicrobianos, ao aumento nas hospitalizações e à escolha inadequada do antimicrobiano, elevando o risco de falha terapêutica e seleção de micro-organismos resistentes devido a não eliminação das bactérias. Portanto, a determinação da suscetibilidade antimicrobiana é essencial para monitorar os perfis de resistência aos diferentes antimicrobianos visando a melhor terapia antimicrobiana (Johnson, 2015).

A introdução e utilização das PCVs resultaram em um efeito significativo no controle da resistência aos antimicrobianos (Domínguez-Alegría; Pintado; Barbolla, 2018), pois em suas formulações estão incluídos cinco dos sorotipos associados à multirresistência (6B, 9V, 14, 19F e 23F) (Cornick; Bentley, 2012).

1.5 Caracterização molecular de *Streptococcus pneumoniae*

A caracterização molecular dos micro-organismos permite estabelecer investigação sistemática de como sua variação genômica pode afetar uma doença, possibilitando compreender a rede de transmissão desta doença e a estrutura populacional do patógeno. Estas informações podem auxiliar no desenvolvimento e implementação de vacinas (Rodrigues; Maiden, 2018).

Para o pneumococo, juntamente com a substituição de sorotipos ou *replacement*, a simples expansão de clones preexistentes à vacinação ou ainda, o *switch* capsular, podem ser consideradas como possíveis explicações para o aumento da frequência dos sorotipos não-vacinais.

O *switch* capsular ou troca capsular ocorre quando genes que codificam um tipo capsular são trocados, via processo genético de transformação ou recombinação, por genes que codificam outro tipo de

cápsula. Este mecanismo de troca permite que linhagens genéticas ou clones geralmente associados com sorotipos vacinais persistam mesmo após a introdução das PCVs, mantendo sua bagagem genética, porém expressando outro sorotipo capsular (Wyres et al., 2013; Rayner et al., 2015), levando ao escape vacinal.

Estudos realizados no Brasil sobre a caracterização genética das cepas de pneumococo do sorotipo 19A indicaram uma rápida expansão da sequência-tipo pandêmica multirresistente 320 (ST320) nos anos seguintes à vacinação (Caierão et al., 2014; Almeida et al., 2016; Azevedo et al., 2016; Almeida et al., 2018). Esse achado é preocupante, pois a ST320 foi responsável pelo aumento do sorotipo 19A como causa de DPI após cinco anos de introdução da PCV7 nos EUA (Moore et al., 2008), assim como em outros países (Van der Linden et al., 2015; Potin et al., 2016; Balsells et al., 2017; Savulescu et al., 2017).

Semelhantemente ao observado para o sorotipo 19A, a emergência gradual do 6C ao longo de três a quatro anos pós-vacinação, seja em DPI ou em portadores de nasofaringe, tem sido detectada no Brasil e em outros países (Millar et al., 2010; Grando et al., 2015; Porat et al., 2016; Brandileone et al., 2016, 2018). Isolados do sorotipo 6C também são associados à multirresistência, porém possuem alto grau de diversidade genética (Almeida et al., 2016; Diamantino-Miranda et al., 2017; Almeida et al., 2018; Neves et al., 2018).

O sorotipo 3 apresenta uma tendência clonal associada ao complexo clonal CC180 e, embora raras, cepas do sorotipo 3 resistentes a vários antimicrobianos (tetraciclina, cloranfenicol e a macrolídeos) têm sido identificadas em outros países (Azarian et al., 2018).

O *Multilocus Sequence Typing* (MLST) é uma das metodologias de caracterização molecular que permitiram a detecção e reconhecimento de clones epidêmicos bem sucedidos de bactérias

resistentes (Johnson, 2015), tais como os descritos pelo *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network* (PMEN), criado em 1997, com o objetivo de unificar a nomenclatura e a classificação de clones de *S. pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos em todo o mundo. Entretanto, clones suscetíveis aos antimicrobianos internacionalmente distribuídos também foram incluídos no PMEN. Atualmente são descritos 43 clones com a seguinte nomenclatura: país que primeiro identificou a linhagem seguido do sorotipo da linhagem em sobrescrito e da numeração sequencial atribuída pela rede, por exemplo, Espanha^{23F}-1. Várias publicações mostraram que membros de um único clone podem expressar diferentes polissacarídeos capsulares em decorrência do *switch* capsular, passando a incorporar esta variação de sorotipo em sua nomenclatura, como por exemplo, Espanha^{23F}-1-19F (PMEN, 2014).

O MLST, método de genotipagem desenvolvido por Enright e Spratt (1998), é o mais amplamente utilizado para caracterizar *S. pneumoniae*. Consiste das etapas da PCR, purificação do DNA amplificado, sequenciamento e análise das sequências de sete genes constitutivos necessários para a manutenção das funções celulares básicas (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* e *ddl*) do *S. pneumoniae* (Enright; Spratt, 1998; Rayner et al., 2015).

Estes sete genes são considerados estáveis e menos propensos a recombinação do que os de outras regiões do genoma do *S. pneumoniae* (Rodrigues; Maiden, 2018). Estes genes, também chamados de alelos, recebem um número quando sua sequência é comparada com um banco de dados internacional. A combinação dos números atribuídos às sequências de cada um dos sete alelos gera uma nova numeração intitulada sequência-tipo (ST) (MLST, 2018). As STs podem ser agrupadas por semelhança de cinco ou seis alelos, formando o complexo clonal (CC). O fundador primário (*predicted founder*) do CC é a ST que possui o maior número de variante de locus único quando comparada às outras STs do grupo (eBurst, 2018).

O MLST tem a capacidade de produzir resultados não ambíguos, passíveis de análise entre diferentes laboratórios, fornece boa resolução e poder discriminatório que pode ser usado em estudos de epidemiologia local e global (Rodrigues; Maiden, 2018).

Com o avanço da tecnologia de sequenciamento de nova geração (*New Generation Sequence*, NGS), vários protocolos que combinam o MLST com NGS foram publicados (Boers; Van der Reijden; Jansen, 2012; Rayner et al., 2015).

Avanços no sequenciamento e na bioinformática estão permitindo que coleções cada vez maiores de pneumococos sejam sequenciadas, possibilitando uma análise global de alta resolução da epidemiologia pneumocócica nos períodos pré e pós-vacinação. Estes avanços permitem uma melhor descrição não só do sorotipo e genótipo, mas também uma descrição detalhada das proteínas de superfície e suas variantes alélicas, que fornecem informação para o desenvolvimento de novas vacinas pneumocócicas (Jauneikaite et al., 2015).

Neste contexto foi criado o projeto *Global Pneumococcal Sequencing* (GPS), que engloba vários países, a citar, África do Sul, países da África Ocidental, Gâmbia e Malawi. Este estudo colaborativo tem como objetivo examinar o efeito da implantação das PCVs nas cepas de pneumococos que evadem da ação da vacina, por meio da comparação de sequências genômicas completas da espécie antes e após a introdução da vacinação. O GPS é considerado um dos maiores projetos de sequenciamento de um patógeno humano já desenvolvido e proverá dados valiosos do repertório de genes responsáveis pelo escape à vacinação ou pela resistência aos antimicrobianos (GPS, 2016).

Em reconhecimento ao seu papel de laboratório de saúde pública do Estado de São Paulo e como laboratório de referência nacional para as meningites bacterianas e infecções pneumocócicas pelo Ministério da Saúde, que dentre suas atribuições oferece o

suporte técnico-científico e efetiva cooperação à vigilância epidemiológica no planejamento de ações para prevenção, controle e eliminação de doenças e agravos, o IAL, Centro de Bacteriologia, Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas (NMPI) participa deste importante projeto GPS desde 2016.

1.6 Justificativa do estudo

O desenvolvimento das PCVs resultou em um enorme ganho para a saúde pública na prevenção da DPI. Entretanto, o uso dessas vacinas na imunização de rotina das crianças, resultou em uma mudança na epidemiologia dos sorotipos que causam DPI, isto é, redução dos sorotipos vacinais e um aumento da frequência dos sorotipos não vacinais, sendo alguns destes associados à multirresistência. Esse novo cenário necessita ser continuamente investigado para se avaliar o uso rotineiro da PCV10, seja em crianças alvo da vacina ou para avaliar o efeito rebanho na população não alvo da vacina. Visto que alguns sorotipos de pneumococo estão associados às flutuações ao longo do tempo, há a necessidade de um monitoramento em um período longo após a introdução das PCVs para se observar a sustentabilidade da prevalência desses sorotipos após vacinação.

Questões que englobam a proteção cruzada de sorotipos vacinais contra sorotipos não incluídos nas PCVs permanecem em aberto. Adicionalmente, em consequência da grande diversidade de sorotipos e a emergência de novos sorotipos, novas vacinas conjugadas de pneumococo com maior valência de sorotipos estão em desenvolvimento. Portanto, há a necessidade de se avaliar um grande número de isolados provenientes de diferentes regiões do Brasil, visando o delineamento de um cenário nacional. O IAL como laboratório de referência para as meningites e infecções pneumocócicas é ponto focal técnico da rede nacional de vigilância do

pneumococo pelo Ministério da Saúde, recebendo isolados dos Laboratórios Centrais Estaduais (LACENs), localizados nos diferentes estados brasileiros e Distrito Federal.

Estudo focando a distribuição de sorotipos no Brasil, utilizando os dados parciais obtidos da vigilância laboratorial passiva do IAL, mostra a grande diversidade de sorotipos de pneumococo identificados no período pós-vacinal (Brandileone et al., 2018). Estudos sobre perfil de resistência aos antimicrobianos e sobre a caracterização molecular dos isolados no Brasil são fundamentais para o entendimento do efeito da PCV10 nos processos de disseminação de linhagens genéticas, da pressão vacinal e do uso de antimicrobianos.

Portanto, nos propusemos a investigar o efeito da PCV10 nas características fenotípicas e moleculares de isolados invasivos de pneumococo em um período de tempo mais longo (2010-2017) após a introdução da PCV10 no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as características fenotípicas e moleculares de cepas de *S. pneumoniae* isoladas de doença pneumocócica invasiva nos períodos pré-PCV10 (2005-2009) e pós-PCV10 (2010-2017).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a distribuição dos sorotipos vacinais que constituem a PCV10 e a PCV13, e dos sorotipos não-vacinais, por diagnóstico clínico e faixa etária;**
- Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos;**
- Determinar linhagens genéticas de uma amostragem dos isolados associada aos sorotipos prevalentes nos períodos estudados.**

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem

O IAL em São Paulo é o laboratório de referência nacional para meningites e infecções pneumocócicas, e como tal, recebe isolados de *S. pneumoniae* provenientes de quadros de DPI isolados nas diferentes regiões do país e encaminhados por 25 LACENs (com exceção dos LACENs de Rondônia e Roraima), pelos Centros de Laboratórios Regionais do IAL no Estado de São Paulo, e laboratórios públicos e privados da região metropolitana de São Paulo. Os isolados são enviados ao NMPI do Centro de Bacteriologia do IAL pelo sistema de vigilância laboratorial passiva vinculado à Coordenação Geral de Laboratórios (CGLab), Ministério da Saúde, para a confirmação da identificação fenotípica, realização da sorotipagem, testes de suscetibilidade antimicrobiana e estudos moleculares.

Neste estudo, DPI foi definida como os casos nos quais houve o isolamento do *S. pneumoniae* por cultura a partir de um sítio normalmente estéril.

O levantamento dos dados para determinação da distribuição dos sorotipos e perfil de suscetibilidade foi realizado em fevereiro 2018, a partir de banco de dados de *Streptococcus pneumoniae* recebidos no NMPI do IAL, onde são registrados os resultados laboratoriais de identificação e perfil de suscetibilidade realizados pelo IAL e os dados demográficos, epidemiológicos e clínicos dos pacientes encaminhados pelas instituições de origem dos isolados.

Somente um isolado de *S. pneumoniae* de cada paciente com diagnóstico de DPI foi incluído na análise. Diferentes sorotipos isolados de mesmo paciente com intervalo superior a 30 dias foram considerados como episódios distintos de DPI e, portanto, foram incluídos no estudo.

Os isolados em que a fonte de isolamento foi sangue, porém não dispúnhamos de informação do diagnóstico clínico foram considerados como origem invasiva e contabilizados dentro do diagnóstico clínico bacteriemia/sepsis.

De janeiro de 2005 a dezembro de 2017, o IAL recebeu 11.492 isolados de *S. pneumoniae* de pacientes com quadros clínicos de DPI. Deste total foram excluídos do estudo 201 (1,7%) isolados devido à ausência de identificação de sorotipo e 155 (1,3%) isolados com perfil de resistência incompleto. Desta forma, permaneceram no estudo 11.136 isolados de *S. pneumoniae*. Os isolados foram agrupados em três diferentes períodos de análise: 4.077 (36,6%) isolados no período pré-PCV10 (2005 a 2009), 3.789 (34,0%) isolados no período pós-PCV10- imediato (2010 a 2013) e 3.270 (29,4%) isolados no período pós-PCV10- tardio (2014 a 2017), em relação à introdução da PCV10 no PNI.

A tabela 1 apresenta a distribuição dos isolados incluídos no estudo de acordo com o ano de isolamento e o período vacinal. Em 11.032 (99,1%) isolados foi possível se obter o sexo do paciente, sendo 6.718 (60,3%) pertencentes ao sexo masculino.

Para o estudo de caracterização molecular foi selecionada uma amostragem de conveniência de 688 isolados de *S. pneumoniae* recebidas entre os anos de 2005 e 2015. Isolados recebidos no ano 2010 foram excluídos desta seleção por este ser o ano de introdução da PCV10 no Brasil. Os isolados foram selecionados por sorteio, considerando em torno de 10% do número total de isolados pertencentes aos sorotipos presentes na vacina PCV10 (sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F ou 23F; 2), sorotipos presentes exclusivamente a vacina PCV13, (sorotipos 3, 6A e 19A) e sorotipos prevalentes não incluídos na PCV10 e na PCV13 (sorotipos 6C, 8 e 12F). Os isolados foram agrupados por período de estudo: 350 isolados do período pré-PCV10 (2005 a 2009) e 338 isolados no período pós-PCV10 (2011 a 2015) (Tabela 2).

Tabela 1 - Distribuição dos isolados de *Streptococcus pneumoniae*, por ano de isolamento e por período de estudo

Período de estudo/ano	Pré-PCV10 (n=4.077)					Pós-PCV10-imediato (n=3.789)				Pós-PCV10-tardio (n=3.270)				Total
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	
Número de isolados	768	899	824	872	714	816	938	998	1037	863	840	820	747	11.136

Tabela 2 – Distribuição dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* caracterizadas molecularmente pela metodologia de MLST por período vacinal

Sorotipo	Pré-PCV10 (2005-2009)		Pós-PCV10 (2011-2015)	
	molecular/total	% molecular	molecular/total	% molecular
PCV10	266/2456	10,8%	156/1400	11,1%
1	11/97	11,3%	4/33	12,1%
4	14/138	10,1%	20/197	10,2%
5	10/98	10,2%	16/167	9,6%
6B	40/350	11,4%	24/144	16,7%
7F	16/99	16,2%	18/192	9,4%
9V	14/138	10,1%	10/88	11,4%
14	88/859	10,2%	28/202	13,9%
18C	20/171	11,7%	8/83	9,6%
19F	26/248	10,5%	12/134	9,0%
23F	27/258	10,5%	16/160	10,0%
PCV13	58/498	11,6%	107/964	11,1%
3	24/245	9,8%	49/478	10,3%
6A	19/135	14,1%	25/159	15,7%
19A	15/118	12,7%	33/327	10,1%
SNV	26/245	10,6%	75/744	10,1%
6C	6/54	11,1%	24/219	11,0%
8	4/42	9,5%	20/216	9,3%
12F	16/149	10,7%	31/309	10,0%
Total	350/3199	10,9%	338/3108	10,9%

3.2 Identificação bacteriana e sorotipagem do *Streptococcus pneumoniae*

A identificação bacteriana foi realizada de acordo com recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011). Foram analisadas as características morfo-tintoriais pela coloração de Gram; presença de diplococos Gram positivos; aspecto da colônia; presença de alfa-hemólise em placa de agar 5% sangue de carneiro; prova da catalase negativa; presença de halo ≥ 14 mm na prova optoquina (disco 5 μ g) (Oxoid, Reino Unido) e teste bile solubilidade em desoxicolato de sódio a 10% (Sigma, EUA) (Anexo 1).

A determinação dos sorotipos foi realizada pela reação de Quellung, que é uma reação antígeno-anticorpo visualizada em microscopia ótica, empregando-se uma bateria de antissoros produzidos em coelhos pelo *Staten Serum Institute*, Copenhagen, Dinamarca (SSI, 2018). Uma reação positiva ocorre quando um anticorpo específico para o sorogrupo/sorotipo se liga à cápsula do pneumococo, levando a uma mudança no seu índice de refração, o que torna a cápsula mais intumescida e mais visível ao microscópio.

3.3 Testes de suscetibilidade antimicrobiana

Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados seguindo os procedimentos e critérios de controle de qualidade determinados pelo CLSI (CLSI, 2015a, 2015b, 2017).

Os isolados de *S. pneumoniae* foram testados por disco-difusão para os antimicrobianos: oxacilina (1 μ g), cloranfenicol (30 μ g), eritromicina (15 μ g), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 μ g) e vancomicina (30 μ g), (Oxoid, Reino Unido) (Anexo 2). Halos de inibição para oxacilina ≥ 20 mm foram consideradas suscetíveis à penicilina e ceftriaxona (Anexo 3). Isolados com resultados de halos de inibição para oxacilina ≤ 19 mm foram submetidas à determinação da

concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição, realizado em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (Difco, EUA) acrescido de 3% de sangue lisado de cavalo para os antimicrobianos: penicilina (PEN), ceftriaxona (CEF), cloranfenicol (CLO), eritromicina (ERI), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) e vancomicina (VAN) (Sigma, Alemanha). Na determinação da CIM foi utilizada a cepa padrão de *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 como controle de qualidade interno do teste (Anexo 4).

Os resultados dos testes de suscetibilidade antimicrobiana pelo método de disco-difusão e determinação da CIM foram sobrepostos para descrição do perfil de suscetibilidade de cada isolado estudado para cada um dos antimicrobianos testados.

Os isolados resistentes ou com resistência intermediária a no mínimo três classes dos antimicrobianos (CLSI, 2017) foram considerados multirresistentes (Magiorakos et al., 2012; Kim et al., 2016).

3.4 Caracterização molecular

A caracterização molecular dos isolados de pneumococo (n=688) foi realizada pelo MLST seguindo duas metodologias, a citar: sequenciamento Sanger, realizada no NMPI do IAL (n=366) conforme metodologia descrita abaixo, e sequenciamento total do genoma (wgMLST) realizado através do projeto colaborativo GPS (GPS, 2016), executado em parceria com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), EUA e o Instituto Sanger, Reino Unido (n=322).

Os sete genes constitutivos utilizados para a determinação dos perfis genéticos foram: *shikimate dehydrogenase* (*aroE*), *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (*gdh*), *glucose kinase* (*gki*), *transketolase* (*recP*), *signal peptidase I* (*spi*), *xanthine phosphoribosyltransferase* (*xpt*) e *D-alanine-D-alanine ligase* (*ddl*) (MLST, 2018) (Anexo 5).

3.4.1 Crescimento bacteriano

Os 688 isolados de *S. pneumoniae* selecionados para a realização da caracterização molecular foram crescidos em caldo Todd-Hewitt (Difco, EUA), em seguida semeados em placa de agar 5% sangue de carneiro e incubados por 24-48h a 37°C em estufa com 5% de tensão de CO₂. Uma colônia de *S. pneumoniae* foi transferida para uma nova placa de agar 5% sangue de carneiro para obtenção de massa bacteriana, e incubada por 16-18h a 37°C em estufa com 5% de tensão de CO₂.

3.4.2 Metodologia MLST por sequenciamento Sanger

A metodologia de determinação de MLST por sequenciamento Sanger, utilizada em 366 isolados, foi descrita por Enright e Spratt (Enright; Spratt, 1998) e realizada no NMPI de acordo com as etapas descritas a seguir:

3.4.2.1 Extração do DNA

Foram preparadas suspensões bacterianas em 300 µL de solução fisiológica 0,85% a partir de crescimento bacteriano obtido conforme descrito anteriormente. As suspensões foram aquecidas a 70°C/15 minutos em banho-seco e depois centrifugadas a 4000 rpm/2 minutos. O sobrenadante de cada suspensão bacteriana foi desprezado e o sedimento ressuspenso em tampão TE pH 7,5 (Tris-base 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0). Adicionou-se 10 µL de mutanolisina 3000U/µL (Sigma Aldrich, Alemanha) e 8 µL de hialuronidase 30mg/mL (Sigma Aldrich, Alemanha) seguido de incubação em banho-maria a

37°C/30 minutos até 18 horas, verificando-se continuamente a ocorrência de alteração de turbidez indicando o rompimento das células bacterianas e liberação do DNA. Em seguida, o material foi aquecido em banho-seco a 100°C/10 minutos e centrifugado a 12000 rpm/4 minutos. O DNA extraído foi armazenado em freezer -20°C até o momento de uso (CDC/NCIRD/DBD, 2009).

3.4.2.2 Amplificação dos genes alvo

A reação de amplificação do DNA foi realizada para cada um dos sete genes constitutivos descritos na página da web do MLST (MLST, 2018), e os iniciadores utilizados encontram-se descritos no Anexo 5.

Cada reação com volume final de 25 µL foi constituída de: 8,5 µL de água ultra-pura (ThermoFischer Scientific, EUA), 12,5 µL de uma solução para PCR 2x concentrada (ThermoFischer Scientific, EUA), 0,75 µL de cada iniciador a 20 µM (*forward* e *reverse*) e 2,5 µL de DNA do isolado estudado. A solução para PCR 2x concentrada teve em sua composição: tampão de reação com 4 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,05U/µL de enzima Taq DNA polimerase.

A reação da PCR foi realizada em termociclador (Veriti, Applied Biosystems), seguindo a programação: 1 ciclo de 94°C/1 minuto; 30 ciclos de 94°C/15 segundos, 54°C/30 segundos e 72°C/45 segundos; 1 ciclo de 72°C/10 minutos e manutenção a 4°C até armazenamento a -20°C.

Os fragmentos de DNA amplificados pela PCR para cada um dos sete genes estudados foram visualizados em gel de agarose a 1% (Sigma, Alemanha) acrescido de 0,03 µg/mL de brometo de etídio (Fluka, Alemanha) em tampão Tris-Borato 0,5X (Tris-base 0,89; Ácido Bórico 0,89 M; EDTA 0,25 M pH 8,0; água destilada) sob tensão de corrente elétrica de 100 volts por 1 hora. Após a corrida eletroforética,

as bandas foram visualizadas em transiluminador com luz ultravioleta (DNR Bio-Imaging Systems, Israel), para observação do produto final e da qualidade da reação da PCR.

3.4.2.3 Purificações dos produtos da amplificação dos genes alvo

Os fragmentos de DNA resultantes das PCRs de amplificação foram purificados com o reagente *ExoSAP-IT*TM (Affymetrix, USB Products, EUA) em uma proporção de 5 µL do produto amplificado para 2 µL da *ExoSAP-IT*TM. A purificação foi realizada em termociclador (Veriti, Applied Biosystems), seguindo a programação: 1 ciclo de 37°C/15 minutos para a degradação dos resíduos e nucleotídeos, seguido de 1 ciclo de 80°C/15 minutos para a inativação do reagente. O DNA purificado foi utilizado para as reações de amplificação do sequenciamento.

3.4.2.4 Reações de amplificação do Sequenciamento Sanger

Os DNAs dos sete genes constitutivos amplificados e purificados foram processados para as reações de amplificação de sequenciamento.

Nestas reações foram utilizados os mesmos sete pares de iniciadores utilizados para amplificação dos genes alvo para MLST por PCR (Anexo 5) e reagente contendo desoxinucleotídeos modificados para o sequenciamento dos genes amplificados.

Para cada reação de amplificação do sequenciamento com volume final de 5 µL foi utilizado: 0,88 µL de água ultra-pura (ThermoFischer Scientific, EUA), 0,88 µL de tampão *Big Dye*TM (Applied Biosystems, EUA), 0,25 µL de *Big Dye*TM Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA), 2 µL de iniciador 0,67 µL (*forward* ou *reverse*) e 1 µL do DNA amplificado e purificado de cada isolado. Para

cada gene estudado foram utilizadas duas reações distintas, uma somente com o iniciador *forward* e outra somente com o iniciador *reverse*. As condições de ciclagem no termociclador (Veriti, Applied Biosystems) foram: 1 ciclo de 96°C/1 minuto; 25 ciclos de 96°C/10 segundos, 55°C/5 segundos e 60°C/4 minutos; 1 ciclo de 4°C/7 minutos. O produto resultante da reação de sequenciamento foi armazenado a 4°C até o momento do uso.

3.4.2.5 Purificações dos produtos das reações de amplificação para o sequenciamento e reações de sequenciamento

Os produtos das reações de amplificação do sequenciamento foram purificados utilizando acetato de sódio (Sigma, Alemanha) e etanol (Sigma, Alemanha).

Para a purificação de cada produto foram adicionados 15 µL de água destilada estéril e 52 µL de solução contendo etanol/acetato de sódio (etanol 95%; 0,12 M acetato de sódio) seguindo de uma centrifugação a 500 g/1 minuto a 4°C e incubação a temperatura ambiente/15 minutos em ambiente escuro. Posteriormente, os produtos foram centrifugados a 2750 g/1 hora a 4°C, sendo o sobrenadante retirado por inversão, e o excedente retirado pela centrifugação invertida das amostras a 500 g/1 minuto a 4°C. Em cada reação foram adicionados 150 µL de etanol a 70%, seguido de centrifugação a 2750 g/10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado por inversão e o volume residual foi retirado pela centrifugação por inversão a 500 g/1 minuto a 4°C, seguida de incubação a temperatura ambiente/15 minutos em ambiente escuro. Os produtos finais das reações de sequenciamento purificados foram armazenados a -20°C em ambiente escuro até o momento de entrada no equipamento para conclusão do sequenciamento realizado em equipamento analisador genético 3130xl (Applied Biosystems, EUA).

3.4.3 Metodologia de MLST por sequenciamento total do genoma (wgMLST)

O sequenciamento total do genoma, realizado pelo Instituto Sanger, Reino Unido, utilizou tecnologia de sequenciamento de nova geração e faz parte do projeto GPS (GPS, 2016).

Os 322 isolados de *S. pneumoniae* foram encaminhados ao CDC, EUA, que realizou as extrações e quantificações dos DNAs bacterianos de acordo com metodologias pré-estabelecidas no projeto GPS. Os DNAs bacterianos foram então encaminhados ao Instituto Sanger.

No Instituto Sanger, o sequenciamento *paired end* foi realizado em equipamento Illumina HiSeq (Illumina, EUA), utilizando a construção da biblioteca genômica pela tecnologia Truseq[®] (Illumina, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Ao final do processo foram obtidos fragmentos de 150 pares de bases para todos os isolados estudados.

3.5 Análise de dados

A análise de distribuição dos sorotipos considerou os sorotipos incluídos na vacina PCV10 e os sorotipos não incluídos na PCV10 (não-PCV10). Os sorotipos não-PCV10 foram subdivididos em dois grupos: os sorotipos adicionais da PCV13 (3, 6C e 19A) e outros sorotipos não-vacinais (SNV, sorotipos não incluídos nas vacinas PCV10 ou PCV13). Os isolados não-tipáveis (NT) foram considerados como SNV.

A distribuição dos sorotipos PCV10, PCV13 e SNV, e o perfil de suscetibilidade antimicrobiana foram analisados por diagnóstico clínico de meningites e diagnóstico invasivo denominado neste estudo como não-meningite (abscessos, ascite, bacteriemia, sepse, endocardite e pneumonia), e pelos grupos etários <2 meses (m), 2m-4 anos (a), 5-9a, 10-49a, 50-64a e $\geq 65a$ nos três períodos determinados

para o estudo (pré-PCV10, pós-PCV10-imediato e pós-PCV10-tardio). Indivíduos nos grupos etários 2m-4a com isolados pertencentes ao período pós-PCV10 e no grupo 5-9a com isolados no período pós-PCV10-tardio foram considerados população alvo da vacinação, pois a vacina PCV10 foi introduzida em 2010.

Mudanças na frequência dos sorotipos e nas taxas de resistência aos antimicrobianos nos períodos pós-PCV10-imediato e pós-PCV10-tardio foram calculadas utilizando o período pré-PCV10 como referência. Diferenças nas porcentagens de frequência de sorotipos e nas taxas de resistência aos antimicrobianos entre os períodos pré e pós-PCV10 foram calculadas pela fórmula de variação percentual ou porcentagem de *change* (%*change*):

$$\%change = \frac{(\% \text{ Pós-PCV10} - \% \text{ Pré-PCV10})}{\% \text{ Pré-PCV10}} * 100$$

Valores de %*change* positivos expressaram aumento na frequência dos sorotipos ou na suscetibilidade/resistência no período pós-PCV10 e valores de %*change* negativos expressaram redução na frequência dos sorotipos ou na suscetibilidade/resistência no período pós-vacinação.

3.6 Análise das sequências gênicas para caracterização molecular das amostras estudadas

3.6.1 Análise das sequências gênicas obtidas pela metodologia de MLST por Sequenciamento Sanger

A análise das sequências gênicas foi realizada no programa SeqMan (DNASar Lasergene, EUA), seguida de comparação com as

sequências descritas na página da web do MLST para *S. pneumoniae* (MLST, 2018). As sequências correspondentes a cada alelo receberam um número, e a combinação dos sete alelos definiu a sequência-tipo (ST). Novas sequências gênicas ou STs foram submetidas à curadoria da página eletrônica para avaliação, definição do número de alelo ou ST e depósito no banco de sequências internacional de MLST para *S. pneumoniae*.

3.6.2 Análise das sequências gênicas obtidas pela metodologia de wgMLST

No Instituto Sanger, os dados brutos gerados (extensão .fastq), correspondentes as sequências gênicas, foram analisados quanto à qualidade em programa FastQC (FastQC, 2018). As leituras foram concatenadas (*de novo assembly*) e anotadas de acordo com Parkhill et al., 2016. Os resultados das análises foram utilizados para determinação de wgMLST após aprovação dos critérios de controle de qualidade do projeto GPS. Os critérios adotados foram: número de *contigs* menor que 500; profundidade de cobertura de mais de 20; mapeamento dos fragmentos gerados maior que 60% com a cepa de *S. pneumoniae* ATCC[®] 700669; e após o *assembly*, comprimento do genoma entre 1.8 e 2.2 Mb. A análise do wgMLST foi realizada seguindo o algoritmo *mlst_check* proposto por Page et al, 2016. Os dados de wgMLST foram então encaminhados ao IAL.

3.6.3 Análises das sequências-tipo e complexos clonais no programa eBURST

A identificação do complexo clonal (CC) foi realizada com dados obtidos no dia 28.05.2018 pelo programa eBURST (eBURST, 2018). As STs que compartilharam cinco alelos idênticos com pelo

menos um membro do grupo foram classificadas como pertencentes ao mesmo CC.

A denominação do CC foi atribuída pelo fundador primário (*predicted founder*), definido como a ST que possui o maior número de variante de um único gene (locus único) quando comparada às outras STs do grupo. Em alguns casos, a identificação do fundador primário não foi possível, portanto estes agrupamentos receberam a denominação de todas as STs pertencentes a cada um dos grupos, como por exemplo, CC53-12574. Já as STs que não possuem similaridade de cinco alelos com nenhuma ST pertencente ao estudo receberam a denominação de *Singletons*.

3.6.4 Análises das sequências-tipo e complexos clonais no programa Bionumerics v7.6

As comparações entre as diferentes STs e CCs caracterizadas neste estudo foram realizadas no programa Bionumerics versão 7.6 (Applied Maths, Bélgica) através da *Minimum Spanning Tree*. O diâmetro dos círculos foi vinculado à quantidade de isolados pertencentes ao CC e a espessura ou intensidade das linhas foi relacionada à quantidade de alelos diferentes entre os CC analisados.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos isolados estudados

As tabelas 3 e 4 mostram a distribuição do número de isolados de acordo com o diagnóstico clínico e espécime clínico de isolamento, respectivamente. Um total de 5.462 (49,0%) isolados foram provenientes do diagnóstico não-meningite e 5.674 (51,0%) de pacientes com meningite. Foi observado que no período pré-PVC10, o diagnóstico mais frequente foi meningite (63,2%) com maior fonte de isolamento do líquido (58%); no período pós-PCV10-tardio, o diagnóstico clínico não-meningite foi o mais frequente (61,8%), com um maior número de isolados de bacteriemia/sepsis (47,6%) e pneumonia (13,1%), sendo o sangue o principal espécime clínico de isolamento.

No decorrer dos períodos estudados houve um declínio no número de isolados de crianças com idade entre 2m-4a e 5-9a, e aumento nos isolados de adultos com idade ≥ 50 anos (Tabela 5).

Tabela 3 - Distribuição do número de isolados de *Streptococcus pneumoniae* por diagnóstico clínico e período de estudo

Diagnóstico clínico	Pré-PCV10 (2005-2009)		Pós-PCV10-imediato (2010-2013)		Pós-PCV10-tardio (2014-2017)		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Não-meningite	1.501	36,8	1.939	51,2	2.022	61,8	5.462	49,0
Abscessos	17	0,4	31	0,8	8	0,2	56	0,5
Ascite	13	0,3	27	0,7	26	0,8	66	0,6
Bacteriemia/Sepse	721	17,7	1.236	32,6	1.557	47,6	3.514	31,6
Endocardite	0	-	1	0,03	4	0,1	5	0,04
Pneumonia	750	18,4	644	17,0	427	13,1	1.821	16,4
Meningite	2.576	63,2	1.850	48,8	1.248	38,2	5.674	51,0
Total	4.077	-	3.789	-	3.270	-	11.136	-

Tabela 4 - Distribuição do número de isolados de *Streptococcus pneumoniae* por espécime clínico de isolamento e período de estudo

Espécime Clínico	Pré-PCV10 (2005-2009)		Pós-PCV10-imediato (2010-2013)		Pós-PCV10-tardio (2014-2017)		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Fluído estéril	34	0,8	56	1,5	31	0,9	121	1,1
Lavado bronco-alveolar	25	0,6	9	0,2	19	0,6	53	0,5
Líquor	2.366	58,0	1.545	40,8	1.111	34	5.022	45,1
Líquido pleural	195	4,8	150	4,0	97	3	442	4,0
Sangue	1.457	35,7	2.029	53,5	2.012	61,5	5.498	49,4
Total	4.077	-	3.789	-	3.270	-	11.136	-

Tabela 5 - Distribuição do número de isolados de *Streptococcus pneumoniae* por faixa etária e período de estudo

Faixa etária	Pré-PCV10 (2005-2009)		Pós-PCV10-imediato (2010-2013)		Pós-PCV10-tardio (2014-2017)		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<2m	60	1,5	39	1,0	48	1,5	147	1,3
2m-4a	1.290	31,6	733	19,3	511	15,6	2.534	22,8
5-9a	336	8,2	196	5,2	121	3,7	653	5,9
10-49a	1.317	32,3	1.455	38,4	1137	34,8	3.909	35,1
50-64a	405	9,9	727	19,2	774	23,7	1.906	17,1
≥65a	270	6,6	506	13,4	575	17,6	1.351	12,1
sem idade	399	9,8	133	3,5	104	3,2	636	5,7
Total	4.077	-	3.789	-	3.270	-	11.136	-

m: meses, a: anos

4.2 Sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* nos períodos pré e pós-PCV10

Considerando todas as faixas etárias e diagnóstico clínico foi observado um declínio de 37,7% e 69,6% na prevalência dos sorotipos PCV10 nos períodos pós-PCV10-imediato e pós-PCV10-tardio, quando comparado com o período pré-PCV10 (Tabela 6, Figura 1).

A diminuição na prevalência dos sorotipos PCV10 foi observada em todas as faixas etárias, em ambos os períodos pós-PCV10, e nos diagnósticos clínicos de meningite e não-meningite. As maiores reduções ocorreram no período pós-PCV10-tardio, onde a %*change* de -90,3% e -82,8% foi observada nos pacientes com meningite com idade de 2m-4a e ≥65a, respectivamente; nos pacientes com diagnóstico clínico não-meningite, a %*change* foi de -89,8% e -60,0% nas respectivas faixas etárias (Tabela 7).

Entre os sorotipos vacinais, ao compararmos os períodos pré-PCV10 e pós-PCV10-tardio, foi observado uma redução dos sorotipos 14 (%*change* -93,3%) e 6B (%*change* -86,8%), altamente prevalentes no

período pré-PCV10 (29,7%) e uma baixa alteração nas prevalências dos sorotipos 4, 5 e 7F, onde a análise de *%change* revelou um aumento de 20,2%, 24,7% e 12,1%, respectivamente, no período pós-PCV10-tardio (Tabela 6, Figuras 1 e 2). A estratificação dos dados para os sorotipos 4, 5 e 7F por faixa etária mostrou uma maior prevalência destes sorotipos nos grupos de idade acima dos 10 anos (Figura 3).

Em paralelo, no período pós-PCV10-tardio foi observado um aumento de 105,8% dos sorotipos não-PCV10 (Tabela 6). O aumento dos sorotipos PCV13 foi observado nos períodos pós-PCV10-imediate (*%change*: 46,7%) e Pós-PCV10-tardio (*%change*:122,1%), em todos os grupos de idade e em ambos diagnósticos clínicos avaliados (Tabelas 5 e 6). Prevalência dos sorotipos 3 e 19A aumentou nos períodos pós-PCV10, mostrando uma respectiva *%change* de 83,2% e 380,8%, no período pós-PCV10-tardio (Tabela 6, Figuras 1 e 2). A estratificação desses dois sorotipos da PCV13 por faixa etária mostra uma alta prevalência nos grupos de idade 2m-4a e >50a (Figura 4). Em contrapartida, uma redução de 33,5% na prevalência do sorotipo 6A é observada no período pós-PCV10-tardio (Tabela 6, Figuras 1 e 2). A estratificação da prevalência do sorotipo 6A por faixa etária mostra uma diminuição desde sorotipo nos grupos de 2m-4a e 5-9a (Figura 4).

Um aumento dos SNV também foi observado nos períodos após a introdução da PCV10, com uma *%change* de 98,1% no pós-PCV10-tardio (Tabela 6, Figura 2). Observou-se uma grande diversidade de SNV em todos os períodos, sendo 53 sorotipos identificados no período pré-PCV10 e 44 sorotipos em cada um dos períodos pós-PCV10-imediate e tardio (Tabela 6, Figura 1). Entre os SNV, os sorotipos 6C, 8 e 12F se destacam em número absolutos no período pós-PCV10-tardio, apresentando uma *%change* de 447,2%, 354,2% e 24,7%, respectivamente (Tabela 6, Figura 2). Sorotipo 6C mostra alta prevalência nos grupos de idade 2m-4a e >10 anos de idade com um aumento gradual ao longo dos três períodos estudados nos adultos

>50 anos. Os sorotipos 8 e 12F também apresentaram um aumento gradual na prevalência em adultos >50 anos (Figura 5).

Entre os sorotipos PCV13 e SNV, os sorotipos 3, 6C, 8, 12F e 19A representaram 41,4% (n=1354/3270) dos isolados de *S. pneumoniae* identificadas no período pós-PCV10-tardio.

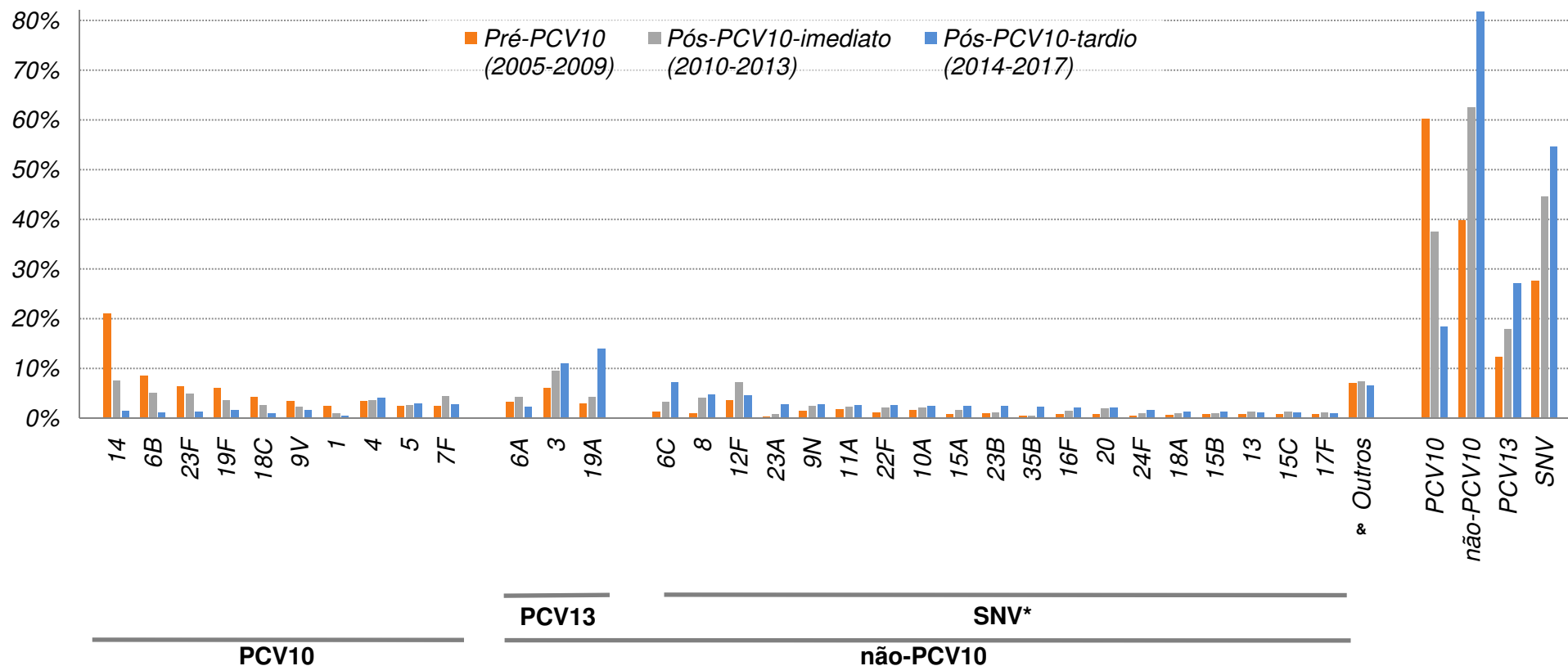


Figura 1 - Distribuição dos sorotipos PCV10, PCV13 e SNV de *Streptococcus pneumoniae* nos períodos pré-PCV10 (2005-2009), pós-PCV10- imediato (2010-2013) e pós-PCV10- tardio (2014-2017). * SNV: sorotipos não vacinais, ou seja, não incluídos nas vacinas PCV10 ou PCV13; & Outros: SNV (n=780) com número total <100 isolados, 6D (n=1), 7A (n=11), 7B (n=3), 7C (n=80), 9L (n=1), 10B (n=1), 10F (n=13), 11B (n=20), 11C (n=2), 11F (n=4), 12A (n=1), 15F (n=9), 17A (n=1), 18B (n=64), 18F (n=11), 19B (n=3), 21 (n=17), 22A (n=5), 24A (n=2), 25A (n=59), 28A (n=54), 28F (n=1), 29 (n=87), 31 (n=21), 33A (n=2), 33F (n=9), 34 (n=60), 35A (n=12), 35C (n=6), 35F (n=78), 36 (n=6), 37 (n=4), 38 (n=26), 40 (n=11), 42 (n=7), 47F (n=1), 29/35 (n=1), G (n=3), I (n=2), NT (n=81).

Tabela 6 - Sorotipos PCV10, PCV13 e sorotipos não vacinais (SNV) de *Streptococcus pneumoniae* nos períodos de estudo

Sorotipo	Período							
	Pré-PCV10 (2005-2009)		Pós-PCV10-imediate (2010-2013)			Pós-PCV10-tardio (2014-2017)		
	n	%	n	%	%change*	n	%	%change
PCV10	2456	60,2	1421	37,5	-37,7	599	18,3	-69,6
1	97	2,4	36	1,0	-60,1	18	0,6	-76,9
4	138	3,4	133	3,5	3,7	133	4,1	20,2
5	98	2,4	100	2,6	9,8	98	3,0	24,7
6B	350	8,6	189	5,0	-41,9	37	1,1	-86,8
7F	99	2,4	169	4,5	83,7	89	2,7	12,1
9V	138	3,4	88	2,3	-31,4	53	1,6	-52,1
14	859	21,1	285	7,5	-64,3	46	1,4	-93,3
18C	171	4,2	100	2,6	-37,1	30	0,9	-78,1
19F	248	6,1	135	3,6	-41,4	51	1,6	-74,4
23F	258	6,3	186	4,9	-22,4	44	1,3	-78,7
não-PCV10	1621	39,7	2368	62,5	57,4	2671	81,7	105,8
PCV13	498	12,2	679	17,9	46,7	887	27,1	122,1
3	245	6,0	364	9,6	59,9	360	11,0	83,2
6A	135	3,3	158	4,2	25,9	72	2,2	-33,5
19A	118	2,9	157	4,1	43,2	455	13,9	380,8
SNV	1123	27,5	1689	44,6	61,8	1784	54,6	98,1
6C	54	1,3	122	3,2	143,1	237	7,2	447,2
6D	0	-	0	-	-	1	0,03	-
7A	7	0,2	0	-	-	4	0,1	-28,8
7B	1	0,02	1	0,03	7,6	1	0,03	24,7
7C	23	0,6	33	0,9	54,4	24	0,7	30,1
8	42	1,0	155	4,1	297,1	153	4,7	354,2
9L	1	0,02	0	-	-	0	-	-
9N	61	1,5	94	2,5	65,8	88	2,7	79,9
10A	66	1,6	81	2,1	32,1	82	2,5	54,9
10B	1	0,02	0	-	-	0	-	-
10F	4	0,1	5	0,1	34,5	4	0,1	24,7
11A	72	1,8	84	2,2	25,5	84	2,6	45,5
11B	0	-	7	0,2	-	13	0,4	-
11C	2	0,05	0	-	-	0	-	-
11F	3	0,1	1	0,03	-64,1	0	-	-
12A	1	0,02	0	-	-	0	-	-
12F	149	3,7	271	7,2	95,7	149	4,6	24,7
13	33	0,8	49	1,3	59,8	37	1,1	39,8
15A	32	0,8	60	1,6	101,8	80	2,4	211,7
15B	31	0,8	35	0,9	21,5	40	1,2	60,9
15C	32	0,8	48	1,3	61,4	34	1,0	32,5

continua

Sorotipo	Período								
	Pré-PCV10 (2005-2009)		Pós-PCV10-imediato (2010-2013)			Pós-PCV10-tardio (2014-2017)			
	n	%	n	%	%change*	n	%	%change	
15F	2	0,05	0	-	-	7	0,2	336,4	
16F	35	0,9	53	1,4	62,9	69	2,1	145,8	
17A	1	0,02	0	-	-	0	-	-	
17F	34	0,8	45	1,2	42,4	32	1,0	17,3	
18A	25	0,6	35	0,9	50,6	41	1,3	104,5	
18B	31	0,8	25	0,7	-13,2	8	0,2	-67,8	
18F	10	0,2	1	0,03	-89,2	0	-	-	
19B	0	-	1	0,03	-	2	0,1	-	
20	34	0,8	73	1,9	131,0	68	2,1	149,4	
21	10	0,2	4	0,1	-57	3	0,1	-62,6	
22A	5	0,1	0	-	-	0	-	-	
22F	46	1,1	79	2,1	84,8	84	2,6	127,7	
23A	13	0,3	29	0,8	140,0	89	2,7	753,6	
23B	39	1,0	41	1,1	13,1	78	2,4	149,4	
24A	1	0,02	0	-	-	1	0,03	24,7	
24F	21	0,5	34	0,9	74,2	54	1,7	220,6	
25A	1	0,02	35	0,9	3666,0	23	0,7	2767,6	
28A	14	0,3	23	0,6	76,8	17	0,5	51,4	
28F	0	-	1	0,03	-	0	-	-	
29	15	0,4	51	1,3	265,8	21	0,6	74,6	
31	2	0,05	12	0,3	545,6	7	0,2	336,4	
33A	0	-	1	0,03	-	1	0,03	-	
33F	3	0,1	3	0,1	7,6	3	0,1	24,7	
34	36	0,9	7	0,2	-79,1	17	0,5	-41,1	
35A	1	-	5	0,1	438	6	0,2	648,1	
35B	18	0,4	20	0,5	19,6	72	2,2	398,7	
35C	1	0,02	3	0,1	222,8	2	0,1	149,4	
35F	9	0,2	36	1,0	330,4	33	1,0	357,2	
36	1	0,02	2	0,1	115,2	3	0,1	274,0	
37	4	0,1	0	-	-	0	-	-	
38	21	0,5	5	0,1	-74,4	0	-	-	
40	3	0,1	5	0,1	79,3	3	0,1	24,7	
42	5	0,1	2	0,1	-57,0	0	-	-	
47F	0	-	0	-	-	1	0,03	-	
NT	61	1,5	12	0,3	-78,8	8	0,2	-83,6	
29/35	1	0,02	0	-	-	0	-	-	
G	3	0,1	0	-	-	0	-	-	
I	2	0,05	0	-	-	0	-	-	
Total	4077	-	3789	-	-	3270	-	-	

* %change: [(percentagem de sorotipos no pós-PCV10 - percentagem de sorotipos pré-PCV10 / percentagem de sorotipos no pré-PCV10) * 100].

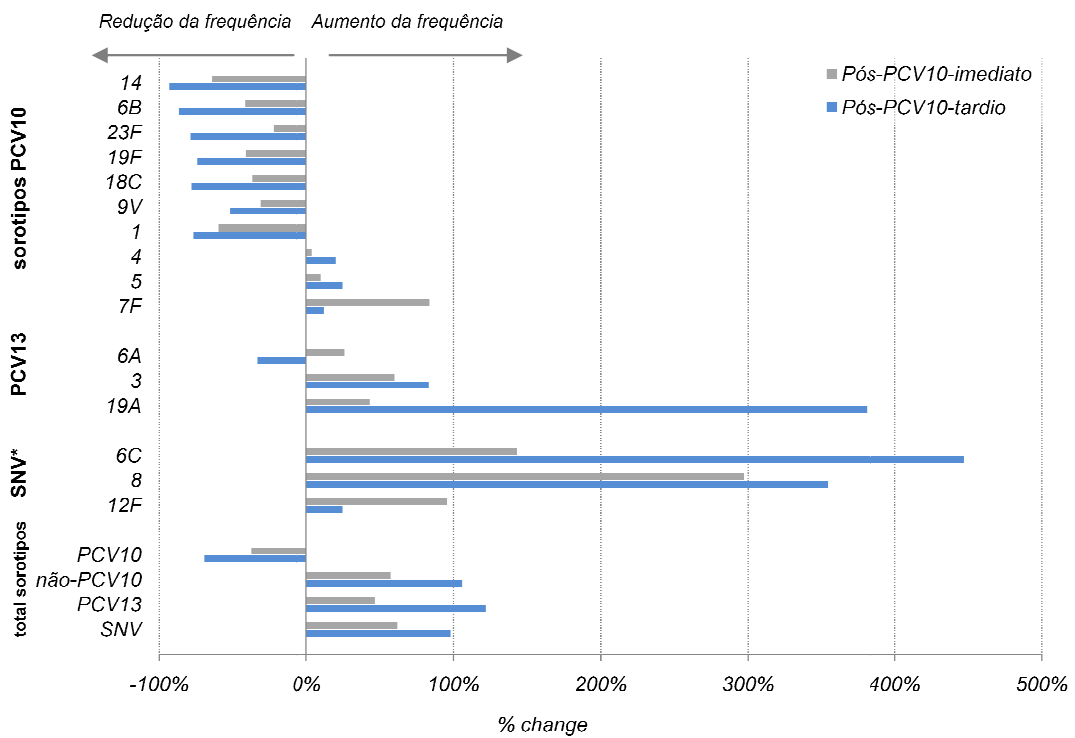


Figura 2 – Representação gráfica dos %change para os sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* nos períodos vacinais pós-PCV10. O período pré-PVC10 foi utilizado como referência. Valores positivos de %change indicam aumento dos sorotipos nos períodos pós-PCV10 enquanto valores negativos representam redução dos sorotipos nos períodos pós-PCV10. * SNV: sorotipos não vacinais.

Tabela 7 - Distribuição dos sorotipos PCV10, PCV13* e sorotipos não vacinais (SNV) de *Streptococcus pneumoniae* por faixa etária, diagnóstico clínico por período de estudo

Faixa etária/ Sorotipo	Meningite Período**						Não-meningite Período										
	Pré-PCV10		Pós-PCV10-imediato			Pós-PCV10-tardio			Pré-PCV10		Pós-PCV10-imediato			Pós-PCV10-tardio			
	n	%	n	%	%change ^x	n	%	%change	n	%	n	%	%change	n	%	%change	
<2m																	
PCV10	27	56,3	10	41,7	-25,9	4	21,1	-62,6	8	66,7	1	6,7	-90,0	7	24,1	-63,8	
PCV13	4	8,3	5	20,8	150,0	8	42,1	405,3	3	25,0	4	26,7	6,7	5	17,2	-31,0	
SNV	17	35,4	9	37,5	5,9	7	36,8	4,0	1	8,3	10	66,7	700,0	17	58,6	603,4	
2m-4a																	
PCV10	569	78,1	192	50,8	-34,9	16	7,6	-90,3	458	81,6	145	40,8	-50,0	25	8,3	-89,8	
PCV13	63	8,6	64	16,9	95,9	65	30,8	256,5	61	10,9	113	31,8	192,7	147	49,0	350,6	
SNV	97	13,3	122	32,3	142,6	130	61,6	363,0	42	7,5	97	27,3	265,0	128	42,7	469,9	
5-9a																	
PCV10	140	61,4	66	53,2	-13,3	12	20,3	-66,9	82	75,9	40	55,6	-26,8	15	24,2	-68,1	
PCV13	27	11,8	15	12,1	2,2	17	28,8	143,3	10	9,3	14	19,4	110,0	26	41,9	352,9	
SNV	61	26,8	43	34,7	29,6	30	50,8	90,1	16	14,8	18	25,0	68,8	21	33,9	128,6	
10-49a																	
PCV10	397	43,2	247	30,5	-29,5	81	14,9	-65,6	242	60,7	273	42,3	-30,2	179	30,2	-50,2	
PCV13	141	15,4	147	18,1	18,2	128	23,5	53,2	36	9,0	85	13,2	46,1	128	21,6	139,2	
SNV	380	41,4	416	51,4	24,1	335	61,6	48,8	121	30,3	287	44,5	46,7	286	48,2	59,0	
50-64a																	
PCV10	117	44,3	91	29,5	-33,3	34	12,1	-72,6	78	55,3	131	31,3	-43,5	110	22,3	-59,7	
PCV13	41	15,5	51	16,6	6,6	68	24,3	56,4	19	13,5	66	15,8	16,9	111	22,5	66,7	
SNV	106	40,2	166	53,9	34,2	178	63,6	58,3	44	31,2	222	53,0	69,8	273	55,3	77,1	
≥65a																	
PCV10	56	40,3	57	39,0	-3,1	7	6,9	-82,8	58	44,3	114	31,7	-28,5	84	17,7	-60,0	
PCV13	21	15,1	23	15,8	4,3	29	28,7	90,1	26	19,8	69	19,2	-3,4	131	27,6	39,2	
SNV	62	44,6	66	45,2	1,3	65	64,4	44,3	47	35,9	177	49,2	37,0	259	54,6	52,3	
Total	2326	-	1790	-	-	1214	-	-	1352	-	1866	-	-	1952	-	-	

*PCV13: sorotipos 3, 6A e 19A, **Períodos: pré-PCV10 (2005-2009), pós-PCV10-imediato (2010-2013) e pós-PCV10-tardio (2014-2017), ^x%change: [(percentagem de sorotipos no pós-PCV10 - percentagem de sorotipos no pré-PCV10 / percentagem de sorotipos no pré-PCV10) * 100], m: meses, a: anos.

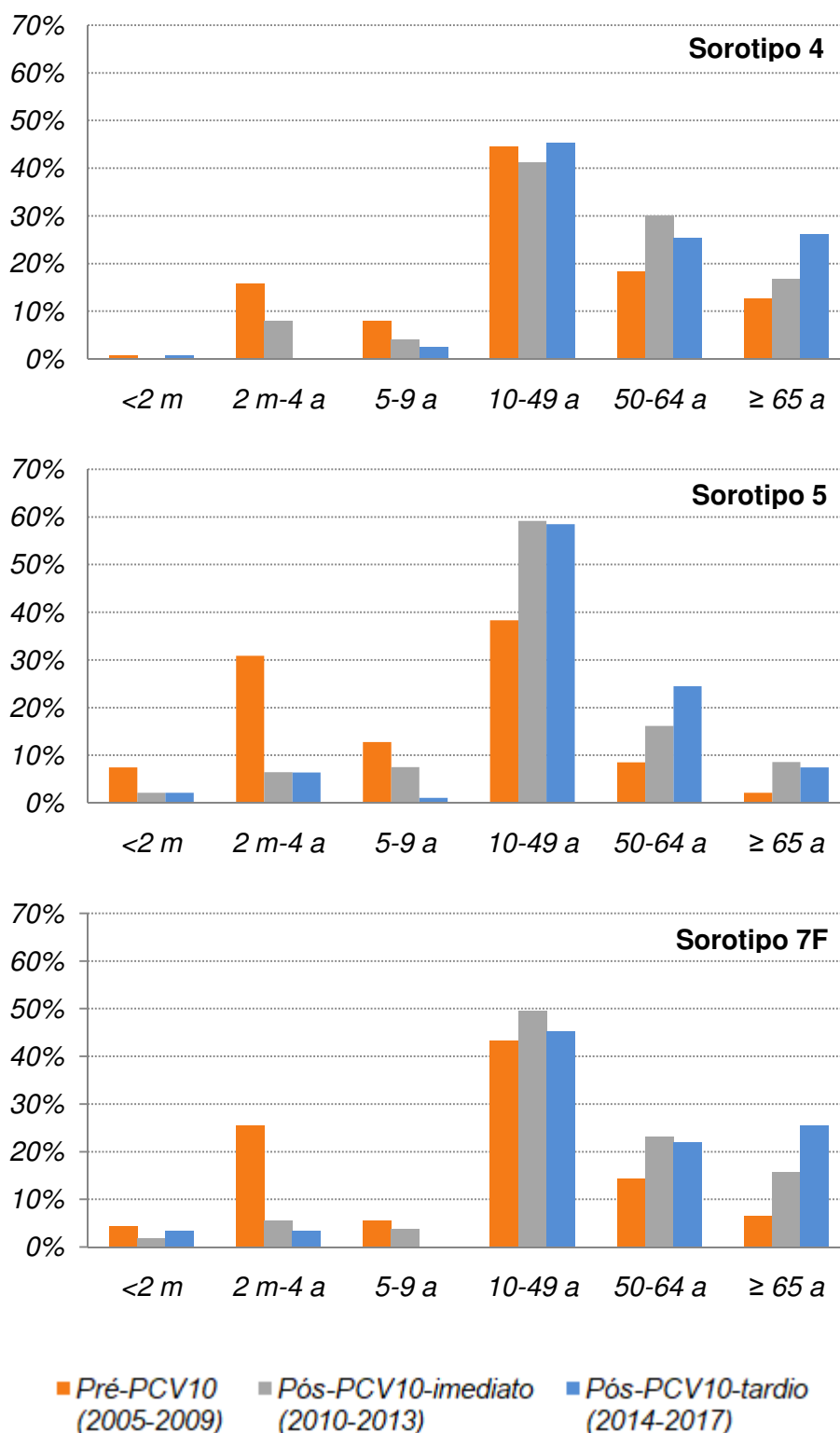


Figura 3 - Distribuição dos sorotipos PCV10 4, 5 e 7F de *Streptococcus pneumoniae* por faixa etária nos períodos de estudo. m: meses; a: anos.

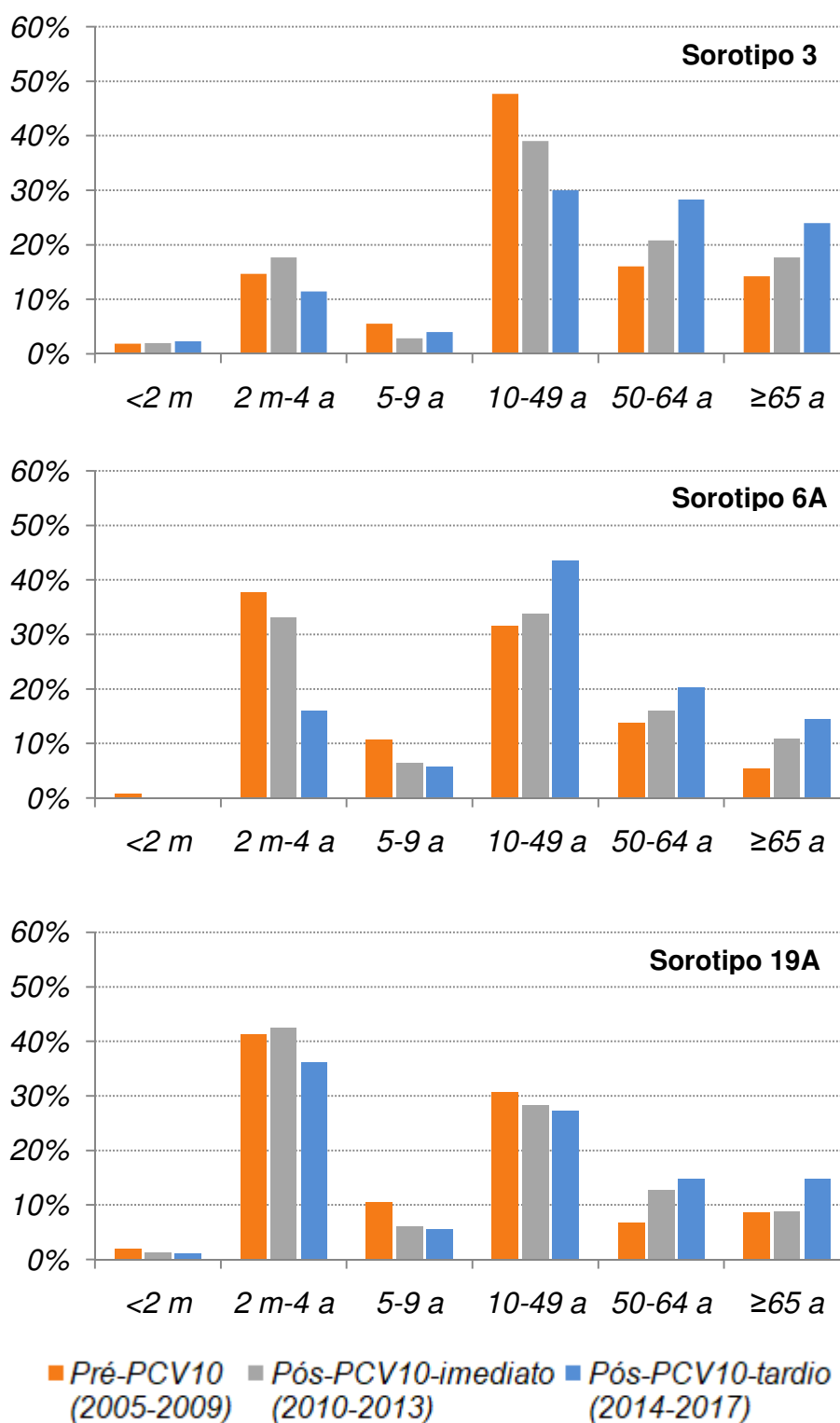


Figura 4 - Distribuição dos sorotipos PCV13 3, 6A e 19A de *Streptococcus pneumoniae* por faixa etária nos períodos de estudo. m: meses; a: anos.

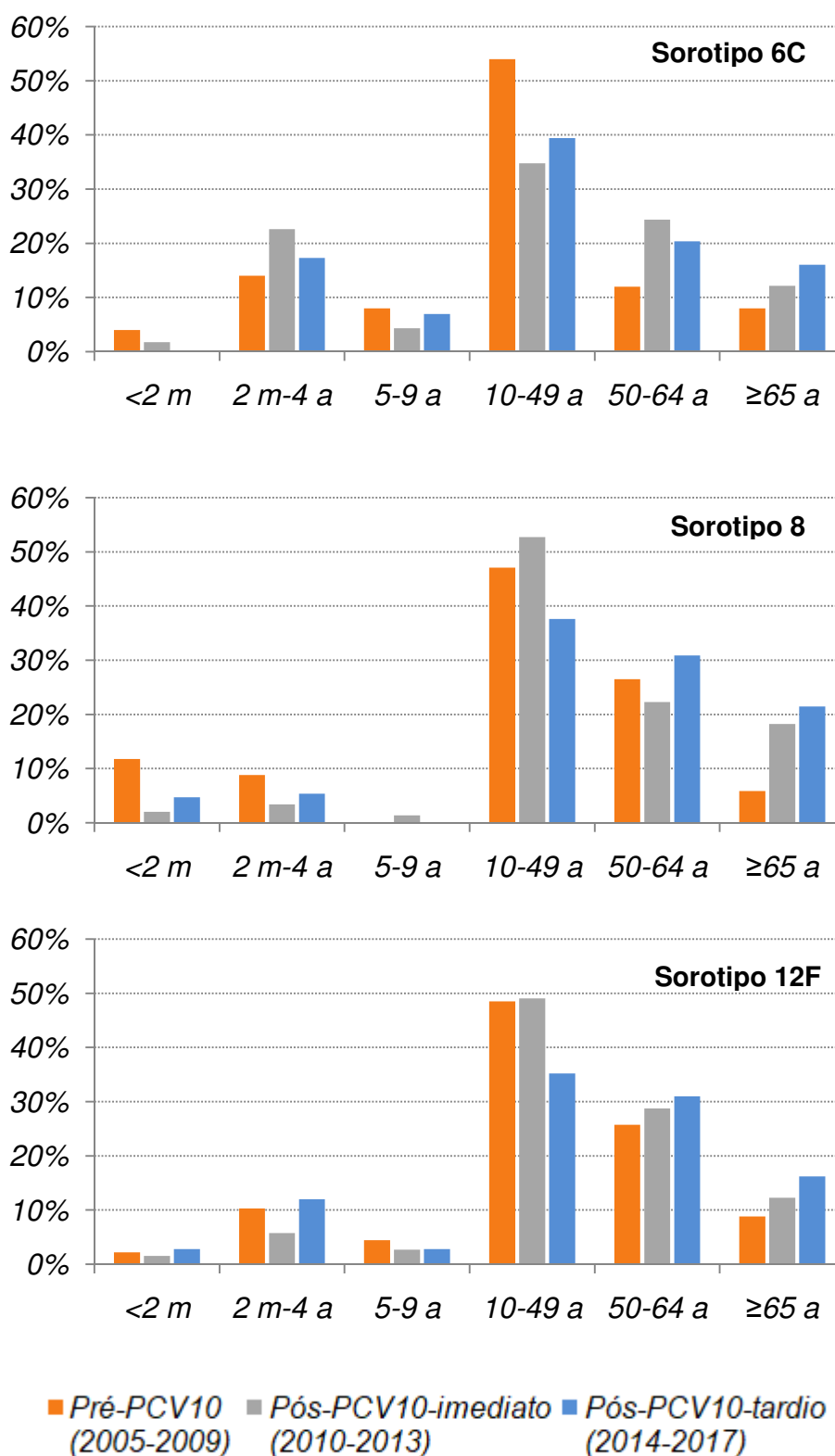


Figura 5 - Distribuição dos SNV 6C, 8 e 12F de *Streptococcus pneumoniae* por faixa etária nos períodos de estudo. m: meses; a: anos.

4.3 Suscetibilidade antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae*

Um aumento da suscetibilidade à penicilina foi observado no período pós-PCV10-imediato (%*change*: 5,3%) e no pós-PCV10-tardio (%*change*: 0,7%) entre os isolados de meningites, como também nos isolados de não-meningite (%*change*: 4,0% e 1,7%, nos respectivos períodos). Aumento da suscetibilidade à ceftriaxona também foi observado nos períodos pós-PCV10-imediato (%*change*: 3,2%) e no pós-PCV10-tardio (%*change*: 0,7%) entre os isolados de meningites, como também nos isolados não-meningite (%*change*: 2,6% e 0,6%, nos respectivos períodos). Suscetibilidade à trimetoprim-sulfametoxazol aumentou em 54,6% no período pós-PCV10-imediato e em 53,8% no pós-PCV10-tardio. Todos os *S. pneumoniae* estudados foram suscetíveis à vancomicina (Tabela 8).

Quanto ao cloranfenicol, foi observado um aumento de 72,9% e 38,0% nos isolados resistentes nos períodos pós-PCV10-imediato e pós-PCV10-tardio, respectivamente, assim como foi observado um aumento de 97,2% e 304,6% de isolados resistentes à eritromicina nos períodos pós-PCV10-imediato e no pós-PCV10-tardio (Tabela 8).

Isolados com perfil de multirresistência diminuíram em 22,0% e em 10,6% nos períodos pós-PCV10-imediato e pós-PCV10-tardio, respectivamente (Tabela 8).

O perfil de multirresistência mais frequente no período pré-PCV10 foi o PEN-CEF-SXT com uma prevalência de 72,9%, diminuindo para 7,0% no pós-PCV10-tardio. No período pós-PCV10-tardio, o perfil mais frequente envolveu quatro classes de antimicrobianos, a citar PEN-CEF-ERI-SXT, representando 61,3% dos isolados multirresistentes nesse período. O perfil de multirresistência a cinco classes de antimicrobianos, a citar PEN-CEF-CLO-ERI-SXT, não sofreu alteração ao longo do período estudado (Tabela 9).

Tabela 8 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana do *Streptococcus pneumoniae* nos períodos de estudo

Antimicrobiano	Categoria	Período Pré-PCV10 (2005- 2009)		Pós-PCV10-imediato (2010-2013)			Pós-PCV10-tardio (2014-2017)		
		n	%	n	%	%change**	n	%	%change
Penicilina (meningite)	Suscetível	1787	69,0	1352	73,1	5,3	872	69,9	0,7
	Resistente	789	31,0	498	26,9	-12,1	376	30,1	-1,6
Penicilina (não-meningite)	Suscetível	1373	91,5	1844	95,1	4,0	1881	93,0	1,7
	Intermediário	128	8,5	95	4,9	-42,5	141	7,0	-18,2
	Resistente	0	-	0	-	-	0	-	-
Ceftriaxona (meningite)	Suscetível	2272	88	1684	91,0	3,2	1108	88,8	0,7
	Intermediário	197	8,0	115	6,2	-18,7	91	7,3	-4,7
	Resistente	107	4,0	51	2,8	-33,6	49	3,9	-5,5
Ceftriaxona (não-meningite)	Suscetível	1425	94,9	1888	97,4	2,6	1931	95,5	0,6
	Intermediário	76	5,1	51	2,6	-48,1	91	4,5	-11,1
	Resistente	0	-	0	-	-	0	-	-
Trimetoprim-Sulfametoxazol	Suscetível	1642	40,3	2359	62,3	54,6	2025	61,9	53,8
	Intermediário	331	8,1	221	5,8	-28,2	252	7,7	-5,1
	Resistente	2104	51,6	1209	31,9	-38,2	993	30,4	-41,2
Vancomicina	Suscetível	4077	100,0	3789	100,0	-	3270	100,0	-
Cloranfenicol	Suscetível	4049	99,3	3744	98,8	-0,5	3239	99,1	-0,3
	Resistente	28	0,7	45	1,2	72,9	31	0,9	38,0
Eritromicina	Suscetível	3832	94,0	3340	88,1	-6,2	2475	75,7	-19,5
	Resistente	245	6,0	449	11,9	97,2	795	24,3	304,6
Multirresistência*	Intermediário ou resistente	421	10,3	305	8,0	-22,0	302	9,2	-10,6

* Multirresistência: intermediário ou resistente a três ou mais classes de antimicrobianos (CLSI, 2017). ** %change: [(percentagem de sorotipos no pós-PCV10 - percentagem de sorotipos pré-PCV10 / percentagem de sorotipos no pré-PCV10) * 100].

Tabela 9 - Perfil de multirresistência* aos antimicrobianos do *Streptococcus pneumoniae* nos períodos de estudo

Perfil multirresistência	Pré-PCV10 (2005-2009)		Pós-PCV10- imediato (2010-2013)		Pós-PCV10-tardio (2014-2017)	
	n	%	n	%	n	%
3 classes	352	83,6	203	66,6	110	36,4
PEN-CEF-SXT	307	72,9	103	33,8	21	7,0
PEN-ERI-SXT	39	9,3	78	25,6	73	24,2
PEN-CEF-ERI	2	0,5	11	3,6	13	4,3
CLO-ERI-SXT	2	0,5	7	2,3	3	1,0
PEN-CLO-SXT	2	0,5	4	1,3	0	-
4 classes	62	14,7	92	30,2	185	61,3
PEN-CEF-ERI-SXT	58	13,8	90	29,5	185	61,3
PEN-CEF-CLO-SXT	3	0,7	1	0,3	0	-
PEN-CEF-CLO-ERI	1	0,2	1	0,3	0	-
5 classes	7	1,7	10	3,3	7	2,3
PEN-CEF-CLO-ERI-SXT	7	1,7	10	3,3	7	2,3
Total	421	-	305	-	302	-

PEN, penicilina; CEF, ceftriaxona; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol. * Multirresistência: intermediário ou resistente a três ou mais classes de antimicrobianos (CLSI, 2017).

4.4 Sorotipos prevalentes de *Streptococcus pneumoniae* associados à resistência à penicilina, eritromicina e a multirresistência no período pós-PCV10

No período pós-PCV10-imediato (2010-2013), a resistência à penicilina esteve relacionada aos sorotipos 6B, 9V, 14, 19F e 23F incluídos na PCV10, e em menor frequência aos sorotipos não vacinais 6A, 6C e 19A. Ao longo dos anos, observamos uma diminuição dos sorotipos da PCV10 expressando resistência à penicilina, e um aumento gradual dos sorotipos 6C e 19A resistentes à penicilina, principalmente após três anos da introdução da PCV10 (após 2013) (Figura 6).

Resistência à eritromicina aumentou ao longo dos anos, principalmente após três anos da introdução da PCV10 (2013), relacionada aos sorotipos 6C e 19A (Figura 6).

A multirresistência foi relacionada principalmente aos sorotipos 14 e 19A, porém se observa que a prevalência de isolados do sorotipo 14 multirresistente diminuiu após o ano de 2012, enquanto os isolados do sorotipo 19A têm sido a principal causa de multirresistência desde 2013 (Figura 6).

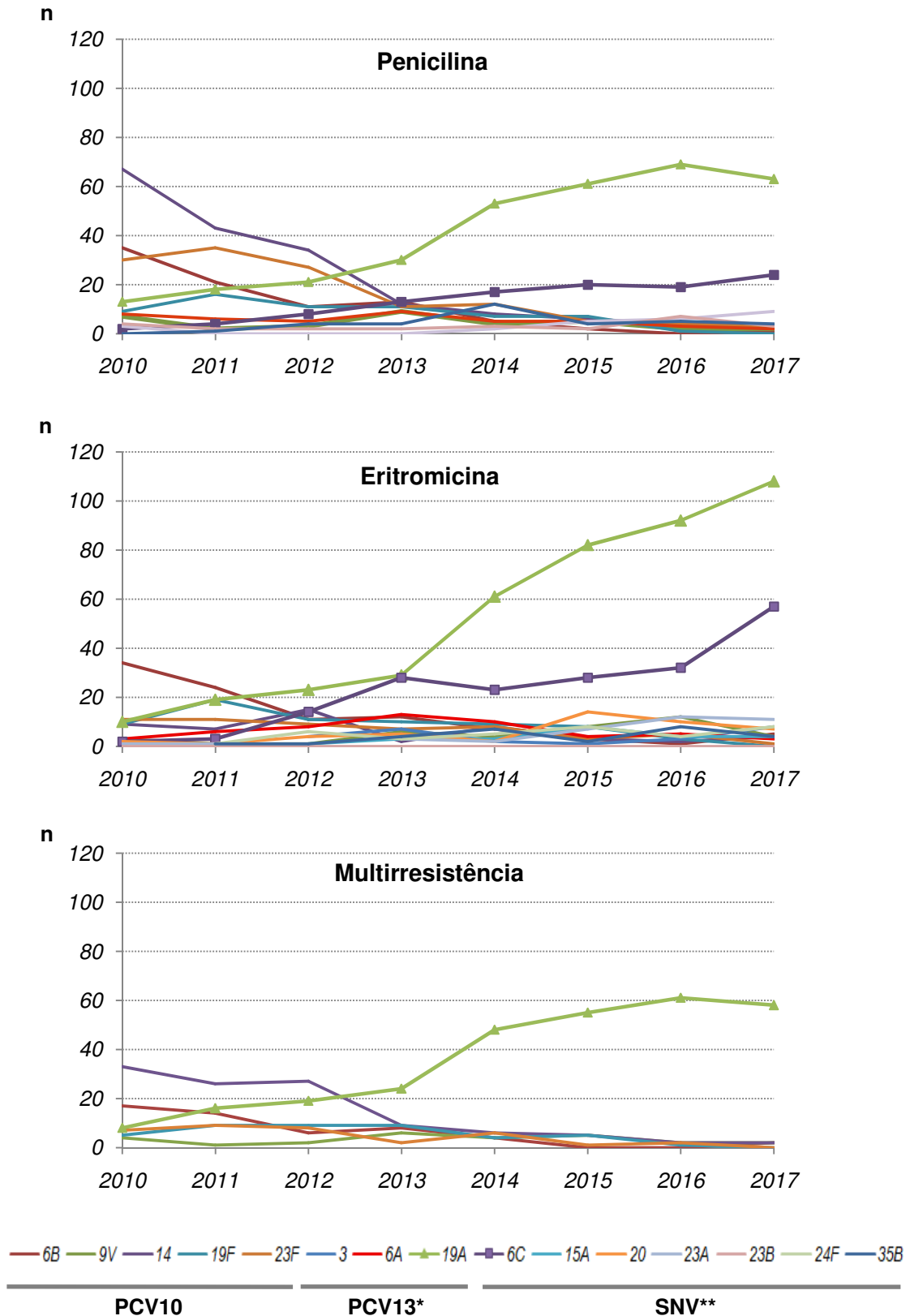


Figura 6 - Distribuição dos sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* relacionados à resistência aos antimicrobianos ao longo dos anos no período pós-PCV10 (2010-2017). Resistência à penicilina ou multirresistência incluiu a somatória das categorias de resistência intermediária e resistente aos antimicrobianos. Foram incluídos os sorotipos com número >20 isolados identificados. Penicilina (n=1049, excluídos n=61); Eritromicina (n=1171, excluídos n=73); e Multirresistente (n=553, excluídos n=54). *PCV13: sorotipos 3, 6A e 19A, **SNV: sorotipos não vacinais.

4.5 Caracterização molecular dos sorotipos estudados de *Streptococcus pneumoniae*

Foram estudados molecularmente por MLST 688 *S. pneumoniae* isolados entre 2005 a 2015 e pertencentes aos sorotipos PCV10 (1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F), PCV13 (3, 6A e 19A) e SNV (6C, 8 e 12F) (Tabela 2). Os resultados completos da caracterização molecular estão descritos no Anexo 6.

Entre os 688 isolados, 182 STs foram identificadas, sendo 61 STs correspondentes a novas linhagens ou perfis genéticos; em 17 das novas STs foram identificados novos alelos ou genes. Os isolados foram agrupados em 33 complexos clonais (CC) e 30 singletons, que são STs sem similaridade com as outras STs do estudo (Anexo 6).

De acordo com o *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network*, foram identificados 16 diferentes clones internacionais e 3 variantes de sorotipo de clones internacionais (Tabela 10). No período pós-PCV10 foi observada uma menor frequência de clones internacionais pertencentes aos sorotipos PCV10 (pré-PCV10 n=164/198, 82,8%; pós-PCV10 n= 84/163, 51,5%) e uma frequência maior dos clones Holanda³-31, Holanda⁸-33 e Dinamarca^{12F}-34, clones internacionais pertencentes aos sorotipos não presentes na vacina PCV10 (pré-PCV10 n=34/198, 17,2%; pós-PCV10 n=79/163, 48,5%). É importante mencionar a alta prevalência do CC236/ST320 pertencente ao sorotipo 19A no período pós-PCV10 (pré-PCV10 n=2/10, 20%; pós-PCV10 n=15/21, 71,4%), variante de duplo locus (DLV) do clone Taiwan^{19F}-14, e dos CC315-386-11315/ST386 (DLV Polônia^{6B}-20) e CC338/ST2777 (variante de *locus* único (SLV) Colômbia^{23F}-26) no sorotipo 6C, presentes principalmente no período pós-PCV10 (Anexo 6).

A figura 7 ilustra a distribuição dos CCs e sorotipos e na tabela 10 são apresentados os principais resultados da caracterização

molecular de *S. pneumoniae* para os sorotipos PCV10, PCV13 e SNV, ambas nos períodos pré-PCV10 (2005-2009) e pós-PCV10 (2011-2015).

Comparando-se a frequência dos CCs nos isolados selecionados no período pré-PCV10 (n=350) e no período pós-PCV10 (n=338), observamos uma redução principalmente nos sorotipos/complexos 1/S-304 (3,1% para 0,3%), 9V,14/CC156 (25,4% para 9,5%), 14,19F/CC66-11327-12487-12837 (3,5% para 0,6%), 18C/CC193 (5,7% para 1,8%) e 19F/CC177 (2,9% para 0,3%) e uma expansão dos sorotipos/complexos 3/CC180 (4,9% para 9,8%), 3/CC458-11332 (0,9% para 4,4%), 4,6A/CC770 (2,3% para 5,9%), 6A,6B,7F/CC473 (0,9% para 3,3%), 8/CC53-12574 (0,9% para 5,9%), 12F/218 (4,3% para 8,6%) e 19A,19F/CC236 (2,9% para 6,2%) (Tabela 10).

Tabela 10 - Caracterização molecular de *Streptococcus pneumoniae* por sorotipos PCV10, PCV13 ou SNV por período pré e pós-PCV10

Grupo Sorotipo	Sorotipo	CC	n	Pré-PCV10 (2005-2009) n=350	%	Pós-PCV10 (2011-2015) n=338	%	Clones Internacionais
PCV10								
1	S-304 ^{&}		12	11	3,1%	1	0,3%	Suécia ¹ -40
	S-306		2	0	-	2	0,6%	Suécia ¹ -28
	S-615		1	0	-	1	0,3%	EUA ¹ -29
4	770		25	8	2,3%	17	5,0%	
5	289-10408		26	10	2,9%	16	4,7%	Colômbia ⁵ -19
6B	90		16	11	3,1%	5	1,5%	Espanha ^{6B} -2
	473		1	1	0,3%	0	-	
	315-386-11315		11	8	2,3%	3	0,9%	Polônia ^{6B} -20
7F	S-191		33	16	4,6%	17	5,0%	Holanda ^{7F} -39
	473		1	0	-	1	0,3%	
9V	156		21	14	4,0%	7	2,1%	Espanha ^{9V} -3
14	156		100	75	21,4%	25	7,4%	Espanha ^{9V} -3-14
	66-11327-12487-12837		12	10	2,9%	2	0,6%	
18C	193		26	20	5,7%	6	1,8%	Grécia ²¹ -30-18C
19F	177		11	10	2,9%	1	0,3%	Portugal ^{19F} -21
	236		11	7	2,0%	4	1,2%	Taiwan ^{19F} -14
	338		1	1	0,3%	0	-	Colômbia ^{23F} -26-19F
	66-11327-12487-12837		2	2	0,6%	0	-	
23F	338		32	21	6,0%	11	3,3%	Colômbia ^{23F} -26
	242-11306		3	0	-	3	0,9%	Taiwan ^{23F} -15
	S-81		4	3	0,9%	1	0,3%	Espanha ^{23F} -1
PCV13*								
3	180		50	17	4,9%	33	9,8%	Holanda ³ -31
	458-11332		18	3	0,9%	15	4,4%	
6A	473		13	2	0,6%	10	3,0%	
	770		3	0	-	3	0,9%	
19A	236		20	3	0,9%	17	5,0%	ST320 DLV [§] Taiwan ^{19F} -14
SNV**								
6C	338		12	4	1,1%	8	2,4%	ST2777 SLV [#] Colômbia ^{23F} -26
	315-386-11315		10	0	-	10	3,0%	ST386 DLV Polônia ^{6B} -20
8	53-12574		23	3	0,9%	20	5,9%	Holanda ⁸ -33
12F	218		44	15	4,3%	29	8,6%	Dinamarca ^{12F} -34

*PCV13: sorotipos 3, 6A e 19A, **SNV: sorotipos não vacinais, [&]S: singletons, [§]DLV: variante *locus* duplo, [#]SLV: variante único *locus*

Nas figuras 8, 9 e 10 podem ser observadas as relações clonais e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos penicilina, eritromicina e multirresistência, respectivamente.

Em 42,3% (n=291/688) dos isolados caracterizados molecularmente a resistência a penicilina foi de $\geq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$; 52,2% (n=152/291) apresentaram resistência à penicilina entre 0,125-1 $\mu\text{g/mL}$ e foram relacionadas aos CC/sorotipos CC338/6C,23F (27,6%, n=42), CC156/14 (12,5%, n=19), CC473/6A (7,2%, n=11), CC66-11327-12487-12837/14 (7,2%, n=11), CC4978/6B (6,6%, n=10), CC1118/19A (5,3%, n=8), CC315-386-11315/6C (5,3%, n=8), CC90/6B (3,3, n=5) e CC8640-9793-9801-13837/19A (2,6%, n=4); e 47,8% (n=139/291) apresentaram resistência à penicilina ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ e foram principalmente relacionadas aos CC/sorotipos CC156/14 (57,6%, n=80), CC236/19A (13,7%, n=19), CC90/6B (7,2%, n=10), 276-2307/19A,19F (2,9%, n=4) e S-81/23F (2,2%, n=3).

Entre os isolados caracterizados molecularmente 15,6% (n=107/688) apresentaram resistência a eritromicina. Os principais CC/sorotipos relacionados à resistência a este antimicrobiano foram: CC236/19A (18,7%, n=20), CC315-386-11315/6B,6C (17,8%, n=19), CC90/6B (15%, n=16), CC473/6A (10,3%, n=11), CC8640-9793-9801-13837/19A (2,8%, n=3), 276-2307/19A (2,8%, n=3), CC242-11306/6A,23F (2,8%, n=3) e S-81/23F (2,8%, n=3).

Os isolados multirresistentes caracterizados por MLST representaram 15,7% (n=108/688) e estiveram relacionadas aos CC/sorotipos CC156/14 (38,9%, n=42), CC236/19A (17,6%, n=19), CC90/6B (13,9%, n=15), CC473/6A (3,7%, n=4), CC315-386-11315/6B (2,8%, n=3) e S-81/23F (2,8%, n=3).

Os principais perfis de multirresistência observados no estudo foram relacionados aos CC/sorotipos CC156/14 [PEN-CEF-SXT (34,3%, n=37)], CC236/19A [PEN-CEF-ERI-SXT (12%, n=13) e PEN-ERI-SXT (5,6%, n=6)], CC90/6B [PEN-CEF-ERI-SXT (9,3%, n=10) e PEN-ERI-SXT (4,6%, n=5)] e CC8640-9793-9801-13837/19A [PEN-ERI-SXT (2,8%, n=3)].

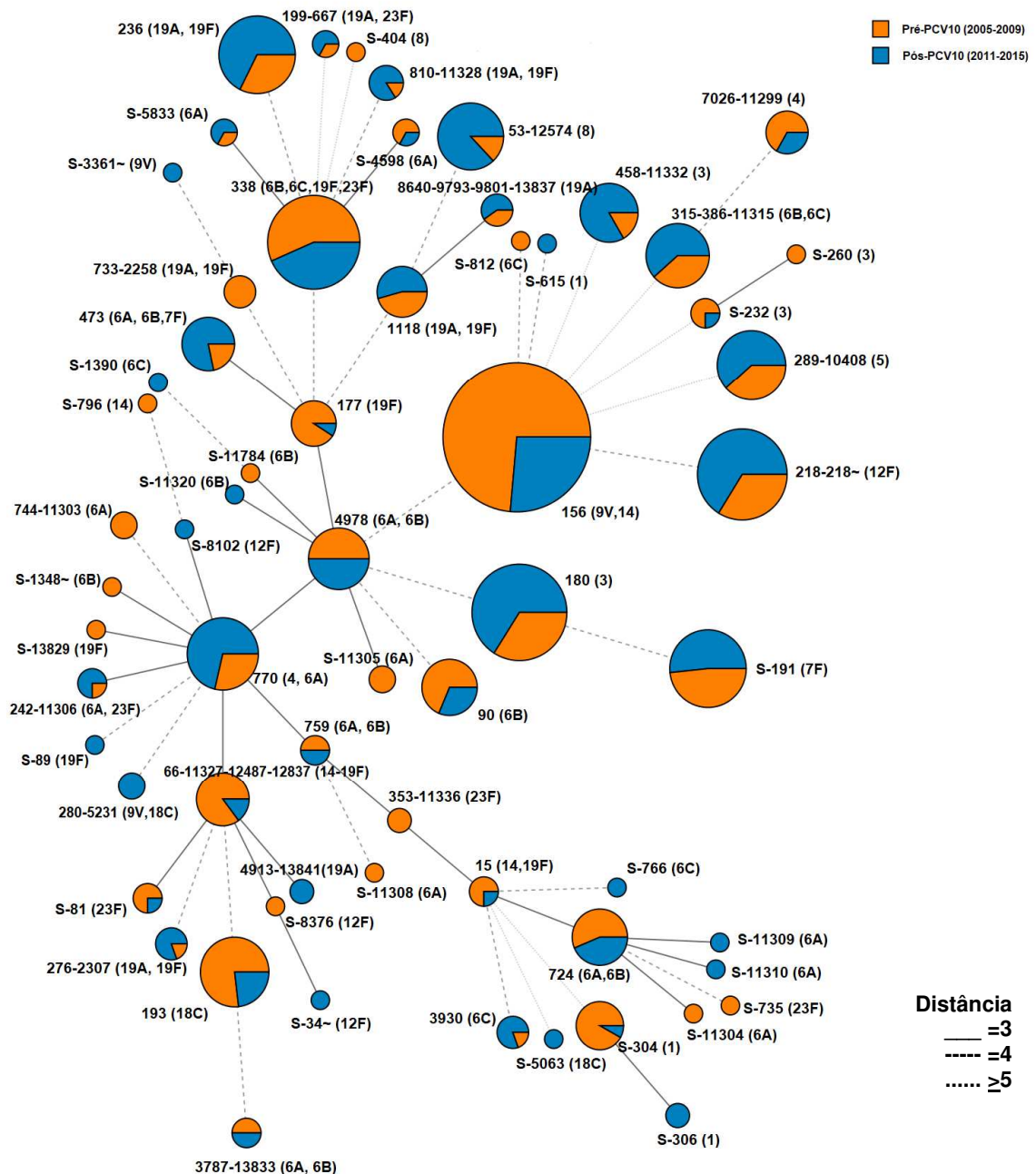


Figura 7 - Distribuição dos complexos clonais de *Streptococcus pneumoniae* isolados de DPI nos períodos pré-PCV10 (2005-2009, laranja) e pós-PCV10 (2011-2015, azul). *Minimum spanning tree* a partir do programa Bionumerics. O tamanho do círculo é proporcional ao número de isolados em cada complexo clonal. Os sorotipos pertencentes aos diferentes complexos clonais estão indicados entre parênteses.

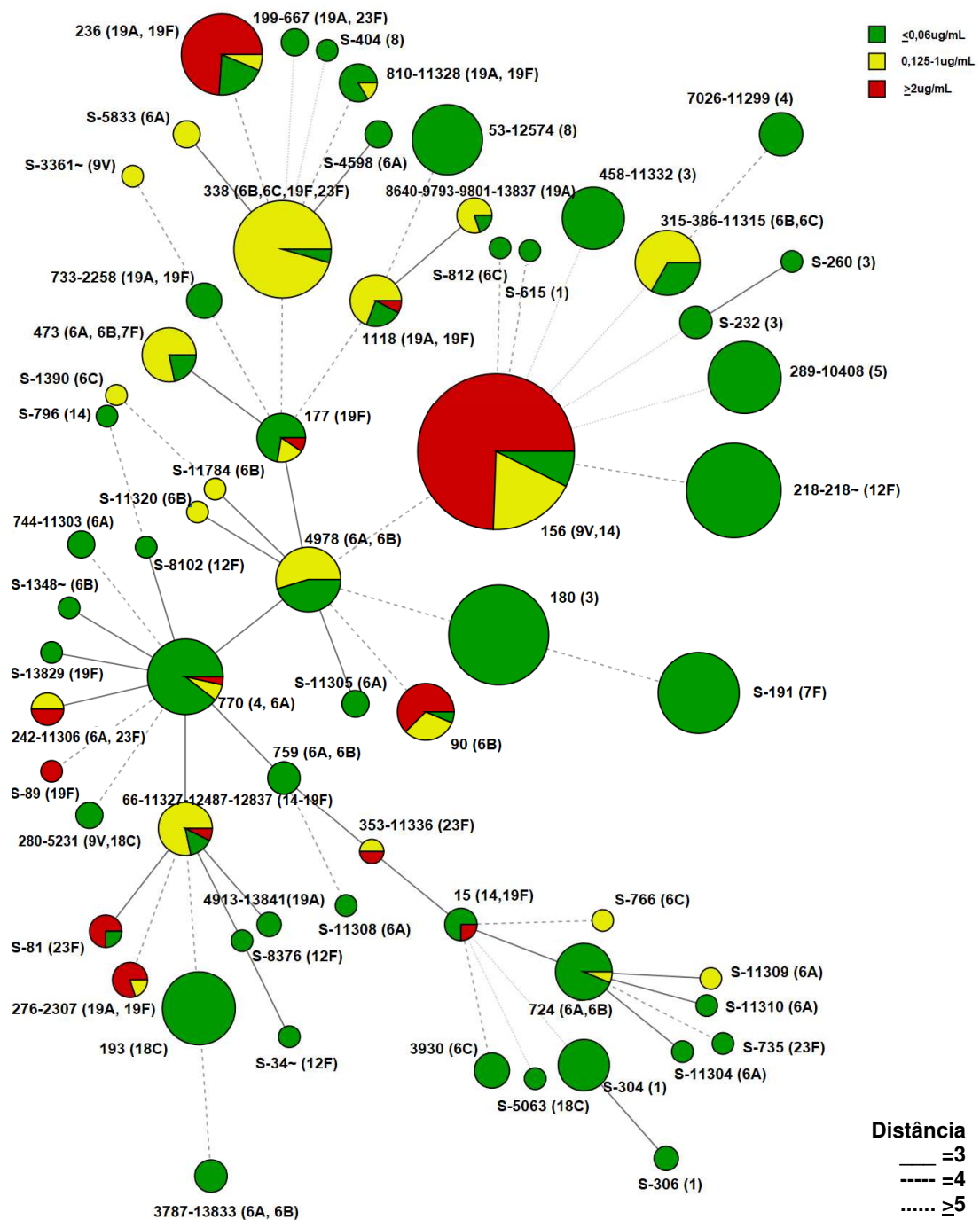


Figura 8 - Distribuição dos complexos clonais de *Streptococcus pneumoniae* isolados de DPI relacionados ao perfil de suscetibilidade a penicilina. *Minimum spanning tree* a partir do programa Bionumerics. O tamanho do círculo é proporcional ao número de isolados em cada complexo clonal. Os sorotipos pertencentes aos diferentes complexos clonais estão indicados entre parênteses.

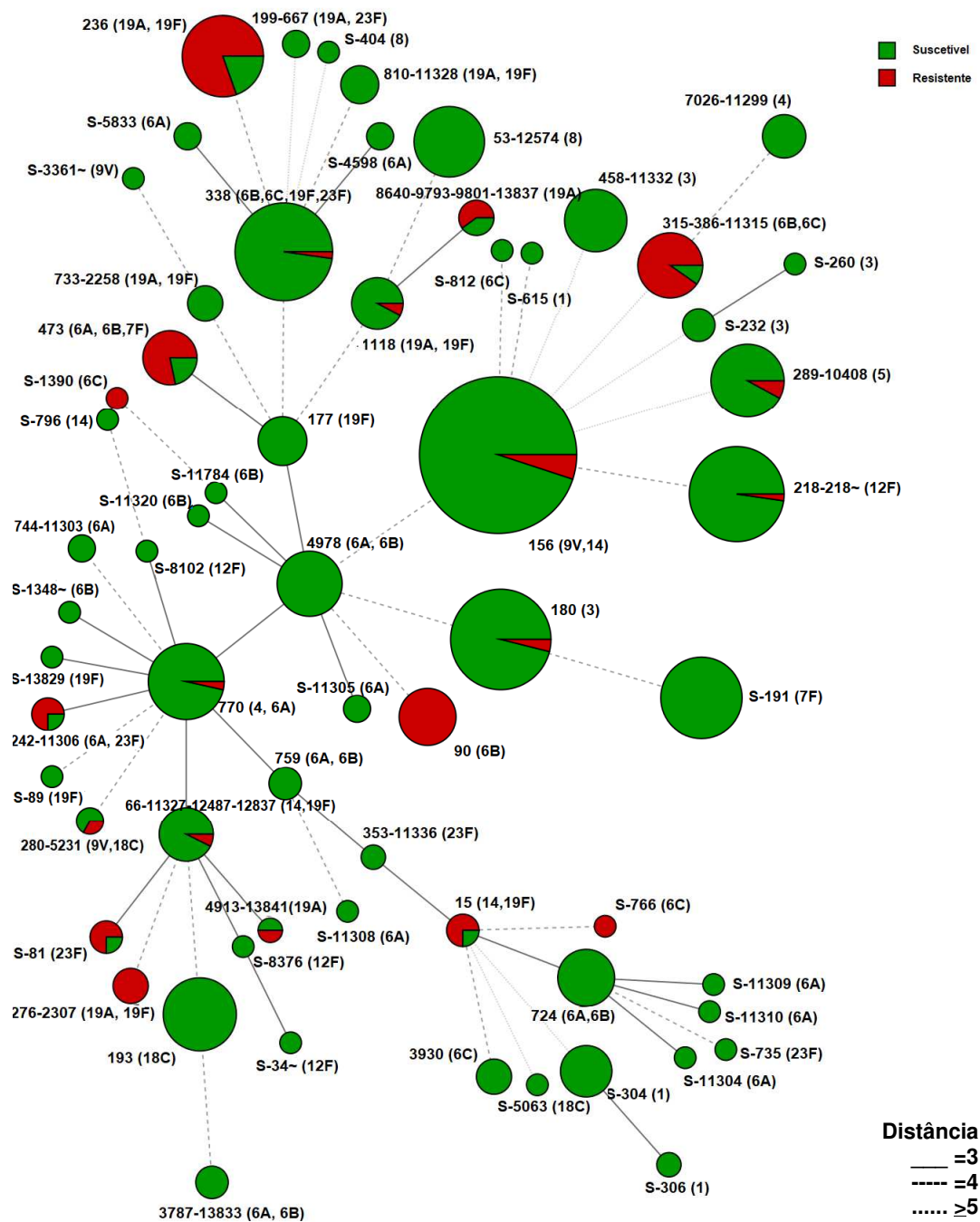


Figura 9 - Distribuição dos complexos clonais de *Streptococcus pneumoniae* isolados de DPI relacionados ao perfil de suscetibilidade a eritromicina. *Minimum spanning tree* a partir do programa Bionumerics. O tamanho do círculo é proporcional ao número de isolados em cada complexo clonal. Os sorotipos pertencentes aos diferentes complexos clonais estão indicados entre parênteses.

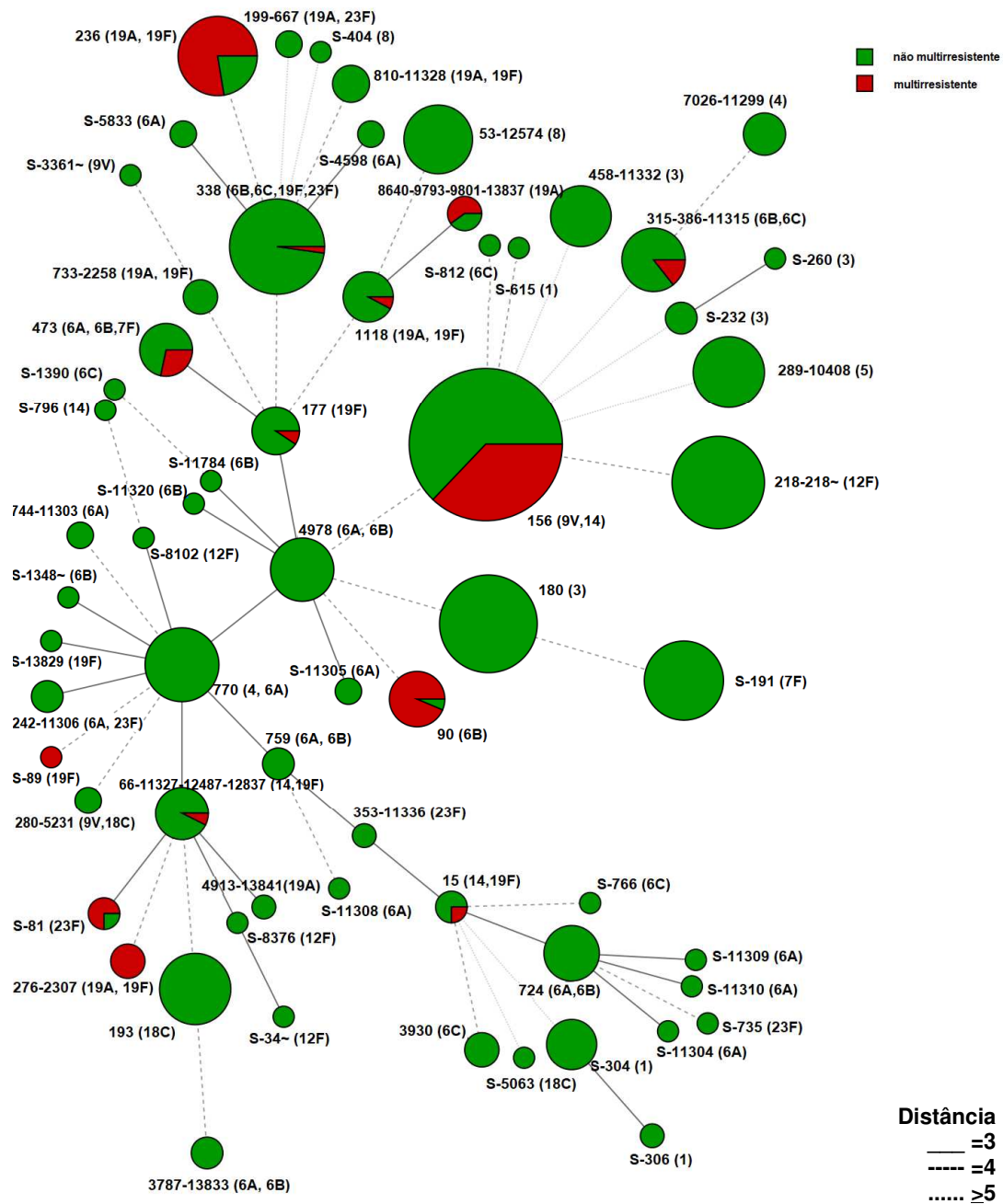


Figura 10 - Distribuição dos complexos clonais de *Streptococcus pneumoniae* isolados de DPI relacionados ao perfil de multirresistência. *Minimum spanning tree* a partir do programa Bionumerics. O tamanho do círculo é proporcional ao número de isolados em cada complexo clonal. Os sorotipos pertencentes aos diferentes complexos clonais estão indicados entre parênteses.

5 DISCUSSÃO

Este estudo mostrou a distribuição dos sorotipos e perfil de resistência de *S. pneumoniae* isolados de quadros de DPI antes e após sete anos (2010-2017) da introdução da vacina PCV10 no programa nacional de imunização infantil (PNI) no Brasil, bem como evidenciou as linhagens genéticas dos sorotipos prevalentes.

Estudos sobre impacto da PCVs investigando a prevalência dos sorotipos antes e após o uso destas vacinas têm sido amplamente utilizados e mostram uma redução dos sorotipos incluídos nas formulações vacinais e aumento dos sorotipos não incluídos nestas formulações. O monitoramento da prevalência dos sorotipos não vacinais por período de tempo mais prolongado após a introdução da vacinação é fundamental para se avaliar a sustentabilidade destes sorotipos como causa de DPI, frente à ocorrência das flutuações sazonais e seculares dos sorotipos (Pichon et al., 2013; Cohen; Biscardi; Levy, 2016; Savulescu et al., 2017).

Como observado neste estudo, os sorotipos presentes na PCV10 diminuíram consideravelmente no período pós-PCV10-tardio (69,6%) levando a uma alteração na distribuição dos sorotipos que causam a DPI após um período de 7 anos de uso da PCV10.

As maiores reduções nos sorotipos PCV10, independentemente do diagnóstico clínico, foram observadas nas populações alvo para vacina PCV10, crianças de 2m-4a (90,3% no diagnóstico meningite e 89,8% não-meningite) e também nos indivíduos com $\geq 65a$ (82,8% e 60,0%, respectivamente), mostrando um efeito vacinal direto na população de crianças alvo da vacina e um efeito vacinal indireto de rebanho nos idosos, o qual é extremamente importante para o controle da DPI.

A faixa etária de 5-9a, também classificada como população alvo para vacina PCV10, apresentou menores valores de variação percentual

(66,9% no diagnóstico meningite e 68,1% não-meningite) nos períodos pós-PCV10-imediato e tardio. Nesta faixa etária estão as crianças que receberam esquemas vacinais diversificados devido a presença do *catch up* no ano de introdução da vacina (2010), que poderiam ter sido responsáveis por um menor impacto na eliminação dos sorotipos PCV10 nesta faixa etária. Outro fator importante a ser ressaltado seria a menor taxa de portação de pneumococo na nasofaringe, que pode resultar em menores taxas de DPI.

Após o período de 7 anos de uso da PCV10, a distribuição de sorotipos passou a ser mais relacionada aos sorotipos não-PCV10, os quais no período pós-PCV10-tardio aumentaram 105,8% e foram mais associados a uma elevação na prevalência dos sorotipos PCV13 (%*change* 122,1%) e SNV (%*change* 98,1%), reforçando a presença do fenômeno de *replacement* ou substituição de sorotipos também identificado em outros estudos como consequência da introdução das PCVs (Weinberger; Malley; Lipsitch, 2011; Hausdorff; Hanage, 2016; Varghese; Jayaraman; Veeraghavan, 2017).

Com relação ao perfil de suscetibilidade dos isolados estudados foi evidenciado que o período pós-PCV10 foi marcado pelo aumento da suscetibilidade a diferentes antimicrobianos, a mencionar penicilina, ceftriaxona e sulfametoxazol-trimetoprim. Este evento pode ser relacionado a redução dos sorotipos PCV10, principalmente ao 6B, 9V, 14, 19F e 23F, tradicionalmente associados aos perfis de alta resistência antimicrobiana no período pré-PCV10 (Cohen; Biscardi; Levy, 2016; Naucler et al., 2017). Para os antimicrobianos cloranfenicol e eritromicina foi detectada elevação da resistência.

A multirresistência foi marcada pela redução em sua frequência total entre os períodos pré (10,3%) e pós-PCV10-tardio (%*change* -10,6%). No entanto, observamos um aumento na frequência dos perfis que possuem o antimicrobiano eritromicina, PEN-ERI-SXT (9,3% para 24,2%) e PEN-CEF-ERI-SXT (13,8% para 61,3%) no período pós-PCV10-tardio.

Como observado em outros estudos, a estratificação dos dados de suscetibilidade aos antimicrobianos frente aos diferentes sorotipos evidenciou que, no período pós-PCV10, a resistência antimicrobiana esteve relacionada aos sorotipos 6C (Gertz et al., 2010; Rolo et al., 2011; Van der Linden et al., 2013b; Kim et al., 2016; Neves et al., 2017) e 19A (Choi et al., 2008; Moore et al., 2008; Van der Linen et al., 2013a; Cohen; Biscardi; Levy, 2016; Kim et al., 2016; Isturiz et al., 2017), caracterizados por possuírem suscetibilidade diminuída a penicilina e a eritromicina, sendo o sorotipo 19A relacionado a multirresistência antimicrobiana.

A amostragem de *S. pneumoniae* caracterizada molecularmente antes e após a introdução da PCV10 revelou a ampla diversidade genética presente entre os isolados no Brasil, detectou 182 STs com agrupamento em 33 complexos clonais e 30 singletons.

O período pré-PCV10 foi marcado pela presença de CCs e por clones internacionais relacionados, principalmente, aos sorotipos PCV10, acompanhando a prevalência e resistência antimicrobiana destes sorotipos neste período.

Também foi registrada a presença de clones internacionais (Holanda³-31, Holanda⁸-33 e Dinamarca^{12F}-34) e de linhagens genéticas (ST320/19A, ST2777/6C e ST386/6C) relacionados aos sorotipos PCV13 ou SNV que, devido ao aumento na frequência nestes sorotipos, passaram a ter maior representatividade no período pós-PCV10.

Apesar da diminuição global dos sorotipos PCV10, a estratificação dos dados revelou uma queda menos pronunciada para os sorotipos 4, 5 e 7F, principalmente relacionado ao isolamento destes sorotipos na faixa etária de indivíduos não alvo da vacina. Entre as hipóteses para estas observações citamos:

- Os estudos de determinação do potencial invasivo dos diferentes sorotipos que evidenciaram que os sorotipos 5 e 7F estão mais associados aos quadros de DPI e menos relacionados ao isolamento a partir da nasofaringe de portadores de *S. pneumoniae* (Del Amo et al.,

2016; Balsells et al., 2018). Uma suposta baixa taxa de colonização por estes sorotipos com alto potencial invasivo somada a redução da circulação destes sorotipos como causa de DPI nos indivíduos alvo da vacina poderia levar a um menor efeito indireto, havendo necessidade de um período de tempo maior para observação da redução destes sorotipos na população não alvo da vacina;

- A oscilação na taxa de cobertura vacinal também poderia ser considerada como hipótese para ausência de redução na frequência dos sorotipos 4, 5 e 7F, uma vez que, dados do Ministério da Saúde apontam uma ampliação da cobertura vacinal nacional da PCV10 entre os anos de 2011 (82%) e 2013 (92%) (Ministério da Saúde, 2015), porém, desde então, variações nos níveis de cobertura vacinal vêm sendo registrados nas diferentes regiões do país, sendo que em 2017 a cobertura registrada no Brasil foi de 86,32% (Ministério da Saúde, 2018d); e

- A possibilidade de variações seculares na frequência para estes sorotipos.

Essas hipóteses devem ser monitoradas com a continuidade da vigilância epidemiológica laboratorial passiva realizada pelo IAL.

Os resultados obtidos na caracterização molecular destes sorotipos 4, 5 e 7F apontam para linhagens genéticas mais conservadas, uma vez que estes sorotipos apresentaram uma baixa diversidade de CCs.

O sorotipo 4 foi relacionado ao CC770. No banco de dados internacional do MLST verificamos o depósito de 2 cepas de *S. pneumoniae* pertencentes a este sorotipo e relacionadas à ST770 na cidade do Rio de Janeiro (MLST, 2018). Na era pós-PCVs, este sorotipo tem sido relacionado a surtos de DPI ocorridos em moradores de rua da cidade de Calgary, Canadá, onde a PCV13 substituiu a PCV7 em 2010, porém as STs (ST205 e ST244) mencionadas não foram evidenciadas no presente estudo (Ricketson et al., 2018).

O sorotipo 5, pertencente ao clone Colômbia⁵-19 (ST289), esteve presente em ambos os períodos estudados. Atualmente, relatos da presença deste clone têm ocorrido em Gâmbia, onde, desde a era pré-introdução da PCV13, este sorotipo se mantém como um dos mais prevalentes na DPI (Ashu et al., 2016; Ngwa et al., 2018).

O sorotipo 7F foi classificado, quase na totalidade dos isolados estudados, no singleton S-191 (clone Holanda^{7F}-39), pouco relacionado à resistência antimicrobiana e, de acordo com o banco de dados internacional do MLST, globalmente disseminado (MLST, 2018).

Entre os sorotipos PCV10, o estudo de caracterização molecular evidenciou que os sorotipos PCV10 1 e 18C também apresentaram baixa variabilidade genética.

Entre as cepas do sorotipo 1, detectamos a presença de três diferentes clones internacionais, EUA¹-29, Suécia¹-28 e Suécia¹-40. Os clones Suécia¹-40 (Chiou et al., 2008) e EUA¹-29 (dados IAL) foram descritos no Brasil desde meados da década de 90, sendo também descritos em outros países da América Latina (Žemlicková et al., 2005). Esta estabilidade clonal do sorotipo 1 tem sido associada a sua baixa prevalência e densidade na nasofaringe de portadores que resulta em uma oportunidade reduzida de trocas genéticas entre as linhagens (Bruggemann; Spratt, 2003). Apesar do sorotipo 1 ter sido uma das causas mais frequentes de DPI no Brasil durante a última década, uma redução no isolamento do sorotipo 1 foi verificada mesmo antes da introdução da PCV10 no Brasil, em 2010, o que pode ser relacionada à flutuação cíclica natural deste sorotipo reconhecida globalmente (Brandileone et al., 2003; Chiou et al., 2008; Mantese et al., 2009; Hausdorff; Hanage, 2016).

O sorotipo 18C foi, basicamente, relacionado ao CC193, variante de sorotipo do clone Grécia²¹-30-18C e clone internacionalmente difundido com representantes em diferentes sorotipos (MLST, 2018). No Brasil esse CC193 foi documentado em estudos envolvendo S.

pneumoniae isolados de portadores e de DPI (Azevedo et al., 2016; Neves et al., 2018).

Na era pré-PCV10, o sorotipo 14, juntamente com o sorotipo 6B, mostraram-se os mais prevalentes e associados à multirresistência antimicrobiana. A caracterização molecular do sorotipo PCV10 14 revelou que este sorotipo apresentou uma maior variabilidade de CCs e linhagens genéticas, muitas vezes, compartilhadas por isolados de diferentes sorotipos, como 9V e 19F.

Os sorotipos 9V e 14, prevalentes no período pré-PCV10, foram principalmente representados pelo CC156, caracterizado pela multirresistência, pela presença do clone Espanha^{9V}-3 e sua variante no sorotipo 14, globalmente identificados e presentes no Brasil em isolados de portadores e DPI desde meados 1990 (Kim et al., 2016; Pinto et al., 2016; Neves et al., 2018).

O CC66-11327-12487-12837 se apresentou relacionado aos sorotipos 14 e 19F no período pré-PCV10. As STs pertencentes a este CC são variantes do clone Tennessee¹⁴-18, descritas previamente no Brasil (Žemilicková et al., 2005; Pinto et al., 2016; Neves et al., 2018), mundialmente identificadas em diversos sorotipos e relacionadas com suscetibilidade diminuída a penicilina como descrito no banco internacional do MLST (MLST, 2018).

O sorotipo 19F apresentou uma grande diversidade de linhagens genéticas vinculadas ao período pré-PCV10. Os CC177 e CC236, relacionados aos clones Portugal^{19F}-21 e Taiwan^{19F}-14, respectivamente, foram os principais complexos clonais observados neste estudo. Ambos foram descritos mais recentemente no Brasil (Neves et al., 2018) como característico do período pré-PCV10. No banco de dados internacional do MLST, o CC177 e o CC236 apresentam registro de uma distribuição mais globalizada (MLST, 2018). Neste estudo, o CC177 apresentou uma baixa relação com a resistência antimicrobiana, diferentemente do CC236 altamente relacionado com a resistência e multirresistência antimicrobiana.

Os principais CCs relacionados ao sorotipo 23F foram CC338, CC242-11306 e S-81, contendo representantes dos clones internacionais Colômbia^{23F}-26, Taiwan^{23F}-15 e Espanha^{23F}-1, respectivamente. O CC338 foi descrito anteriormente no país em isolados de DPI e portadores (Caierão et al., 2014; Neves et al., 2018). O CC242-11306 foi encontrado no período pós-PCV10, porém sua presença foi registrada no Brasil desde o período pré-PCV10 (Žemlicková et al., 2005). Os CC338 e CC242-11306 apresentaram um menor nível de resistência à penicilina (0,125-1 µg/mL), enquanto o CC242-11306 foi relacionado com a resistência à eritromicina. Em contraste, o S-81 apresentou uma elevada resistência à penicilina (≥2 µg/mL) e eritromicina, podendo ser relacionado à multirresistência antimicrobiana.

A substituição dos sorotipos PCV10 pelos sorotipos não-PCV10 foi evidenciada pelo aumento dos sorotipos adicionais da PCV13, relacionada aos sorotipos 3 e 19A, ou aos SNV, principalmente associados a elevação na prevalência dos sorotipos 6C, 8 e 12F. De maneira global, a substituição dos sorotipos associados às diferentes formulações das PCVs foi documentada em países que adotaram a ampla utilização destas vacinas em seus calendários de imunização (Esposito; Principi, 2015; Cohen et al., 2017).

O aumento dos sorotipos 19A e 3 observado independentemente do diagnóstico clínico estudado e principalmente relacionado à faixa etária alvo da vacina, crianças com 2m-4a, e aos indivíduos >50a foi observado no Chile, Suécia e Holanda, países que, como o Brasil, introduziram a PCV10 em seus calendários de vacinação (Instituto de Salud Publica Chile, 2016; Naucner et al., 2017; Vissers et al., 2018).

Nossos achados não suportam uma possível proteção cruzada do sorotipo 19F presente na PCV10 contra a DPI causada pelo sorotipo 19A, em contraste com relatos anteriores publicados após um curto período da introdução da PCV10 no Brasil, Finlândia e Canadá (Quebec) (Deceuminck et al., 2015; Domingues et al., 2014; Jokinen et

al., 2015; Verani et al., 2015). Recentemente, estudos realizados na Suécia e Finlândia, em período mais prolongado após a introdução da PCV10, evidenciaram os mesmos resultados observados neste estudo e relataram ausência de reatividade cruzada entre os sorotipos 19F e 19A verificada pelo aumento de DPI causada pelo sorotipo 19A (Naucler et al., 2017; Rinta-Kokko et al., 2018).

O sorotipo 19A passou a ser um dos mais prevalentes como causa de DPI, sendo a sua expansão associada aos países que introduziram as PCV7 ou PCV10 (Moore et al., 2008; Van der Linden et al., 2013a).

No Chile, onde a PCV10 foi introduzida em 2011, a proporção de DPI relacionada ao sorotipo 19A aumentou de 5% para 12% entre os períodos pré e pós-introdução da PCV10, sendo o maior impacto observado entre as crianças com idade inferior a 2a, onde a DPI pelo sorotipo 19A no período pré-PCV10 representava <8% aumentando para 25% após a introdução da PCV10. Este cenário resultou na recomendação para substituição da PCV10 pela formulação PCV13 neste país (Potin et al., 2016). Em 2017 a vacina PCV10 foi substituída pela formulação PCV13 no PNI do Chile (comunicação pessoal Instituto de Salud Publica de Chile).

Dados recentes do sistema de vigilância nacional com base populacional do Reino Unido e País de Gales, um dos primeiros países que introduziu a PCV13 (2010) em substituição a PCV7 (2006), mostraram que a despeito do excelente impacto atingido com a utilização das PCVs na redução da DPI pelos sorotipos vacinais em crianças, extensivo à população de adultos e idosos, foi detectada uma elevação na prevalência do sorotipo 19A, principalmente nos indivíduos $\geq 65a$, indicando que este sorotipo se mantém em circulação depois de 6 anos da introdução da PCV13 (Ladhani et al., 2018). Isto mostra que os estudos de vigilância e impacto das PCVs devem ser constantes a fim de buscarmos uma compreensão mais ampla do uso prolongado destas vacinas e seu efeito protetor.

Desde a introdução do uso das PCVs, o aumento da frequência do sorotipo 19A tem sido relacionado à expansão da ST320 multirresistente aos antimicrobianos (Deng et al., 2015; Kim; Lee; Kim, 2016; Balsells et al., 2017; Agudelo; Antonio; Castañeda, 2018; Setchanova et al., 2018). A caracterização molecular revelou o CC236 no qual identificamos a presença da ST320 (DLV Taiwan^{19F}-14), presente principalmente no sorotipo 19A desde o período pré-PCV10, sendo detectada em um isolado do sorotipo 19F no período pós-PCV10.

Este estudo documentou a elevação da prevalência do sorotipo 19A associado à multirresistência no período pós-PVC10, relacionada à expansão da ST320 DLV Taiwan^{19F}-14, presente no Brasil desde o período pré-PCV10. Múltiplos fatores podem ser associados à elevação na frequência do sorotipo 19A/ST320, como a pressão vacinal levando ao *switch* capsular do sorotipo 19F para 19A e a uma vantagem adaptativa da multirresistência aos antimicrobianos, que podem ter propiciado um aumento da colonização por este sorotipo na nasofaringe, pré-requisito para o desenvolvimento da DPI.

A presença do sorotipo 19A/ST320 foi registrada pelo IAL nos estudos de portadores realizados em 2010, 2013 (Cassiolato, 2015; Brandileone et al., 2016) e 2017 (dados do IAL). A ST320 representou 11,1% (1/9), 20% (2/10) e 68,7% (22/32) dos sorotipos 19A isolados nos estudos de portadores realizados nos períodos pré-PCV10 (2010), pós-PCV10-imediate (2013) e pós-PCV10-tardio (2017), respectivamente. É importante ressaltar que 19A/ST320 passou a ter maior representatividade no último estudo realizado em 2017 ainda em fase de publicação (dados do IAL).

Globalmente, o mecanismo pelo qual a frequência do sorotipo 19A aumentou não é totalmente claro. Embora possa ser atribuído ao fenômeno de substituição de sorotipos, eventualmente ocorrido com a introdução da PCV7 ou PCV10 (Isturiz et al., 2017) este aumento do 19A não foi observado unicamente após a introdução das PCVs. Sua frequência aumentou, por exemplo, na DPI na Coreia (Choi et al., 2008) e

em casos de otite-média aguda em Israel (Dagan et al.,2009), mesmo antes da introdução do PCV7. O mecanismo adicional importante que poderia ser relacionado a este aumento seria da resistência aos antimicrobianos, uma vez que grande parte do aumento no sorotipo 19A na era pós PCVs têm sido relacionado ao isolamento de clones resistentes ou multirresistentes aos antimicrobianos.

Já o aumento de prevalência no sorotipo 3 é preocupante, pois este sorotipo tem sido associado a quadros de pneumonia grave e alta mortalidade em pacientes adultos (Garcia-Vidal et al., 2010; Burgos et al., 2014; Horácio et al., 2016; Ladhani et al., 2018). Recentemente, Azarian et al. (2018) documentaram a presença de multirresistência antimicrobiana (resistência principalmente a eritromicina, clindamicina e tetraciclina) em cepas do sorotipo 3.

Em países que adotaram a vacina PCV13, o sorotipo 3 permanece como um desafio pois dados de eficácia desta vacina revelaram baixo impacto na prevenção da DPI causada por este sorotipo (Andrews et al., 2014; Moore et al., 2015; Silva-Costa et al., 2018). A síntese da cápsula do sorotipo 3 resulta em um polissacarídeo que não é covalentemente ligado ao peptidoglicano e que pode ser liberado durante o crescimento bacteriano (Choi et al., 2016; Silva-Costa et al., 2018). Choi et al. (2016), em seu estudo *in vitro* e *in vivo* em ratos, hipotetizaram que a liberação deste polissacarídeo durante o crescimento poderia reduzir a proteção mediada pelos anticorpos anti-sorotipo 3, que seriam inativados pelos fragmentos de polissacarídeos deixando de se ligarem à bactéria íntegra, não exercendo seu papel opsonizante o que poderia explicar a menor eficácia deste componente na vacina PCV13.

Conforme documentado tanto no período pré como no pós-PCV10, os sorotipos SNV mostraram grande diversidade. Destacamos a elevação das prevalências dos sorotipos 6C, 8 e 12F no período pós-PCV10-tardio, não relacionadas ao diagnóstico clínico, mas vinculada ao grupo de indivíduos ≥ 50 anos.

O aumento da prevalência dos sorotipos 8 e 12F também foi relatada após a introdução das PCVs nos EUA (Moore et al., 2015; Hulten, 2018), Europa (Cohen; Biscardi; Levy, 2016; Naucler et al., 2017; Vestjens et al., 2017; Ladhani et al., 2018), Ásia (Jaiswal et al., 2014; Ikuse et al., 2018) e Oriente Médio (Rokney et al., 2018).

A caracterização molecular pelo MLST de cepas pertencentes aos sorotipos 3, 8 e 12F revelou a presença de três clones internacionais, Holanda³-31 (CC180), Holanda⁸-33 (CC53-12574) e Dinamarca^{12F}-34 (CC218), respectivamente associados a esses sorotipos. Neves et al. (2018), estudando cepas isoladas no Rio de Janeiro, documentou a presença destes clones em seu estudo de colonização em crianças, porém somente o CC53-12574 foi encontrado no período pós-PCV10. Outro estudo de Caierão et al. (2014) realizado em Porto Alegre, em isolados de DPI, documentou a presença destes clones no período pós-PCV10, e os identificou como clones associados a DPI e, portanto, raramente encontrados na nasofaringe. Azevedo et al. (2016) também relatou a presença dos clones Holanda³-31 (pré-PCV) e Dinamarca^{12F}-34 (pós-PCV) em seu estudo envolvendo quadros de meningite em Salvador. Raramente estes clones Holanda³-31 (CC180), Holanda⁸-33 (CC53-12574) e Dinamarca^{12F}-34 (CC218) estão associados à resistência antimicrobiana, porém relatos recentes têm relacionado o clone Holanda³-31 (CC180) a multirresistência antimicrobiana (Azarian et al., 2018).

O SNV 6C foi raramente identificado nos primeiros anos do estudo (período pré-PCV10, 2005-2009), seguido de um aumento ao longo dos períodos pós-PCV10-imediate e tardio, principalmente entre crianças a partir dos 2m de idade e em adultos. Estes dados evidenciam que o sorotipo 6B incluído na PCV10 não induz a proteção cruzada para este sorotipo como mostrado anteriormente em estudo de imunogenicidade e frequência deste sorotipo após introdução da PCV (Park et al., 2008; Van der Linden et al., 2013b).

No Brasil, a alta prevalência do sorotipo 6C foi previamente detectada nos estudos de portadores nasofaríngeos realizados em crianças após 3 a 4 anos da introdução da PCV10 (Brandileone et al., 2016; Neves et al., 2017). No estudo realizado por Brandileone et al. (2016) foi observada uma elevação na prevalência do sorotipo 6C na nasofaringe de crianças de 1,8% (9/501) no período pré-PCV10 (2010) para 11,2% (45/400) no período pós-PCV10- imediato (2013). Novo estudo realizado no período pós-PCV10-tardio (2017), com o mesmo desenho dos anteriores, evidenciou que a prevalência para este sorotipo foi de 17,7% (94/531) (dados do IAL). Os dados do IAL mostram o sorotipo 6C como o mais prevalente na nasofaringe de crianças desde 2013 e após sete anos de introdução do PCV10.

A emergência do sorotipo 6C como causa de DPI também foi relatada após a introdução da PCV em várias localidades, como EUA e Espanha (Gertz et al., 2010; Millar et al., 2010; Rolo et al., 2011).

Por outro lado, foi observada uma redução significativa da frequência do sorotipo PCV13 6A no período pós-PCV10 tardio, na faixa etária de crianças alvo da vacinação com a PCV10 (2m-9a). Esse achado é esperado pois proteção cruzada entre o sorotipo vacinal 6B e o 6A tem sido observada em vários países após a vacinação e em estudos de imunogenicidade das PCVs (Park et al., 2008; Van der Linden et al., 2013b; Rinta-Kokko et al., 2018).

Nossos achados estão de acordo com os dados recentemente publicados no estudo populacional realizado na Suécia que comparou o impacto da PCV10 e da PCV13 neste país. Naucler et al. (2017) relataram uma redução na incidência da DPI associada aos sorotipos vacinais nos municípios suecos que utilizam em seus programas de vacinação as vacinas PCV10 ou PCV13, porém, somente nos municípios que utilizaram a vacina PCV10, foi observada a elevação no isolamento dos sorotipos 6C e 19A com declínio na prevalência do sorotipo 6A, devido provavelmente a proteção cruzada com o 6B.

Isolados do sorogrupo 6, representados pelos sorotipos 6A, 6B e 6C, revelaram uma grande diversidade genética, exatamente como relatado por outras publicações de estudo realizados no Brasil (Neves et al., 2018) e em outros países (Gertz et al., 2010; Rolo et al., 2011; Marimón et al., 2016; Porat et al., 2016; Diamantino-Miranda et al., 2017).

O sorotipo 6A foi marcado pela presença do CC473 resistente a penicilina e a eritromicina, principalmente no período pós-PCV10. A presença deste CC também foi relatada nos EUA, Portugal e na Espanha (Gertz et al., 2010; Rolo et al., 2011; Diamantino-Miranda et al., 2017), porém, em Portugal, este CC foi relacionado ao sorotipo 6C, diferentemente do observado no Brasil, Espanha e EUA (Gertz et al., 2010; Rolo et al., 2011).

No sorotipo 6B, altamente prevalente no período pré-PCV10, foi evidenciado a presença dos clones Espanha^{6B}-2 (ST90) e Polônia^{6B}-20 (ST315), ambos frequentes no período pré-PCV10 e relacionados à resistência. O CC90 é relacionado à multirresistência sua presença foi descrita em Portugal (Diamantino-Miranda et al., 2017), sendo atualmente mais prevalente na Ásia (Shi et al., 2018).

Como mencionado anteriormente, o sorotipo 6C apresentou uma maior prevalência relacionada ao período pós-PCV10. O estudo molecular destacou os CC315-386-11315 (ST386 DLV Polônia^{6B}-20) e CC338 (ST2777 SLV Colômbia^{23F}-26) como prevalentes entre as cepas do sorotipo 6C, sendo que a presença destas variantes sugere um *switch* capsular uma vez que os clones foram descritos nos sorotipos 6B e 23F, respectivamente. A ST386 foi recentemente associada à expansão do CC386 no Brasil, sendo descrita em isolados de portadores e com característica de multirresistência (Neves et al., 2018). Também foi documentada em diferentes países como Portugal, Espanha, Bulgária (Rolo et al., 2011; Diamantino-Miranda et al., 2017; Setchanova et al., 2018) e na China, sendo neste último relacionada ao sorotipo 6B (Shi et al., 2018).

Em linhas gerais, o presente estudo demonstrou o impacto do uso da vacina PCV10 na redução dos sorotipos PCV10, principalmente no período pós-PCV10-tardio. Alta diversidade de sorotipos foi observada após vários anos da introdução da PCV10 evidenciado pela elevação da prevalência dos sorotipos 3 e 19A, incluídos na PCV13, e dos SNV 6C, 8 e 12F, que no período pós PCV10-tardio somaram 41,1% dos isolados identificados.

Este fenômeno de substituição por sorotipos não-PCV10 pode ser ocasionado por diferentes fatores não associados a introdução de vacinas, como a pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos, tendências seculares que podem ocorrer na prevalência dos sorotipos ao longo do tempo, pela presença de sorotipos não vacinais de pneumococos na nasofaringe de portadores e a presença de comorbidades que podem ampliar a suscetibilidade da população a DPI, entre outros fatores (Feikin et al., 2013).

Este estudo teve como base os dados obtidos no IAL através da vigilância laboratorial passiva de isolados de DPI e têm suas limitações.

No decorrer do período de estudo foi verificada um aumento no recebimento de isolados do diagnóstico clínico não-meningite principalmente, no espécime clínico sangue, podendo ser considerada como uma evidência indireta de uma melhoria na vigilância da DPI no país; parte deste resultado, principalmente relacionado ao período pós-PCV10-imediate, pode ser atribuído a melhoria da vigilância de *S. pneumoniae* dos quadros de DPI em dez estados brasileiros introduzido pelo Ministério da Saúde para a realização do estudo de efetividade da PCV10 com desenho caso-controle realizado por Domingues et al (2014), no período 2010 a 2012. Fato este que nos impulsionou a incluir uma análise dos dados de sorotipos e resistência antimicrobiana em um período mais prolongado e após a finalização do estudo de efetividade da PCV10, aqui determinado como período pós-PCV10-tardio (2014–2017).

O Brasil classifica a meningite como uma doença de notificação compulsória e mantém uma vigilância para este agravo. Assim, a coleção de *S. pneumoniae* utilizada neste estudo foi composta por uma grande parcela de isolados de casos de meningite. Já os isolados de *S. pneumoniae* do diagnóstico clínico não-meningite provavelmente estão subestimados uma vez que o país carece de vigilância para estes agravos. No entanto, o número de isolados não-meningite foi suficiente para permitir uma análise da prevalência dos sorotipos.

Os resultados obtidos com a realização deste estudo são importantes para o entendimento da epidemiologia do *S. pneumoniae* no Brasil na era pós-PCV10, uma vez que, o IAL além de ser o laboratório nacional de referência para as meningites bacterianas e infecções pneumocócicas no Ministério da Saúde tem experiência no isolamento, identificação e caracterização de isolados de pneumococo, recebendo durante anos isolados encaminhados pelas mesmas instituições em todo o território brasileiro, o que garante a qualidade e robustez dos dados aqui apresentados.

A amostragem de isolados caracterizados molecularmente possibilitou o conhecimento das linhagens genéticas que circulam entre os pneumococos isolados de DPI no Brasil e servirá de linha de base para os estudos posteriores de vigilância.

Em 2016, o PNI do Ministério da Saúde alterou a administração da vacina PCV10 para 2 + 1 doses (Ministério da Saúde, 2018a). Portanto, seguiremos com o monitoramento das características fenotípicas e moleculares de *S. pneumoniae* a fim de possibilitar a avaliação não somente da adequação deste novo calendário de vacinação, bem como se a elevação na prevalência dos sorotipos 3, 6C, 8, 12F e 19A será sustentada, possibilitando também uma melhor compreensão do quadro de resistência antimicrobiana para o *S. pneumoniae*. Recomendamos esforços na implementação de melhorias na vigilância da DPI, como a inclusão de estudos de base populacional.

6 CONCLUSÕES

Houve mudança na prevalência dos sorotipos, perfil de suscetibilidade antimicrobiana e distribuição de linhagens genéticas de *S. pneumoniae* isolados de DPI, nos períodos pré-PCV10 (2005-2009) e pós-PCV10 (2010-2017).

Ocorreu uma redução dos sorotipos PCV10 independentemente do diagnóstico clínico e faixa etária, evidenciando uma proteção direta e indireta da PCV10 contra a DPI causada pelos sorotipos vacinais. Os sorotipos PCV13, 3 e 19A, e os SNV, 6C, 8 e 12F, permaneceram como os mais prevalentes na DPI nos anos mais recentes do estudo, período pós-PCV10-tardio.

A despeito do aumento da suscetibilidade aos antimicrobianos, ocorrida como resultado da diminuição dos sorotipos PCV10 associados a resistência antimicrobiana, observou-se a elevação da resistência a eritromicina relacionada principalmente aos sorotipos 6C e 19A prevalentes no período pós-PCV10.

A amostragem de isolados caracterizados molecularmente e pertencentes aos sorotipos mais prevalentes no período pré e pós-PCV10 evidenciou a alteração da composição genética da população de pneumococos que acompanhou a alteração na prevalência dos sorotipos nos períodos pré- e pós-PCV10. O estudo evidenciou a ampla diversidade clonal dos isolados de *S. pneumoniae* no Brasil, identificou diversos clones internacionais, principalmente no período pós-PCV10, os clones Holanda³-31 (CC180), Holanda⁸-33 (CC53-12574) e Dinamarca^{12F}-34 (CC218), detectou a expansão clonal no sorotipo 19A/ST320 multirresistente aos antimicrobianos e a presença do 6C/ST386 e 6C/ST2777.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agudelo CI, Antonio R, Castañeda E. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in Latin America and the Caribbean 2010–2015: A systematic review and a time series analysis. *Vaccine* [Internet]. 2018;36:4861–4874.

Alicino C, Paganino C, Orsi A, Astengo M, Trucchi C, Icardi G, et al. The impact of 10-valent and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines on hospitalization for pneumonia in children: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2017; 35(43):5776–85.

Almeida SCG, Cassiolato AP, Amorim CS, Guerra MLLS, Bokermann S, Prado LS, et al. Increase in 19A and 6C serotypes after 5 years of PCV10 routine immunization in Brazil. In: 10th International symposium on pneumococci & pneumococcal diseases, 2016; Glasgow, Scotland.

Almeida SCG, Hawkins PA, Cassiolato AP, Dias UJ, Gladstone, RA, Lo SW, et al. Molecular characterization of *S. pneumoniae* strains isolated from invasive disease in the pre- and post-PCV10 periods in Brazil, 2005 to 2015. In: 11th International symposium on pneumococci & pneumococcal diseases, 2018, Melbourne, Australia.

Almeida ST, Nunes S, Santos Paulo AC, Valadares I, Martins S, Breia F, et al. Low prevalence of pneumococcal carriage and high serotype and genotype diversity among adults over 60 years of age living in Portugal. *PLoS One*. 2014; 9(3):1–10.

Althouse BM, Hammitt LL, Grant L, Wagner BG, Reid R, Larzelere-Hinton F, et al. Identifying transmission routes of *Streptococcus pneumoniae* and sources of acquisitions in high transmission communities. *Epidemiol Infect*. 2017; 145(13):2750–8.

Andrade AL, Ternes YM, Vieira MA, Moreira WG, Lamaro-Cardoso J, Kipnis A, et al. Direct effect of 10-valent conjugate pneumococcal vaccination on pneumococcal carriage in children Brazil. PLoS One. 2014; 9(6):1–8.

Andrade AL, Minamisava R, Policena G, Cristo EB, Domingues CMAS, Brandileone MC de C, et al. Evaluating the impact of PCV-10 on invasive pneumococcal disease in Brazil: A time-series analysis. Hum Vaccines Immunother. 2016; 12(2):285–92.

Andrews NJ, Waight PA, Burbidge P, Pearce E, Roalfe L, Zancolli M, et al. Serotype-specific effectiveness and correlates of protection for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a postlicensure indirect cohort study. Lancet Infect Dis. 2014;14(9):839–46.

Ashu EE, Jarju S, Dione M, Mackenzie G, Ikumapayi UNA, Manjang A, et al. Population structure, epidemiology and antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* serotype 5: prior to PCV-13 vaccine introduction in Eastern Gambia. BMC Infect Dis. 2016;16(1):33:1–7.

Azarian T, Mitchell P, Georgieva M, Thompson CM, Ghoulia A, Pollard AJ, et al. Global emergence and population dynamics of divergent serotype 3 CC180 pneumococci. bioRxiv [Internet]. 2018 [acesso em 12 Jul 2018]. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/05/04/314880>.

Azevedo J, Anjos ES dos, Cordeiro SM, Santos MS dos, Escobar EC, Lobo PR, et al. Genetic profiles and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* non-PCV10 serotype isolates recovered from meningitis cases in Salvador, Brazil. J Med Microbiol. 2016; 65(10):1164–70.

Balsells E, Guillot L, Nair H, Kyaw MH. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the

post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(5):1–20.

Balsells E, Dagan R, Yildirim I, Gounder PP, Steens A, Muñoz-Almagro C, et al. The relative invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* among children after PCV introduction: a systematic review and meta-analysis. *J Infect [Internet]*. 2018. [acesso em 06 Jul 2018]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445318301828?via%3Dihub>.

Bhutta ZA, Das JK, Walker N, Rizvi A, Campbell H, Rudan I, et al. Interventions to address deaths from childhood pneumonia and diarrhoea equitably: what works and at what cost? *Lancet*. 2013; 381(9875):1417–29.

Boers SA, Van der Reijden WA, Jansen R. High-throughput Multilocus Sequence Typing: bringing molecular typing to the next level. *PLoS One*. 2012; 7(7):1–8.

Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4(3):144–54.

Brandileone MC, de Andrade ASS, Di Fabio J, Guerra MLS, Austrian R. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. *J Infect Dis*. 2003;187(8):1206–12.

Brandileone MC de C, Zanella RC, Almeida SCG, Brandao AP, Ribeiro AF, Carvalhanas TRMP, et al. Effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among children in São Paulo, Brazil. *Vaccine*. 2016; 34(46):5604–11.

Brandileone MCC, Almeida SCG, Minamisava R, Andrade AL.

Distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes before and 5 years after the introduction of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *Vaccine*. 2018; 36(19):2559–66.

Brueggemann AB, Spratt BG. Geographic distribution and clonal diversity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates. *J Clin Microbiol*. 2003;41(11):4966–70.

Burgos J, Luján M, Larrosa MN, Fontanals D, Bermudo G, Planes AM, et al. Risk factors for respiratory failure in pneumococcal pneumonia: The importance of pneumococcal serotypes. *Eur Respir J*. 2014;43(2):545–53.

Caierão J, Hawkins P, Sant'anna FH, da Cunha GR, d'Azevedo PA, McGee L, et al. Serotypes and genotypes of invasive *Streptococcus pneumoniae* before and after PCV10 implementation in southern Brazil. *PLoS One*. 2014; 9(10):1–20.

Cassiolato AP. Importância de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 19A isolados de doenças invasivas e de portadores antes e após a introdução da vacina conjugada 10-valente no Brasil. [dissertação]. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças; 2015.

CDC/NCIRD. Pneumococcal vaccination: what you should know. CDC [Internet]. 2017 [acesso em 03 Jul 2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/vaccines/vpd/pneumo/public/index.html>.

CDC/NCIRD/DBD. Fast Extraction of DNA for Streptococcal culture isolates. CDC [Internet]. 2009. [acesso em 18 Jul 2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/streplab/pcr.html>.

Chiou A-C, Andrade SS, Almeida SCG, Zanella RC, Andrade A-L, Brandileone M-C d. C. Molecular assessment of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 in Brazil: evidence of clonal replacement. *J Med*

Microbiol. 2008;57(7):839–44.

Choi EH, Kim SH, Eun BW, Kim SJ, Kim NH, Lee J, et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in children, South Korea. Emerg Infect Dis. 2008;14(2):275–81.

Choi EH, Zhang F, Lu Y, Malley R. Strains Reduces the Protective Effect of Anti-Type 3 CPS Antibodies. Clin Vaccine Immunol. 2016;23(2):162–7.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015a.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015b.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100-27th. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

Cohen R, Biscardi S, Levy C. The multifaceted impact of pneumococcal conjugate vaccine implementation in children in France between 2001 to 2014. Hum Vaccin Immunother. 2016;(2):277–84.

Cohen O, Knoll M, O'Brien K, Ramakrishnan M, Constenla, Privor-Dumm L, et al. Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV) Product Assessment. Int Vaccine Access Center Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. 2017;41(April):1–162.

Cornick JE, Bentley SD. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. Microbes Infect. 2012; 14(7–8):573–83.

Dagan R, Givon-Lavi N, Leibovitz E, Greenberg D, Porat N. Introduction and proliferation of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A clones that cause acute otitis media in an unvaccinated population. *J Infect Dis.* 2009;199(6):776–85.

Deceuninck G, De Serres G, Boulianne N, Lefebvre B, De Wals P. Effectiveness of three pneumococcal conjugate vaccines to prevent invasive pneumococcal disease in Quebec, Canada. *Vaccine.* 2015;33(23):2684–9.

Del Amo E, Esteva C, Hernandez-Bou S, Galles C, Navarro M, Sauca G, et al. Serotypes and clonal diversity of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in the Era of PCV13 in Catalonia, Spain. *PLoS One.* 2016;11(3):1–12.

Deng X, Arya G, Memari N, Mackenzie R, MacMullin G, Low DE, et al. Genetic analysis of invasive pneumococcal isolates from children in Ontario, Canadá, 2007–2012. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(6):594–8.

Devine VT, Jefferies JM, Clarke SC, Faust SN. Nasopharyngeal bacterial carriage in the conjugate vaccine era with a focus on pneumococci. *J Immunol Res [Internet].* 2015. 2015: 1-8. [acesso em 24 Nov 2017]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/394368>.

Diamantino-Miranda J, Aguiar SI, Carriço JA, Melo-Cristino J, Ramirez M. Clonal and serotype dynamics of serogroup 6 isolates causing invasive pneumococcal disease in Portugal: 1999-2012. *PLoS One.* 2017; 12(2):1-8.

Domingues CMAS, Verani JR, Renoier EIM, Brandileone MC de C, Flannery B, Oliveira LH de, 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(6):1-8.

Domínguez-Alegría AR, Pintado V, Barbolla I. Treatment and prevention

of invasive pneumococcal disease. *Rev Clínica Española*. 2018; 218(5):244–52.

eBURST. eBURST V3 [página da web]. 2018. [acesso em 29 Jun 2018]. Disponível em: http://eburst.mlst.net/v3/mlst_datasets/.

Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*. 1998; 144:3049–60.

Esposito S, Principi N. Impacts of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children. *J Immunol Res*. 2015;2015:5–10.

EUCAST. Clinical breakpoints v8.1. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [Internet]. 2018. [acesso em 23 Jun 2018]. Disponível em: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.

Falkenhorst G, Renschmidt C, Harder T, Hummers-Pradier E, Wichmann O, Bogdan C. Effectiveness of the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV23) against pneumococcal disease in the elderly: Systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017; 12(1):1-18.

FastQC. FastQC Babraham Bioinformatics. 2018. [acesso em 19 Jul 2018]. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

Feikin DR, Kagucia EW, Loo JD, Link-Gelles R, Puhan MA, Cherian T, et al. Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate vaccine introduction: a pooled analysis of multiple surveillance sites. *PLoS Med*. 2013;10(9):e1001517.

Feldman C, Anderson R. Current and new generation pneumococcal vaccines. *J Infect*. 2014; 69(4):309–25.

Garcia-Vidal C, Ardanuy C, Tubau F, Viasus D, Dorca J, Liñares J, et al.

Pneumococcal pneumonia presenting with septic shock: host- and pathogen-related factors and outcomes. Thorax. 2010;65(1):77–81.

GBD 2013 Mortality and Causes of Death. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. 2015; 385(385):117–71.

Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted I, Klugman KP, Jones C, et al. Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(3):871–99.

Gertz RE, Li Z, Pimenta FC, Jackson D, Juni BA, Lynfield R, et al. Increased penicillin nonsusceptibility of nonvaccine-serotype invasive pneumococci other than serotypes 19A and 6A in post-7-valent conjugate vaccine era. J Infect Dis. 2010;201(5):770–5.

GPS, Global Pneumococcal Sequencing Project (GPS). 2016. [acesso em 29 Jun 2018]. Disponível em: <https://www.pneumogen.net/gps/index.html>.

Grando IM, Moraes C de, Flannery B, Ramalho WM, Horta MA, Pinho DL, et al. Impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis in children up to two years of age in Brazil. Cad Saude Publica. 2015; 31(2):276–84.

Hausdorff WP, Hanage WP. Interim results of an ecological experiment - Conjugate vaccination against the pneumococcus and serotype replacement. Hum Vaccin Immunother. 2016; 12(2):358–74.

Hausdorff WP, Hoet B, Adegbola RA. Predicting the impact of new pneumococcal conjugate vaccines: serotype composition is not enough. Expert Rev Vaccines. 2015; 14(3):413–28.

Horácio AN, Silva-Costa C, Lopes JP, Ramirez M, Melo-Cristino J, Vaz T, et al. Serotype 3 remains the leading cause of invasive pneumococcal

disease in adults in Portugal (2012-2014) despite continued reductions in other 13-valent conjugate vaccine serotypes. *Front Microbiol.* 2016;7(Oct):1–11.

Hulten KG. The changing epidemiology of pneumococcal diseases. *Lancet Infect Dis.* 2018;3099(18):23–4.

Instituto de Salud Publica Chile. Comportamiento de *Streptococcus pneumoniae* serotipos 3 y 19A en Chile, años 2007 – 2015. Boletín de Vigilancia de Laboratorio Instituto de Salud Pública de Chile [Internet]. 2016 [acceso em 30 Ago 2018]. Disponível em: http://www.ispch.cl/sites/default/files/Boletin_S.pneumoniae_19A_y_3.pdf http://www.ispch.cl/sites/default/files/Boletin_S.pneumoniae_19A_y_3.pdf, accedido el 9 Agosto del 2016.

Ikuse T, Habuka R, Wakamatsu Y, Nakajima T, Saitoh N, Yoshida H, et al. Local outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 12F caused high morbidity and mortality among children and adults. *Epidemiol Infect.* 2018;1–4.

Isturiz R, Sings HL, Hilton B, Arguedas A, Reinert RR, Jodar L. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A: worldwide epidemiology. *Expert Rev Vaccines.* 2017;16(10):1007–27.

Jaiswal N, Singh M, Das RR, Jindal I, Agarwal A, Thumburu KK, et al. Distribution of serotypes, vaccine coverage, and antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus pneumoniae* in children living in SAARC countries: A systematic review. *PLoS One.* 2014;9(9): e108617.

Jansen KU, Anderson AS. The role of vaccines in fighting antimicrobial resistance (AMR). *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2018; 0(0):1–8. [acceso em 18 Jul 2018]. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2018.1476814>.

Jauneikaite E, Tocheva AS, Jefferies JM, Gladstone RA, Faust SN, Christodoulides M, et al. Current methods for capsular typing of

- Streptococcus pneumoniae*. J Microbiol Methods. 2015; 113:41–9.**
- Johnson AP. Surveillance of antibiotic resistance. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2015; 370:1–12.**
- Jokinen J, Rinta-Kokko H, Siira L, Palmu AA, Virtanen MJ, Nohynek H, et al. Impact of ten-valent pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease in Finnish children - A population-based study. PLoS One. 2015;10(3):1–11.**
- Kim L, Mcgee L, Tomczyk S, Beall BW. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: A United States perspective. Clin Microbiol Rev. 2016;29(3):525–52.**
- Kim HW, Lee S, Kim KH. Serotype 6B from a pneumococcal polysaccharide vaccine induces cross-functional antibody responses in adults to serotypes 6A, 6C, and 6D. Medicine (Baltimore). 2016;95(37):e4854.**
- Kobayashi M, Bennett NM, Gierke R, Almendares O, Moore MR, Whitney CG, et al. Intervals between PCV13 and PPSV23 vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2015; 64(34):944–7.**
- Ladhani SN, Collins S, Djennad A, Sheppard CL, Borrow R, Fry NK, et al. Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000–17: a prospective national observational cohort study. Lancet Infect Dis. 2018;18(4):441–51.**
- Madhi SA. Pneumococcal conjugate vaccine and changing epidemiology of childhood bacterial meningitis. J Pediatr. 2015; 91(2):108–10.**
- Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske**

CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268–81.

Mantese OC, Paula A de, Almeida VVP, Aguiar PADF de, Wolkers PCB, Alvares JR, et al. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of pneumococcus in children: analysis of 9 years. *J Pediatr (Rio J).* 2009;85(6):495–502.

Marimón JM, Ercibengoa M, Tamayo E, Alonso M, Pérez-Trallero E. Long-term epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* serogroup 6 in a region of southern Europe with special reference to serotype 6E. *PLoS One.* 2016;11(2):10–4.

Millar E V., Pimenta FC, Roundtree A, Jackson D, Carvalho M da G, Perilla MJ, et al. Pre- and post-conjugate vaccine epidemiology of pneumococcal serotype 6C invasive disease and carriage within Navajo and White Mountain Apache Communities. *Clin Infect Dis.* 2010; 51(11):1258–65.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais. 4^a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações: aspectos históricos dos calendários de vacinação e avanços dos indicadores de coberturas vacinais, no período de 1980 a 2013. *Bol Epidemiológico.* 2015; 46(30):1–13.

Ministério da Saúde. Calendário Vacinal 2018. Ministério da Saúde [Internet]. 2018a [acesso em 02 Jun 2018]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/jpg/2018/janeiro/30/calendario-vacinal-2018.jpg>.

Ministério da Saúde. Meningite casos confirmados, óbitos, incidência e letalidade 2010-2013. Ministério da Saúde [Internet]. 2018b. [acesso em 07 Jul 2018]. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/agosto/21/Tabela-Meningite-Obitos-incid-ncia.pdf>.

Ministério da Saúde. TabNet MENINGITE - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil. Ministério da Saúde [Internet]. 2018c. [acesso em 07 Jul 2018]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/meninbr.def>.

Ministério da Saúde. TabNet Imunização-cobertura-Brasil – Coberturas vacinais por ano segundo região. Ministério da Saúde [Internet]. 2018d. [acesso em 13 Ago 2018]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?pni/cnv/cpniuf.def>.

MLST. *Streptococcus pneumoniae* MLST Home Page [página da web]. 2018. [acesso em 29 Jun 2018]. Disponível em: <https://pubmlst.org/spneumoniae/>.

Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, Van der Poll T, van de Beek D, Der T Van, Poll T Van Der, et al. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24(3):557–91.

Moore MR, Gertz RE, Woodbury RL, Barkocy-Gallagher GA, Schaffner W, Lexau C, et al. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. *J Infect Dis.* 2008; 197(7):1016–27.

Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W, Lynfield R, Lexau C, Bennett NM, et al. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: Analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(3):301–9.

Naucler P, Galanis I, Morfeldt E, Darenberg J, Örtqvist Å, Henriques-Normark B. Comparison of the impact of pneumococcal conjugate vaccine 10 or pneumococcal conjugate vaccine 13 on invasive pneumococcal disease in equivalent populations. *Clin Infect Dis*. 2017;65(11):1780–9.

Neves FPG, Cardoso NT, Snyder RE, Marlow MA, Cardoso CAA, Teixeira LM, et al. Pneumococcal carriage among children after four years of routine 10-valent pneumococcal conjugate vaccine use in Brazil: The emergence of multidrug resistant serotype 6C. *Vaccine*. 2017;35(21):2794–800.

Neves FPG, Cardoso NT, Souza AR V., Snyder RE, Marlow MM, Pinto TCA, et al. Population structure of *Streptococcus pneumoniae* colonizing children before and after universal use of pneumococcal conjugate vaccines in Brazil: emergence and expansion of the MDR serotype 6C-CC386 lineage. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73(5):1206–12.

Ngwa D, Senghore M, Worwui A, Pe T, Okoi C, Salaudeen R, et al. Genomic epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* serotype 5 pre and post introduction of PCV13 in The Gambia. In: *International Journal of Infectious Diseases*. Melbourne, Austrália; 2018.

Novaes HMD, Sartori AMC, Soárez PC De. Hospitalization rates for pneumococcal disease in Brazil, 2004-2006. *Rev Saude Publica*. 2011; 45(3):539–47.

O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009; 374(9693):893–902.

Oliveira LH de, Camacho LAB, Coutinho ESF, Martinez-Silveira MS, Carvalho AF, Ruiz-Matus C, et al. Impact and effectiveness of 10 and 13-

valent pneumococcal conjugate vaccines on hospitalization and mortality in children aged less than 5 years in Latin American Countries: a systematic review. *PLoS One*. 2016; 11(12):1-25.

Page AJ, Taylor B, Keane JA. Multilocus sequence typing by blast from de novo assemblies against PubMLST. *J Open Source Softw*. 2016; 1(8):10–1.

Park IH, Moore MR, Treanor JJ, Pelton SI, Pilishvili T, Beall B, et al. Differential Effects of Pneumococcal Vaccines against Serotypes 6A and 6C. *J Infect Dis*. 2008;198(12):1818–22.

Parkhill J, Quail MA, Hunt M, Silva N de, Keane JA, Page AJ, et al. Robust high-throughput prokaryote de novo assembly and improvement pipeline for Illumina data. *Microb Genomics*. 2016; 2(8):1–7.

Pichon B, Ladhani SN, Slack MPE, Segonds-Pichon A, Andrews NJ, Waight PA, et al. Changes in molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis following introduction of pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales. *J Clin Microbiol*. 2013;51(3):820–7.

Pinto TCA, Kegele FCO, Dias C, Barros RR, Peralta JM, Merquior VLC, et al. *Streptococcus pneumoniae* serotypes 9 and 14 circulating in Brazil over a 23-year period prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine: role of international clones in the evolution of antimicrobial resistance and description of a novel genotype. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(11):6664–72.

Pittet LF, Posfay-Barbe KM. Pneumococcal vaccines for children: a global public health priority. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(5):25–36.

PMEN. Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN) [página da web]. 2014. [acesso em 27 Jun 2018]. Disponível em: <https://www.pneumogen.net/pmen/>.

Porat N, Benisty R, Givon-Lavi N, Trefler R, Dagan R. The impact of pneumococcal conjugate vaccines on carriage of and disease caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6C and 6D in southern Israel. *Vaccine*. 2016; 34(25):2806–12.

Potin M, Fica A, Wilhem J, Cerda J, Contreras L, Escobar C, et al. Opinión del Comité Consultivo de Inmunizaciones Sociedad Chilena de Infectología: vacuna neumocócica conjugada en niños y la emergencia de serotipo 19A. *Rev Chil infectología*. 2016; 33(3):304–6.

Principi N, Terranova L, Zampiero A, Montinaro V, Lerardi V, Rios WP, et al. Pharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in older children and adolescents in a geographical area characterized by relatively limited pneumococcal vaccination coverage. *Pediatr Infect Dis J*. 2015; 34(4):426–32.

Rayner RE, Savill J, Hafner LM, Huygens F. Genotyping *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol*. 2015; 10(4):653–64.

Ricketson L, Vanderkooi O, Pyra S, MacDonald J, Kellner J, CASPER invesGgators. Persistence of vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease after introduction of the 13-valent vaccine in Calgary, Canada. In: 11th International symposium on pneumococci & pneumococcal diseases, 2018, Melbourne, Australia.

Rinta-Kokko H, Palmu AA, Auranen K, Nuorti JP, Toropainen M, Siira L, et al. Long-term impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease among children in Finland. *Vaccine*. 2018;36(15):1934–40.

Rodrigues CMC, Maiden MCJ. A world without bacterial meningitis: how genomic epidemiology can inform vaccination strategy. *F1000 Research*. 2018; 7:1–13.

Rokney A, Ben-Shimol S, Korenman Z, Porat N, Gorodnitzky Z, Givon-Lavi N, et al. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 12F

after Sequential Introduction of 7- and 13-Valent Vaccines, Israel. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(3):453–61.

Rolo D, Fenoll A, Ardanuy C, Calatayud L, Cubero M, Campa AG de la, et al. Trends of invasive serotype 6C pneumococci in Spain: Emergence of a new lineage. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(8):1712–8.

Sartori AMC, Novaes CG, Soárez PC de, Toscano CM, Novaes HMD. Estimating health service utilization for treatment of pneumococcal disease: The case of Brazil. *Vaccine.* 2013; 31:C63–71.

Savulescu C, Krizova P, Lepoutre A, Mereckiene J, Vestrheim DF, Ciruela P, et al. Effect of high-valency pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in children in SpIDnet countries: an observational multicentre study. *Lancet Respir Med.* 2017; 5(8):648–56.

SBIM. Calendário Vacinal SBIm 2017/2018. SBIM [Internet]. 2018. [acesso em 03 Mar 2018]. Disponível em: <https://sbim.org.br/images/calendarios/calend-sbim-0-100.pdf>.

Schroeder MR, Stephens DS. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016; 6:1–9.

Scotta MC, Veras TN, Klein PC, Tronco V, Polack FP, Mattiello R, et al. Impact of 10-valent pneumococcal non-typeable Haemophilus influenzae protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) on childhood pneumonia hospitalizations in Brazil two years after introduction. *Vaccine.* 2014;32(35):4495–9.

Setchanova L, Alexandrova A, Pencheva D, Sirakov I, Mihova K, Kaneva R, et al. Rise of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones expressing nonvaccine serotypes among children after introduction of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Bulgaria. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018;15:6–11.

Sgambatti S, Minamisava R, Bierrenbach AL, Toscano CM, Vieira MA, Policena G, et al. Early impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in childhood pneumonia hospitalizations using primary data from an active population-based surveillance. *Vaccine*. 2016; 34(5):663–70.

Shi W, Liu Y, Meng Q, Yuan L, Gao W, Yao K. Antimicrobial susceptibility and fluctuations in clonal complexes of serogroup 6 *Streptococcus pneumoniae* isolates collected from children in Beijing, China, between 1997 and 2016. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2018 [acesso em 30 Ago 2018]; Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838217307876>.

Silva-costa C, Brito MJ, Pinho MD, Friães A, Aguiar SI, Ramirez M, et al. Pediatric complicate pneumonia cause by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 in 13-valent pneumococcal conjugate vaccines, Portugal, 2010-2015. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(7):1307–14.

Simell B, Auranen K, Käyhty H, Goldblatt D, Dagan R, O'Brien KL. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines*. 2012; 11(7):841–55.

Skovsted I, autor. Elverdal PL, Kern MB, Sørensen JF, Otte S, Fursted K, Harboe ZB, et al., editores. *Streptococcus pneumoniae: textbook in diagnosis, serotyping, virulence factors and Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for measuring pneumococcal antibodies*. 4th ed. Copenhagen: SSI Diagnostica; 2017.

Slotved H-C, Facklam RR, Fursted K. Assessment of a novel bile solubility test and MALDI-TOF for the differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from other mitis group streptococci. *Sci Rep*. 2017; 7(1):7167.

Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. In: Versalovic J, Carroll K., Funke G, Jorgensen J., Landry M., Warnock D. *Manual of Clinical*

Microbiology. 10th ed. Washington: American Society for Microbiology; 2011. p. 331–49.

SSI. Statem Serum Institute Diagnostica (SSI Diagnostica). 2018. [acesso em 19 Jul 2018]. Disponível em: <https://www.ssidiagnostica.com/neufeld-antisera/?cid=36>.

Tin Tin Htar M, Stuurman AL, Ferreira G, Alicino C, Bollaerts K, Paganino C, et al. Effectiveness of pneumococcal vaccines in preventing pneumonia in adults, a systematic review and meta-analyses of observational studies. PLoS One. 2017; 12(5):1-16.

Tregnaghi MW, Sáez-Llorens X, López P, Abate H, Smith E, Pósleman A, et al. Efficacy of pneumococcal nontypable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) in young Latin American children: A double-blind randomized controlled trial. PLoS Med. 2014; 11(6):1-18.

Van der Linden M, Reinert RR, Kern W V., Imöhl M. Epidemiology of serotype 19A isolates from invasive pneumococcal disease in German children. BMC Infect Dis. 2013a;13(1):1–9.

Van der Linden M, Winkel N, Kuntzel S, Farkas A, Perniciaro SR, Reinert RR, et al. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* serogroup 6 isolates from IPD in children and adults in Germany. PLoS One. 2013b;8(4): e60848.

Van der Linden M, Falkenhorst G, Perniciaro S, Imohl M. Effects of infant pneumococcal conjugate vaccination on serotype distribution in invasive pneumococcal disease among children and adults in Germany. PLoS One. 2015; 10(7):1–17.

Varghese R, Jayaraman R, Veeraraghavan B. Current challenges in the accurate identification of *Streptococcus pneumoniae* and its serogroups/serotypes in the vaccine era. J Microbiol Methods. 2017; 141:48–54.

Verani JR, Domingues CMAS, Moraes JC de, Montenegro ER, Brandileone MC de C, Flannery B, et al. Indirect cohort analysis of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine effectiveness against vaccine-type and vaccine-related invasive pneumococcal disease. *Vaccine*. 2015; 33(46): 6145–8.

Vestjens SMT, Wagenvoort GHJ, Grutters JC, Meek B, Aldenkamp AF, Vlamincxx BJM, et al. Changes in pathogens and pneumococcal serotypes causing community-acquired pneumonia in The Netherlands. *Vaccine*. 2017;35(33):4112–8.

Vila-Corcoles A, Ansa X, Ochoa-Gondar O, Satue E, De Diego C, Rodriguez-Blanco T. Pneumococcal pneumonia in adults 60 years or older: Incidence, mortality and prevention. *Medicina Clinica*. 2016; 146(5):199-202.

Vissers M, Wijmenga-Monsuur AJ, Knol MJ, Badoux P, van Houten MA, van der Ende A, et al. Increased carriage of non-vaccine serotypes with low invasive disease potential four years after switching to the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in The Netherlands. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194823.

Wahl B, O'Brien K, Greenbaum A, Liu L, Chu Y, Majumder A, et al. Global, regional, and national burden of *Streptococcus pneumoniae* and Haemophilus influenzae type b disease in children in the era of conjugate vaccines: updated estimates from 2000-2015. *Lancet Glob Heal*. 2018; 6(7):e744–57.

Walker CLF, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet*. 2013; 381:1405–16.

Wang YY, Li J, Wang YY, Gu W, Zhu F. Effectiveness and practical uses of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in healthy and

special populations. *Hum Vaccin Immunother.* 2018; 14(4):1003–12.

Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet.* 2011;378(9807):1962–73.

Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2018. [acesso em 06 Abr 2018]. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41579-018-0001-8>.

Whitney CG, Goldblatt D, O'Brien KL. Dosing schedules for pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2014; 33:S172–81.

WHO. 2008 Hib Spn summary by WHO regions rounded. WHO [Internet]. 2008. [acesso em 27 Abr 2018]. Disponível em: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/Pneumo_hib/en/.

WHO. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*-WHO manual. 2^a ed. Geneva: World Health Organization; 2011.

WHO Advisory Group. Pneumococcal vaccines WHO position paper – 2012. *Weekly Epidemiological Record*, 2012;14(87):129-144.

Wyres KL, Lambertsen LM, Croucher NJ, McGee L, Von Gottberg A, Liñares J, et al. Pneumococcal capsular switching: A historical perspective. *J Infect Dis.* 2013; 207(3):439–49.

Žemličková H, Crisóstomo MI, Brandileone MC de C, Camou T, Castañeda E, Corso A, et al. Serotypes and clonal types of penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in five Latin American countries. *Microb Drug Resist.* 2005;11(3):195–204.

8 Anexos

Anexo 1: Identificação de *Streptococcus pneumoniae*

A. Coloração de Gram (método modificado por Hucker)

1- Cristal Violeta:

Solução A:

Cristal violeta	2,0 g
Álcool etílico a 95%	20 mL

Solução B:

Oxalato de amônia	0,8 g
Água destilada	80 mL

As soluções A e B foram misturadas 24 horas antes do uso, armazenadas em frasco cor âmbar e filtradas no momento do uso.

2- Solução Iodetada (mordente):

Iodo	1,0 g
Iodeto de potássio	2,0 g
Água destilada	300 mL

Iodo e iodeto foram triturados. A água foi acrescentada até a formação de uma solução quando homogeneizada. A solução foi armazenada em frasco cor âmbar.

3- Descorante:

Álcool-acetona a 70%

Álcool etílico a 95% 700 mL

Acetona 300 mL

Os dois reagentes foram misturados e acondicionados para o uso.

4 - Coloração de Contraste:

Fucsina	2,5 g
Álcool etílico a 95%	100 mL

Procedimento:

- 1- O esfregaço foi preparado em lâmina de vidro. O crescimento foi homogeneizado em solução fisiológica com movimentos circulares a partir do centro do esfregaço.**
- 2- A fixação do esfregaço foi realizada pelo calor, passando-se a lâmina sobre a chama do bico de Bunsen.**
- 3- A lâmina foi coberta com a solução de cristal violeta. Evitou-se o gotejamento direto sobre o esfregaço.**
- 4- Após 10 segundos, a lâmina foi lavada com água e coberta com solução iodetada por aproximadamente 10 segundos.**
- 5- A solução descorante foi aplicada rapidamente sobre a lâmina, 6 segundos no máximo, e esta foi, imediatamente, enxaguada em água.**
- 6- A lâmina foi coberta com água sobre a qual foram gotejadas cinco gotas do corante de contraste, por intermédio de funil com papel filtro. Após 30 segundos, a lâmina foi lavada e seca a temperatura ambiente.**
- 7- A leitura da lâmina foi realizada em microscópio ótico, aumento 1000x com óleo de imersão.**

B. Testes de Identificação de *S. pneumoniae*

A identificação do pneumococo é baseada em sua morfologia de diplococos Gram positivos, na ausência da enzima catalase, na presença de alfa-hemólise em placa de agar 5% sangue de carneiro, na suscetibilidade à optoquina e a sais biliares.

1- Pesquisa da Catalase:

A presença da catalase permite diferenciar o gênero estreptococos (catalase negativa) de outros cocos Gram positivos produtores de catalase, por exemplo, estafilococos. A enzima catalase converte o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. A liberação do oxigênio é observada pela formação de bolhas.

Procedimento:

- 1- Colônias a partir de crescimento de 18-24 horas foram transferidas para uma lâmina de microscopia.**
- 2- Adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%.**

Interpretação:

- Presença de bolhas (catalase positiva) indica a presença da enzima catalase.**
- Ausência de bolhas (catalase negativa) é indicativo de estreptococos.**

2- Teste da Optoquina:

A optoquina (etil-hidrocupreína hidrocloreídica) é uma substância química solúvel em água que se difunde para o meio de cultura e inibe o crescimento de *S. pneumoniae*.

O disco de optoquina em geral tem 6 mm de diâmetro e uma concentração de 5 µg da substância química.

Procedimento:

- 1- A partir de uma cultura pura as colônias suspeitas de *S. pneumoniae* foram semeadas em placa de agar 5% sangue carneiro.**

2- O disco contendo optoquina foi aplicado sobre o crescimento e seguiu-se com incubação por 18 horas a 36°C em condições de 5-7% de CO₂.

3- A leitura do halo foi realizada com régua.

Interpretação:

O halo de inibição do crescimento quando ≥ 14 mm foi interpretado como positivo (sensível à optoquina) e forneceu uma identificação presuntiva de *S. pneumoniae*. Nas isolados em que halos entre 6 e 14 mm foram observados a confirmação da identificação foi realizada através do teste de bile solubilidade, para exclusão de outros estreptococos alfa-hemolíticos do grupo viridans.

3- Teste da Bile Solubilidade:

Detergentes como sais biliares, desoxicolato de sódio ou taurocolato de sódio têm a capacidade de lisar seletivamente o *S. pneumoniae* quando adicionado em suspensão bacteriana em fase logarítmica. O pneumococo produz enzimas autolíticas (autolisinas) e a adição de sais biliares ativam essas enzimas, acelerando a reação lítica natural da bactéria.

Solução de Desoxicolato de Sódio (10%):

Desoxicolato de Sódio	10 g
Água destilada	completar para 100 mL

Procedimento:

1- Foi preparada uma suspensão bacteriana homogênea em uma concentração equivalente à escala 1,0 de McFarland (3×10^8 cfu/mL).

- 2- Foram transferidos 0,5mL desta suspensão bacteriana para dois tubos de ensaio, um identificado como "Teste" (T) e outro como "Controle" (C).
- 3- Ao tubo T foi adicionado 0,5 ml de solução de desoxicolato de sódio a 10%.
- 4- Ao tubo C, 0,5 ml de solução fisiológica.
- 5- Os tubos seguiram para incubação em estufa a 35°C por até 3 horas.

Interpretação:

A presença de lise bacteriana, determinada pela ausência de turbidez no tubo T quando comparado com a presença de turbidez do tubo C de cada isolado testado, foi observada após 1, 2 e 3 horas de incubação. A lise bacteriana identificou as amostras como *S. pneumoniae*.

Anexo 2: Teste de disco-difusão

Procedimento:

- 1- Foi preparada uma suspensão bacteriana em solução fisiológica estéril (inoculo) a partir de cultura pura crescida por até 18 horas em placa de agar 5% sangue de carneiro.**
- 2- A turbidez do inoculo foi ajustada para escala 0,5 de McFarland.**
- 3- O inoculo foi semeado, com auxílio de haste de algodão estéril, por toda a superfície de uma placa de agar Mueller-Hinton 5% sangue de carneiro.**
- 4- Após secagem do inoculo no agar os discos foram dispostos na superfície do agar.**
- 5- A distribuição dos discos na placa não excedeu o máximo de cinco discos por placa de 90 mm como preconizado pelo CLSI.**
- 6- As placas foram incubadas a 35°C por 18-20 horas em tensão de CO₂.**
- 7- Após 18-20 horas de incubação, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos com régua. Eventuais colônias crescidas dentro da zona de inibição foram investigadas e possíveis contaminações foram descartadas.**

Interpretação:

A interpretação do tamanho da zona de inibição seguiu determinações disponíveis nas tabelas no CLSI-M100, 2017 e o resultado foi classificado como suscetível (S), resistência intermediária (I) ou resistente (R).

O controle de qualidade dos discos foi realizado semanalmente e a cada abertura de novo lote, utilizando a cepa padrão de *S. pneumoniae* ATCC® 49619. Para controle do disco de oxacilina também foi utilizada a cepa padrão de *S. aureus* ATCC® 25923.

Pontos de corte utilizados no teste de disco-difusão (CLSI, 2017):

- Oxacilina (1 μ g): suscetível ≥ 20 mm;
- Cloranfenicol (30 μ g): suscetível ≥ 21 mm e resistente ≤ 20 mm;
- Eritromicina (15 μ g): suscetível ≥ 21 mm, intermediário 16-20 mm e resistente ≤ 15 mm;
- Trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 μ g): suscetível ≥ 19 mm, intermediário 16-18 mm e resistente ≤ 15 mm; e
- Vancomicina (30 μ g): suscetível ≥ 17 mm.

Anexo 3: Teste de disco-difusão para Oxacilina

O disco de oxacilina (1 µg) foi utilizado como teste de triagem para determinar a susceptibilidade do *S. pneumoniae* à penicilina sem, entretanto, diferenciar entre os isolados intermediários e resistentes. O resultado do teste da oxacilina foi utilizado para prever a atividade aos outros antibióticos beta-lactâmicos. Isolados de pneumococo falso-resistentes para penicilina pelo teste da oxacilina ocorrem, porém, falso-suscetíveis não ocorrem. Portanto, este teste é considerado um ótimo teste de triagem para susceptibilidade à penicilina. Frente a um isolado oxacilina resistente procedeu-se o teste de determinação da CIM para confirmação de resistência.

A determinação do perfil de resistência deve ser realizada através da CIM para penicilina e cefalosporina de 3ª geração, uma vez que não há padronização do teste de disco-difusão para estes antimicrobianos pelo CLSI.

Procedimento:

Foi seguido o mesmo procedimento descrito no Anexo 2.

Interpretação:

Isolados de *S. pneumoniae* de quadros clínicos invasivos com zonas de inibição >20 mm foram consideradas susceptíveis (S) à penicilina e ceftriaxona.

Quando aos isolados de *S. pneumoniae*, de quadros clínicos invasivos, apresentaram zona de inibição da oxacilina ≤19 mm foi realizada a determinação da CIM para penicilina e ceftriaxona, uma vez que há possibilidade de falsa-resistência.

O controle de qualidade dos discos de oxacilina 1 µg foi realizado sistematicamente a cada novo lote de discos e semanalmente em paralelo à rotina, utilizando cepas padrões de *S.aureus* ATCC®

25923 (cepa sensível, 18-24 mm) e *S. pneumoniae* ATCC® 49619 (cepa resistente à oxacilina, ≤ 12 mm).

Anexo 4: Teste determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Meio de cultura:

Foi utilizado o caldo Mueller-Hinton Cátion ajustado (Difco, EUA) acrescido de 2 - 5 % de lisado de sangue de cavalo.

Preparo das soluções estoques de antimicrobianos:

Os sais dos antimicrobianos foram estocados em freezer -20°C protegidos da umidade. Após o preparo, as soluções foram armazenadas a -70°C e mantidas por até 6 meses.

O preparo seguiu o preconizado pelo CLSI, o cálculo para se determinar a concentração real do antibiótico (com atividade) foi realizado de acordo com as fórmulas:

$$\begin{array}{ccc} \text{Peso do antimicrobiano} & \times & \text{Potência descrita fabricante} = \text{Peso real do antimicrobiano} \\ (\mu\text{g/unidade}) & & (\text{unidade/mg}) & & (\mu\text{g/mg}) \end{array}$$

$$m = \frac{V \times []}{P}$$

Onde:

m= massa a pesar (mg)

V= volume da solução (mL)

[]= concentração do antimicrobiano ($\mu\text{g/mL}$)

P = potência do antimicrobiano ($\mu\text{g/mg}$)

Preparo da Solução de Uso:

Em um tubo de ensaio foi adicionado volume adequado da solução estoque para a concentração de antimicrobiano inicial na placa e completou-se para 10 mL com caldo Muller-Hinton cátion ajustado com 3% de lisado de sangue de cavalo.

Preparo das Placas:

O volume preparado foi suficiente para confecção de 10 placas de fundo U com 96 orifícios.

As placas foram preparadas com o dobro da concentração final do antimicrobiano desejado.

- a. Foram preparados 12 tubos de ensaio (16x160 mm) numerados de 1 a 12.
- b. No tubo 1, foi adicionado a solução de uso do antimicrobiano.
- c. A partir do tubo 2, foi distribuído 5 mL de meio.
- d. Seguiu-se com a diluição seriada, tomando 5 mL do primeiro tubo e transferindo-o para o tubo seguinte, parando a diluição no tubo 11. Abaixo segue um exemplo, para penicilina, de concentrações obtidas após a diluição seriada nos tubos.
- e. O tubo 12 foi utilizado para controle de crescimento, portanto não recebeu antimicrobiano.
- f. Seguiu-se a distribuição de 50 µL a partir de cada tubo numerado com seu correspondente na numeração impressa da placa.
- g. As placas foram identificadas, datadas, tampadas e armazenadas em freezer -20°C por até três meses.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL	0,25 µg/mL	0,125 µg/mL	0,06 µg/mL	0,03 µg/mL	0.015 µg/mL

Preparo da Suspensão Bacteriana:

- a. Foi preparada suspensão bacteriana a partir de uma placa agar 5% sangue carneiro com crescimento recente (até 18 horas) em solução fisiológica estéril. Esta suspensão foi ajustada para uma densidade igual à escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ cfu/mL). A

diluição foi conferida em espectrofotômetro (aproximadamente 0,1 de absorbância no comprimento de onda de 625 nm).

- b. A suspensão bacteriana ajustada foi diluída 1/100 em caldo Muller-Hinton cátion ajustado acrescido de 3% de lisado de sangue de cavalo (50 µL da suspensão bacteriana em 4,95 mL do meio de cultura).

Semeadura das Suspensões Bacterianas:

- a. O inóculo foi adicionado à placa contendo as diluições de antimicrobiano. Foram semeados 50 µL do inóculo em cada diluição do antimicrobiano. Cada isolado testado correspondeu à indicação de A até H impressa na placa. Portanto, em cada placa foram realizados oito testes simultâneos.
- b. As placas foram incubadas em estufa a 35°C, por 20-24 horas.

Controle do Inóculo:

- a. A um tubo de ensaio (16 X 160 mm), identificado com o número do isolado em teste, foi adicionado 9,9 mL de solução fisiológica estéril.
- b. 10 µL retirados do poço 12 de um dos isolados teste foram transferidos para o tubo contendo a solução fisiológica.
- c. Após homogeneização, 100 µL foram retirados do tubo e semeados no centro da placa de agar 5% sangue de carneiro identificada com o número do isolado em teste.
- d. O inóculo foi distribuído sobre a superfície do agar com bastão em "L".
- e. A placa foi incubada por 18-24 horas a 35°C em condições de CO₂.
- f. Ao término do período de incubação foi realizada a contagem das colônias.

- g. Quando escala 0,5 de McFarland e diluições foram preparadas segundo protocolo descrito acima, espera-se a obtenção de uma contagem com cerca de 50 colônias no controle do inoculo.

Aceitação do Teste:

O teste somente foi considerado quando:

- a. Os poços de controle de crescimento para cada isolado teste exibiam o crescimento bacteriano esperado.
- b. A CIM da cepa controle ATCC[®] 49619 apresentou resultados concordantes com os preconizados pelo CLSI.

Interpretação:

A CIM foi atribuída como a menor concentração de antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento visível do microrganismo, ou seja, a menor concentração de antimicrobiano em que não foi visualizada turbidez no meio de cultura, após incubação do teste. A leitura do teste é realizada com auxílio de iluminação adequada.

A interpretação foi realizada de acordo com a tabela de pontos de corte para CIM de *Streptococcus pneumoniae* do CLSI-M100, 2017 e os resultados foram complementados com a classificação suscetível (S), resistência intermediária (I) ou resistência (R). Sempre observando o diagnóstico clínico para definição desta classificação do ponto de corte.

Pontos de corte utilizados na determinação da CIM (CLSI, 2017):

-Penicilina (meningite): suscetível $\leq 0,06$ $\mu\text{g/mL}$ e resistente $\geq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$;

-Penicilina (não-meningite): suscetível ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$, intermediário=4 $\mu\text{g/mL}$ e resistente ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$;

-Ceftriaxona (meningite): suscetível $\leq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$, intermediário=1 $\mu\text{g/mL}$ e resistente ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$;

-Ceftriaxona (não-meningite): suscetível ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$, intermediário= 2 $\mu\text{g/mL}$ e resistente ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$;

-Cloranfenicol: suscetível ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$ e resistente ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$;

-Eritromicina: suscetível $\leq 0,250$ $\mu\text{g/mL}$, intermediário= $0,5$ $\mu\text{g/mL}$ e resistente ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$;

-Trimetoprim-sulfametoxazol: suscetível $\leq 0,5/9,5$ $\mu\text{g/mL}$, intermediário $1/19-2/38$ $\mu\text{g/mL}$ e resistente $\geq 7/76$ $\mu\text{g/mL}$; e

-Vancomicina: suscetível ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$.

Anexo 5: Relação dos genes, seqüências de nucleotídeos dos iniciadores utilizados nas reações para amplificação e sequenciamento e tamanho dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação para determinação dos perfis genéticos dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* pela metodologia de MLST* Sanger.

Gene	Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores		Tamanho dos fragmentos pares de base (pb)
	<i>forward</i>	<i>reverse</i>	
<i>sikimate dehydrogenase - aroE</i>	5'-GCC TTT GAG GCG ACA GC-3'	5'-TGC AGT TCA (G/A)AA ACA T(A/T)T TCT AA-3'	405
<i>glucose-6-phosphate dehydrogenase- gdh</i>	5'-ATG GAC AAA CCA GC(G/A/T/C) AG(C/T) TT-3'	5'-GCT TGA GGT CCC AT(G/A) CT(G/A/T/C) CC-3'	460
<i>glucose kinase - gki</i>	5'-GGC ATT GGA ATG GGA TCA CC-3'	5'-TCT CCC GCA GCT GAC AC-3'	483
<i>transketolase - recP</i>	5'-GCC AAC TCA GGT CAT CCA GG-3'	5'-TGC AAC CGT AGC ATT GTA AC-3'	450
<i>signal peptidase I- spi</i>	5'-TTA TTC CTC CTG ATT CTG TC-3'	5'-GTG ATT GGC CAG AAG CGG AA-3'	474
<i>xanthine phosphoribosyl transferase -xpt</i>	5'-TTA TTA GAA GAG CGC ATC CT-3'	5'-AGA TCT GCC TCC TTA AAT AC-3'	486
<i>D-alanine-D-alanine ligase - ddl</i>	5'-TGC (C/T)CA AGT TCC TTA TGT GG-3'	5'-CAC TGG GT(G/A) AAA CC(A/T) GGC AT-3'	441

* MLST- *Multilocus Sequence Typing* (MLST, 2018)

Anexo 6- Distribuição dos CCs e STs dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* nos períodos pré e pós-PCV10

CC	ST	Sorotipo	n	Pré-PCV10 (2005-2009)	Pós-PCV10 (2011-2015)	Clones Internacionais
15	-	14,19F	4	3	1	
	15	14	1	1	0	
	2922	14	1	1	0	
	13831*	19F	1	1	0	
	13931*&	14	1	0	1	
90	-	6B	16	11	5	
	90	6B	13	10	3	Clone Espanha ^{6B} -2
	12495	6B	1	1	0	
	13832*	6B	1	0	1	
	13839*&	6B	1	0	1	
156	-	9V,14	121	89	32	
	156	9V,14	101	73	28	
		14	89	66	23	Clone Espanha ^{9V} -3-14
		9V	12	7	5	Clone Espanha ^{9V} -3
	162	9V	8	7	1	
	1556	14	1	1	0	
	2335	14	1	1	0	
	9668	9V	1	0	1	
	12505	14	1	1	0	
	12506	14	2	2	0	
	12507	14	1	1	0	
	12508	14	1	1	0	
	12839	14	1	1	0	
	13838*&	14	1	1	0	
	13932*&	14	1	0	1	
	13933*&	14	1	0	1	
	177	-	19F	11	10	1
51		19F	1	1	0	
177		19F	4	4	0	Clone Portugal ^{19F} -21
646		19F	1	0	1	
2881		19F	1	1	0	
3013		19F	1	1	0	
12510		19F	1	1	0	
12512		19F	1	1	0	
12513		19F	1	1	0	
180		-	3	50	17	33
	180	3	48	16	32	Clone Holanda ³ -31
	3236	3	1	1	0	
	8388	3	1	0	1	

continua

CC	ST	Sorotipo	n	Pré-PCV10 (2005-2009)	Pós-PCV10 (2011-2015)	Clones Internacionais	
193	-	18C	26	20	6		
	193	18C	21	16	5	Clone Grécia ²¹ -30-18C	
	1358	18C	1	1	0		
	11324*	18C	1	1	0		
	12517	18C	1	1	0		
	12838	18C	1	1	0		
	13835*	18C	1	0	1		
	236	-	19A,19F	31	10	21	
236	202	19A	1	1	0		
	236	19F	2	2	0	Clone Taiwan ^{19F} -14	
	271	19F	1	0	1		
	320	19A,19F	18	2	16	DLV ^S Taiwan ^{19F} -14	
		19A	17	2	15		
		19F	1	0	1		
	763	19F	3	3	0		
	1451	19A	1	0	1		
	2323	19F	2	0	2		
	11326*	19F	2	2	0		
	13290	19A	1	0	1		
	338	-	6B,6C,19F,23F	46	26	20	
		338	19F,23F	21	15	6	
			19F	1	1	0	Clone Colômbia ^{23F} -26-19F
			23F	20	14	6	Clone Colômbia ^{23F} -26
791		23F	3	2	1		
2777		6C	7	1	6	SLV [#] Colômbia ^{23F} -26	
3163		23F	1	1	0		
4559		23F	1	1	0		
4967		23F	1	1	0		
11318*		6B	1	0	1		
11323*		6C	2	2	0		
11329*		23F	1	1	0		
11330*		23F	1	0	1		
11334* ^{&}		6C	1	0	1		
11335* ^{&}		6C	1	0	1		
12835		23F	1	1	0		
13828*		6C	1	1	0		
13834*		23F	1	0	1		
13840* ^{&}	23F	1	0	1			
13842*	23F	1	0	1			

continua

CC	ST	Sorotipo	n	Pré-PCV10 (2005-2009)	Pós-PCV10 (2011-2015)	Clones Internacionais	
473	-	6A,6B,7F	14	3	11		
	471	6A	1	1	0		
	473	6A,7F	4	0	4		
		6A	3	0	3		
		7F	1	0	1		
	497	6B	1	1	0		
	1190	6A	1	0	1		
	1876	6A	5	0	5		
	4331	6A	1	1	0		
	11311*	6A	1	0	1		
	724	-	6A,6B	16	9	7	
		724	6A,6B	7	3	4	
			6A	1	0	1	
			6B	6	3	3	
5847		6A,6B	2	2	0		
		6A	1	1	0		
		6B	1	1	0		
7021		6A	1	1	0		
10242		6A	1	0	1		
11307*		6A	1	1	0		
11316*		6B	1	0	1		
12465		6B	2	2	0		
13872*		6B	1	0	1		
759		-	6A,6B	4	2	2	
	759	6B	1	1	0		
	11312*	6A	1	0	1		
	11785*&	6A	1	1	0		
	13870*	6A	1	0	1		
	770	-	4,6A	28	8	20	
770		4	17	4	13		
4269		6A	3	0	3		
11298*		4	1	1	0		
11300*		4	3	1	2		
11302*		4	1	0	1		
12500		4	2	2	0		
13836*		4	1	0	1		
1118		-	19A,19F	13	6	7	
		1118	19A	4	2	2	
	2878	19A	2	1	1		
	2880	19A	3	1	2		
	9837	19A	1	0	1		
	9838	19A	1	0	1		
	9942	19A	1	1	0		
	11325*	19F	1	1	0		

continua

CC	ST	Sorotipo	n	Pré-PCV10 (2005-2009)	Pós-PCV10 (2011-2015)	Clones Internacionais
3930	-	6C	5	1	4	
	2185	6C	1	0	1	
	3930	6C	3	0	3	
	13830*	6C	1	1	0	
4978	-	6A,6B	20	10	10	
	750	6B	1	1	0	
	751	6A,6B	5	2	3	
		6A	1	0	1	
		6B	4	2	2	
	4977	6B	2	1	1	
	4978	6B	4	3	1	
	11317*	6B	1	0	1	
	11319*	6B	1	0	1	
	11321*	6B	2	1	1	
	11786*&	6B	1	0	1	
	11787*&	6B	1	0	1	
	12514	6B	1	1	0	
	12841	6B	1	1	0	
53-12574	-	8	23	3	20	
	53	8	22	3	19	Clone Holanda ⁸ -33
	12574	8	1	0	1	
66-11327-12487-12837	-	14,19F	14	12	2	
	66	14,19F	10	8	2	
		14	9	7	2	
		19F	1	1	0	
	11327*	19F	1	1	0	
	12487	14	2	2	0	
	12837	14	1	1	0	
199-667	-	19A,23F	3	1	2	
	199	19A,23F	2	0	2	
		19A	1	0	1	
		23F	1	0	1	
	667	19A	1	1	0	
218	-	12F	44	15	29	
	218	12F	4	15	28	Clone Dinamarca ^{12F} -34
	218~*	12F	1	0	1	
242-11306	-	6A,23F	4	1	3	
	242	23F	3	0	3	Clone Taiwan ^{23F} -15
	11306*	6A	1	1	0	
276-2307	-	19A,19F	5	1	4	
	276	19A	3	1	2	
	2307	19F	2	0	2	

continua

CC	ST	Sorotipo	n	Pré-PCV10 (2005-2009)	Pós-PCV10 (2011-2015)	Clones Internacionais
280-5231	-	9V,18C	3	0	3	
	280	9V,18C	2	0	2	
		18C	1	0	1	
		9V	1	0	1	
		9V	1	0	1	
289-10408	-	5	26	10	16	
	289	5	25	10	15	Clone Colômbia ⁵ -19
	10408	5	1	0	1	
315-386-11315	-	6B,6C	21	8	13	
	315	6B	6	4	2	Clone Polônia ^{6B} -20
	386	6B,6C	12	2	10	DLV ⁶ Polônia ^{6B} -20
		6B	2	2	0	
		6C	10	0	10	
	11315*	6B	3	2	1	
353-11336	-	23F	2	2	0	
	353	23F	1	1	0	
	11336*&	23F	1	1	0	
458-11332	-	3	18	3	15	
	458	3	14	1	13	
	11332*&	3	4	2	2	
733-2258	-	19A,19F	5	5	0	
	733	19A,19F	4	4	0	
		19A	3	3	0	
		19F	1	1	0	
		19F	1	1	0	
744-11303	-	6A	3	3	0	
	744	6A	2	2	0	
	11303*	6A	1	1	0	
810-11328	-	19A,19F	6	1	5	
	810	19F	5	1	4	
	11328*	19A	1	0	1	
3787-13833	-	6A,6B	4	2	2	
	3787	6A,6B	2	2	0	
		6A	1	1	0	
		6B	1	1	0	
		6A	2	0	2	
4913-13841	-	19A	2	0	2	
	4913	19A	1	0	1	
	13841*&	19A	1	0	1	
7026-11299	-	4	9	6	3	
	7026	4	8	5	3	
	11299*	4	1	1	0	

continua

CC	ST	Sorotipo	n	Pré-PCV10 (2005-2009)	Pós-PCV10 (2011-2015)	Clones Internacionais
8640-9793-9801-13837	-	19A	5	2	3	
	8640	19A	2	1	1	
	9793	19A	1	1	0	
	9801	19A	1	0	1	
	13837*	19A	1	0	1	
Singletons	-	-	86	50	36	
	S-81	23F	4	3	1	Clone Espanha ^{23F} -1
	S-89	19F	1	0	1	
	S-191	7F	33	16	17	Clone Holanda ^{7F} -39
	S-232	3	4	3	1	
	S-260	3	1	1	0	
	S-304	1	12	11	1	Clone Suécia ¹ -40
	S-306	1	2	0	2	Clone Suécia ¹ -28
	S-404	8	1	1	0	
	S-615	1	1	0	1	Clone EUA ¹ -29
	S-735	23F	1	1	0	
	S-766	6C	1	0	1	
	S-796	14	1	1	0	
	S-812	6C	1	1	0	
	S-1390	6C	1	0	1	
	S-4598	6A	3	2	1	
	S-5063	18C	1	0	1	
	S-5833	6A	3	1	2	
	S-8102	12F	1	0	1	
	S-8376	12F	1	1	0	
	S-11304	6A	1	1	0	
	S-11305	6A	3	3	0	
	S-11308	6A	1	1	0	
	S-11309	6A	1	0	1	
	S-11310	6A	1	0	1	
	S-11320	6B	1	0	1	
	S-11784	6B	1	1	0	
	S-13829	19F	1	1	0	
	S-34~	12F	1	0	1	
	S-13866	6B	1	1	0	
	S-13929	9V	1	0	1	
Total		-	688	350	338	

- não se aplica, * STs descritas neste estudo, [&] STs com novos alelos descritos neste estudo,
[§]DLV: variante *locus* duplo, [#]SLV: variante único *locus*

Anexo 7: Aprovações na Comissão de Ética em Pesquisa do IAL

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização Molecular de cepas invasivas de *Streptococcus pneumoniae*, isoladas de crianças menores de 2 anos e adultos maiores de 50 anos de idade, antes e após a introdução da vacina conjugada 10-valente no Brasil

Pesquisador: Samanta Cristine Grassi Almeida

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 18941813.8.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Center for Diseases Control and Prevention
Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 393.501

Data da Relatoria: 15/08/2013

Apresentação do Projeto:

Streptococcus pneumoniae ou pneumococo faz parte da microbiota da nasofaringe e é o principal agente das pneumonias comunitárias e, também, um dos principais agentes de meningites bacterianas, bacteremias e sepse. As infecções pneumocócicas ocorrem em todas as faixas etárias, principalmente crianças até 2 anos, idosos com mais de 65 anos e imunocomprometidos. No Brasil, a taxa de letalidade por meningites pneumocócicas é de 34,1%. Em 2012, o Ministério da Saúde do Brasil introduziu no Programa Nacional de Imunização a vacina 10-valente, com potencial de cobrir 80% dos sorotipos causadores de doenças pneumocócicas invasivas. Após a introdução das vacinas conjugadas foi observada, em diferentes países, a diminuição das doenças causadas pelos sorotipos presentes nestas vacinas tanto em crianças vacinadas como nas não vacinadas, fenômeno conhecido como efeito rebanho ou efeito coletivo. Paralelamente a este efeito, houveram relatos de aumento na incidência de sorotipos não incluídos na vacina, fenômeno denominado substituição de sorotipos. A análise comparativa de dados laboratoriais do IAL, nos períodos pré e pós vacinal em crianças menores de 2 anos, mostrou queda de 77% dos sorotipos vacinais e aumento de 49% dos sorotipos não vacinais. Na população maior de 50 anos, observou-se uma pequena diminuição nos sorotipos vacinais no período de dois anos após a vacinação e um

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 393.501

aumento dos sorotipos não vacinais. Para investigar melhor estes dados, este projeto visa caracterizar molecularmente, pela metodologia de "Multilocus Sequence Typing" (MLST), 290 cepas invasivas de *S. pneumoniae* isoladas no Brasil, no período pré vacinação de 9 anos (2001 a 2009), o ano de 2010, ano da introdução da vacina conjugada 10-valente de pneumococo (PCV10), e no período de 4 anos após a vacinação (2011 a 2014), nas populações de crianças de 2 anos e adultos >50 anos de idade. No período pré vacinal serão estudadas 20 cepas do grupo etário de 2 anos e 10 do grupo etário de >50 anos isoladas a cada 2 anos (2001, 2003, 2005, 2007 e 2009), perfazendo um total de 150 cepas; no ano de 2010, serão estudadas 20 cepas, 10 cepas do grupo etário de 2 anos e 10 cepas do grupo etário >50 anos; e, no período pós vacinal serão estudadas 20 cepas provenientes de indivíduos com 2 anos de idade e 10 cepas de maiores de 50 anos, de cada ano (2011, 2012, 2013 e 2014), totalizando 120 cepas. As cepas serão selecionadas de acordo com os sorotipos incluídos na vacina PCV10 e os sorotipos prevalentes após vacinação, os quais possam estar envolvidos no fenômeno de substituição de sorotipos. Da amostragem selecionada, 200 cepas serão caracterizadas pela técnica de MLST no Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, EUA, para treinamento na metodologia. As demais cepas serão caracterizadas no IAL.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a diversidade genética, pela metodologia de MLST, das cepas de pneumococo depositadas no repositório do Centro de Bacteriologia do IAL. Estas cepas são originárias de indivíduos portadores e com doença invasiva, e foram isoladas de crianças vacinadas e população de adultos maiores de 50 anos de idade, nos períodos pré (2001 a 2009), transição (2010), e pós introdução da vacina conjugada PCV-10 no Brasil (2011 a 2014).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos**

Mínimos para os indivíduos, pois não haverá coleta adicional de material biológico.

Para este projeto serão utilizadas cepas de *S. pneumoniae* liofilizadas, mantidas no repositório de cepas do Centro de Bacteriologia e devidamente cadastradas no Núcleo de Coleção de Micro-organismos do IAL.

Benefícios

Elucidação da eficácia da imunização pela vacina conjugada 10 valente de pneumococo (PCV10) pela caracterização molecular de cepas invasivas de *Streptococcus pneumoniae*, isoladas de crianças menores de 2 anos e adultos maiores de 50 anos de idade.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

lmj

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este projeto apresenta interesse em saúde pública, pois no Brasil as informações sobre as linhagens genéticas do *S. pneumoniae*, no período pré e pós à introdução da vacina PCV-10, são escassas e os estudos moleculares poderão avaliar os efeitos da introdução da vacina e verificar a presença de novos clones, principalmente, os ligados à resistência.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1.Folha de rosto - de acordo.

2.TCLE

A pesquisadora responsável propõe dispensa de TCLE, pois o projeto utilizará cepas provenientes da rotina diagnóstica hospitalar da rede pública e privada de diversos estados brasileiros. Estas cepas foram encaminhadas ao Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas do Centro de Bacteriologia do IAL, Laboratório de Referência Nacional para as infecções pneumocócicas pelo Ministério da Saúde, para caracterização fenotípica de sorotipos e resistência antimicrobiana.

A justificativa de não aplicação do TCLE foi aceita.

3.Aprovação quanto ao mérito científico pelo Conselho Técnico Científico do IAL, corroborada pela diretoria geral da instituição.

4.Declaração da pesquisadora responsável, comprometendo-se a manter sigilo, seguir as normas para transporte de cepas, e de utilizar as cepas apenas para este projeto.

5.Outros documentos apresentados.

- Carta convite do CDC original- escrita em inglês.
- Carta convite do CDC traduzida para português.
- Documento de anuência e cooperação do CDC em que também há o comprometimento de que as cepas serão utilizadas apenas e unicamente para cumprir os objetivos deste projeto.
- Instrução Suplementar -ANAC- IS N° 175-001 revisão B, sobre orientações para o transporte aéreo doméstico e internacional de artigos perigosos em aeronaves civis registradas ou não no Brasil.
- Portaria DG IAL-16/2010 - Normas de temporalidade das amostras biológicas e dos produtos

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 393.501

armazenados no IAL.

- Regimento do Comitê de Coleções Biológicas do IAL.
- Declaração de depósito das cepas no repositório do IAL - CCBIAL
- Resolução CNS 441/2011

Recomendações:

Recomenda-se que o coordenador reveja os itens: resumo, metodologia proposta e desenho do estudo pois, os períodos pré e pós vacinal estão com períodos divergentes. No desenho consta período pré (2001 a 2009) e pós (2011 a 2014); no item metodologia proposta no início consta o mesmo período do desenho porém, no final menciona o ano 2000. Já no resumo consta período pré (2000 a 2009) e pós (2010 a 2013). Entendeu-se que no texto quando descrito 2 anos, trata-se de até 2 anos de idade.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo de pesquisa aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 e resoluções complementares.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi analisado em reunião extraordinária de 29 de agosto de 2013.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

- apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa;
- elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- desenvolver o projeto conforme delineado;
- elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 393.501

manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEP/IAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

SAO PAULO, 12 de Setembro de 2013



Assinador por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Sequenciamento genômico de cepas de Streptococcus pneumoniae

Pesquisador: Samanta Cristine Grassi Almeida

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54891516.4.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Centers for Disease Control and Prevention
Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.586.276

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um importante estudo que pretende elucidar detalhes da epidemiologia de Streptococcus pneumoniae pré e pós-introdução das vacinas conjugadas no Brasil e no mundo, podendo auxiliar na tomada de decisões futuras quanto às estratégias de vacinação visando o controle das infecções pneumocócicas. O projeto visa caracterizar molecularmente as cepas de pneumococo isoladas. O Instituto Adolfo Lutz irá selecionar as cepas para o estudo baseado em dados demográficos dos pacientes como idade e diagnóstico clínico. As cepas selecionadas a partir dos bancos de dados Epi-Info versão 6.1, serão ativadas, terão a pureza confirmada e serão congeladas em meio STGG. As cepas serão encaminhadas ao CDC aos cuidados da responsável pelo projeto Dra. Lesley McGee para realização das etapas de extração e quantificação do DNA. Os DNAs extraídos e quantificados serão encaminhados ao Instituto Sanger no Reino Unido para realização do sequenciamento completo do genoma utilizando a plataforma Illumina. Os dados obtidos serão analisados pela equipe de bioinformática do CDC e Instituto Sanger. Os dados gerados para os isolados brasileiros farão parte de um banco global de sequências e serão pertencentes ao IAL.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo principal

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.586.276

O objetivo do projeto é examinar o efeito da implantação da vacina pneumocócica conjugada em cepas de pneumococo brasileiras por meio do sequenciamento e comparação do genoma completo dos microrganismos nos períodos pré (2008 a 2009) e pós (2012 a 2013) a introdução da vacina PCV 10-valente.

Objetivo secundário

A análise de cepas, com resistência aos antimicrobianos de *S. pneumoniae* que possam ter prevalecido no período pós-vacina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

Não foi apontado risco mínimo ao estudo. Porém considera-se que há risco mínimo relacionado ao sigilo dos dados dos participantes obtidos a partir de banco de dados que serão manipulados na fase de seleção das cepas do estudo.

A autora apenas declara que não utilizará a identificação dos participantes em nenhuma das análises.

Benefícios

Sobre os benefícios, afirma que a elucidação epidemiológica das cepas de *S. pneumoniae* será importante para subsidiar definições de políticas de imunização e prevenção das infecções pneumocócicas, assim como gerar informações relevantes para compreensão da evolução que refletem na dinâmica de transmissão deste agente na comunidade.

A metodologia proposta permite análises que não podem ser obtidas por outros métodos ainda não possíveis de serem realizados no IAL devido à ausência de infra-estrutura específica para sua realização. A participação do IAL neste projeto, juntamente com importantes Institutos, contribuirá para uma implantação futura da metodologia de sequenciamento genômico no Instituto, já possibilitando a obtenção de dados que podem apoiar a tomada de ações e estratégias de intervenção no âmbito da vigilância de Saúde Pública.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Não foi comentado se haverá benefícios diretos aos participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto muito bem redigido que poderá gerar dados importantes para o estudo epidemiológico do *S. pneumoniae* pré e pós-introdução das vacinas conjugadas no Brasil e no mundo. Este estudo também poderá auxiliar na tomada de decisões futuras quanto às estratégias de vacinação visando o controle das infecções pneumocócicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Foram anexados documentos referentes a termo de acordo e equipe de trabalho, com CDC em nome da Dra. Lesley McGee.

- Foi anexada a Folha de Rosto com anuência da direção geral do IAL.

- Foi apresentado o cronograma e o orçamento de custos da pesquisa.

- Foi anexado o documento de aprovação do CTC e anuência da Direção Geral do IAL.

- Foi anexado um termo de compromisso de depósito de linhagens nas coleções biológicas do IAL.

- Foi anexado documento de acordo de cooperação (Cooperative Research and Development Agreement), onde foram estipuladas as condições para a autorização do uso das cepas pelo CDC no projeto. Esse documento também foi assinado pela direção do Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas, responsável pelas cepas.

Todos os documentos acima citados foram considerados apropriados e corretos.

- Quanto à justificativa de dispensa de TCLE, não se justifica a impossibilidade apenas devido ao fato de ser realizada a anonimização dos dados referentes aos participantes do estudo. Deve o pesquisador realizar uma reflexão e sempre explicitar as causas diretas que impossibilitam a obtenção do TCLE (por exemplo: dificuldade em se obter meios de contato com o participante).

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.586.276

Recomendações:

Revisão sobre avaliação de riscos e benefícios.

Reflexão ética e revisão sobre a justificativa de dispensa de TCLE avaliando as causas diretas que impossibilitam a sua obtenção.

Observar as normas nacionais e internacionais de transporte de cepas bacterianas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considera-se o projeto aprovado sob o ponto de vista ético.

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL com base nas deliberações da reunião ordinária de 19 de maio de 2016.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

- a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa;
- b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.586.276

do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_677061.pdf	05/04/2016 16:19:39		Aceito
Outros	RelatorioParcialRelacoesClonaisSpneumoniae19AALeC.docx	05/04/2016 16:19:07	Samanta Cristine Grassi Almeida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	SequenciamentoGenomicoStreptococcus pneumoniaeFINAL.pdf	15/03/2016 09:00:04	Samanta Cristine Grassi Almeida	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoGPSproject.pdf	15/03/2016 08:54:41	Samanta Cristine Grassi Almeida	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoResponsabilidadeSigiloGPSproject.pdf	10/03/2016 08:43:13	Samanta Cristine Grassi Almeida	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoComprometimentoCadastroCepsCtnbioGPSproject.pdf	10/03/2016 08:42:50	Samanta Cristine Grassi Almeida	Aceito
Declaração de Pesquisadores	JustificativaEquipeCtcGPSproject.pdf	10/03/2016 08:42:19	Samanta Cristine Grassi Almeida	Aceito
Outros	EquipeGPSproject.pdf	10/03/2016 08:42:05	Samanta Cristine Grassi Almeida	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DeclaracaoCompromissoDepositoLinhasGPSproject.pdf	10/03/2016 08:41:28	Samanta Cristine Grassi Almeida	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermConditionCollaboratingInvestigatorGPSproject.pdf	09/03/2016 17:08:19	Samanta Cristine Grassi Almeida	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PersonalAgreementTeamMemberLesleyMcGeeGPSproject.pdf	09/03/2016 17:07:55	Samanta Cristine Grassi Almeida	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CooperativeResearchDevelopmentAgreementGPSproject.pdf	09/03/2016 17:07:25	Samanta Cristine Grassi Almeida	Aceito
Outros	ParecerCtcGPSproject.pdf	09/03/2016 17:01:29	Samanta Cristine Grassi Almeida	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90**Bairro:** Cerqueira César**CEP:** 01.246-902**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)3068-2859**Fax:** (11)3085-3505**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.586.276

SAO PAULO, 13 de Junho de 2016

Assinado por:
Maria de Fátima Costa Pires
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br