

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE -  
UFCSPA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Mariana Preussler Mott**

**Prevalência de resistência aos  
antimicrobianos e diversidade genética  
de *Streptococcus pneumoniae* isolados  
de doença invasiva e não invasiva**

**UFCSPA**  
Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

**Porto Alegre  
2016**

MARIANA PREUSSLER MOTT

**Prevalência de resistência aos antimicrobianos e diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* isolados de doença invasiva e não invasiva**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Cícero Armínio Gomes Dias

**Porto Alegre  
2016**

### Catálogo na Publicação

Preussler Mott, Mariana

Prevalência de resistência aos antimicrobianos e diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* isolados de doença invasiva e não invasiva / Mariana Preussler Mott. -- 2016.

89 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Orientador(a): Cícero Armídio Gomes Dias.

1. *Streptococcus pneumoniae*. 2. Perfil de Suscetibilidade. 3. Sorotipo 19A. 4. PCV10. 5. Brasil. I. Título.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela força e determinação que fizeram com que eu não desistisse diante de vários obstáculos.

Ao professor Cícero Dias que mesmo sem me conhecer abriu as portas do Laboratório para que eu pudesse realizar o meu estágio, e posteriormente pela confiança depositada em mim, me proporcionando várias oportunidades como a orientação do mestrado. E pela paciência nos momentos de choro.

Ao professor Pedro d'Azevedo pela ajuda financeira e também por abrir a porta do Laboratório de Microbiologia Molecular me proporcionando esta oportunidade, além da confiança em meu trabalho.

Aos meus colegas de Laboratório pela amizade e companheirismo. Em especial a Bruna Batista, Janira Prichula, Rebeca Inhoque, Renata Soares, Thiago Paim, Gustavo Sambrano, Juliana Caierão e Gabriela da Cunha. A Gabriela por toda a ajuda e disponibilidade. A Juliana pelo conhecimento transmitido, ao Thiago e Gustavo que além do conhecimento me proporcionaram vários momentos de risada. A Bruna, Janira, Rebeca e Renata pela amizade conquistada e pelos momentos de “terapia em grupo”.

Aos meus colegas do Laboratório Central, em especial ao Setor de Bacteriologia, por toda a ajuda e apoio. A Marina Moreira, Otávio Raro e Everton Inamine pela troca de experiência profissional e de conhecimento, além da amizade.

A minha família que é o meu alicerce, especialmente meu pai, minha mãe e minha avó Beth por todo carinho e força, por acreditarem em mim e por isso sempre fizeram de tudo para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Aos meus irmãos, Rafael e Maria Antônia pela alegria que sinto quando estou perto de vocês.

Ao meu namorado, Carlos Alberto por toda a paciência, compreensão e carinho durante todos os momentos difíceis. Muito obrigada por tudo!

## RESUMO

As infecções causadas pelo *Streptococcus pneumoniae* são um problema de saúde pública em todo o mundo, acometendo principalmente os extremos das idades. Com o intuito de controlar a doença pneumocócica várias formulações da vacina contra o pneumococo foram desenvolvidas. Apesar da vacina ter diminuído as taxas de doença pneumocócica, após a sua implementação foi observado um aumento da doença causada por sorotipos não vacinais, relacionado com a emergência principalmente do sorotipo 19A, tornando o manejo das infecções um problema, pois este sorotipo está associado à resistência aos antimicrobianos. Como a vacina PCV10 foi recentemente introduzida em nosso País (2010), há poucos estudos demonstrando a epidemiologia local das infecções pneumocócicas e do perfil de suscetibilidade após os novos critérios estabelecidos pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Assim o objetivo deste trabalho foi primeiramente avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em 159 isolados provenientes de Doença Pneumocócica Invasiva (DPI), identificados logo após a introdução da vacina, durante o período de 2010-2012, além de verificar os sorotipos mais frequentes. Posteriormente devido ao aumento observado de isolados pertencentes ao sorotipo 19A, principalmente durante o ano de 2014, foi determinada a prevalência deste sorotipo durante o período de 2008-2014 recuperados de doença invasiva e não invasiva, assim como o perfil de suscetibilidade e perfil genotípico através de técnicas moleculares de MLVA (*Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat*) e MLST (*Multi Locus Sequence Type*). Os isolados foram provenientes de três hospitais de Porto Alegre, RS. Os pneumococos foram sorotipados utilizando a metodologia de multiplex-PCR e/ou *Quellung*, a presença dos genes que conferem resistência aos macrolídeos (*mefA* e *ermB*) foram determinados por duplex-PCR e para determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) utilizou-se fitas de E-test. Em relação aos 159 isolados pertencentes ao período de 2010-2012 identificou-se 33 diferentes tipos capsulares. A taxa de não suscetibilidade aos  $\beta$ -lactâmicos, como penicilina e ceftriaxona, foi baixa ficando restrita aos sorotipos 14 e 19A. A resistência a eritromicina foi de 8,2% e o gene *mefA* foi o determinante genético de resistência aos macrolídeos mais frequente. A não suscetibilidade a sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina foi de 37,7% e 22%, respectivamente. Ao comparar os anos pré e pós PCV-10 foi

observado à emergência do sorotipo não vacinal 19A no período pós-vacinal. Assim foram estudados 38 isolados deste sorotipo, sendo que 3,46% dos isolados pertenciam ao período pré-vacinal, ocorrendo um aumento significativo para 8,10% no período pós-vacinal ( $p = 0,04196$ ). Considerando apenas os anos pós-PCV10 houve um aumento significativo de 1,24% em 2011 para 18,51% em 2014 ( $p=0,00001$ ). Comparando os dois períodos, também ocorreu um aumento da não suscetibilidade aos antimicrobianos, principalmente associada com a emergência da ST320. A não suscetibilidade para sulfametoxazol-trimetoprim eritromicina e tetraciclina foi de 80,7%, 74,2% e 48,4%, respectivamente. O gene *ermB* estava associado com os maiores MICs para a eritromicina, entretanto o gene *mefA* estava presente na maioria dos isolados (75,8%). Estudos como este são de extrema importância por que podem auxiliar na tomada de decisão clínica, pois muitas vezes a antibioticoterapia é realizada de forma empírica, além de auxiliar em uma possível substituição da vacina que atualmente é disponibilizada para a população.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Streptococcus pneumoniae*. Perfil de suscetibilidade. Sorotipo 19A. PCV10. Brazil.

## ABSTRACT

Infections caused by *Streptococcus pneumoniae* are a global public health problem, affecting mainly infants and elders. Several formulations of the vaccine against pneumococcus have been developed to control pneumococcal disease. Although the vaccine has reduced pneumococcal disease rates, an increase in the disease caused by non-vaccine serotypes after its implementation was observed, mainly due to the emergence of serotype 19A. The management of infections is a problem as this serotype is associated with antimicrobial resistance. The PCV10 vaccine was recently introduced in Brazil (2010), and there have been few studies demonstrating the local epidemiology of pneumococcal infections and susceptibility profile after the new breakpoints established by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). This study aims at evaluating the susceptibility profile of 159 isolates from invasive pneumococcal disease (IPD), identified soon after the introduction of the vaccine in 2010-2012, apart from identifying the most common serotypes. Subsequently due to an increase in serotype 19A isolates, mainly in 2014; we determined the prevalence of this serotype from 2008 to 2014 recovered from invasive and non-invasive sites, as well as the susceptibility and genotypic profile through MLVA (Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat) and MLST (Multi Locus Sequence Type). The isolates were obtained from three hospitals in Porto Alegre, southern Brazil. Isolates were serotyped using a multiplex PCR and/or Quellung reaction. 33 different serotypes were obtained from the 159 isolates between 2010 and 2012. Non-susceptibility rate to  $\beta$ -lactam, such as penicillin and ceftriaxone, were low, mainly associated to serotypes 14 and 19A. Resistance to erythromycin occurred in 8.2% and the *mefA* gene was the most common macrolide genetic determinant. Non-susceptibility to trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracycline was 37.7% and 22.0%, respectively. Comparing the pre- and post-PCV10 periods an emergence of the 19A non-vaccine serotype was observed in the post vaccine period. Therefore we studied 38 isolates of this specific serotype, of which 3.46% of the isolates belonged to the pre-vaccine period, and a significant increase in the post-vaccine period (8.10%) was observed when comparing both periods ( $p=0.04196$ ). In the post-PCV10 period a significant increase from 1.24% in 2011 to 18.51% in 2014 ( $p=0.00001$ ) was observed. In the post-PCV10 period an increase in non-susceptibility to antimicrobials was found, mainly associated with the

emergence of the ST320 MLST genotype. Non-susceptibility to trimethoprim-sulfamethoxazole, erythromycin and tetracycline was 80.7%, 74.2% and 48.4%, respectively. The *ermB* gene was associated to higher MICs, on the other hand the *mefA* gene was present in most isolates (75.8%). Studies like this are extremely important as they can assist in clinical decisions as, often, antibiotic therapy is performed empirically, and they can also aid in providing evidence for a possible *replacement* for the vaccine that is currently available for the population.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*. Susceptibility profile. Serotype 19A. PCV10. Brazil.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Increase of 19A isolates after the PCV10 introduction .....	71
FIGURA 2 - E-burst analysis of MLST result .....	72
FIGURA 3 - MLVA of 19A isolates from non-invasive and invasive disease obtained pre-vaccination and post-vaccination .....	73

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Results from MLST analyzes of 36 serotype 19A <i>S. pneumoniae</i> isolates .....	74
TABELA 2 - STs observed during the study period which include serotypes other than 19A.....	74
TABELA 3 - Characteristics 38 <i>S. pneumoniae</i> isolates of serotype 19A recovered pre and post-vaccine period .....	75
TABELA 4 - Antimicrobial susceptibility profile of 36 <i>S. pneumoniae</i> from serotype 19A pre (5 isolates) and post vaccine (31 isolates). .....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BgaA	β-galactosidade
CC	Clonal Complex
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cpsA	Capsular polysaccharide Synthesis
CRIE	Centro de Referências de Imunológicos Especiais
DLV	Doble Locus Variant
DPI	Doença Pneumocócica Invasiva
ELISA	Enzima-Imuno Ensaio
Eno	Enolase
EUA	Estados Unidos da América
Hly	Hialuronidase
LytA	Autolisina
MDR	Multirresistentes
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MLVA	Multiple-locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis
NanA	Neuraminidase
PavA	fator de pneumocócico A de adesão e virulência
PBP	Proteína de Ligação à Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCV	Pneumococcal Conjugate Vaccine
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
Ply	Pneumolisina
PMEN	Pneumococcal Molecular Epidemiology Network
PNSP	<i>Streptococcus pneumoniae</i> não suscetível à penicilina
PsaA	Antígeno A de superfície pneumocócica
PspA	Proteína de superfície pneumocócica
QRDR	Região Determinante de Resistência a Quinolonas
SLV	Single Locus Variant
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SIREVA	Sistema de redes de Vigilância de Agentes Bacterianos responsáveis por pneumonia e meningite
ST	Sequence Type
StrH	$\beta$ N-acetilglicosaminidase
SUS	Sistema Único de Saúde
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	13
1.2 Epidemiologia das infecções por <i>S. pneumoniae</i> .....	16
1.3 Fatores de Virulência .....	19
1.4 Imunoprofilaxia .....	20
1.5 Impacto da Vacinação .....	22
1.6 Mecanismos de escape à vacinação .....	25
1.7 Emergência do sorotipo não vacinal 19A após a introdução das vacinas conjugadas PCV-7 e PCV-10 .....	27
1.8 Emergência de outros sorotipos não vacinais após a PCV-13 e novos alvos de vacinas contra o <i>S. pneumoniae</i> .....	29
1.9 Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos .....	29
2.0 Métodos de tipagem molecular em isolados de <i>S. pneumoniae</i> .....	34
2.1 Principais Perfis Genotípicos pertencentes ao sorotipo 19A .....	36
<b>2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>38</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>47</b>
<b>4. OBJETIVO .....</b>	<b>48</b>
4.1 Objetivo Geral .....	48
4.2 Objetivos Específicos .....	48
<b>5. ARTIGOS CIENTÍFICOS .....</b>	<b>49</b>
5.1 Manuscrito I .....	49
5.2 Manuscrito II .....	55
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>79</b>
7.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA .....	79
7.2 Produção Científica Complementar.....	80
7.2.1 Artigo Publicado .....	80
7.2.2 Trabalhos Apresentados em Eventos Científicos.....	84
7.3 Normas para Publicação – <i>Epidemiology and Infections</i> .....	86

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Streptococcus pneumoniae*

O *Streptococcus pneumoniae*, conhecido também como pneumococo, é um coco Gram positivo pertencente ao Reino Monera, Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Lactobacillales, Família Streptococcaceae e Gênero *Streptococcus*. Atualmente são reconhecidas 99 espécies pertencentes a este gênero (Thompson et al., 2013) tendo como característica a não produção da enzima catalase e do citocromo-oxidase. A espécie *S. pneumoniae* apresenta condições de crescimento especiais, é um anaeróbio facultativo, requerendo para o adequado crescimento meio de cultura ricos, como o ágar sangue acrescido de 5% de sangue de carneiro, atmosfera de 5% de nível de CO<sup>2</sup> e temperatura em torno de 35±2°C. Os pneumococos produzem uma hemolisina que quebra a hemoglobina parcialmente, assim as colônias ficam circundadas por uma zona esverdeada durante o crescimento em placas de ágar sangue, caracterizando sua alfa-hemólise, podem ainda apresentar morfologia colonial côncava, característica desta espécie, como a ocorrência de uma depressão central na colônia devido a ação das autolisinas produzidas pelo próprio micro-organismo (Spellerberg & Brandt, 2011).

O *S. pneumoniae* foi descoberto em 1880, quase ao mesmo tempo por dois pesquisadores, Sternberg nos Estados Unidos e Pasteur na França, que o isolaram pela primeira vez em ratos que tinham sido inoculados com saliva humana (Pasteur, 1881; Sternberg, 1881). Inicialmente chamado de "*Micrococcus Pasteuri*, Sternberg", posteriormente passou a ser denominado como atualmente é conhecido. A origem de seu nome atual é devido a semelhança de suas colônias quando visualizadas pelo método de Gram serem parecidas com os estreptococos por isso "*Streptococcus*", e "*pneumoniae*" por ser considerado agente etiológico da pneumonia, posteriormente foi relacionado como agente etiológico de outros processos infecciosos (Austrian, 1999; Henrichsen, 1999).

Entre os estreptococos do grupo alfa-hemolítico o *S. pneumoniae* pode ser separado dos outros estreptococos do grupo viridans (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. cristatus*, *S. infantis*, *S. peroris* e *S. pseudopneumoniae*) a partir dos testes de bile solubilidade e de suscetibilidade à optoquina, que são metodologias realizadas atualmente nos

laboratórios clínicos com o objetivo de identificar o pneumococo, juntamente com a coloração de Gram, sendo possível visualizar as características morfo-tintoriais clássicas, pois se apresentam geralmente como diplococo Gram positivo com extremidades lanceoladas e com um halo em volta dos diplococos devido à produção de cápsula polissacarídica em sua parede celular, além das características morfológicas da colônia quando cultivada em ágar sangue (Spellerberg & Brandt, 2011).

No teste da optoquina (cloridrato de etil-hidrocupreína), este antimicrobiano que não é mais utilizado na prática clínica devido a sua toxicidade, atua alterando seletivamente a membrana celular do *S. pneumoniae* impedindo o seu desenvolvimento na área onde ocorreu a difusão do sal. Como consequência dessa ação, visualiza-se um halo de inibição do crescimento bacteriano, se este halo for  $\geq 14$  mm considera-se suscetível à optoquina, podendo suspeitar de pneumococo. Porém, nos últimos anos, há relatos de pneumococo resistentes à optoquina e de *S. mitis* suscetíveis à optoquina (Spellerberg & Brandt, 2011), assim o teste de bile solubilidade deve ser realizado para complementar a identificação de *S. pneumoniae* para evitar que ocorra identificação errônea e subsequente tratamento inadequado. A resistência do pneumococo à optoquina ocorre devido a mutações no gene *atpC* que codifica subunidades da enzima alvo, uma H<sup>+</sup> ATPase que é responsável pelo transporte de prótons da cadeia respiratória (Dias et al., 2007).

O teste de bile solubilidade está baseado na capacidade do pneumococo em diminuir a turbidez da suspensão de desoxicolato de sódio a 10%, este sal biliar promove a aceleração da atividade lítica das autolisinas em degradar o peptidoglicano presente na parede celular, ocorrendo assim destruição das células e, como consequência, a suspensão ficará límpida. Entretanto, alguns isolados de pneumococo podem se apresentar insolúveis ao desoxicolato de sódio devido a modificações nos mecanismos regulatórios das autolisinas, ou na alteração de sua estrutura molecular (Díaz, López & García, 1992; Obregón et al., 2002).

A identificação do pneumococo também pode ser realizada por métodos moleculares utilizando tanto PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) convencional como a PCR em tempo real podendo inclusive identificar o pneumococo a partir do próprio material clínico sem necessidade de crescimento bacteriano. Com estas técnicas é possível realizar a identificação de *S. pneumoniae* a partir da amplificação do gene *cps* que codifica a cápsula polissacarídica, ou a partir de alguns outros

determinantes de virulência como o gene *pspC* que codifica uma adesina, *lytA* que codifica a principal autolisina de pneumococo ou o gene *ply* responsável por codificar a pneumolisina deste micro-organismo (Jefferies et al., 2007; Gholamhosseini-Moghaddam et al., 2015).

Além dos métodos moleculares a identificação do pneumococo pode ser realizada por testes sorológicos de aglutinação em látex, enzima-imuno ensaio (ELISA), imunodifusão radial dupla, sistema de microesferas Luminex® que utiliza estas microesferas com anticorpos específicos permitindo a identificação de alguns sorotipos (Pride et al., 2012), BinaxNow® que identifica antígenos do pneumococo em amostras de urina de pacientes com pneumonia e em amostras de líquido de pacientes com meningites (Stralin et al., 2004).

Entretanto a metodologia considerada padrão é a reação de *Quellung*, a qual necessita de crescimento bacteriano (Austrian, 1979). Esta metodologia se baseia em uma reação sorológica utilizando antissoros específicos, na qual se observa o intumescimento capsular provocado pela interação das bactérias encapsuladas com anticorpos anticapsulares específicos, que se torna visível ao microscópio óptico, sendo possível distinguir sorotipos do mesmo sorogrupo. Porém esta técnica é trabalhosa e está disponível somente em laboratórios de referência, apresenta algumas limitações como: aquisição de todos os antissoros para identificação capsular, necessita de pessoal capacitado por que a interpretação dos resultados pode ser subjetiva (Selva et al., 2012).

Além da reação de *Quellung*, também é possível identificar os diferentes sorotipos de pneumococo utilizando técnicas moleculares baseadas na detecção dos genes específicos que codificam os polissacarídeos capsulares dentro do *locus cps*. São utilizados *primers* específicos para cada sorotipo ou, em alguns casos, sorogrupo capsular. Para identificar os sorotipos mais frequentes na América Latina, foi desenvolvido um ensaio de PCR multiplex que detecta os 30 sorotipos mais frequentes desta região (Dias et al., 2007).

## 1.2 Epidemiologia das infecções por *S. pneumoniae*

As infecções por *S. pneumoniae* são um problema de saúde pública em todo o mundo, com altas taxas de mortalidade e morbidade, acometendo principalmente os extremos das idades como crianças menores de 5 anos de idade e idosos, além de indivíduos com sistema imunológico debilitado. O pneumococo está relacionado a processos infecciosos importantes e graves, sendo considerado o principal agente causador de Doença Pneumocócica Invasiva (DPI) como meningite, bacteremia e pneumonia, principalmente entre crianças menores de 2 anos de idade (Nourti & Whitney, 2010; Simell et al., 2012), além de otite média aguda e sinusite. Este grupo etário é mais suscetível a infecções devido à imaturidade do sistema imunológico e também por que estão mais expostos a colonização pelo pneumococo (Tan, 2012).

Nos EUA desde a introdução da vacina conjugada contra o *Haemophilus influenzae* tipo b, o pneumococo está entre os principais causadores de meningites bacterianas, responsáveis por mais de 50% de todos os casos, com aproximadamente 10 casos/100.000 habitantes entre as crianças (Tan, 2012; CDC, 2015).

Segundo estimativas mundiais, de aproximadamente 8,8 milhões de mortes anuais que ocorrem em crianças menores de 5 anos de idade, 476 mil foram causadas por infecções pneumocócicas (Sartori, Soares & Novaes, 2012), a maioria destas mortes ocorreu em países em desenvolvimento, onde a pneumonia ainda é a maior causa de morte entre esses indivíduos (WHO, 2012).

Nos EUA ocorrem aproximadamente 400.000 hospitalizações anualmente devido à pneumonia pneumocócica. Mais de 12.000 casos de bacteremia, com uma taxa de caso-fatalidade de aproximadamente 20% aumentando para 60% entre pacientes mais velhos (CDC, 2015).

No Brasil segundo os dados do SIREVA II, de todos os casos de DPI a meningite foi a mais prevalente com 44,8% dos casos, seguida por sepse/bacteremia com 34,4%, 19,3% de pneumonia e 1,6% de outras doenças invasivas (SIREVA II, 2012). Das infecções causadas pelo *S. pneumoniae*, a pneumonia adquirida na comunidade ainda é a mais frequente. Porém como a pneumonia bacteriana não está classificada como uma doença de notificação compulsória, como ocorre nos casos de meningite bacteriana, é possível que os dados disponíveis estejam subestimados; entretanto estima-se que 13,8 milhões de

casos de pneumonia ocorrem a cada ano no mundo, causando 90% de todas as mortes relacionadas com a infecção pneumocócica (Sartori, Soares & Novaes, 2012).

Segundo o Ministério da Saúde, durante o período de 2000 a 2008 houve em média 1.218 casos anuais de meningite pneumocócica, representando cerca de 11% dos casos de meningite bacteriana registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), com incidência anual de 0,7 casos/100.000 habitantes e uma letalidade de 30% (Ministério da Saúde, 2010). Já em crianças menores de dois anos de idade a incidência foi de 5,9 casos/100.000 habitantes com letalidade de 33%, tendo um aumento significativo entre menores de um ano de idade com 9,5 casos/100.000 habitantes e letalidade de 34% (Ministério da Saúde, 2009).

Um dos grandes problemas enfrentados na tentativa de combater as taxas de infecção pneumocócica é que este micro-organismo reside na superfície da mucosa do trato respiratório superior como colonizador assintomático em humanos, ou seja, é um micro-organismo natural da nossa nasofaringe, e a sua transmissão ocorre a partir do contato direto com secreções de indivíduos colonizados, sendo que a colonização é o passo inicial para o processo infeccioso. A efetividade da colonização torna um ambiente propício para o pneumococo alcançar sítios normalmente estéreis configurando DPI (Bogaert, Groot & Hermans, 2004). A colonização é um pré-requisito para que ocorra a doença, a transmissão e a evolução da espécie. Vale ressaltar que apenas um pequeno percentual de portadores irá desenvolver a doença, e alguns fatores contribuem como: o estado imunológico do indivíduo, o sorotipo de pneumococo envolvido, a virulência da cepa, a carga bacteriana e a presença de co-morbidades (Simell et al., 2012). O estado de portador pode ser encontrado em qualquer faixa etária, porém evidências sugerem que é mais frequente nos primeiros dois anos de vida, quando aproximadamente 60% das crianças poderão ser colonizadas, representando o reservatório mais bem estabelecido do pneumococo (Garcia-Rodriguez & Fresnadillo Martinez, 2002; Sá-Leão et al., 2008). O estado de portador decresce com a idade, estudo recente mostra que a prevalência de portador entre indivíduos com mais de 60 anos foi de 2,3%, sugerindo que a transmissão ocorra a partir do contato com crianças colonizadas (Almeida et al., 2014). A baixa prevalência de portadores entre os idosos pode ser devido a maior produção de mediadores inflamatórios, como

consequência haverá desequilíbrio da resposta imunológica necessária para a persistência da colonização (Ferreira et al., 2013).

Existe uma variação nos sorotipos que podem causar doença, enquanto alguns estão mais relacionados com a DPI outros ficam mais restritos a nasofaringe. Um recente estudo mostrou que os sorotipos incluídos nas vacinas conjugadas possuem maior capacidade de causar doença invasiva entre as crianças quando comparados com sorotipos não incluídos nestas vacinas, havendo um significativo aumento do potencial invasivo para o sorotipo 19A incluído apenas na PCV-13 (Vacina Conjugada 13-Valente), dos sorotipos 1 e 7F pertencentes a PCV-10 (Vacina Conjugada 10-Valente) e da PCV-13; e do sorotipo 4 incluído em todas as PCVs. Alguns sorotipos não-vacinais foram encontrados apenas na região da nasofaringe, como o sorotipo 35B, 21 e 38, além de sorotipos não tipáveis (Browall et al., 2014), mostrando que estes sorotipos não possuem capacidade de causar DPI, pois durante o processo de colonização, a cápsula pode interagir com a superfície mucosa da nasofaringe induzindo a produção de anticorpos em indivíduos saudáveis prevenindo futuras infecções causadas por estes sorotipos que estão colonizando (Soinicen et al., 2001).

Dependendo do sorotipo também há diferença nas manifestações clínicas, infecções causadas pelos sorotipos contidos apenas na PCV-7 (Vacina Conjugada 7-Valente) causam mais meningites e estão mais frequentemente associados com infecções em crianças com co-morbidades como: leucemia, doença coronariana e doenças congênitas. Já os sorotipos adicionais incluídos na PCV-10 (sorotipo 1, 5 e 7F) possuem maior capacidade de causar pneumonia. Nos adultos os sorotipos associados com maiores taxas de mortalidade são o 3, 6A e 19A pertencentes somente a PCV-13, e o sorotipo não-vacinal 11A. Os sorotipos não-vacinais estão mais associados a septicemia, afetam principalmente crianças com co-morbidades e adultos imunocomprometidos e estão menos associados com a pneumonia (Browall et al., 2014).

### 1.3 Fatores de Virulência

Vários são os fatores de virulência presente em *S. pneumoniae*, os quais contribuem para o processo de patogênese de modo multifatorial. No processo de colonização, as adesinas são fundamentais, pois permitem a adesão das células bacterianas com as células do epitélio respiratório, além disso, alguns pneumococos podem produzir pili, os quais medeiam à ligação do pneumococo nas células, além de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias (Mitchell & Mitchell, 2010). A Protease de IgA inativa o anticorpo IgA presente nas mucosas do epitélio. A neuraminidase (NanA) favorece a manutenção do pneumococo, pois atua na clivagem de substâncias do muco respiratório, diminuindo assim sua viscosidade (Bogaert et al., 2004). Existem também outras enzimas importantes no processo como a  $\beta$ -galactosidase (BgaA),  $\beta$ N-acetilglicosaminidase (StrH), hialuronidase (Hly), enolase (Eno), fator de pneumocócico A de adesão e virulência (PavA) (Kadioglu et al., 2008).

No processo de dano ao hospedeiro, há a atuação de enzimas como as pneumolisinas (Ply), que são proteínas que desestabilizam as células humanas por inibirem os movimentos ciliares do epitélio respiratório, além de ativarem células do sistema imune do hospedeiro para que depois sejam utilizadas contra o próprio hospedeiro, como TCD4+, citocinas e o sistema do complemento. A autolisina (LytA) que atua degradando o peptidoglicano presente na parede celular, provocando assim lise da célula com liberação de enzimas como a pneumolisina, importante no processo de patogênese. O antígeno A de superfície pneumocócica (PsaA) que integra o sistema de transporte ABC, e permite que a bactéria resista ao estresse oxidativo gerado tanto pelo próprio metabolismo quanto pelo processo da resposta imune do hospedeiro. Já a proteína de superfície pneumocócica (PspA) dificulta a ligação do sistema do complemento na superfície do pneumococo e assim impede a fagocitose e opsonização (Kadioglu et al., 2008; Mitchell & Mitchell, 2010).

Apesar destes fatores de virulência desempenharem um importante papel na instalação do pneumococo, permanência no hospedeiro e manutenção do processo de patogênese, o principal fator de virulência é a cápsula polissacarídica que tem como principal função evitar a fagocitose, protegendo a célula bacteriana contra a resposta imune do hospedeiro (Mitchell & Mitchell, 2010).

A cápsula polissacarídica é codificado por um único locus *cps* (*Capsular Polysaccharide Synthesis*), que na maioria dos pneumococos, está localizado entre os genes *dexB* e *aliA* de seu genoma. O locus *cps* codifica todos os genes para a síntese, translocação através da membrana, polimerização e ligação das cadeias polissacarídica do peptidoglicano da parede celular do pneumococo. Na região 5' do locus *cps* há os genes *cpsABCD* que são importantes na regulação da síntese da cápsula, sendo que o gene *cpsA* é o mais conservado entre os pneumococos (Yother, 2011).

Devido a sua estrutura química e características imunogênicas a cápsula apresenta uma grande variabilidade em sua composição sendo descritos atualmente 95 diferentes sorotipos capsulares (Rayner et al., 2015). Por desempenhar papel fundamental na patogênese do pneumococo, ela é o principal alvo no desenvolvimento de imunoprofilaxia, porém apenas alguns destes sorotipos estão incluídos nas diferentes formulações das vacinas desenvolvidas até o momento.

#### **1.4 Imunoprofilaxia**

Com o descobrimento da penicilina 1940 e posterior utilização mostrando resultados promissores contra as infecções pneumocócicas, o interesse no controle da doença pela imunoprofilaxia diminuiu (Tillett, Cambier & McCormack, 1944; Austrian, 1999). Porém com o surgimento de isolados de pneumococos resistentes à penicilina e multirresistentes, levando ao insucesso do tratamento, aumentando assim as taxas de morbidade e mortalidade entre os indivíduos afetados por este micro-organismo, ressurgiu o interesse da prevenção da DPI através da vacinação (Cherry et al., 2004).

Atualmente existem duas classes de vacinas pneumocócicas que são amplamente utilizadas: a polissacarídica e as vacinas conjugadas com carreadores protéicos. A primeira vacina desenvolvida foi a vacina polissacarídica, em 1977 que continha em sua formulação os 14 sorotipos mais frequentes envolvidos nas infecções pneumocócicas daquela época, posteriormente em 1983 foi licenciada nos EUA a vacina polissacarídica 23-valente, composta por 23 antígenos capsulares do pneumococo (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F), devido a sua baixa imunogeneicidade não deve ser

administrada em crianças menores de 2 anos de idade (CDC, 2010). Nesta faixa etária as células B ainda não estão maduras, e como a vacina é classificada como timo-independente, ou seja, é capaz de ativar somente as células B sem a cooperação das células T-helper, gerando assim uma resposta imunológica baixa e sem a estimulação dos anticorpos de memória, não sendo efetiva na prevenção da DPI entre este grupo etário, o qual é o mais afetado pela doença pneumocócica (Oosterhuis-Kafeja, Beutels & Van Damme, 2007). Sendo recomendada para indivíduos incluídos em grupos especiais de risco para DPI e para adultos acima dos 60 anos de idade (CDC, 2010).

Além disso, este tipo de vacina não interfere no estado de portador e não se mostra efetiva na prevenção de infecções da mucosa, como a otite média e sinusite. Entretanto, parece reduzir significativamente a doença pneumocócica entre indivíduos com *diabetes mellitus*, doença coronariana, doença pulmonar crônica, insuficiência cardíaca congestiva, asplenia funcional ou anatômica (Tan, 2012).

Já as vacinas pneumocócicas conjugadas (*Pneumococcal Conjugate Vaccine* – PCV), a cápsula polissacarídica do pneumococo pode ser conjugada com toxóides tetânicos e/ou com uma variante não tóxica da toxina diftérica (CRM197) e/ou com a proteína D de *Haemophilus influenzae*, dependendo de sua formulação pode conter um ou todos os tipos de carreadores protéicos (Tan, 2012). Infelizmente, como para cada sorotipo necessita-se de uma grande quantidade de conjugado a fim de estimular uma resposta imune-específica, e como existe uma grande quantidade de sorotipos capsulares, apenas um número limitado de sorotipos pode ser incluído na formulação destas vacinas (Briles et al., 1997). A escolha dos sorotipos que fazem parte das vacinas é dirigida aos sorotipos mais frequentemente associados com DPI (Talbot et al., 2004). A primeira vacina conjugada foi a vacina PCV-7 introduzida nos EUA em 2000, para todas as crianças de 2 a 23 meses e para crianças mais velhas com algum fator de risco para a DPI conferindo imunidade para apenas os sete sorotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) responsáveis por mais de 70% de todos os casos de DPI no mundo (WHO, 2012).

Com o objetivo de ampliar o número de sorotipos contemplados nas formulações e assim aumentar a cobertura vacinal abrangendo um maior número possível de sorotipos envolvidos com a DPI, posteriormente foi formulada a PCV-10, que inclui os sete sorotipos da PCV-7 mais três sorotipos adicionais (1, 5, e 7F) e a PCV-13 que inclui os dez sorotipos da PCV-10 mais três sorotipos adicionais (3, 6A,

e 19A). Os sorotipos contidos na PCV-13 causam mais de 80-90% das doenças pneumocócicas em várias regiões do mundo inclusive na América Latina (Romney et al., 2008).

As PCVs promovem a redução do estado de portador pelos sorotipos vacinais e conseqüentemente na DPI, atingindo tanto indivíduos alvos da vacinação, como aqueles que não a recebem devido ao efeito indireto (Tan, 2012).

No Brasil as vacinas contra o pneumococo, como a vacina polissacarídica 23-valente e a PCV-7 estão disponíveis desde a década de 1990 nos Centros de Referências de Imunobiológicos Especiais (CRIE) para indivíduos com maior suscetibilidade a aquisição da infecção pneumocócica. Porém, somente em 1999 a vacina polissacarídica 23-valente passou a fazer parte da Campanha Nacional de Vacinação do Idoso, sendo administrada em indivíduos a partir de 60 anos (Ministério da Saúde, 2010).

Recentemente a vacina PCV-10 foi licenciada no Brasil, como parte do Programa Nacional de Imunizações, distribuída gratuitamente para todas as crianças através do SUS (Ministério da Saúde, 2010). A vacina foi introduzida em todas as cidades do Brasil entre março a setembro de 2010, em 3 doses, a primeira aos 2 meses, seguida de uma dose aos 4 e 6 meses de idade e um reforço adicional entre 12 -15 meses de idade (Afonso et al., 2013). Entretanto, para crianças que tinham na época da introdução da vacina de 12-23 meses de idade a vacina foi administrada somente em uma dose (Domingues et al., 2014). Segundo o Ministério da Saúde, a inclusão da vacina PCV-10 no calendário de vacinação infantil representa um grande avanço para a saúde pública brasileira, e tem como meta imunizar aproximadamente 6 milhões de crianças menores de 2 anos de idade em todo o país (Ministério da Saúde, 2010).

### **1.5 Impacto da Vacinação**

A introdução das vacinas conjugadas dentro dos programas de imunização em várias regiões do mundo teve um impacto positivo na redução da incidência e prevalência da DPI, reduzindo também a taxa de portador na nasofaringe, diminuindo a probabilidade de transmissão das crianças mais novas, frequentemente colonizadas, para outros indivíduos da população, inclusive entre

adultos, mecanismo conhecido como imunidade de rebanho (efeito indireto) favorecendo a redução de sorotipos vacinais do pneumococo circulantes entre os indivíduos (Brueggemann et al., 2007; Pilishvili et al., 2010).

Com a vacinação foi possível reduzir em aproximadamente 20% as taxas de DPI em todas as idades (Harboe et al., 2014). Entretanto o maior impacto foi visualizado entre crianças menores de 2 anos de idade, alvo da imunização, com diminuição de 69% das taxas totais da doença pneumocócica (Whitney et al., 2003). Em relação aos idosos ( $\geq 65$  anos de idade), houve uma queda de 92% de DPI causada por sorotipos vacinais da PCV-7 e de 37% em relação a todos os sorotipos, devido à imunidade de rebanho (Hicks et al., 2007; Pilishvili et al., 2010).

Apesar da vacina contra o pneumococo ter sido introduzida no Brasil recentemente, já é possível ver seu impacto positivo na redução de DPI, pois um estudo realizado em Salvador, Bahia verificou que a incidência anual de casos de meningites diminuiu de 1,65/100.000 habitantes em 1996 para 0,2/100.000 habitantes em 2012 (Santos et al., 2015). Em São Paulo houve uma significativa redução na incidência total de DPI entre crianças menores de 2 anos de idade, reduzindo de 20,3/1000 indivíduos no período pré vacinação para 3,97/1000 indivíduos após a introdução da vacina ( $p < 0,0012$ ), em relação aos sorotipos vacinais contidos na PCV-10 houve também redução de seu envolvimento na DPI entre as crianças menores de 2 anos de idade de 16,47/1000 indivíduos para 0,44/1000 ( $p = 0,0002$ ), mostrando o efeito direto da vacinação nas taxas de DPI (Santos et al., 2013). Em relação ao Rio Grande do Sul as taxas de incidência de meningite diminuíram de 3,80/100.000 em 2007 para 1,80/100.000 habitantes em 2012 (Grando et al., 2015).

Ao ser avaliada a taxa de mortalidade em casos de meningite por pneumococo, verificou-se uma redução nas taxas entre crianças menores de 2 anos de idade de 1,30 para 0,40/100.000 habitantes. Assim a PCV-10 reduziu em 50% a taxa de incidência e em 69% a taxa de mortalidade por meningite pneumocócica, comparando os anos de 2007 e 2012, porém as maiores taxas registradas foram entre as crianças com idade de seis meses completos e menores de um ano (Grando et al., 2015).

Em relação à pneumonia que continua sendo a infecção que mais acomete as crianças menores de 5 anos de idade, com altas taxas de mortalidade verificou-se que entre cinco cidades do Brasil após um ano da introdução da vacina houve diminuição nas taxas de hospitalização por pneumonia (Afonso et al., 2013).

Um estudo caso-controle realizado no Brasil com crianças mostrou que a PCV-10 é efetiva contra a DPI causada por sorotipos vacinais em 83,8% dos casos e em 77,9% dos casos de doença invasiva causada por sorotipos não vacinais, mas que pertencem ao mesmo sorogrupo dos sorotipos da PCV-10 (como os sorotipos 6A, 6C, 6D, 7C, 9N, 18A, 18B, 19A e 23A). A vacina também foi efetiva em crianças que receberam apenas uma dose da vacina das quatro doses recomendadas, por que tinham na época da introdução da vacina entre 12-23 meses de idade. A efetividade para casos de meningite foi de 87,7% e pneumonia ou bacteremia foi de 81,3%. Entretanto a vacina não se mostrou significativamente eficaz contra os sorotipos não vacinais (Domingues et al., 2014).

Fica claro que a vacina conjugada apresenta efeitos positivos em reduzir a doença pneumocócica, uma doença com altas taxas de mortalidade em várias regiões do mundo, porém a vacina modifica a distribuição dos sorotipos de pneumococo mais prevalentes causadores de DPI. Foi verificado nos EUA, primeiro país a introduzir a PCV-7, que apesar da vacina reduzir o número de casos por sorotipos vacinais, houve um aumento de doença invasiva causada por sorotipos não vacinais, estes haviam sido responsáveis por apenas 17% de todos os casos de DPI durante os anos pré-vacina, aumentando para 88% dos casos em 2004, quatro anos após a introdução da vacina (CDC, 2010), tornando-se uma grande preocupação, por que muitos destes sorotipos estão associados com maiores taxas de resistência aos antimicrobianos. Um dos maiores exemplos de emergência após a introdução da PCV-7 foi o sorotipo 19A (Kim et al., 2012; Lee et al., 2013).

Estudo realizado em São Paulo mostrou que os sorotipos mais frequentes antes da vacinação eram 14, 5, 6B, 12F e 1. Após dois anos da introdução da vacina o sorotipo 7F pertencente a PCV-10, foi o mais frequente, seguido dos sorotipos 8, 12F e 3 (não pertencentes a PCV-10). Em relação aos sorotipos não vacinais, houve um aumento não significativo de 26% para 62% em DPI, não sendo observado nesta população o aumento do sorotipo 19A conforme relatado em outros países (Santos et al., 2013). Já para Domingues e col. (2014) os sorotipos mais frequentes em DPI entre as crianças foram: 14, 6B, 19A, 3, 6A e 23F, sendo que o sorotipo 19A, 3 e 6A não estão incluídos na PCV-10, mas estão presentes na PCV-13. Em nossa região sorotipos vacinais como 14, 6B, 23F, 18C e 19F permanecem entre os sorotipos mais frequentes causando doença invasiva dois anos após a introdução da PCV-10, entretanto como este estudo incluiu basicamente a população adulta, sugere-se que

não houve tempo de verificar a efetividade da vacina (imunidade de rebanho) nesta população (Caierão et al., 2014). A circulação de sorotipos vacinais mesmo após a implementação da vacina em Porto Alegre pode ser explicada porque nesta cidade e em São Paulo a cobertura da vacina mesmo após um ano de sua introdução ficou em aproximadamente 80%, enquanto que em outras cidades como Belo Horizonte, Curitiba e Recife a cobertura vacinal foi maior que 90%. Outra possível razão é que em Porto Alegre o início da vacinação começou mais tarde que em outras cidades brasileiras (Afonso et al., 2013).

Vale ressaltar que o impacto da vacinação no Brasil, mesmo sendo introduzida há pouco tempo, mostra um efeito positivo, observado principalmente na população alvo da vacinação (crianças menores de 2 anos de idade). Porém, estudos de vigilância para monitorar a distribuição dos sorotipos circulantes e avaliar a ocorrência de sorotipos emergentes são extremamente importantes. Em especial, a emergência de infecções causadas pelo sorotipo 19A, verificada após a introdução da PCV-7 devendo ser monitorada em países que, como o Brasil, adotaram a vacina PCV-10.

### **1.6 Mecanismos de escape à vacinação**

Apesar de todos os benefícios bem documentados anteriormente em relação à utilização das vacinas, e como apenas alguns sorotipos estão contidos em sua formulação, inevitavelmente a vacina provoca uma redistribuição dos sorotipos mais frequentes envolvidos na infecção pneumocócica e em portadores. Assim, após a introdução das PCVs observa-se um aumento de casos de DPI decorrentes de sorotipos não vacinais em muitas regiões do mundo, estes sorotipos não vacinais começaram a ocupar o nicho anteriormente preenchido pelos sorotipos vacinais (Brueggemann et al., 2007). Como não são alvos da imunoprofilaxia os pneumococos de sorotipos não vacinais escapam da vacina e conseqüentemente reduzem o seu efeito através da expansão e aumento na frequência de clones pré-existentes, devido à substituição de sorotipos e/ou devido à troca de sorotipo capsular. Estes fenômenos estão relacionados com o aumento na frequência de sorotipos não vacinais causando DPI (Brueggemann et al., 2007; Wyres et al., 2013).

A substituição dos sorotipos, fenômeno conhecido como *replacement*, ocorre quando há uma diminuição na prevalência de sorotipos vacinais acompanhada por um aumento de sorotipos não vacinais que acabam preenchendo este nicho desocupado. Este mecanismo de substituição de sorotipos na nasofaringe de crianças saudáveis pode ou não ser um problema, dependendo se estes novos sorotipos têm poder de causar doença (Brueggemann et al., 2007).

Devido ao *replacement*, um significativo aumento de isolados pertencentes ao sorotipo 19A foi verificado nos EUA após a vacinação, tanto em crianças como em idosos. A caracterização genotípica dos sorotipos 19A por MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*) mostrou que a maioria destes isolados circulantes pertencia a ST199 (*Sequence Type*), que já existia antes da introdução da vacina, porém em menor quantidade, ocorrendo a expansão clonal deste genótipo após a pressão exercida pela introdução da vacina (Pai et al., 2005; Brueggemann et al., 2007).

A troca capsular ou *switching* capsular ocorre quando genes que codificam um tipo capsular são trocados, via transformação e recombinação, por genes que codificam outro tipo de cápsula. Este mecanismo de troca permite que clones geralmente associados com sorotipos vacinais persistam mesmo após as PCVs mantendo seu *background* genético, porém agora expressando outro sorotipo capsular (Brueggemann et al., 2007; Rayner et al., 2015), sendo um grande problema por que permite que estes sorotipos escapem da vacina. Isolados que escapam da vacina podem progredir dentro de 2-3 anos após a sua introdução, como já detectado nos EUA e em alguns países da Europa (Brueggemann et al., 2007; Ansaldi et al., 2011).

Estudos *in vitro* mostram que o *switching* capsular pode atuar sobre as propriedades de virulência do pneumococo, principalmente por que a cápsula polissacarídica é o seu principal fator de virulência, assim sorotipos que não tinham um potencial virulento devido à troca capsular passaram a expressar um tipo mais virulento (Sabharwal et al., 2013).

A emergência do sorotipo 19A após introdução da PCV-7, pode ser explicada tanto pelo mecanismo de *replacement*, mas também pelo processo de *switching* capsular que ocorreu, por exemplo, devido à emergência de um novo isolado de pneumococo recombinante como a ST695, que começou a expressar a cápsula do sorotipo 19A, mas manteve seu *background* genético do sorotipo vacinal 4. Estas amostras foram detectadas apenas três anos após a implementação da vacina, mas

rapidamente tiveram sua prevalência aumentada (Brueggemann et al., 2007). Outros exemplos de *switching* capsular foram recentemente sugeridos (Wyres et al., 2013; Caierão et al., 2014).

### **1.7 Emergência do sorotipo não vacinal 19A após a introdução das vacinas conjugadas PCV-7 e PCV-10**

A epidemiologia do pneumococo está constantemente mudando, e esta mudança é favorecida pela própria flutuação na prevalência dos sorotipos que ocorre naturalmente mesmo na ausência de pressão causada pela vacinação (Hulten et al., 2013).

O sorotipo 19A emergiu como o sorotipo mais prevalente nos EUA após a utilização da PCV-7, como característica é um sorotipo relacionado com resistência a múltiplas drogas. De 1999-2000 para 2008-2009 a porcentagem dos sorotipos vacinais entre isolados clínicos nos EUA diminuiu de 55% para 5% e a porcentagem do sorotipo 19A aumentou de 2% para 22% (Richter et al., 2013). O aumento de DPI causada pelo sorotipo 19A foi também observado na Europa, Países Asiáticos (van der Linden et al., 2013; Lai et al., 2014) e em alguns países da América Central. No México, por exemplo, o sorotipo 19A aumentou sua frequência de 6,3% no período pré-vacinação para 23,6% no período pós-vacinação (2009-2012) (Echániz-Avilés et al., 2014).

Um estudo controlado randomizado da Holanda demonstrou um aumento do sorotipo 19A na nasofaringe de indivíduos que receberam a PCV-7, quando comparado com controles que não receberam a vacina (Van Gils et al., 2010). Porém, o aumento do sorotipo 19A também ocorre em países sem a introdução da vacina sugerindo a ação de outros fatores além da vacinação para a emergência deste sorotipo, como a disseminação de alguns clones específicos, como é o caso da ST320 que está disseminada mundialmente e está fortemente associada com resistência à penicilina; além disso, esta ST apresenta algumas vantagens associadas à colonização na nasofaringe permitindo que ela rapidamente ocupasse este nicho (Hsieh et al., 2013).

Na América latina durante o período de 1990-2010, o sorotipo 19A aumentou sua frequência de 1,5% para 4,9%, ocupando o nono lugar entre os 20 sorotipos

mais prevalentes, sendo que na Argentina e Colômbia se verificou um aumento significativo na prevalência deste sorotipo (Castañeda et al., 2012).

No Brasil a distribuição dos sorotipos varia de uma região para outra, em São Paulo a frequência deste sorotipo permaneceu estável logo após a introdução da PCV-10 (Santos et al., 2013). Em Porto Alegre foi observado um aumento não significativo na proporção de isolados pertencentes ao sorotipo 19A em apenas dois anos após a introdução da vacina, aumentando de 2,5% antes da PCV-10 para aproximadamente 5% em 2012 (Caierão et al., 2014).

Alguns estudos sugerem que a PCV-10 induz a imunidade cruzada para sorotipos estreitamente relacionados, assim os anticorpos formados pelos sorotipos 6B e 19F (sorotipos vacinais) induziriam uma proteção cruzada para os sorotipos 6A e 19A (não vacinais), respectivamente, tanto em portadores quanto em casos de doença (Vesikari et al., 2009; Wysocki et al., 2009). Em países que utilizaram a PCV-7, a vacina resultou em 76% de efetividade contra DPI causada pelo sorotipo 6A, mas não foi efetiva na redução de doença pneumocócica devida ao sorotipo 19A (Whitney et al., 2006; van der Linden et al., 2013). Entretanto, alguns autores afirmam que a maneira como ocorre o processo de conjugação da PCV-10, ela proporcionaria esta imunidade cruzada entre estes sorotipos (Poolman et al., 2011; Mrkvan et al., 2013). No Brasil um recente estudo caso-controle realizado com crianças para verificar a efetividade da PCV-10, mostrou que a vacina promove uma proteção cruzada contra o sorotipo 19A, entretanto não foi verificada esta efetividade para o sorotipo 6A. (Domingues et al., 2014). Resultados similares também foram evidenciados por um recente estudo de coorte indireto (Verani et al., 2015).

Em muitos países, como os EUA, após observarem este aumento significativo de sorotipos não vacinais como o sorotipo 19A houve a substituição da PCV-7 pela PCV-13, a qual inclui este sorotipo em sua formulação. Dados recentes indicam uma redução significativa na incidência de DPI em crianças causadas pelos sorotipos da PCV-13, inclusive uma diminuição na prevalência do sorotipo 19A foi observada (Moore et al., 2015).

### **1.8 Emergência de outros sorotipos não vacinais após a PCV-13 e novos alvos de vacinas contra o *S. pneumoniae***

Em 2010 foi licenciada nos EUA a vacina PCV-13 substituindo a PCV-7 após a preocupante emergência principalmente do sorotipo 19A, o qual está associado com altas taxas de resistência. Não foi somente o sorotipo 19A que aumentou em sua frequência, mas os sorotipos adicionais incluídos na PCV-13 (1, 3, 5, 6A, 7F e 19A) acometiam 63% da DPI na população pediátrica após a PCV-7 (Duggan, 2010; Nuorti & Whitney, 2010).

Entretanto após a introdução da PCV-13 observou-se a emergência de sorotipos não incluídos nesta vacina, a prevalência do sorotipo 15B/15C aumentou de 2,7% para 6,3% em 2012, assim como a prevalência do sorotipo 35B que aumentou de 3,6% em 2009 para 8,2% em 2012. Sendo também evidenciado um aumento para os sorotipos 6C/6D e 23A. Interessantemente a proporção de pneumococo não tipáveis isolados de pacientes com idade igual ou maiores de 65 anos aumentou ao longo do tempo (Mendes et al., 2015).

Na tentativa de se prevenir a emergência de sorotipos não vacinas, e como é impossível colocar nas vacinas atualmente disponíveis todos os 95 sorotipos capsulares, novos alvos da vacina estão em desenvolvimento baseados em proteínas de superfície como PspA, PscC, IgA1p, PpmA e SirA, e em fatores de virulência como a pneumolisina, assim estas novas vacinas teriam um potencial de proteção contra todos os sorotipos de pneumococo que causam doença, por que estes são constituintes presentes em todos os pneumococos. Testes em modelos animais mostram sua imunogenicidade e capacidade contra as DPI (Tan, 2012).

### **1.9 Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos**

A evolução clínica DPI é influenciada por diversos fatores, entre eles a escolha do tratamento adequado. De modo geral, o tratamento das infecções pneumocócicas é feito de forma empírica baseada em características clínicas e epidemiológicas da doença (Bartlett, 2011). Nos casos de DPI, especialmente meningite, é de fundamental importância tanto o diagnóstico quanto o tratamento precoce, pois em muitos casos apesar do adequado tratamento, são ainda relatadas

elevadas taxas de sequelas neurológicas e mortalidade entre os pacientes (Ruckinger et al., 2009).

Atualmente, a penicilina continua sendo o antimicrobiano de escolha no tratamento de infecções pneumocócicas apresentando em geral baixos níveis de MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*). Entretanto, devido à emergência de *S. pneumoniae* não suscetível à penicilina (PNSP) ou multirresistentes (MDR), classificados como isolados apresentando resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e a mais outras duas classes de antimicrobianos, o tratamento destas infecções tornou-se um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo (Lee et al., 2010; Tsai et al., 2012).

Como alternativa terapêutica, os macrolídeos, especialmente a eritromicina e a azitromicina, começaram a ser utilizados, porém foi observado resistência a estes antimicrobianos. A resistência aos macrolídeos disseminou-se conjuntamente com os PNSP. Pneumococos resistentes são motivo de grande preocupação devido à disseminação de clones multirresistentes, os quais estão associados a elevadas taxas de mortalidade (Richter et al., 2009).

Entre as classes de antimicrobianos que até o momento não apresentam resistência, os glicopeptídeos como a vancomicina são uma boa opção terapêutica, entretanto, deve ser utilizada com cautela para prevenir o surgimento de resistência. Também há as fluoroquinolonas, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, lincosamidas e cloranfenicol, porém para estes antimicrobianos a taxa de resistência pode ocorrer em frequências variadas dependendo da região (Cunha et al., 2014).

O mecanismo de ação dos  $\beta$ -lactâmicos é pela ligação nas Proteínas de Ligação à Penicilina (PBP) que catalisam o estágio terminal da síntese do peptidoglicano, principal constituinte da parede celular bacteriana; assim estes antimicrobianos provocam lise celular. O primeiro relato de resistência à penicilina ocorreu na década de 1960, porém esse fato só ganhou importância em 1977 quando foi relatada uma epidemia de infecção por pneumococo na África do Sul por isolados resistentes (Appelbaum et al., 1977).

Existem três classes de proteínas totalizando seis diferentes tipos de PBPs. Classe A (PBP1a, PBP1b e PBP2a), classe B (PBP2x e PBP2b) e PBP3. A diminuição da afinidade das PBPs à penicilina pode envolver alteração em uma única PBP ou em diferentes PBPs ao mesmo tempo, conferindo diferentes perfis de suscetibilidade, pois mutações em PBP2x e PBP2b estão fortemente relacionadas a

resistência à penicilina. Mutações em PBP1a juntamente com PBP2b e PBP2x aumentam o MIC da penicilina, já alterações em PBP2a apresentam MICs mais baixos (Cornick & Bentley, 2012).

Mutações nestes genes estão associadas com eventos de recombinação tanto intra espécie, pois algumas destas mutações são estáveis em clones de PNSP disseminados internacionalmente, sugerindo que estes genes proporcionam vantagens evolutivas, como entre espécies, sendo relato eventos de recombinação envolvendo espécie de *S. mitis* e *S. oralis* (Cornick & Bentley, 2012).

Outro mecanismo que confere resistência à penicilina é o *switching* capsular, pois durante a troca do sorotipo capsular, duas das seis Proteínas de Ligação à Penicilina, a PBP2x e PBP1a, as quais ficam posicionadas ambas em regiões finais do locus *cps*, entre os genes *dexB* e *aliA*, que codifica a cápsula do pneumococo (Brueggemann et al., 2007), poderão ser transferidas juntamente para a amostra receptora.

Em 2008, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) estabeleceu novos pontos de corte para os  $\beta$ -lactâmicos como a penicilina e cefalosporinas, devido a características de farmacocinética e farmacodinâmica destes antimicrobianos, levando em consideração o sítio de infecção e a via de administração do fármaco. Assim para a penicilina administrada por via intravenosa em casos de não meningite, houve uma modificação na MIC de  $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$  para  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ , de  $0,12-1,0 \mu\text{g/mL}$  para  $4,0 \mu\text{g/mL}$  e de  $\geq 2,0 \mu\text{g/mL}$  para  $\geq 8,0 \mu\text{g/mL}$ , para os isolados identificados como sensível, intermediário e resistente, respectivamente. Além disso, para os casos de meningite os isolados são categorizados como sensível ou resistente, assim os pontos de corte para penicilina administrada por via intravenosa são de  $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$  ou  $\geq 0,12 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente (CDC, 2008). A adoção dos novos critérios fez com que a prevalência de resistência se modificasse, conforme alguns exemplos a seguir: estudo realizado em Minas Gerais após os novos critérios foi observado diminuição nas taxas de resistência de 33% para 1% (Wolkers et al., 2009). Na Coréia do Sul também ocorreu diminuição na proporção de isolados não suscetíveis a penicilina, de 80,4% para 27,9% (Lee et al., 2010). Estudo realizado por Hampton e col. (2012) mostrou que sob o novo ponto de corte para a administração parenteral, a taxa de DPI causada por PNSP permaneceu abaixo das taxas que existiam antes da introdução da PCV-7, exceto para os adultos com idade entre 50-64 anos. Entretanto, de forma geral, dados avaliando a suscetibilidade à

penicilina após as modificações determinadas pelo CLSI, são, ainda, escassos em nosso país.

Os macrolídeos atuam inibindo a síntese protéica do RNA ribossomal. A resistência pode ocorrer de duas formas, ou devido a modificação no sítio ativo mediado pela enzima *ermB*-metilase codificada pelo gene *erm*, que confere resistência à todos macrolídeos, lincosamidas e estreptogamina B. A produção desta enzima metilase é o principal mecanismo de resistência, conferida pelos genes *erm(B)* responsável pelos maiores MICs de eritromicina, e *erm(TR)*. O outro mecanismo de resistência é devido à bomba de efluxo, codificado pelos genes *mef* (*mefA* e *mefE*). Este mecanismo de resistência não abrange a lincosamidas e estreptogaminas ficando restrita apenas aos macrolídeos, como características apresentam MICs menores. Existem também outros mecanismos menos frequentes como mutações no gene 23S rRNA ou em proteínas ribossomais (Tait-Kamradt et al., 2000; Leclercq & Courvalin, 2002).

As fluoroquinolonas agem em dois alvos importantes para a replicação bacteriana, na DNA girase e na topoisomerase. Ambas as enzimas são compostas por heterotetrâmetros com dois tipos de subunidades, chamadas de GyrA e GyrB na DNA girase e ParC e ParE na topoisomerase IV. A resistência é verificada devido ao acúmulo de mutações ponto na Região Determinante de Resistência a Quinolonas (QRDR), a maioria das mutações ocorre nas regiões de GyrA e/ou ParC, apresentando MICs elevados. Já mutações em GyrB e ParE são menos frequentes e geralmente conferem níveis de resistência mais baixo. Há relatos que a resistência a fluoroquinolonas pode ser devido a uma única mutação em ParC e GyrA (Lupien et al., 2013).

A tetraciclina atua se ligando na subunidade ribossomal 30S inibindo a síntese protéica, a resistência a este antimicrobiano é devido a presença dos genes *Tet(M)* e *Tet(O)*, ou menos frequente devido a bombas de efluxo (Canton et al., 2003; Montanari et al., 2003). O mecanismo de ação da sulfametoxazol-trimetoprim é de inibir a síntese do ácido fólico e a resistência é devido a mutações nos genes *folA* e *folP* (Cornick et al., 2014).

Com a disseminação de isolados resistentes tornou-se necessário à implementação e padronização de técnicas de tipagem molecular com base epidemiológica como o PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e MLST, bem como a padronização da nomenclatura destes clones. Assim, em 1997 foi criada, a

*Pneumococcal Molecular Epidemiology Network* (PMEN) com o objetivo principal de unificar a nomenclatura e a classificação de clones de *S. pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos em todo o mundo, entretanto nos últimos anos clones suscetíveis aos antimicrobianos internacionalmente distribuídos também foram incluídos no PMEN. O primeiro clone classificado pelo PMEN foi o clone Spain<sup>23F</sup>-1 mostrando resistência a macrolídeos, fluoroquinolonas e rifampicina. Foi isolado pela primeira vez na Espanha e pertence ao sorotipo 23F. Esta é a ordem de classificação padronizada pelo PMEN, ou seja, primeiro é colocado o nome do país que primeiramente foi identificado o isolado de pneumococo, em seguida vai o primeiro sorotipo do clone encontrado e por último o número representando a ordem cronológica que foi inserido no PMEN. Quando há o *switching* capsular depois do número de classificação do PMEN é inserido o sorotipo que ocorreu o mecanismo, por exemplo, Spain<sup>23F</sup>-1-19F (sorotipo 19F é uma variante do Spain<sup>23F</sup>-1). Atualmente são descritos 43 clones no PMEN (PMEN, 2015).

A ocorrência da resistência aos antimicrobianos não é homogênea entre as diferentes localidades e nem ao longo do tempo, devido à pressão seletiva causada pelo próprio uso dos antimicrobianos como pela circulação de clones resistentes. A dispersão de alguns isolados resistentes deve-se à expansão de poucos clones no mundo. Nos EUA, durante o período de 2004 – 2005, portanto ainda sob a vigência do antigo critério para definição de resistência, 63% dos isolados eram multirresistentes estando associados principalmente a dois clones internacionais, Taiwan<sup>19F</sup>-14 e Utah<sup>35B</sup>-24 (Richter et al., 2009).

Em Salvador durante o período de 1996 a 2012 um total de 20,3% dos isolados de meningite foram não suscetíveis à penicilina. Havendo um aumento de PNSP de 18,8% em 1996 para 33,3% em 2012, mesmo após os novos pontos de corte (Santos et al., 2015).

Estudo realizado recentemente em Porto Alegre mostrou que poucos são os isolados de DPI com não suscetibilidade à penicilina e a ceftriaxona. Não foram encontrados neste estudo isolados com MIC à penicilina >4 µg/mL. A não suscetibilidade à penicilina ficou restrita aos sorotipos 14 e 19A, sendo que alguns isolados pertencentes ao sorotipo 19A mostraram multirresistência, principalmente relacionada à tetraciclina, eritromicina e a não suscetibilidade aos β-lactâmicos. Neste estudo apenas um isolado foi resistente a levofloxacina. Em relação aos macrolídeos, a não suscetibilidade foi de 8%, sendo associada principalmente com a

presença do gene *mefA* (44,0%). Todos os isolados que apresentavam o gene *ermB* foram resistentes a clindamicina. A não suscetibilidade a eritromicina foi de 7,9% (Caierão et al., 2014).

Outro estudo realizado logo após a introdução da PCV-10 também nesta cidade mostrou que a penicilina e ceftriaxona ainda são boas opções para o tratamento de doença pneumocócica, exceto para casos de meningite, pois foi verificado somente um isolado com suscetibilidade reduzida à penicilina (MIC= 4,0 µg/mL) e dois à ceftriaxone (MIC= 2,0 µg/mL) todos estes isolados pertenciam ao sorotipo 19A. Considerando os pontos de corte para meningites 6 dos 28 isolados de líquido, ou seja, 21,4% foram resistentes à penicilina, estes pertenciam aos sorotipos 14, 3, 9V, 23F e 24F e todos foram sensíveis a ceftriaxona. Resistência a eritromicina foi observada em 8,2% dos isolados, o gene *mefA* foi o mais frequente (46,1%). Entretanto, o gene *ermB* está associada com MIC≥ 256 µg/mL para eritromicina, em três isolados o teste fenotípico de resistência induzível a clindamicina, o teste D estava positivo indicando que nestes casos a clindamicina não deve ser utilizada. A não suscetibilidade a sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina foi de 37,7% e 22% respectivamente, e nenhum isolado apresentou resistência à vancomicina (Mott et al., 2014).

## **2.0 Métodos de tipagem molecular em isolados de *S. pneumoniae***

Na investigação das infecções pneumocócicas é muito importante conhecer as relações genéticas entre os isolados, estudar suas rotas de transmissão, avaliar o impacto das intervenções humanas, como a vacinação e determinar fontes de infecção ou surto. Para realizar estas análises é preciso recorrer a métodos de genotipagem. Atualmente, destacam-se o MLST e o PFGE, entretanto outro método, o MLVA (*Multi Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis*) tem emergido com uma ferramenta mais discriminatória, barata e rápida que o MLST. O MLST e MLVA são úteis para comparar perfis genotípicos entre diferentes regiões do mundo, superiores ao PFGE que é uma técnica que se restringe a caracterização epidemiológica de micro-organismos localmente, não permitindo a comparação dos resultados entre laboratórios (McGee et al., 2001; Rayner et al., 2015).

O MLST foi desenvolvido por Enright e Spratt em 1998. Esta técnica se baseia na amplificação e posterior sequenciamento de sete genes constitutivos (*housekeeping*) (genes *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* e *ddl*) considerados estáveis e menos propensos a eventos de recombinação que o restante do genoma, permitindo estudar possíveis mudanças que ocorrem na população ao longo do tempo (Enright & Spratt, 1998). Cada sequência obtida a partir dos sete genes gera uma sequência tipo (*Sequence Type* ou ST) que será comparada com um banco de dados internacional, disponível em [www.pubmlst.org/spneumoniae/](http://www.pubmlst.org/spneumoniae/). Para que um isolado seja considerado como pertencente ao mesmo Complexo Clonal (CC), este isolado deve ter no mínimo 5 alelos iguais entre os sete analisados. Entretanto o MLST é uma técnica cara e laboriosa, limitada a laboratórios que dispõem de recursos para sequenciamento. A base de dados internacional do MLST pode ser utilizada para comparar isolados de pneumococo encontrados em várias regiões do mundo (Rayner et al., 2015). Com o objetivo de reduzir os custos e de ser uma técnica de mais fácil execução o MLVA foi desenvolvido, porém é mais utilizado para estudos epidemiológicos a curto prazo e surtos localizados (Koeck et al., 2005; Elberse et al., 2011). O MLVA envolve a amplificação do número de repetições (*Variable Number of Tandem Repeats – VNTR*) de sequências curtas de DNA geralmente não codificantes, que se repetem em uma quantidade variável dentro de um *locus* gênico, e o tamanho do produto de PCR amplificado varia de acordo com o tamanho do fragmento. Os VNTR são alvos da genotipagem por que há múltiplos *loci* ao longo do genoma e eles são polimórficos. Um dos grandes problemas é que existem diferentes protocolos de MLVA que possuem como objetivo diminuir o número de *loci* a ser realizado (Rayner et al., 2015). Entretanto, o protocolo que atualmente tem maior poder discriminatório, por que analisa mais regiões, é o esquema proposto por Koeck em 2005 que analisa 18 *loci* (Koeck et al., 2005). Para a técnica de MLVA também há um banco de dados de acesso livre, o qual compara os perfis, atualmente há 1087 diferentes genótipos avaliados neste banco de dados ([www.mlva.eu](http://www.mlva.eu)). Até o momento não há estudos brasileiros utilizando esta técnica de tipagem molecular, ficando restrita a técnica de MLST e PFGE.

## 2.1 Principais Perfis Genotípicos pertencentes ao sorotipo 19A

O PMEN relaciona apenas quatro clones internacionais para o sorotipo 19A, o clone Hungary<sup>19A</sup>-6 (ST268), S.Africa<sup>19A</sup>-7 (ST75), CSR<sup>19A</sup>-11 (ST175), e S.Africa<sup>19A</sup>-13 (ST41) (PMEN, 2015). Serão aqui abordados alguns dos principais clones do sorotipo 19A.

A análise molecular de isolados pertencentes ao sorotipo 19A mostra que a maioria dos clones deste sorotipo nos EUA estava relacionada à expansão clonal da ST199, que já existia antes da introdução da PCV-7. O CC199 (ST199 e suas variantes) predominava entre as amostras de 19A isoladas de crianças < 5 anos de idade antes da era vacinal e durante 2003-2004, representando aproximadamente 70% das amostras invasivas identificadas (Pai et al., 2005). Novos genótipos de 19A foram também observados, em função da ocorrência de eventos de recombinação, como o que ocorreu com o clone do sorotipo 19A ST199, em que um fragmento contendo o *locus* capsular e duas proteínas ligadoras de penicilina adjacentes foram transferidas para uma amostra receptora pertencente ao sorotipo 4 da ST695 (Brueggemann et al., 2007), tornando-se o terceiro clone mais comum entre os casos de DPI ocasionados pelo sorotipo 19A em 2007 nos EUA (Beall, 2007).

Porém, após a introdução da PCV-7 nos EUA, a ST320 foi o clone mais importante que emergiu relacionado ao sorotipo 19A. Esta ST é uma *Doble Locus Variant* (DLV) da ST236 (clone Taiwan<sup>19F</sup>-14), ou seja, elas compartilham cinco alelos dos sete analisados pelo MLST (Hsieh et al., 2013). Conhecido também como clone Taiwan<sup>19F</sup>-14 ou como PMEN14, primeiramente detectado como sendo do tipo capsular vacinal 19F, quando foi caracterizado por MLST foi identificado em um hospital Taiwanês em 1997, se espalhou globalmente antes da introdução da PCV-7, com características de resistência aos antibióticos. Este clone pertence a ST236 que sofreu um evento de *switching* capsular entre o sorotipo 19F e o sorotipo não vacinal 19A resultando na ST320 (Croucher et al., 2014).

A evolução genética do clone ST236 para ST320, em que a ST320 melhor se adaptou à colonização da nasofaringe, não reflete apenas na mudança do sorotipo capsular (*switch*), mas também nas mudanças de outros *loci* como a transferência de genes relacionados com a resistência à penicilina (Hsieh et al., 2013).

Nos países em que a PCV-7 é ausente ou que a cobertura vacinal é muito baixa, também se verificou esta substituição entre a ST236 para a ST320,

mostrando que a utilização dos antimicrobianos, também pode estar associada com a emergência do sorotipo 19A ST320. Além disso, um estudo mostrou que o sorotipo 19A pertencente a ST320 é mais virulento que seu ancestral, a ST236 (Hsieh et al., 2013).

A ST271 é uma *Single Locus Variant* (SLV) da ST236, sendo idêntica em seis dos genes analisados pelo MLST. Porém, a ST271 é menos resistente aos  $\beta$ -lactâmicos que a maioria dos isolados PNEM 14 (ST236). As STs 236, 271 e 320 são todas agrupadas dentro do CC320, que inclui também pneumococo não MDR (Croucher et al., 2014).

Outra ST relacionada com o sorotipo 19A é a ST230 representando pelo clone Denmark<sup>14</sup>-32 é uma importante causa de manutenção da resistência antimicrobiana, sendo relatada antes da introdução da vacina PCV-7 em Portugal (Aguilar et al., 2010).

No Brasil e em países da América Latina, o conhecimento sobre os diferentes genótipos causadores da DPI é limitado, o que representa uma importante lacuna de conhecimento. Em um dos primeiros estudos publicados que envolveu isolados de DPI, predominantemente de paciente adultos, obtidos entre 2007 e 2012, do Sul do Brasil, observou que entre os isolados pertencentes ao sorotipo 19A houve uma considerável diversidade genética quando comparada com outros sorotipos. Foram descritas duas STs novas, a ST8800 e ST8884, esta última com fenótipo de multirresistência sendo uma SLV da ST320. Também foram encontradas as STs: ST2878, ST320, ST4967, ST199, ST733. Entretanto, a ST2878 foi a mais frequente (36,4%), e é um clone identificado no Brasil em diferentes regiões e momentos, sendo descrito pela primeira vez em 1998, mostrando que esta ST está bem adaptada em nosso país. Neste estudo, também foram demonstrados sete eventos de recombinação que não tinham sido relatados anteriormente, sugerindo o evento de *switching* capsular, sendo que um deles foi relacionado à ST4967 primeiramente identificada como pertencendo ao sorotipo 23F e agora sendo relatada como sorotipo 19A (Caierão et al., 2014).

As diferenças entre os perfis genotípicos relacionados com o sorotipo 19A mostram a necessidade de mais estudos em nosso País, já que a emergência deste sorotipo não incluído na PCV-10 é preocupante, levando em consideração à resistência relacionada com seus clones.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO E, MINAMISAVA E, BIERRENBACH AL, et al. Effect of 10-Valent Pneumococcal Vaccine on Pneumonia among Children, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**.19(4): 589-597, 2013.
- AGUIAR SI, PINTO FR, NUNES S, et al. Denmark<sup>14</sup>-230 clone as an increasing cause of pneumococcal infection in Portugal within a background of diverse serotype 19A lineages. **Journal of Clinical Microbiology**. 48: 101–108, 2010.
- ALMEIDA S, NUNES S, PAULO AC, 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**. 9(3): e90974, 2014.
- ANSALDI F, CANEPA P, DE FLORENTIIS D, et al. Increasing incidence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A and emergence of two vaccine escape recombinant ST695 strains in Liguria, Italy, 7 years after implementation of the 7-valent conjugated vaccine. **Clinical and Vaccine Immunology**.18: 343–345, 2011.
- APPELBAUM PC, BHAMJEE A, SCRAGG JN, et al. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. **The Lancet**. 2:995-997, 1977.
- AUSTRIAN R. The Quellung reaction, a neglected microbiologic technique. **Mount Sinai Journal of Medicine**. 43: 699-709, 1979.
- \_\_\_\_\_. The pneumococcus at the millennium: not down, not out. **Journal of Infectious Diseases**. 179 (Suppl 2): S338-341, 1999.
- BARTLETT ,J.G. Diagnostic tests for agents of community-acquired pneumonia. **Clinical Infectious Diseases**. 52: S296-S304, 2011.
- BEALL, B. Vaccination with the pneumococcal 7-valent conjugate: A successful experiment but the species is adapting. **Expert Review of Vaccines**. 6( 3): 297-300, 2007.
- BOGAERT D, DE GROOT R, HERMANS PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **The Lancet Infectious Diseases**. 4:144–154, 2004.
- \_\_\_\_\_, VAN BELKUM A, SLUIJTER M, et al. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. **The Lancet**. 363 (9424):1871-2, 2004.
- BRILES DE, HOLLINGSHEAD SK, SWIATLO E, et al. *PspA* and *PspC*: their potential for use as pneumococcal vaccines. **Microbial Drug Resistance**. 3(4): 401-408, 1997.
- BROWAAL S, BACKHAUS E, NAUCLER P, et al. Clinical manifestatitons of invasive pneumococcal disease by vaccine and non-vaccine types. **European Respiratory Journal**. 44:1646-1657, 2014.

BRUEGGEMANN AB, PAI R, CROOK DW, BERNARD BEALL B. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. **PLOS Pathogens**. 3(11): 1628-36, 2007.

CAIERÃO J, HAWKINS P, SANT'ANNA FH, et al. Serotypes and Genotypes of Invasive *Streptococcus pneumoniae* Before and After PCV10 Implementation in Southern Brazil. **PLOS ONE**. 9(10):e111129, 2014.

CANTON R, MOROSINI M, ENRIGHT MC, et al. Worldwide incidence, molecular epidemiology and mutations implicated in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from the global PROTEKT surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 52:944-52, 2003.

CASTAÑEDA E, AGUDELO C, DE ANTONIO R, et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis, 1990-2010. **BioMed Central Infectious Diseases**. 12:124, 2012.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2008. Effects of New Penicillin Susceptibility Breakpoints for *Streptococcus pneumoniae* --- United States, 2006—2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report – MMWR**. Mortal Wayne, 57:1353-1355, 2008.

\_\_\_\_\_ (CDC). 2010. Invasive pneumococcal disease in Young children before licensure of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine – United States, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report – MMWR**. Rep.59:253-257.

\_\_\_\_\_ (CDC). Atlanta, USA, 2015. Última revisão da página em 10 de Junho de 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/pneumococcal/clinicians/clinical-features.html>> Acesso em: 02.12.2015.

CHERRY, FEIGIN, DEMMBER, et al. Pneumococcal infection. 1204-1258(5th,) 2004.

CORNICK JE, BENTLEY SD. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. **Microbes and Infection**. 14:573-583, 2012.

\_\_\_\_\_, HARRIS SR, PARRY CM, et al. Genomic identification of a novel co-trimoxazole resistance genotype and its prevalence amongst *Streptococcus pneumoniae* in Malawi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 69:368-374, 2014.

CROUCHER N, CHEWAPREECHA C, HANAGE W, et al. Evidence for Soft Selective Sweeps in the Evolution of Pneumococcal Multidrug Resistance and Vaccine Escape. **Genome Biology Evolution**. 6(7):1589–1602, 2014.

CUNHA G, CAIERÃO J, D'AZEVEDO P, et al. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanisms and current epidemiology. **Clinical & Biomedical Research**. 34(2):97-112, 2014.

DIAS CA, AGNES G, FRAZZON AP, et al. Diversity of mutations in the *atpC* gene coding for the *c* subunit of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase in clinical isolates of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. 45(9):3065-7, 2007.

\_\_\_\_\_, TEIXEIRA LM, CARVALHO MG, et al. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. **Journal of Medical Microbiology**. 56:1185-1188, 2007.

DÍAZ E, LÓPEZ R, GARCÍA JL. Role of the major pneumococcal autolysin in the atypical response of a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**. 174(17): 5508-5515, 1992.

DOMINGUES CM, VERANI JR, MONTENEGRO RENOINER E, et al. Effectiveness of tem-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. **The Lancet Respiratory Medicine**. 2:464–47, 2014.

DUGGAN ST. Pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (13- valent, absorbed) [Pevnar 13]. *Drugs* 70:1973–1986, 2010.

ECHÁNIZ-AVILÉS G, ROMÁN-ÁLVAREZ LS, SÁNCHEZ-ALEMÁN M, et al. Prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A antes y después de la introducción de la vacuna conjugadaheptavalente en México. **Salud Pública de México**. 56(3):266-271, 2014.

ELBERSE KEM, NUNES S, SA-LEAO R, et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: comparison with PFGE and MLST. **PLOS ONE**. 6: e19668, 2011.

ENRIGHT MC, SPRATT BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. **Microbiology**.144: 3049–3060, 1998.

FERREIRA DM, NEILL DR, BANGERT M, et al. Controlled human infection and rechallenge with *Streptococcus pneumoniae* reveals the protective efficacy of carriage in healthy adults. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 187: 855–864, 2013.

GARCIA-RODRIGUEZ JA, FRESNADILLO MARTINEZ MJ. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 50 Suppl S2: 59–73, 2002.

GHOLAMHOSSEINI-MOGHADDAM T, RAD M, MOUSAVI SF, et al. Detection of *lytA*, *pspC*, and *rrgA* genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated from healthy children. **Iranian Journal of Microbiology**. 7(3):156-60, 2015.

GRANDO IM, DE MORAES C, FLANNERY B, et al. Impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis in children up to two years of age in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**. 31(2):1-9, 2015.

HAMPTON LM, FARLEY MM, SCHAFFNER W, et al. Prevention of Antibiotic-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* with conjugate vaccines. **Journal of Infectious Diseases**. 205: 401-411, 2012.

HARBOE Z, DALBY T, WEINBERGER D, et al. Impact of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccination in Invasive Pneumococcal Disease Incidence and Mortality. **Clinical Infectious Diseases**. 59(8):1066–73, 2014.

HENRICHSEN, J. Typing of *Streptococcus pneumoniae*: Past, present, and future. **American Journal of Medicine**. 107(1A): 50S-54S, 1999.

HICKS LA, HARRISON LH, FLANNERY B, et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998–2004. **Journal of Infectious Diseases**. 196:1346 –1354, 2007.

HSIEH YC, LIN TL, CHANG KY, et al. Expansion and evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19a ST320 clone as compared to its ancestral clone, Taiwan <sup>19F</sup>-14 (ST236). **Journal of Infectious Diseases**. 15:203-210, 2013.

HULTEN K, KAPLAN S, LAMBERTH L, et al. Changes in *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A Invasive Infections in Children from 1993 to 201. **Journal of Clinical Microbiology**. 51(4):1294–1297, 2013.

JEFFERIES JM, JOHNSTON CH, KIRKHAM LA, et al. Presence of non-hemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks. **Journal of Infectious Diseases**. 196: 936–944, 2007.

KADIOGLU A, WEISER JN, PATON JC, et al. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nature Reviews Microbiology**. 6:288-301, 2008.

KIM SH, SONG JH, CHUNG DR, et al. Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asian countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 56:1418–26, 2012.

KOECK J, NANJANPOP-LAFOURCADE B, CADE S, et al. Evaluation and selection of tandem repeat *loci* for *Streptococcus pneumoniae* MLVA strain typing. **BioMed Central Microbiology**. 5: 66–74, 2005.

LAI CY, HUANG LM, LEE PY, et al. Comparison of invasive pneumococcal disease caused by serotype 19A and non-19A pneumococci in children: More empyema in serotype 19A invasive pneumococcal disease. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. 47: 23-27, 2014.

LECLERCQ R, COURVALIN P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobology Agents Chemotherapy**. 46:2727-2734, 2002.

LEE S, LEE K, KANG Y, et al. Prevalence of Serotype and Multidrug-Resistance of *Streptococcus pneumoniae* Respiratory Tract Isolates in 265 Adults and 36 Children In Korea, 2002-2005. **Microbial Drug Resistance**. 16: 135-142, 2010.

LEE MR, CHEN CM, CHUANG TY, et al. Capsular serotypes and antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive pneumococcal disease from 2009–2012 with an emphasis on serotype 19A in bacteraemic pneumonia and empyema and  $\beta$ -lactam resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 42: 395-402, 2013.

LUPIEN A, BILLAL DS, FANI F, et al. Genomic Characterization of ciprofloxacin resistance in a laboratory-derived mutant and a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 57:4911-4919, 2013.

McGee L, MCDUGAL L, ZHOU J, et al. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. **Journal Clinical Microbiology**. 39: 2565-2571, 2001.

MENDES R, HOLLINGSWORTH R, COSTELLO A, et al. Noninvasive *Streptococcus pneumoniae* Serotypes Recovered from Hospitalized Adult Patients in the United States in 2009 to 2012. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 59(9):5595-5601, 2015.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, Coordenação de Vigilância de Doenças Respiratórias e Imunopreveníveis, 2009. Disponível em: <[http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq\\_723\\_infotec.pdf](http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_723_infotec.pdf)> Acesso em: 01.12.2015.

Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde, departamento de vigilância epidemiológica. Coordenação-geral do Programa Nacional de Imunizações. **INFORME TÉCNICO DA VACINA PNEUMOCÓCICA 10-VALENTE (CONJUGADA)**. Brasília- Fevereiro de 2010. Disponível em: <[http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq\\_723\\_infotec.pdf](http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_723_infotec.pdf)> Acesso em: 01.12.2015.

MITCHELL AM, MITCHELL TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. **Clinical Microbiology Infection**. 16: 411–8, 2010.

MONTANARI MP, COCHETTI I, MINGOIA M, et al. Phenotypic and molecular characterization of tetracycline- and erythromycin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 47:2236-41, 2003.

MOORE MR, LINK-GELLES R, SCHAFFNER W, 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. **The Lancet Infectious Diseases**. 15:301–309, 2015.

MOTT M, CAIERÃO J, ROSA DA CUNHA G, et al. Susceptibility profiles and correlation with pneumococcal serotypes soon after implementation of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**. 20:47-51, 2014.

MRKVAN T, HOET B, ADEGBOLA RA, et al. Serotype 19A and the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV): Lessons learned to date. Milan: European Society for Paediatric Infectious Diseases (**ESPID**), 2013.

NUORTI J.P., WHITNEY C.G. Prevention of pneumococcal disease among infants and children-use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recommendations and Reports**. Rep.59 (RR-11):1-18, 2010.

OBREGÓN V, GARCÍA P, GARCÍA E, et al. Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. **Journal of Clinical Microbiology**. 40(7): 2545-54, 2002.

OOSTERHUIS-KAFEJA F, BEUTELS P, VAN DAMME P. Immunogenicity, efficacy, safety and effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines (1998-2006). **Vaccine**. 25(12): 2194-2212, 2007.

PAI R, MOORE MR, PILISHVILI T, et al. Postvaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. **Journal of Infectious Diseases**.192: 1988–1995, 2005.

PASTEUR I. Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de l'âge. **Comptes Rendus**. 92:159-65, 1881.

PILISHVILI T, LEXAU F, FARLEY MM, et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. **Journal of Infectious Diseases**. 201:32– 41, 2010

Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN) Disponível em: <<http://web1.sph.emory.edu/PMEN/>> Acesso em: 03.12.2015.

POOLMAN J, FRASCH C, NURKKA A, et al. Impact of the conjugation method on the immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19F polysaccharide in conjugate vaccines. **Clinical and Vaccine Immunology**. 18:327-36, 2011.

PRIDE M, HUIJTS S, WU K, et al. Validation of an Immunodiagnostic Assay for Detection of 13 *Streptococcus pneumoniae* Serotype-Specific Polysaccharides in Human Urine. **Clinical and Vaccine Immunology**. 19 (8):1131-1141, 2012.

RAYNER RE, SAVILL J, HAFNER LM, et al. Modified MLVA for Genotyping Queensland Invasive *Streptococcus pneumoniae*. **PLOS ONE**. 10 (4): 1-15, 2015.

RICHTER SS, HEILMANN KP, DOHRN CL, et al. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 2004-2005, **Clinical Infectious Diseases**. 48: e23-e33, 2009.

RICHTER SS, HEILMANN KP, DOHRN CL, et al. Pneumococcal serotype before and after introduction of conjugate vaccines, United States, 1999-2011. **Emerging Infectious Diseases**. 19:1074–1083, 2013.

ROMNEY MG, HULL MW, GUSTAFSON R, et al. Large community outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 5 invasive infection in an impoverished, urban population. **Clinical Infectious Diseases**. 47:768–74, 2008.

RUCKIGER S, VON KRIES R, SIEDLER A, et al. Association of serotype of *Streptococcus pneumoniae* with risk of severe and fatal outcome. **Pediatric Infectious Diseases Journal**. 28:118-122, 2009.

SÁ-LEÃO R, NUNES S, BRITO-AVÔ A, et al. High rates of transmission of and colonization by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* within a day care center revealed in a longitudinal study. **Journal of Clinical Microbiology**. 46: 225–234, 2008.

SABHARWAL V, STEVENSON A, FIGUEIRA M, et al. Capsular switching as a strategy to increase pneumococcal virulence in experimental otitis media model. **Microbes and Infection**. 16 (4): 292-299, 2013.

SANTOS M, AZEVEDO J, MENEZES AP, et al. Temporal trends and clonal diversity of penicillin non-susceptible pneumococci from meningitis cases from 1996 to 2012, in Salvador, Brazil. **BioMed Center Infectious Diseases**.15(302)1-10, 2015.

SANTOS SR, PASSADORE LF, TAKAGI EH, et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. **Vaccine**. 31(51): 6150-4, 2013.

SARTORI AMC, SOAREZ PC, NOVAES HMD. Cost-effectiveness of introducing the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine into the universal immunization in Brazil. **Journal of Epidemiology & Community Health**. 66:1–8, 2012

SELVA L, DEL AMO E, BROTONS P, et al. Rapid and easy identification of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by use of fragment analysis by automated fluorescence-based capillary electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**. 50(11): 3451-7, 2012.

SIMELL B, AURANEN K, KAYHTY H, et al. Pneumococcal Carriage Group. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. **Expert Review of Vaccines**. 11:841-855, 2012.

Sistema de Redes de Vigilância de Agentes Bacterianos Responsáveis por Pneumonia e Meningite (SIREVA II) **Informe Regional de SIREVA II, 2011**. Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de

*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores. Washington, D.C.: OPS, 2012. Documentos técnicos. Regulaciones Sanitarias Internacionales, Alerta y Respuesta y Enfermedades Epidémicas (HSD/IR).

SOINICEN A, PRUSIAINEN H, KILPI T, et al. Natural development of antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides depends on the serotype: association with pneumococcal carriage and acute otitis media in young children. **Journal of Infectious Diseases**. 184 (5): 569-76, 2001.

SPELLERBERG B, BRANDT C. *Streptococcus*. In: Versalovic J, Carrole K, Funke G, Jorgensen J, Landry ML, Warnock D. **Manual of Clinical Microbiology**. 10<sup>th</sup> ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, p 331-349, 2011.

STERNBERG GM. A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human salina. An experimenta research. **National Board of Health Bull**. 2:781-3, 1881.

STRALIN K, KALTOFT MS, KONRADSEN HB, et al Comparison of two urinary antigen tests for establishment of pneumococcal etiology of adult community-acquired pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**. 42:3620 –3625, 2004.

TAIT-KAMRADT A, DAVIES T, APPELBAUM PC, et al. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 44:3395-3401, 2000.

TALBOT TR, POEHLING KA, HARTERT TV, et al. Reduction in high rates of antibiotic-nonsusceptible invasive PD in Tennessee after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. **Clinical Infectious Diseases**. 39:641–8, 2004.

TAN, T. Q. Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in the era of pneumococcal conjugate vaccines. **Clinical Microbiology Reviews**. 25(3): 409-419, 2012.

THOMPSON CC, EMMEL VE, FONSECA EL, et al. Streptococcal taxonomy based on genome sequence analyses. **F1000 Research**. 2, 2013.

TILLET WS, CAMBIER MJ, McCORMACK JE. The treatment of lobar pneumonia and pneumococcal empyema with penicillin. **Bulletin of the New York Academy Medicine**. 20:142-78, 1944.

TSAI HY, LAUDERDALE TL, WANG JT, et al. Uptade antibiotic resistance and clinical spectrum of infections caused by *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan: emphasis on risk factors for penicillin non-susceptibilities. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. 46: 345-51, 2012.

van der LINDEN M, REINERT R, KERN W, IMÖHL M. Epidemiology of serotype 19A isolates from invasive pneumococcal disease in German children. **BioMed Center Infectious Diseases**. 13:70, 2013.

VAN GILS EJ, VEENHOVEN RH, HAK E, et al. Pneumococcal conjugate vaccination and nasopharyngeal acquisition of pneumococcal serotype 19A strains. **Journal of the American Medical Association**. 304:1099–106, 2010.

VERANI JR, DOMINGUES CMAS, de MORAES JC. Indirect cohort analysis of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine effectiveness against vaccine-type and vaccine-related invasive pneumococcal disease. **Vaccine**. 33:6145-6148, 2015.

VESIKARI T, WYSOCKI J, CHEVALLIER B, et al. Immunogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) compared to the licensed 7vCRM vaccine. **Pediatric Infectious Diseases Journal**. 28 (4suppl): S66-76, 2009.

YOTHER, J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: Paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. **Annual Review of Microbiology**. 65: 563-581, 2011.

WHITNEY CG, FARLEY MM, HADLER J, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. **The New England Journal of Medicine**. 348:1737–1746, 2003.

WHITNEY CG, PILISHVILI T, FARLEY MM et al. Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case-control study. **The Lancet**. 368: 1495-502, 2006.

WOLKERS PC, MANTESE OC, PAULA A, et al. New susceptibility breakpoints in antimicrobial resistance rates of invasive pneumococcal strains. **Jornal de pediatria**. 85: 421-425, 2009.

World Health Organization (WHO). **Pneumococcal vaccines, 2012**. Disponível em: <[http://www.who.int/immunization/position\\_papers/PP\\_pneumococcal\\_April\\_2012\\_summary.pdf](http://www.who.int/immunization/position_papers/PP_pneumococcal_April_2012_summary.pdf)> Acesso em: 19.12.2015.

WYRES KL, KLUGMAN KP, PARKHILL J, et al. Pneumococcal capsular switching: a historical perspective. **Journal Infectious Diseases**. 207: 439–449, 2013.

WYSOCKI J, TEJEDOR JC, GRUNERT D, et al. Immunogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) when coadministered with different *Neisseria meningitidis* serogroup C conjugate vaccines. **Pediatric Infectious Disease Journal**. 28 (4suppl): S77-88, 2009.

### **3. JUSTIFICATIVA**

O monitoramento das infecções pneumocócicas invasivas é importante para o estabelecimento de medidas de controle. O conhecimento sobre a distribuição dos sorotipos e o perfil de resistência aos antimicrobianos são componentes fundamentais neste processo. Embora existam características gerais que definem estes fenômenos, como a pressão seletiva causada pelo uso de antimicrobianos, ou os mecanismos de escape à vacinação, há questões específicas em espaço e tempo que exigem constante investigação. Há uma lacuna de conhecimento sobre esta questão em países como o Brasil. Estudos como este têm papel importante sobre a necessidade futura de uma potencial substituição da vacina atualmente distribuída para a população.

## 4. OBJETIVO

### 4.1 Objetivo Geral

Determinar a prevalência da resistência de *Streptococcus pneumoniae* aos antimicrobianos, correlacionando com o sorotipo e genótipos em isolados clínicos de Porto Alegre, RS.

### 4.2 Objetivos Específicos

Verificar a prevalência da resistência antimicrobiana de isolados de *S. pneumoniae* após a introdução da PCV-10;

Verificar os sorotipos prevalentes após a PCV-10;

Correlacionar sorotipos e resistência;

Verificar a emergência de sorotipos não vacinais após a PCV-10;

Avaliar o perfil de resistência dos isolados pertencentes ao sorotipo 19A.

Avaliar através da utilização de técnicas de tipagem molecular, a relação clonal entre os isolados do sorotipo 19A;

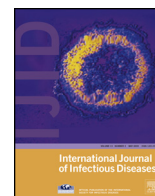
## 5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

### 5.1 MANUSCRITO I

Publicado na revista: International Journal of Infectious Diseases

MOTT M, CAIERÃO J, CUNHA GR, PEREZ LRR, MATUSIAK R, de OLIVEIRA KRP, d'AZEVEDO P, DIAS C. (2014). Susceptibility profiles and correlation with pneumococcal serotypes soon after implementation of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *Int J Infect Dis* 20:47-51.

Fator de Impacto: 1.859



## Susceptibility profiles and correlation with pneumococcal serotypes soon after implementation of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil<sup>☆</sup>



Mariana Mott<sup>a</sup>, Juliana Caierão<sup>a,\*</sup>, Gabriela Rosa da Cunha<sup>a</sup>,  
Leandro Reus Rodrigues Perez<sup>b</sup>, Roberto Matusiak<sup>c</sup>,  
Katia Ruschel Pilger de Oliveira<sup>d</sup>, Pedro Alves d'Azevedo<sup>a</sup>, Cícero Dias<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Sarmento Leite, 245, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup> Hospital Mãe de Deus, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>c</sup> Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>d</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 July 2013

Received in revised form 19 November 2013

Accepted 20 November 2013

**Corresponding Editor:** Eskild Petersen,  
Aarhus, Denmark

#### Keywords:

*Streptococcus pneumoniae*

Resistance

Serotypes

Vaccines

### SUMMARY

**Objectives:** To evaluate the susceptibility patterns among *Streptococcus pneumoniae* recovered during the years 2010–2012 and to correlate these with serotypes.

**Methods:** Pneumococci from invasive sites were serotyped by sequential multiplex PCR and/or Quellung reaction. Etest strips were used to determine the minimal inhibitory concentrations, and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines were used for interpretation. Genetic determinants of macrolide resistance were assessed by PCR, and the occurrence of the D phenotype was analyzed following the recommendations of the CLSI.

**Results:** One hundred fifty-nine *S. pneumoniae* were studied; most were recovered from blood and were associated with serotypes 14, 3, 4, 23F, 20, 7F, 12F, 19A, and 19F. Pneumococcal conjugate vaccine PCV7, PCV10, and PCV13 and 23-valent polysaccharide vaccine serotypes represented 38.2%, 48.7%, 64.5%, and 85.5%, respectively.  $\beta$ -Lactam non-susceptibility (non-meningitis) was basically related to serotype 19A. For meningitis, it was observed in 21.4% (serotypes 14, 3, 9V, 23F, and 24F). Resistance to erythromycin occurred in 8.2% and *mefA* was the most common macrolide genetic determinant. One isolate was resistant to levofloxacin. Non-susceptibility to trimethoprim-sulfamethoxazole was 37.7% and to tetracycline was 22.0%.

**Conclusions:** Our population of pneumococci represents a transition era, soon after the introduction of PCV10. Non-susceptible patterns were found to be associated with classical PCV serotypes (especially serotype 14), which is still highly prevalent, and non-PCV10 ones (19A), which may disseminate, occupying the biological niche left by the vaccine serotypes.

© 2013 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. All rights reserved.

### 1. Introduction

The microbiological diagnosis of pneumococcal diseases is frequently associated with challenging situations, such as the lack of sensitivity of culture-related methodologies and the use of antimicrobials prior to specimen collection.<sup>1</sup> Thus, the final diagnosis is commonly based on clinical and epidemiological characteristics of the disease, which results in empirical therapy.<sup>2</sup>

However, antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* has become a subject of concern, and as a result, empirical therapeutic choices may be compromised.<sup>3</sup>

Penicillin is the most important antibiotic against pneumococcal diseases. Strains with decreased susceptibility to penicillin were first reported in the 1960s, and since that period, resistance to this agent and other antimicrobials has been increasing constantly, to various degrees, from one region to another.<sup>4–8</sup> For the laboratory detection of penicillin and ceftriaxone resistance, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) currently defines different breakpoints for meningitis and non-meningitis isolates.<sup>9</sup>

Studies have reported that some resistance patterns may be related to specific serotypes or clones, and the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN) has described the most

<sup>☆</sup> This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

\* Corresponding author.

E-mail address: [julianaca@ufcspa.edu.br](mailto:julianaca@ufcspa.edu.br) (J. Caierão).

relevant clones of antibiotic-resistant pneumococci.<sup>10</sup> The increase in penicillin non-susceptibility in the USA following the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7), which was strongly associated with the dissemination of serotype 19A, is a good example of the clone–resistance pattern correlation.<sup>11</sup>

The introduction of different formulations of conjugate vaccines, as well as other variables, has contributed to changes in antimicrobial resistance worldwide.<sup>8</sup> In Brazil, a 10-valent vaccine (PCV10) has been introduced for children aged less than 2 years as part of the national program of immunization; however its effect on serotype distribution and antimicrobial resistance in this country are yet to be determined. As the diversity of serotypes and the increasing resistance to antibiotics are two essential elements that must be taken into account for the prevention and management of pneumococcal infections,<sup>5,12</sup> the objective of the present study was to evaluate the susceptibility patterns among *S. pneumoniae* recovered during the years 2010–2012 and to correlate these with serotypes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial isolates

A total of 159 non-duplicate *S. pneumoniae* isolates were included in the study. They were isolated from January 2010 to April 2012 in three general hospitals in Porto Alegre, Brazil. The study included isolates from patients with invasive pneumococcal diseases (IPD). The isolates were maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$  and the species identification was done by routine tests: colony morphology, optochin susceptibility, and sodium deoxycholate lysis.<sup>13</sup>

### 2.2. Serotyping

Isolates were serotyped using a sequential multiplex PCR<sup>14</sup> targeting the 30 most common serotypes related to IPD in Latin America plus the capsular polysaccharide (*cps*) gene. For most isolates that presented amplification of only the *cps* gene, the Quellung reaction was performed using pool-, type-, and factor-specific antisera kindly provided by the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

### 2.3. Susceptibility tests

Etest strips (AB Biodisk, Stockholm, Sweden) were used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC), following the manufacturer's instructions. MICs for penicillin, ceftriaxone, vancomycin, meropenem, erythromycin, levofloxacin, tetracycline, and trimethoprim–sulfamethoxazole were evaluated. Interpretation of the results was done in accordance with the CLSI guidelines (2013),<sup>9</sup> taking into account the site of isolation to set the penicillin and ceftriaxone susceptibilities. Etest MICs were rounded up to a standard two-fold agar dilution scale. The reference strain *S. pneumoniae* ATCC 49619 was used for quality control.

### 2.4. Inducible resistance to clindamycin

To determine the erythromycin inducible resistance to clindamycin, isolates presenting resistance to erythromycin and susceptibility or intermediate resistance to clindamycin were submitted to D-zone test, following the 2013 CLSI recommendations.<sup>9</sup>

### 2.5. Genetic determinants of macrolide resistance

Isolates presenting a MIC  $\geq 0.5$   $\mu\text{g/ml}$  for erythromycin were submitted to a duplex PCR reaction for the detection of the *ermB* and *mefA* genes, in accordance with Widdowson and Klugman.<sup>15</sup>

Briefly, approximately 100 ng of DNA were used as template in a 20- $\mu\text{l}$  reaction with 0.75  $\mu\text{M}$  of each primer and 2 U of Taq DNA polymerase, at an annealing temperature of  $56^{\circ}\text{C}$ . PCR products were visualized on a 2% TBE (Tris–borate–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) agarose gel, containing 0.5  $\mu\text{g/ml}$  of ethidium bromide.

## 3. Results

We studied 159 *S. pneumoniae* isolates obtained from invasive sites, including blood ( $n = 124$ ), cerebrospinal fluid (CSF) ( $n = 28$ ), pleural fluid ( $n = 5$ ), peritoneal fluid ( $n = 1$ ), and joint fluid ( $n = 1$ ). Patients ranged in age from 0 to 94 years, with an average of 47.9 years. Seventeen patients (10.7%) were aged  $\leq 5$  years and 39 (24.5%) were aged  $\geq 65$  years. Age was not available in the records for 13 patients and three others were identified as 'pediatric' without a defined age.

The distribution of serotypes found among isolates (in general and stratified by age) is shown in Table 1. Three isolates could not

**Table 1**

Serotype distribution of 159 pneumococcal isolates from invasive infections; Porto Alegre, Brazil, 2010–2012

Serotype	Vaccine formulation <sup>a</sup>	Number of isolates		
		Total	$\leq 5$ years old	$\geq 6$ years old
1	PCV10, PVC13, and PV23	3	-	3
3	PCV13 and PV23	13	2	11
4	PCV7, PCV10, PVC13, and PV23	15	-	15
5	PCV10, PVC13, and PV23	2	-	2
6A	PCV13	4	1	3
Serogroup 6	?	1	-	1
6B	PCV7, PCV10, PVC13, and PV23	5	1	4
6C	-	2	1	1
7C	-	1	-	1
7F	PCV10, PVC13, and PV23	11	-	11
8	PV23	5	1	4
9A	-	1	-	1
9N	PV23	1	-	1
9V	PCV7, PCV10, PVC13, and PV23	6	-	6
10A	PV23	1	-	1
11A	PV23	4	-	4
12F	PV23	11	-	11
14	PCV7, PCV10, PVC13, and PV23	16	6	10
15B	PV23	1	-	1
16F	-	2	-	2
17F	PV23	1	-	1
18A	-	1	-	1
18C	PCV7, PCV10, PVC13, and PV23	1	-	1
19A	PVC13, and PV23	7	1	6
19F	PCV7, PCV10, PVC13, and PV23	5	2	3
20	PV23	12	-	12
22F	PV23	1	-	1
23F	PCV7, PCV10, PVC13, and PV23	10	1	9
24F	-	4	-	4
28A	-	1	-	1
34	-	1	-	1
35F	-	2	-	2
38	-	2	1	1
Non-typeable	-	3	-	3
Not available for serotyping	-	3	-	3
Total		159	17	142

<sup>a</sup> PCV 7, 10, and 13 = pneumococcal conjugated vaccine with 7, 10, and 13 serotypes; PV23 = 23-valent polysaccharide vaccine.

**Table 2**Prevalence of resistance and the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> among 159 invasive pneumococcal isolates; Porto Alegre, Brazil, 2010–2012

	Susceptibility			MIC	
	R (%)	I (%)	S (%)	MIC <sub>50</sub> (μg/ml)	MIC <sub>90</sub> (μg/ml)
Penicillin (non-meningitis)	0	1 (0.6)	158 (99.4)	0.025	1
Ceftriaxone (non-meningitis)	0	2 (1.3)	157 (98.7)	0.016	0.5
Meropenem	1 (0.6)	6 (3.8)	152 (95.6)	0.006	0.25
Erythromycin	13 (8.2)	0	146 (91.8)	0.125	0.25
Tetracycline <sup>b</sup>	30 (19)	5 (3.2)	123 (77.8)	0.25	16
Levofloxacin	1 (0.63)	0	158 (99.4)	1	1
Trimethoprim–sulfamethoxazole	32 (20.1)	28 (17.6)	99 (62.3)	0.25	4

MIC, minimal inhibitory concentration; R, resistant; I, intermediate; S, susceptible.

<sup>a</sup> Statistically significant.<sup>b</sup> One isolate was not available for tetracycline testing.

be recovered for serotyping, and one isolate belonging to serogroup 6 (according to the sequential multiplex PCR procedure) was not available for Quellung reaction. A total of 33 different serotypes were identified. Isolates belonging to serotypes 14 ( $n = 16$ ), 4 ( $n = 15$ ), 3 ( $n = 13$ ), 20 ( $n = 12$ ), 7F ( $n = 11$ ), 12F ( $n = 11$ ), 23F ( $n = 10$ ), 19A ( $n = 7$ ), 9V ( $n = 6$ ), 6B ( $n = 5$ ), and 19F ( $n = 5$ ) were the most frequently found. Three isolates were defined as non-typeable by Quellung reaction. Serotypes included in the 7-, 10-, and 13-valent conjugate vaccines and the 23-valent polysaccharide vaccine represented 38.2% ( $n = 58$ ), 48.7% ( $n = 74$ ), 64.5% ( $n = 98$ ), and 85.5% ( $n = 130$ ), respectively, of the 152 isolates with a defined serotype. Among children aged  $\leq 5$  years ( $n = 17$ ), serotype 14 was again the most common, but at this time more representative (35.5% vs. 7.0% in the population  $> 5$  years old). Vaccine coverage in this group was 58.8%, 58.8%, and 82.3% for the 7-, 10-, and 13-valent conjugate vaccines, respectively. In the even more restrictive group (under 2 years of age,  $n = 12$ ), the vaccine coverage was 58.3%, 58.3%, and 83.3%. Taking into account people aged  $\geq 65$  years, these numbers decreased further: 30.8% (12/39), 33.3% (14/39), and 41.0% (18/40) for the 7-, 10-, and 13-valent conjugate vaccines, respectively. However, the polysaccharide vaccine (PPV23) had 71.8% coverage in this specific population.

Table 2 presents the prevalence of resistance and the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for the 159 pneumococcal isolates. One isolate was not available for tetracycline testing. Regardless of resistance rates, the most potent drugs against pneumococci were meropenem and erythromycin (MIC<sub>90</sub> = 0.25 μg/ml). All isolates were susceptible to

penicillin and ceftriaxone (non-meningitis breakpoints); however, intermediate resistance was found to penicillin (one isolate) and ceftriaxone (two isolates), all isolates serotyped as 19A. Considering the meningitis breakpoint ( $\geq 0.125$  μg/ml), resistance to penicillin was observed in 6/28 (21.4%) isolates obtained from CSF, belonging to the following serotypes: 14 (two isolates), 3, 9V, 23F, and 24F (one isolate each). All CSF isolates were susceptible to ceftriaxone (meningitis breakpoint). Characteristics of pneumococci presenting resistance to penicillin (intermediate, non-meningitis), to ceftriaxone (intermediate or full, meningitis or non-meningitis), and to meropenem (intermediate or full resistance), the serotypes, and resistance to other antimicrobials are detailed in Table 3. Penicillin MICs higher than 0.06 μg/ml were more frequently associated with serotypes 14 (32.0%), 23F (12.0%), 9V (12.0%), 19A (8.0%), and 19F (6.0%), representing 70.0% of all cases.

Resistance (MIC  $\geq 1$  μg/ml) to erythromycin was observed in 8.2% (13/159) of the isolates. The *mefA* gene alone was amplified in 6/13 (46.1%) and the *ermB* gene alone in 4/13 (30.8%) pneumococci; both genes were amplified in 3/13 (23.0%). The presence of *ermB* (alone or with *mefA*) was associated with a MIC  $\geq 256$  μg/ml. Table 4 shows the distribution of genes involved in erythromycin resistance, the results of the D-test, and serotypes found among THESE pneumococci.

Isolates were fully susceptible to vancomycin (MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> = 0.5 μg/ml). Only one *S. pneumoniae*, isolated from a blood culture, was resistant to levofloxacin, with a MIC of 16 μg/ml; this isolate belonged to serotype 23F. Higher levels of non-susceptibility

**Table 3**

Characteristics of isolates presenting resistance to penicillin (intermediate, non-meningitis), to ceftriaxone (intermediate or full, meningitis or non-meningitis), and to meropenem (intermediate or full resistance)

Isolate number	Serotype	Specimen	Patient age (years)	MIC (μg/ml)					<i>ermB</i> gene	<i>mefA</i> gene
				PEN	CRO	MER	ERY	TET		
033.12	14	Blood	27	2	1	0.5	0.047	0.125	ND	ND
008.11	14	Blood	Pediatric	1	0.5	0.5	24	0.125	Neg	Pos
112.11	14	Pleural fluid	2	0.5	0.5	0.5	24	0.25	Neg	Pos
162.11	14	blood	4	1	0.5	0.5	16	<0.25	Neg	Pos
164.11	14	blood	4	1.5	0.5	0.5	8	1	Neg	Pos
025.12	19A	Blood	67	4	2	1	>256	6	Pos	Pos
167.11	19A	Blood	67	2.0	2	0.5	>256	8	Pos	Pos

MIC, minimal inhibitory concentration; PEN, penicillin; CRO, ceftriaxone; MER, meropenem; ERY, erythromycin; TET, tetracycline; ND, not done.

**Table 4**

Distribution of the genes involved among the 13 erythromycin-resistant isolates, serotypes found, minimal inhibitory concentrations, and results of the D-test

Genes involved	<i>n</i>	Serotypes (number in parenthesis)	MIC or MIC range (μg/ml)	D-test results
<i>mefA</i>	6	14 (5), 19A, non-typeable (1)	1.5–24	Neg
<i>ermB</i>	4	6B (1), 19F (1), 23F (1), 24F (1)	>256	Neg (2); Pos (2)
<i>mefA</i> + <i>ermB</i>	3	19A (2), 19F (1)	>256	Pos

MIC, minimal inhibitory concentration.

were observed for trimethoprim–sulfamethoxazole (37.7%: 20.1% intermediate and 17.6% resistant) and tetracycline (22.0%: 18.9% intermediate and 3.1% resistant).

#### 4. Discussion

Pneumococcal disease is a global public health problem, especially in developing countries. In these regions, epidemiological surveillance focusing on the serotype distribution and resistance profiles of pneumococci is of great importance to reduce the burden of the disease and to improve therapy. A comprehensive understanding of antimicrobial resistance and the influence of serotypes on the susceptibility profiles should be obtained from investigations with pneumococci gathered from different parts of the world. In this context, the present study generated epidemiological data on the pneumococci circulating in the South of Brazil, taking into account the occurrence of antimicrobial resistance and its correlation with serotypes.

Many studies around the world have demonstrated an increasing trend in resistance of pneumococci to various classes of antimicrobials,<sup>4–8,12</sup> both in regions where a conjugated vaccine is available and efficiently provided to the population,<sup>8</sup> and where there is no active public vaccination program.<sup>5</sup> In the former context, the fact is possibly explained by the replacement of vaccine serotypes with others, which may present worrying resistance rates; serotype 19A is a classical example. In the second group, the reduced susceptibility may be especially related to the circulation of vaccine serotypes typically associated with antimicrobial resistance, such as 14, 19F, and 23F. Therefore, regardless of the existence or not of a vaccination program, resistance among pneumococci is becoming a matter of concern.

Our pneumococci represent post-vaccination isolates. However, considering that our study population consisted mostly of adults, we may expect the findings to represent a transition era, i.e., not enough time has elapsed to observe the effects of vaccination (herd immunity) on the adult population. Indeed, almost half (47.4%) of our pneumococcal isolates represented PCV10 serotypes, while the remaining isolates represented mixed non-PCV10 ones. According to Afonso et al.,<sup>16</sup> vaccine coverage in Porto Alegre is around 80%, which is lower than in other cities of Brazil. Altogether, these data support this being a transitional period.

Dos Santos et al.<sup>17</sup> first evaluated the distribution of serotypes among invasive disease before and after the implementation of PCV10 in Brazil. As expected, the incidence of PCV10 serotypes decreased in a comparison of the two periods, although the reduction was statistically significant only for the population aged <2 years. This reinforces the concept that a longer period of time needs to elapse from the implementation of PCV10 to observe its effect on the adult population (transition period). Among PCV10 serotypes, 14, 1, 5, and 7F were in the group of serotypes with a higher incidence during both periods observed by Dos Santos et al. Regarding non-PCV10 serotypes, 19A, 3, and 12F were predominant in this group. Although these data are from a different geographical region of Brazil, our serotype distribution results are, in general, consistent with those observed in that study. Our isolates present a wide distribution of serotypes, which include members of the different vaccine formulations, but 17.7% of them are not included in the most comprehensive of the vaccines, PPV23.

Among children (age ≤5 years), the proportion of isolates belonging to serotypes included in the vaccine (PCV10) was lower compared to values observed in other Brazilian studies (58% vs. 75.7–80%<sup>17,18</sup>). However, it is necessary to note that our data are derived from a relatively limited number of isolates, which compromises the interpretation of the results.

With regard to our general population, PCV10 coverage was even lower. This may be explained in part by the circulation of

serotypes not related to PCV10, such as 12F, 7F, 20, and 19A. Attention should be drawn to the fact that serotypes such as 12F and 20, which were among the six most frequent, are not included in the available conjugate vaccines. This highlights the possibility of the emergence of these serotypes in the future.

In general, our resistance rates are lower than those observed in other countries with vaccination programs.<sup>6,8,19</sup> In groups where there is no active vaccination, or where vaccine coverage is not wide, resistance rates have also been higher than ours. In these cases, the most common serotypes recovered have been 14, 23F, 6B, and 19F, classical PCV7 ones.<sup>4,5</sup> In Latin America, knowledge of the circulating pneumococci is limited. Data from the SIREVA project, connected to the Pan American Health Organization, have shown reduced susceptibility to penicillin in 38% of isolates, with an increasing trend in some countries, including Brazil.<sup>20</sup> Data from Brazil are still scarce and fragmented. Some studies have shown low<sup>21,22</sup> or no<sup>23</sup> rates of non-susceptibility to penicillin, whereas others have indicated rates around 20%;<sup>24–25</sup> serotypes 14, 23F, 6B, and 19F have been most commonly associated with this resistance in Brazilian studies.<sup>24,25</sup>

Full resistance (MIC >4.0 µg/ml) to penicillin was not found among the isolates included in this study. However, pneumococci showing intermediate or full resistance to β-lactams were observed, and this was associated with serotypes 14 and 19A. The characteristics of patients are distinct among those with serotype 14 and 19A. Patients with infection due to resistant serotype 14 isolates were younger (four children and one aged 27 years), whereas patients with 19A infections were older (>65 years). Also, β-lactam-resistant isolates of serotype 14 were resistant to erythromycin due to the presence of the *mefA* gene, while those belonging to serotype 19A harbored the *ermB* gene and had higher erythromycin MICs (>256 µg/ml). Both of these serotypes contain clones associated with resistance that are internationally distributed, such as sequence types ST156 (serotype 14) and ST320 (serotype 19A). While serotype 14 has historically (pre-vaccination period) been associated with penicillin resistance, with ST156 distributed worldwide including in Brazil,<sup>25</sup> many studies in the post-vaccination era have pointed to the important relationship between 19A and penicillin non-susceptibility.<sup>8,18,26</sup>

As noted above, among patients infected with non-susceptible serotype 14 pneumococci, four out of five were children, one of them without a defined age ('pediatric'). Two of them were 4 years old at the time of specimen collection (2011), which suggests that these patients did not receive the 2010 PCV10 immunization. The remaining patients were 2 years old (2011). These data may explain the occurrence of resistant serotype 14 among our pediatric population. However, as the number of children included in the study was low, statistical power is lacking to support information considering serotype distribution and antimicrobial susceptibility characteristics in this specific age group.

Another important therapeutic choice for pneumococcal infections is the macrolides. Resistance to erythromycin varies, in general from 25% to near 50%.<sup>4,5,8</sup> However, rates as high as 92% have been reported in some regions.<sup>6</sup> As shown by Mendonça-Souza et al.<sup>27</sup> in a large prospective study of isolates from three major cities in Brazil, pneumococci belonging to serotype 19A have been circulating in our region since 1996, recovered particularly from non-invasive sites and presenting resistance to erythromycin, tetracycline, and penicillin (previous 2008 CLSI breakpoints). Vaccination may provide conditions for the emergence of non-PCV10 serotypes, such as 19A. Further studies involving genotyping and clonality are necessary to better determine the influence of such specific clones on antibiotic resistance in Brazil. It is also important to highlight the occurrence of isolates exhibiting both *ermB* and *mefA* genes among serotypes 19A and 19F.

In a recent study in Brazil,<sup>23</sup> no quinolone resistance and only one isolate with intermediate resistance was observed among invasive and non-invasive pneumococci. Similar results were found in the current study (one fully resistant isolate) and by another group of authors in Latin America.<sup>28</sup> Although our data are also in agreement with those of other Brazilian studies with regard to tetracycline resistance (between 20% and 30%), some authors have shown higher trimethoprim–sulfamethoxazole resistance rates (up to 60%) in other regions of the country.<sup>24,25</sup>

Our study has some limitations. As we did not have a pre-vaccination population, we were unable to evaluate the impact of vaccination on resistance rates in our region. We also emphasize that serotyping the strains before starting a vaccination campaign is highly recommended for future experience. Also, as mentioned, our population included a small number of patients less than 5 years of age. Thus, we were not able to evaluate the initial effects of the vaccination appropriately, once children became the target for first-stage processing.

Nevertheless, our data provide important information on the susceptibility profile of pneumococci soon after the introduction of the vaccination. To our knowledge, this is among the first works to provide information on the pneumococcal serotype distribution following implementation of vaccination in Brazil. Our data show the occurrence of non-susceptibility to penicillin and other  $\beta$ -lactams among serotypes 14 and 19A. It is expected that the finding of serotype 14 in invasive disease will be massively reduced as the effect of PCV10 is increasingly observed. On the other hand, because serotype 19A is not included in the current vaccine formulation, non-susceptible isolates may increase in our region. In this context, epidemiological studies should be done systematically to evaluate the long-term effects of vaccination on serotype distribution and how changes in the distribution of serotypes in the post-vaccination era will impact resistance rates in the pneumococcal population.

## Acknowledgements

We are grateful for the financial support received from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (11/2058-5, FAPERGS/CAPES; 473607/2008-5, CNPq; and 10/0026.1, FAPERGS). We also thank the Streptococcus Laboratory (especially Dr Lesley McGee) of the US Centers for Disease Control and Prevention for technical support in the Quellung serotyping. We also thank Andreia Duprat, Janira Prichula, and Rebeca Inhoque for technical assistance.

*Conflict of interest:* No conflict of interest to declare.

## References

- Werno AM, Murdoch DR. Laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. *Clin Infect Dis* 2008;**46**:926–32.
- Bartlett JG. Diagnostic tests for agents of community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2011;**52**:S296–304.
- Jones RN, Jacobs MR, Sader HS. Evolving trends in *Streptococcus pneumoniae* resistance: implications for therapy of community-acquired bacterial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2010;**36**:197–204.
- Charfi F, Smaoui H, Kechrid A. Non-susceptibility trends and serotype coverage by conjugate pneumococcal vaccines in a Tunisian pediatric population: a 10-year study. *Vaccine* 2012;**30**:G18–24.
- Tali-Maamar H, Laliem R, Bentchouala C, Touati D, Sababou K, Azrou S, et al. Reprint of: Serotyping and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Algeria from 2001 to 2010. *Vaccine* 2012;**30**:G25–31.
- Tsai HY, Lauderdale TL, Wang JT, Chen YS, Liu JW, Huang JH, et al. Updated antibiotic resistance and clinical spectrum of infections caused by *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan: emphasis on risk factors for penicillin non-susceptibilities. *J Microbiol Immunol Infect* 2012;**46**:345–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2012.07.012>.
- Munier AL, de Lastours V, Varon E, Donay JL, Porcher R, Molina JM. Invasive pneumococcal disease in HIV-infected adults in France from 2000 to 2011: antimicrobial susceptibility and implication of serotypes for vaccination. *Infection* 2013;**41**:663–8. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-013-0419-x>.
- Jones RN, Sader HS, Mendes RE, Flamm RK. Update on antimicrobial susceptibility trends among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: report of ceftaroline activity from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2011). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;**75**:107–9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 23<sup>rd</sup> Informational supplement. M100-S23. Wayne, PA: CLSI; 2013.
- McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, et al. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. *J Clin Microbiol* 2001;**39**:2565–71.
- Moore M, 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**:1016–27.
- Isaacman DJ, McIntosh ED, Reintert RR. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis* 2010;**14**:e197–209.
- Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of clinical microbiology*. 10<sup>th</sup> ed., Washington, DC: American Society for Microbiology; 2011 p. 331–49.
- Dias CA, Teixeira LM, Carvalho MG, Beall B. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J Med Microbiol* 2007;**56**:1185–8.
- Widdowson CA, Klugman KP. Emergence of the M phenotype of erythromycin-resistant pneumococci in South Africa. *Emerg Infect Dis* 1998;**4**:277–81.
- Afonso ET, Minamisava R, Bierrenbach AL, Escalante JJ, Alencar AP, Domingues CM, et al. Effect of 10-valent pneumococcal vaccine on pneumonia among children, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2013;**19**:589–97.
- Dos Santos SR, Passadore LF, Takagi EH, Fujii CM, Yoshioka CR, Gilio AE, et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. *Vaccine* 2013;**31**:6150–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.042>.
- Andrade AL, Oliveira R, Vieira MA, Minamisava R, Pessoa Jr V, Brandileone MC, et al. Population-based surveillance for invasive pneumococcal disease and pneumonia in infants and young children in Goiânia, Brazil. *Vaccine* 2012;**30**:1901–9.
- Oftadeh S, Gidding HF, Gilbert GL. Laboratory surveillance of invasive pneumococcal disease in New South Wales, Australia, before and after introduction of 7-valent conjugate vaccine: reduced disease, but not antibiotic resistance rates. *Epidemiol Infect* 2012;**25**:1–10.
- Castañeda E, Agudelo CI, Regueira M, Corso A, Brandileone MC, Brandão AP, et al. Laboratory-based surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin American countries: a SIREVA II project, 2000–2005. *Pediatr Infect Dis J* 2009;**28**:e265–70.
- Bedran MB, Camargos PA, Leocádio Filho G, Bedran RM, Najar HC. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin in the state of Minas Gerais, Brazil, from 1997–2004. *Braz J Infect Dis* 2005;**9**:390–7.
- Mouro A, Kiffer C, Koga PC, Monteiro AM, Camargo EC, Pignatari AC. Spatial exploration of *Streptococcus pneumoniae* clonal clustering in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2011;**15**:462–6.
- Rossi F, Franco MR, Rodrigues HM, Andreazzi D. *Streptococcus pneumoniae*: susceptibility to penicillin and moxifloxacin. *J Bras Pneumol* 2012;**38**:66–71.
- Menezes AP, Campos LC, dos Santos MS, Azevedo J, Dos Santos RC, Carvalho Mda G, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000–2007. *Vaccine* 2011;**29**:1139–44.
- Barroso DE, Godoy D, Castañeiras TM, Tulenko MM, Rebelo MC, Harrison LH.  $\beta$ -Lactam resistance, serotype distribution, and genotypes of meningitis-causing *Streptococcus pneumoniae*, Rio de Janeiro, Brazil. *Pediatr Infect Dis J* 2012;**31**:30–6.
- Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Beekmann SE, Doern GV. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 2004–2005. *Clin Infect Dis* 2009;**48**:e23–33.
- Mendonça-Souza CR, Carvalho MD, Barros RR, Dias CA, Sampaio JL, Castro AC. Occurrence and characteristics of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in three major Brazilian states. *Microb Drug Resist* 2004;**10**:313–20.
- Mendes C, Marin ME, Quiñones F, Sifuentes-Osornio J, Cuijly Siller C, Castanheira M, et al. Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Latin America: results from the PROTEKT surveillance study (1999–2000). *Braz J Infect Dis* 2003;**7**:44–61.

## 5.2 MANUSCRITO II

**Emergence of serotype 19A after PCV10 associated with a ST320 in adult population, in Porto Alegre, BRAZIL.** Será submetido à revista *Epidemiology & Infection*, cujas normas para a publicação estão apresentadas como anexo deste documento.

Fator de Impacto: 2.535

1 **Emergence of serotype 19A after PCV10 associated with a ST320 in adult**  
2 **population, in Porto Alegre, BRAZIL**

3

4 M.P.MOTT 1; J. CAIERÃO 1; G.R.CUNHA 1; F.H. SANT'ANNA 2, L. McGEE 3;  
5 C.A. DIAS 1

6 1 Basic Health Department, Federal University of Health Science of Porto  
7 Alegre, Porto Alegre, Brazil

8 2 Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre,  
9 Brazil

10 3 Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA

11

12

13

14 Address correspondence to Cícero A.G. Dias.

15 Corresponding author at: Basic Health Department, Federal University of Health  
16 Science of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Sarmiento Leite Street, 245. ZIP  
17 code 90050-170. Phone +555133038740.

18 E-mail address: [cicero@ufcspa.edu.br](mailto:cicero@ufcspa.edu.br)

19

20

21 Running head: Emergence of serotype 19A after PCV10.

22

23

24

## 25 SUMMARY

26

27 Use of pneumococcal conjugate vaccine may cause the emergence of  
28 non-vaccine serotypes, as 19A. As far as we know, no Brazilian data  
29 specifically related to this serotype is available. We aimed to evaluate frequency  
30 of occurrence, susceptibility profile and molecular epidemiology of serotype 19A  
31 before and after vaccination in Brazil. Identification was conventionally  
32 performed. Serotypes were defined by multiplex PCR and/or Quellung.  
33 Resistance was determined by Etest and duplex PCR was used to determine  
34 the presence of *ermB* and/or *mefA*. Pneumococci were typed by MLST and  
35 MLVA. Serotype 19A consistently emerged after vaccine from 3.46% to 8.10%  
36 ( $p = 0.04196$ ). 38 *S. pneumoniae* serotype 19A were recovered mostly from  
37 invasive sites. Non susceptibility increased to most antimicrobials after vaccine  
38 and was associated to CC 320. MLST showed nine different STs, which were  
39 grouped in two different clonal complexes: CC320 (63.9%) and CC236 (13.9%).  
40 Considering only post vaccine period, frequency of this serotype increased  
41 significantly ( $p= 0.00001$ ) from 1.24% in 2011 to 18.51% in 2014, decreasing  
42 the genetic variability: ST 320 consistently predominated after vaccination  
43 (61.1%). Overall, our results showed a post PCV10 increase in the frequency of  
44 serotype 19A. This was accompanied by a selection of CC320 and antimicrobial  
45 resistance.

46

47

48 **Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, Serotype 19A, ST320, Brazil.

49

## 50 INTRODUCTION

51 Infections caused by *Streptococcus pneumoniae* are a public health  
52 problem worldwide, notably in developing countries, with high morbidity and  
53 mortality rates [1,2]. In order to reduce the occurrence of pneumococcal  
54 diseases, as well as the dissemination of isolates non-susceptible to penicillin  
55 and/or multidrug-resistant, vaccination is a powerful tool [3].

56 Since the implementation of 7-valent polysaccharide formula (PCV-7), an  
57 increased participation of non-PCV7 serotypes, such as 19A, in invasive  
58 diseases has been observed in some countries [4, 5, 6, 7, 8]. Serotype 19A,  
59 mainly ST 320 [9], has been associated with higher resistance rates, including  
60 penicillin non-susceptibility and multidrug-resistance [7, 8, 10].

61 To control the worrisome emergence of this (and other) serotypes, 13-  
62 valent (PCV-13) formula (adding serotypes 1, 3, 5, 6A, 7F and 19A) was  
63 implemented for use in US [11]. In Brazil, the 10-valent (PCV10) vaccine, which  
64 does not contain serotype 19A, has been licensed for routine child immunization  
65 since 2010. Its positive impact is clearly observed, decreasing the incidence of  
66 invasive pneumococcal disease, their mortality rates, the hospitalization rates  
67 due to pneumonia and the occurrence of vaccine serotypes [12, 13, 14, 15, 16].  
68 Despite these expected and unquestionable benefits, non-PCV10 serotypes,  
69 including 19A, may emerge because of selective pressure. The knowledge of  
70 these epidemiological changes is a subject of concern to an eventual need of  
71 adequacy of vaccine formulas.

72 As far as we know, studies focusing on isolates of serotype 19A from  
73 Brazil had not been published yet. This encouraged us to analyze the

74 frequency of occurrence, susceptibility profile and molecular epidemiology of  
75 serotype 19A *S. pneumoniae* recovered from invasive and non-invasive sites  
76 from pre and post vaccine periods in Porto Alegre, South Brazil.

77

## 78 **METHODS**

79 *S. pneumoniae* of serotype 19A obtained from patients with invasive and  
80 non-invasive disease from 2008 to 2014 were included in this retrospective  
81 study. Isolates recovered from 2008 to 2010 were considered pre-vaccine, while  
82 the ones recovered from 2011 to 2014 were the post-vaccine isolates. These  
83 isolates were obtained from three hospitals in Porto Alegre, South Brazil:  
84 Grupo Hospitalar Conceição (GHC), Hospital Mãe de Deus (HMD), and  
85 Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), which had the study approved by  
86 their Research Ethics Committee. Identification was performed as described  
87 elsewhere: Gram stain, optochin susceptibility and bile solubility [17]. Isolates  
88 were serotyped using sequential multiplex PCR [18] and/or Quellung reaction.

89 Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) for penicillin, ceftriaxone,  
90 meropenem, tetracycline, erythromycin, trimethoprim-sulfamethoxazole,  
91 levofloxacin and vancomycin were determined using E-test strips, following the  
92 manufacturer's instruction, and interpreted according to breakpoints  
93 recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [19]. The  
94 reference strain *S. pneumoniae* ATCC 49619 was included for quality control  
95 purposes. Isolates non-susceptible to erythromycin were submitted to duplex  
96 PCR reaction for the detection *ermB* and *mefA* genes [20].

97 Molecular typing of serotype 19A was performed using Multilocus  
98 Sequence Typing (MLST), according to Enright & Spratt [21], and Multiple-  
99 Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA), which was  
100 performed according to Koeck and co-workers [22] with 18 simplex PCR  
101 reactions. *S. pneumoniae* ATCC BAA-255 (R6) was included as reaction  
102 control. Results generated MLVA Types (MT), which belonged to the same  
103 Clonal Group (CG) if at least 13 of the 18 *loci* were identical (more 70%  
104 similarity).

105 Statistical analysis was performed using chi-squared test and Fisher's  
106 exact test whenever necessary. Results were considered statistically significant  
107 when  $p < 0.05$ .

108

## 109 **RESULTS AND DISCUSSION**

110 From 2008 to 2014, 568 *S. pneumoniae* were serotyped, 30.46%  
111 (173/568) recovered during pre-vaccine period and 69.54% (395/568)  
112 recovered post vaccination. Of note, pneumococci were mainly (60.91%,  
113 346/568) recovered from older children (5-18 years old) and adults (19-64 years  
114 old): 8.63% (49/568) from children less than 5 years, 25.53% (145/568) from  
115 elderly ( $\geq 65$  years old). No defined age was available on medical records for  
116 4.93% (28/568). Also, invasive sites were mainly the origin of pneumococci,  
117 representing 74.29% (422/568), while non-invasive samples were the source of  
118 isolation of 22.71% (129/568), and 17 pneumococci were from unknown sites.  
119 Overall, 38 out of 568 (6.69%) were serotyped as 19A: 3.46% (6/173) before  
120 and 8.10% (32/395) after vaccination, demonstrating a statistically significant

121 increase in the frequency of this serotype ( $p = 0.04196$ ) [Figure 1]. It was  
122 notably observed among invasive samples (83.78% - 31/37), mainly blood (one  
123 isolate has not information about site of origin). Age of patients belonging to  
124 serotype 19A ranged from 1 to 80 years old (average: 46.55 years old; median:  
125 54 years old). Only 5 (13.15%) patients had 5 years old or less.

126 Considering post vaccine period, year-by-year, proportion of 19A  
127 serotype increased. In 2011 it was 1.24% (2/161); 2012, 10.38% (8/77); 2013,  
128 9.21% (7/76); and in 2014 it was 18.51% (15/81). Comparing 2011 with 2014,  
129 frequency of this serotype increased significantly ( $p = 0.00001$ ) [Figure 1].

130 MLST was performed for 36 isolates, 5 pre and 31 post vaccine. Nine  
131 different STs were observed and isolates were grouped in two different clonal  
132 complexes: CC320 (63.9%; 23/36) and CC236 (13.9%; 5/36). The remaining  
133 isolates represented singletons [Table 1]. Both, ST 2878 and ST 9678, are  
134 single locus variant (SLV) of ST 236, which is the ST of the PMEN clone  
135 Taiwan<sup>19F</sup> – 14. While ST 199 and ST 2878 were recovered either during pre  
136 and post vaccine period, some had presented period specificity: ST 8800 and  
137 ST 4967 were exclusively observed previous vaccination and the remaining  
138 only appeared after vaccine implementation (CC320, ST 2260, ST 733 and ST  
139 9678) [Figure 2]. According to MLST database, most of STs described among  
140 our isolates belong exclusively to serotype 19A (ST 2878, ST 9678, ST 8800,  
141 ST 2260 and ST 8884). Interestingly, all but ST 8800 were previously recovered  
142 in Brazil.

143 On the other hand, some STs are represented by more than one  
144 serotype and/or serotypes other than 19A [Table 2]. For example, according to

145 MLST database [23], ST 733 was first recovered from a patient in Brazil in 2001  
146 and it was an isolate belonging to serotype 19F. After that, all other 4 ST 733  
147 isolates (1 from Germany and 3 from Brazil) were serotyped as 19A.  
148 Nevertheless; and also considering MLST database, ST 4967 previously  
149 described in Brazil were serotyped as 23F.

150 Penicillin MICs were determined for 35 isolates (5 pre- and 30 post-  
151 vaccine) and varied from  $\leq 0.03$  to 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .  $\text{MIC}_{50}$  and  $\text{MIC}_{90}$  for all isolates of  
152 serotype 19A were 1.5 and 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. However, if isolates of CC  
153 320 are not considered,  $\text{MIC}_{50}$  and  $\text{MIC}_{90}$  consistently decrease to 0.094  $\mu\text{g}/\text{mL}$   
154 and 0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. Ceftriaxone MICs for all isolates varied from  $\leq$   
155 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .  $\text{MIC}_{50}$  was 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and  $\text{MIC}_{90}$ , 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Again,  
156  $\text{MIC}_{50}$  and  $\text{MIC}_{90}$  decrease if CC 320 are not included: 0.047  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.064  
157  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively.

158 Table 3 brings the susceptibility profile of all isolates. We had observed  
159 non-susceptibility neither to vancomycin nor to levofloxacin. Considering all  
160 other antimicrobials, an increased frequency of non-susceptibility was seen post  
161 vaccination, mostly associated with ST 320 [Table 3 and 4].

162 Thirty five isolates were typed using MLVA, which was, in general, more  
163 discriminatory than MLST [Figure 3]. Among ST 320, isolates presented four  
164 different MLVA profiles, and the one named MT 19A.1 was the most common  
165 (68.2%; 15/22), which was also the MLVA type of ST 8884, a SLV of ST 320.  
166 ST 733 and ST 2878 were also related to more than one MLVA type.

167 Serotype 19A has been a subject of concern in some regions since PCV-  
168 7 implementation [7, 8, 24, 25, 26]. As far as we know, this is the first Brazilian

169 study to evaluate frequency of occurrence, susceptibility profile and molecular  
170 epidemiology of this serotype before and after vaccination with PCV10.

171 Data from Latin America showed that, from 1990 to 2010, this serotype  
172 increased from 1.5% to 4.9% [27]. On the other hand, a study conducted by  
173 Santos and co-workers [13], demonstrated a stable incidence of serotype 19A  
174 among Brazilian children, soon after PCV10 implementation. Also, our group  
175 described a not significant increase in the frequency of serotype 19A among  
176 adult, comparing pre and post vaccination period [28].

177 Domingues and co-workers [14] designed a study to evaluate the  
178 effectiveness of PCV10 vaccine against invasive pneumococcal diseases in  
179 Brazilian children, and serotype 19A was the third most common; however,  
180 such case-control study concluded that PCV10 might provide cross-  
181 protection against serotype 19A. We must consider that young adults  
182 predominantly compose our study, cross-protection may not be observed  
183 among them. Apart that, our data show that increase of serotype 19A was  
184 consistent comparing pre and post vaccine period. It should be considered,  
185 however, that the increase in 19A is unlikely to be caused exclusively by  
186 vaccination. Other factors may be associated, as antimicrobial use. It was  
187 demonstrated in South Korea, where the spread of the multidrug-resistant CC  
188 320 in the absence of a vaccination program was attributed to antibiotic  
189 pressure [29]. Temporal serotype variation must be also considered [30].

190 The challenges inherent to some specific clones of serotype 19A also  
191 clearly appeared in our study, i.e., antimicrobial resistance. Indeed, molecular  
192 epidemiology analysis clearly demonstrated a selection, post vaccine, of CC

193 320, decreasing considerably the genetic variability of serotype 19A population.  
194 It is well known the relationship between this CC and penicillin non-susceptibility  
195 and/or multiresistant isolates [7, 8, 9]. Undoubtedly, it had become highlighted  
196 in our data.

197 ST 320 is a DLV (Doble Locus Variant) of the worldwide-established  
198 Taiwan<sup>19F</sup>-14 (ST 236) clone, primarily associated with serotype vaccine 19F,  
199 which, by capsular switching, resulted in the ST 320 [31]. The genetic evolution  
200 from ST 236 to ST 320 not only provided advantages in the colonization  
201 process, but also was associated with transference of penicillin resistant genes  
202 [32]. ST 320 was more important clone that emerged after introduction PCV-7 in  
203 several regions the world, mainly in the United States of America [7, 9, 32, 33],  
204 becoming a subject of concern worldwide because of its consistent association  
205 with antibiotic resistance [31].

206 Interestingly, we could see some combinations of ST and serotype that  
207 may represent a capsular switching. ST733, for example, may be a 19F -19A  
208 switching, as the first described pneumococci (2001) of this ST belonged to  
209 serotype 19F. Also, ST4967 was described in Brazil as serotype 23F  
210 pneumococci (MLST database) [23]. What is not so obvious in this molecular  
211 event is the fact we recovered our 19A belonging to ST4967 before vaccine.  
212 However, it does not exclude the fact that this capsular switching may have  
213 occurred as a response of selective pressures from other global regions and,  
214 then, came to Brazil.

215 MLVA analysis was more discriminatory among our isolates, subtyping  
216 some STs, such as ST320. As this technique takes into consideration regions

217 other than housekeeping genes, what are the biological conditions that  
218 determine changes in this locus remains to be determined, as well as the  
219 stability of this variations. We had not find any critical characteristic (such as  
220 resistance profile, patient's age, source of the isolate) that could be associated  
221 with a specific MLVA subtype.

222 Higher MICs for penicillin and ceftriaxone occurred only ST320 and  
223 ST8884, as well as the increased proportion of multidrug-resistance. However  
224 vancomycin and levofloxacin showing to have good activity for pneumococcal  
225 disease. The presence *ermB* and *mefA* genes were observed only in ST320  
226 and ST8884 isolates. The *ermB* gene was associates with higher MICs for  
227 erythromycin. Study previously performed in Brazil showed that non-  
228 susceptibility to penicillin and ceftriaxone were low (0.6% and 1.3%,  
229 respectively), being present in isolates belonging to serotypes 19A and 14 [34].

230 Overall, our results showed a consistent post PCV10 increase in the  
231 frequency of serotype 19A in invasive and non-invasive isolates of *S.*  
232 *pneumoniae*. This was accompanied by a selection of CC320, and,  
233 consequently, antimicrobial non-susceptibility also increased consistently.  
234 Surveillance studies must be performed systematically to determine if this data  
235 will be confirmed in the following years.

236

237

238

239

## 240 **Acknowledgements**

241 We thank the Streptococcus Laboratory of the US Centers for Disease  
242 Control and Prevention for technical support.

243

## 244 **Financial support**

245 This work was supported by Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal  
246 de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do  
247 Rio Grande do Sul (FAPERGS).

248

## 249 **Conflict of interest**

250 The authors declare none conflicts of interest.

251

## 252 **Ethical standards**

253 The authors assert that all procedures contributing to this work comply  
254 with the ethical standards of the relevant national and institutional committees  
255 on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised  
256 in 2008.

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267 **REFERENCES**

268

269 1. NUORTI JP, WHITNEY CG. Prevention of pneumococcal disease among  
270 infants and children-use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-  
271 valent pneumococcal polysaccharide vaccine. Recommendations of the  
272 Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm.  
273 2010; Rep.59 (RR-11):1-18.

274

275 2. SIMELL B, et al. Pneumococcal Carriage Group. The fundamental link  
276 between pneumococcal carriage and disease. Exp. Rev. Vaccines 2012;  
277 11:841-855.

278

279 3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009). Pneumonia  
280 hospitalizations among young children before and after introduction of  
281 pneumococcal conjugate vaccine-United States, 1997-2006. MMWR Morb  
282 Mortal Wkly Rep 58:1-4.

283

284 4. WHITNEY CG, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the  
285 introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. N Eng J Med 2003;  
286 348 (18): 1737-1746.

287

288 5. AGUIAR SI, et al. Denmark<sup>14</sup>-230 clone as an increasing cause of  
289 pneumococcal infection in Portugal within a background of diverse serotype  
290 19A lineages. J Clin Microbiol 2010; 48: 101-108.

291

292

293 6. ANSALDI F, et al. Increasing incidence of *Streptococcus pneumoniae*  
294 serotype 19A and emergence of two vaccine escape recombinant ST695  
295 strains in Liguria, Italy, 7 years after implementation of the 7-valent conjugated  
296 vaccine. Clin Vaccine Immunol 2011; 18: 343-345.

297

298 7. RICHTER S, et al. Pneumococcal serotypes before and after introduction of  
299 conjugate vaccines, United States, 1999-2011. Emerging Infectious Disease  
300 2013; 19 (7): 1074-1083.

301

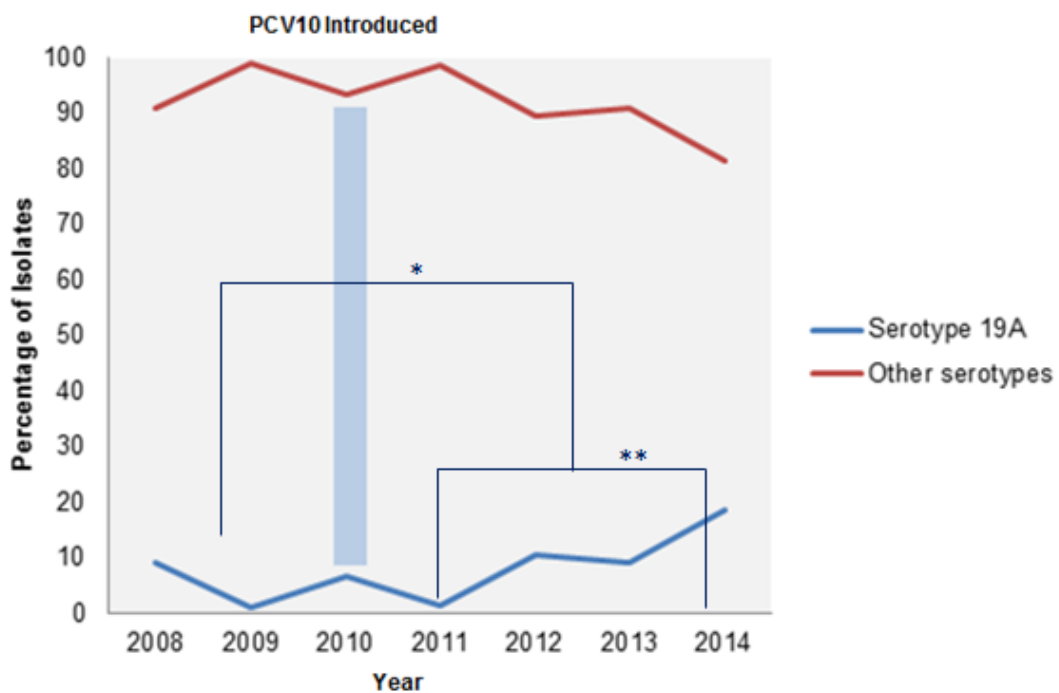
302 8. van der LINDEN M, et al. Epidemiology of serotype 19A isolates from  
303 invasive pneumococcal disease in German children. BMC Infectious Diseases  
304 2013; 13 (70).

- 305 9. ARDANUY C, et al. Emergence of a multidrug-resistant clone ST320 among  
306 invasive serotype 19A pneumococci in Spain. Journal of Antimicrobial  
307 Chemotherapy 2009; 64: 507-510.
- 308
- 309 10. TAN TQ. Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in  
310 the era of pneumococcal conjugate vaccines. Clin. Microbiol. Rev. 2012; 25(3):  
311 409-419.
- 312
- 313 11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2010. Invasive  
314 pneumococcal disease in Young children before licensure of 13-valent  
315 pneumococcal conjugate vaccine – United States, 2007 MMWR Morb. Mortal.  
316 Wkly. Rep.59:253-257.
- 317
- 318 12. AFONSO E, et al. Effect of 10-Valent Pneumococcal Vaccine on  
319 Pneumonia among Children, Brazil. Emerging Infectious Diseases 2013; 19(4):  
320 589-597.
- 321
- 322 13. SANTOS S, et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae*  
323 isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and  
324 after tem-pneumococcal conjugate vaccine implementation. Vaccine 2013; 31:  
325 6150-6254.
- 326
- 327 14. DOMINGUES CM, et al. Effectiveness of tem-valent pneumococcal  
328 conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched  
329 case-control study. Lancet Respir Med 2014; 2(6): 464-71.
- 330
- 331 15. SANTOS M, et al. Temporal trends and clonal diversity of penicillin non-  
332 susceptible pneumococci from meningitis cases from 1996 to 2012, in Salvador,  
333 Brazil. BMC Infectious Diseases 2015; 15(302)1-10.
- 334
- 335
- 336 16. GRANDO IM, et al. Impact of 10-valent pneumococcal conjugate  
337 vaccine on pneumococcal meningitis in children up to two years of age in Brazil.  
338 Cad. Saúde Pública 2015; 31(2):1-9.
- 339
- 340 17. SPELLERBERG B, BRANDT C. Streptococcus. In: Versalovic J, Carrole K,  
341 Funke G, Jorgensen J, Landry ML, Warnock D. Manual of Clinical Microbiology.  
342 10<sup>th</sup> ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, 2011;p 331-349.
- 343

- 344 18. DIAS CA, et al. Sequential multiplex PCR for determining capsular  
345 serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. J Med Microbiol  
346 2007; 56:1185-1188.  
347  
348
- 349 19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2015. Performance  
350 standards for antimicrobial susceptibility testing. 25th informational supplement  
351 M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.  
352
- 353 20. WIDDOWSON CA, KLUGMAN KP. Emergence of the M phenotype of  
354 erythromycin-resistant pneumococci in South Africa. Emerg Infect Dis 1998;  
355 4:277–81.  
356
- 357 21. ENRIGHT MC, SPRATT G. A multilocus sequence typing scheme for  
358 *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious  
359 invasive disease. Microbiology 1998; 144:3049-3060.  
360
- 361 22. KOECK JL, et al. Evaluation and selection of tandem repeat *loci* for  
362 *Streptococcus pneumoniae* MLVA strain typing. BMC Microbiol 2005; 5:66.  
363
- 364 23. Multi Locus Sequence Typing (MLST). MLST Database.  
365 <http://pubmlst.org/spneumoniae/>. Accessed on January, 14th 2016.  
366
- 367 24. KIM SH, et al. Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of  
368 *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asian countries: an Asian Network for  
369 Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. Antimicrob Agents  
370 Chemother 2012; 56:1418–26.  
371  
372
- 373 25. LEE MR, et al Capsular serotypes and antimicrobial susceptibilities of  
374 *Streptococcus pneumoniae* causing invasive pneumococcal disease from  
375 2009–2012 with an emphasis on serotype 19A in bacteraemic pneumonia and  
376 empyema and  $\beta$ -lactam resistance. Intern. Journal Antimicrobial Agents 2013;  
377 42: 395-402.  
378
- 379 26. ECHÁNIZ-AVILÉS G, et al. Prevalencia de *Streptococcus pneumoniae*  
380 serotipo 19A antes y después de la introducción de la vacuna  
381 conjugada heptavalente en México. Salud Pública de México 2014; 56(3):266-  
382 271.  
383  
384

- 385 27. CASTAÑEDA E, et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in Latin  
386 America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis, 1990-  
387 2010. BMC Infect Dis 2012; 12:124.  
388
- 389 28. CAIERÃO J, et al. Serotypes and Genotypes of Invasive *Streptococcus*  
390 *pneumoniae* Before and After PCV10 Implementation in Southern Brazil. Plos  
391 One 2014; 9(10):e111129.  
392
- 393 29. CHOI EH, et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in children, South  
394 Korea. Emerg Infect Dis 2008; 14: 275-281.
- 395  
396 30. HULTEN K, et al. Changes in *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A  
397 Invasive Infections in Children from 1993 to 201. Journal of Clinical  
398 Microbiology 2013; 51(4):1294–1297.  
399
- 400 31. CROUCHER N, et al. Evidence for Soft Selective Sweeps in the Evolution  
401 of Pneumococcal Multidrug Resistance and Vaccine Escape. Genome Biol.  
402 Evol 2014; 6(7):1589–1602.  
403
- 404 32. HSIEH YC, et al. Expansion and evolution of *Streptococcus pneumoniae*  
405 serotype 19A ST320 clone as compared to its ancestral clone, Taiwan <sup>19F</sup>-14  
406 (ST236). J Infect Dis 2013; 15:203-210.  
407
- 408 33. SHIN J, et al. Predominance of ST320 among *Streptococcus pneumoniae*  
409 serotype 19A isolates from 10 Asian countries. J Antimicrob Chemother 2011;  
410 66: 1001-1004.
- 411  
412 34. MOTT M, et al. Susceptibility profiles and correlation with pneumococcal  
413 serotypes soon after implementation of the 10-valent pneumococcal conjugate  
414 vaccine in Brazil. Int J Infect Dis 2014; 20:47-51.  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422

423



424

425 **Figure 1:** Increase of 19A isolates after the PCV10 introduction.

426

427 (\*) Statistically significant ( $p = 0.04196$ ) comparing pre- and post-vaccination; (\*\*) Statistically  
 428 significant ( $p = 0.00001$ ) comparing only post vaccine period 2011 with 2014.

429

430

431

432

433

434

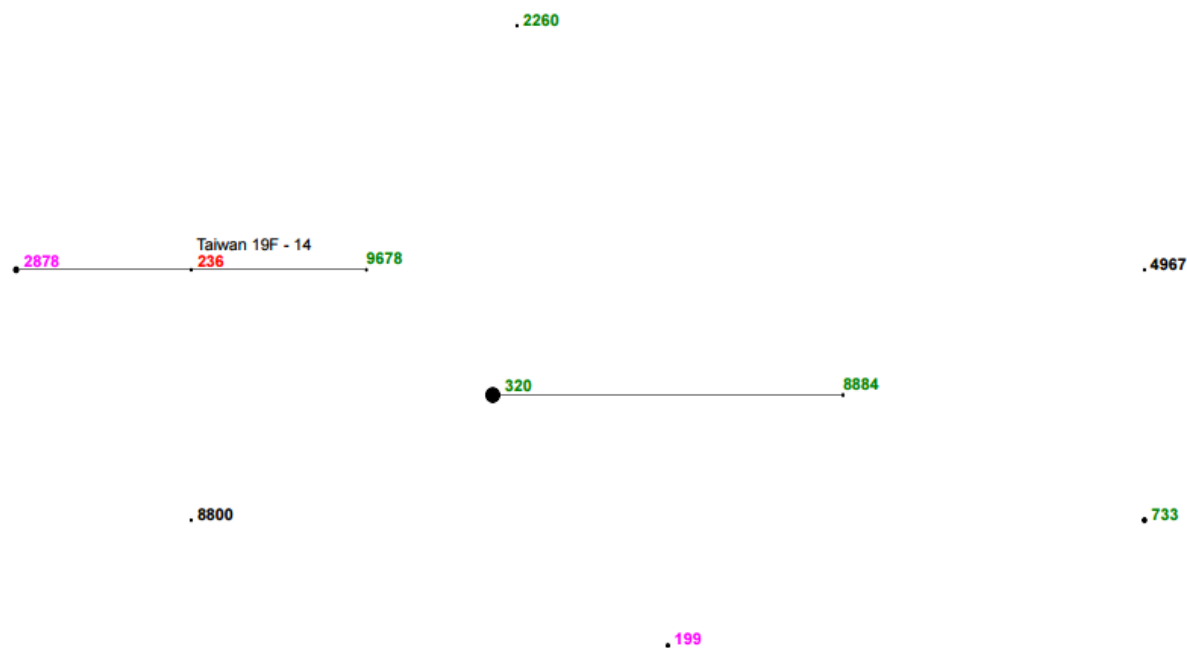
435

436

437

438

439



440

441 **Figure 2:** e-burst analysis of MLST result. Size of circles are proportional to the  
 442 number of isolates. Pink represent STs recovered during pre and post period. Green,  
 443 STs of post vaccination period and in black are the STs from pre vaccine years. In red,  
 444 the ST of PMEN clone Taiwan<sup>19F</sup>-14.

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454



483

484 **Table 1:** Results from MLST analyzes of 36 serotype 19A *S. pneumoniae* isolates.

ST	CC	N (%)	pre (%) / post (%)
320	320	22 (61.1%)	zero / 22 (100%)
8884	320	1 (2.8%)	zero / 1 (100%)
2878	236	4 (11.1%)	2 (50%) / 2 (50%)
9678	236	1 (2.8%)	zero / 1 (100%)
733	Singleton	3 (8.3%)	zero / 3 (100%)
199	Singleton	2 (5.5%)	1 (50%) / 1 (50%)
4967	Singleton	1(2.8%)	1 (100%) / zero
8800	Singleton	1 (2.8%)	1 (100%) / zero
2260	Singleton	1 (2.8%)	zero / 1 (100%)

485

486

487

488

489 **Table 2:** STs observed during the study period which include serotypes other than 19A

490

ST	Period	Serotypes	Region
<b>320</b>	Post	Mainly 19F and 19A	Around the world, including Brazil
<b>199</b>	Pre and post	Many	Around the world, including Brazil
<b>733</b>	Post	19F and 19A	Brazil and Germany
<b>4967</b>	Pre	23F	Brazil

491

492

493 **Table 3:** Characteristics 38 *S. pneumoniae* isolates of serotype 19A recovered pre and  
 494 post vaccine period.

Period	Identification	Specimen	ST	MT	PEN ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	CRO ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	MER ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	TET ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	SXT ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ERY ( $\mu\text{g}/\text{m}$ )	erm B	mefA
<b>Pre-Vaccination</b>												
	049-09	Blood	4967	19A.13	0.25	0.06	$\leq 0.06$	0.5	$>4$	$\leq 0.03$	-	-
	022-10	Blood	8800	19A.12	$\leq 0.03$	$\leq 0.03$	$\leq 0.06$	$\leq 0.25$	0.25	$\leq 0.03$	-	-
	025-11	Blood	199	19A.5	0.12	0.06	$\leq 0.06$	$\leq 0.25$	$\leq 0.12$	$\leq 0.03$	-	-
	015-08	Pleural fluid	2878	19A.2	0.12	$\leq 0.03$	$\leq 0.06$	$\leq 0.25$	1	0.06	-	-
	055-11	Blood	2878	19A.2	0.12	$\leq 0.03$	$\leq 0.06$	$\leq 0.25$	0.5	$\leq 0.03$	-	-
	015-10	-	-	19A.10	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Post-Vaccination</b>												
	030-12	Blood	2878	19A.2	0.12	0.06	$\leq 0.06$	$\leq 0.25$	0.5	0.06	-	-
	062-12	Blood	2878	19A.14	0.094	0.06	$\leq 0.06$	$\leq 0.25$	0.25	$\leq 0.03$	-	-
	046-13	Tracheal aspirate	199	19A.5	$\leq 0.03$	$\leq 0.03$	$\leq 0.06$	$\leq 0.25$	0.064	0.047	-	-
	022-12	Blood	733	19A.4	$\leq 0.03$	$\leq 0.03$	$\leq 0.06$	$\leq 0.25$	0.75	$\leq 0.03$	-	-
	001-14	Blood	733	19A.11	0.016	$\leq 0.03$	$\leq 0.06$	$\leq 0.25$	3	$\leq 0.03$	-	-
	049-14	Blood	733	19A.4	0.016	$\leq 0.03$	$\leq 0.06$	$\leq 0.25$	1.5	$\leq 0.03$	-	-
	060-14	Blood	2260	19A.9	0.064	$\leq 0.03$	$\leq 0.06$	$\leq 0.25$	1.5	0.047	-	-
	014-14	Blood	9678	19A.2	0.047	0.06	$\leq 0.06$	$\leq 0.25$	0.25	$\leq 0.03$	-	-
	130-12	CSF	8884	19A.1	4	2	1	$>8$	$>4$	$>32$	pos	pos
	167-11	Blood	320	19A.1	2	2	1	$>8$	$>4$	$>32$	pos	pos
	006-12	Sputum	320	19A.1	4	2	1	$\leq 0.25$	$>4$	4	neg	pos
	025-12	Blood	320	19A.1	4	2	1	$>8$	$>4$	$>32$	pos	pos
	054-12	Sputum	320	19A.1	4	1	0.38	$>8$	3	$>32$	pos	pos
	010-13	Pleural fluid	320	19A.1	1.5	2	0.5	$>8$	$>4$	$>32$	pos	pos
	063-13	Blood	320	19A.1	2	1.5	0.5	$>8$	$>4$	$>32$	pos	pos
	112-13	Pleural fluid	320	19A.1	4	1	0.25	4	$>4$	$>32$	pos	pos
	115-13	Blood	320	19A.1	1.5	1.5	0.38	$\leq 0.25$	2	2	neg	pos
	016-14	Blood	320	19A.1	0.75	1	0.25	$\leq 0.25$	3	3	neg	pos
	017-14	Blood	320	19A.1	0.75	1	0.38	3	3	$>32$	pos	pos
	030-14	Blood	320	19A.1	2	2	0.38	$\leq 0.25$	1.5	2	neg	pos
	037-14	Blood	320	19A.1	3	2	0.25	$\leq 0.25$	1	0.75	neg	pos
	056-14	Blood	320	19A.1	0.75	0.75	0.25	$\leq 0.25$	1.5	2	neg	pos
	057-14	CSF	320	19A.1	0.75	0.75	0.25	$\leq 0.25$	1.5	2	neg	pos
	065-14	Blood	320	19A.1	2	2	0.38	1.5	1	$>32$	pos	pos
	024-14	CSF	320	19A.3	1.5	1.5	0.38	3	0.75	$>32$	pos	pos
	025-14	Blood	320	19A.3	1.5	2	0.38	1	0.38	$>32$	pos	pos
	014-12	Tracheal aspirate	320	19A.6	4	2	1	$>8$	$>4$	$>32$	pos	pos
	041-14	Blood	320	19A.7	1.5	2	0.25	3	1.5	$>32$	pos	pos
	062-13	Blood	320	-	2	2	0.25	3	3	$>32$	pos	pos
	092-14	Blood	320	-	0.125	0.38	$\leq 0.06$	6	1.5	$>32$	pos	pos
	111-13	Broncho alveolar lavage	320	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	087-12	Sputum	-	19A.8	-	-	-	2	0.5	12	neg	pos

ST (Sequence Type); MT (MLVA type); PEN (Penicillin); CRO (Ceftriaxone); MER (Meropenem); TET (Tetracycline); SXT (trimethoprim-sulfamethoxazole); ERY (Erythromycin); CSF (cerebrospinal fluid); Neg (negative); pos (positive).  
MIC Penicillin parenteral (nonmeningitis):  $\leq 2.0$  - 4.0-  $\geq 8.0$   $\mu\text{g/mL}$ ; MIC Penicillin parenteral (meningitis):  $\leq 0.06$  -  $\geq 0.12$   $\mu\text{g/mL}$ ; MIC Ceftriaxone (nonmeningitis):  $\leq 1.0$  - 2.0 -  $\geq 4.0$   $\mu\text{g/mL}$ ; MIC Ceftriaxone (meningitis):  $\leq 0.5$  - 1.0-  $\geq 2.0$   $\mu\text{g/mL}$ ; MIC Meropenem:  $\leq 0.25$  - 0.50-  $\geq 1.0$   $\mu\text{g/mL}$ ; MIC Tetracycline:  $\leq 1.0$  - 2.0-  $\geq 4.0$   $\mu\text{g/mL}$ ; MIC Erythromycin:  $\leq 0.25$  - 0.50-  $\geq 1.0$   $\mu\text{g/mL}$ ; MIC Trimethoprim-Sulfamethoxazole:  $\leq 0.5$  - 1/19-2/38 –  $\geq 4/76$   $\mu\text{g/mL}$ ; MIC

495

496

497

498

499

500

501

502 **Table 4:** Antimicrobial susceptibility profile of 36 *S. pneumoniae* from serotype 19A pre (5  
 503 Isolates) and post vaccine (31 isolates)

	PRE			POST		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
Penicillin (non-meningitis)*	5 (100)	0 (0)	0 (0)	23 (76.7%)	7 (23.3%)	0 (0)
Penicillin (meningitis)*	1 (20%)	-	4 (80%)	7 (23.3%)	-	23(76.7%)
Ceftriaxone (non-meningitis)*	5 (100)	0 (0)	0 (0)	15 (50.0%)	15(50.0%)	0 (0)
Ceftriaxone (meningitis)*	5 (100)	0 (0)	0 (0)	9 (30.0%)	9 (30.0%)	12(40.0%)
Meropenem*	5 (100)	0 (0)	0 (0)	16 (53.3%)	9 (30.0%)	5 (16.7%)
Tetracycline	5 (100)	0 (0)	0 (0)	16 (51.6%)	6 (19.4%)	9 (29.0%)
Erythromycin	5 (100)	0 (0)	0 (0)	8 (25.8%)	1 (3.2%)	22(71.0%)
Trimethoprim- Sulfamethoxazole	3 (60)	1 (20)	1 (20)	6 (19.3%)	17(54.9%)	8 (25.8%)

505

506 S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

507 Post-vaccine period was analyses only 30 isolates for Penicillin, Ceftriaxone and Meropenem

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

## 6. CONCLUSÕES

- A taxa de não suscetibilidade para os  $\beta$ -lactâmicos ficou baixa, com 0,6% para penicilina e 1,3% para ceftriaxona. Porém, quando considerado os *breakpoints* para meningite 21,4% dos isolados foram resistentes à penicilina. A não suscetibilidade a sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina e meropenem foi de 37,7%, 22,0% e 4,4%, respectivamente. E a taxa de resistência a eritromicina foi de 8,2%.
- Dois anos após a introdução da PCV10 observou-se que entre os isolados invasivos, o sorotipo vacinal 14 foi o mais predominante, e entre os sorotipos não vacinais os mais prevalentes foram o 3, 20, 12F e 19A;
- Quando analisado todos os sorotipos a não suscetibilidade fica restrita ao sorotipo 14 e 19A. Havendo diferença no perfil de suscetibilidade entre os sorotipos, enquanto o sorotipo 14 apresentou menores MICs para a eritromicina devido a presença do gene *mefA*; o sorotipo 19A estava associado com maiores MICs para a eritromicina estando presente o gene *ermB*;
- Verificou-se o aumento do sorotipo não vacinal 19A após a introdução da PCV10, principalmente no ano de 2014 (quatro anos após a introdução da vacina);
- Paralelamente com a emergência deste sorotipo aumentou as taxas de não suscetibilidade aos antimicrobianos após a introdução da PCV10. Para penicilina a taxa de não suscetibilidade foi de 23,3% e para ceftriaxona foi de 50,0% (*breakpoints* para não meningite). Já para o meropenem a taxa de não suscetibilidade foi de 46,7%, para tetraciclina foi de 48,4%, eritromicina foi de 74,2% e para sulfametoxazol-trimetoprim foi de 80,7%;
- O aumento do sorotipo 19A foi devido à emergência da CC320 (63,9%), um clone bem estabelecido em outras regiões e com características de resistência. Dentro deste CC há a ST8884 uma SLV da ST320. Já s ST2878 e a ST 9678 são uma SLV da ST236 (clone Taiwan<sup>19F</sup> -14), enquanto a ST320 é uma DLV do clone Taiwan<sup>19F</sup> -14. Dentre os 9 tipos de ST identificadas 2 tipos foram identificadas somente no período pré-PCV10 (ST8800 e ST4967), outras 2 em ambos os períodos (ST199 e a ST2878), e o restante foi identificada apenas no período pós-PCV10 (CC320, ST2260, ST733 e ST9678).

## 7. ANEXOS

### 7.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Prevalência de resistência aos antimicrobianos e diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* isolados de doença invasiva

**Pesquisador:** Cicero Armidio Gomes Dias

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 45435115.7.0000.5345

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul  
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.115.418

**Data da Relatoria:** 18/06/2015

##### Recomendações:

Solicita-se adequar as citações no projeto à a resolução vigente (466/12), pois os pesquisadores citam a 196/96.

##### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências e o projeto, tão logo aprovado pelo instituições Coparticipantes, poderá ter seu início.

##### Situação do Parecer:

Aprovado

##### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

##### Considerações Finais a critério do CEP:

Dea acordo com o parecer do Relator.

## 7.2 Produção Científica Complementar

### 7.2.1 Artigo publicado

CAIERÃO J, CORNELLY AFH, CUNHA GR, MOTT M, ZAVASCKI AP, DIAS C. Streptococcus pneumoniae appendicitis in na adult patient: case report and review of the literature. American Journal Emergency Medicine. 33: 990.e1-990.e3, 2015.

Fator de Impacto: 1.274



## Case Report

## *Streptococcus pneumoniae* appendicitis in an adult patient: case report and review of the literature<sup>☆</sup>

### Abstract

*Streptococcus pneumoniae* is a rare cause of appendicitis. We report a pneumococcal appendicitis with secondary peritonitis in a human immunodeficiency virus–positive adult, with favorable outcome after surgery and antibiotic therapy. Secondary peritonitis is frequently complication of *S pneumoniae* appendicitis in the few reported cases, and no specific risk factor has been identified so far.

A 43-year-old woman, human immunodeficiency virus (HIV) positive (CD4<sup>+</sup>, 239 cells/mm<sup>3</sup>), was admitted to the emergency service complaining of fever, severe diffuse abdominal pain, diarrhea, and vomiting. Initial laboratory examinations demonstrated leukocytosis (16 100 cells/mm<sup>3</sup>, with 79% neutrophils). Abdominal tomography revealed a thickened appendix (filled with liquid) with approximately 1 cm in the higher diameter with discrete densification of the appendiceal fat, high number of regional lymph nodes, and a moderate amount of free intracavitary fluid.

Exploratory laparotomy revealed multiple abscesses, which were drained, and the presence of a large amount of pus was observed. Appendectomy was performed, and empirical therapy for a secondary bacterial peritonitis was initiated (2-g intravenous ceftriaxone every 12 hours and 500-mg intravenous metronidazole every 8 hours). Pathologic examination revealed cecal appendix with vascular congestion and acute fibrinosuppurative perivisceritis.

Culture of drained purulent secretion revealed pure growth of *Streptococcus pneumoniae* belonging to the capsular serotype 3 as defined using a sequential multiplex polymerase chain reaction [1]. Minimal inhibitory concentration was determined using E-test (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). The isolate was susceptible to all antimicrobials tested, following the interpretative Clinical and Laboratory Standards Institute breakpoints [2]: penicillin (minimal inhibitory concentration, 0.012 µg/mL), ceftriaxone (0.023 µg/mL), erythromycin (0.023 µg/mL), levofloxacin (1.0 µg/mL), tetracycline (0.19 µg/mL), trimethoprim/sulfamethoxazole (0.19 µg/mL), and vancomycin (1.0 µg/mL).

Treatment was changed to 3-g intravenous ampicillin/sulbactam every 6 hours plus 500-mg metronidazole every 8 hours. The association of a β-lactamase inhibitor was used because of the unavailability of ampicillin alone. Despite the anti-anaerobical activity of this combination, metronidazole was maintained due to the severity of the case to cover potential β-lactam-β-lactamase-resistant *Bacteroides* species. Patient was discharged 12 days after abdominal intervention without any complication.

Infection involving abdominal organs, such as appendix, is among the less common form of intraabdominal pneumococcal disease [3]. The first published description dates almost 40 years ago [4], and very few cases have been reported (Table).

Only 3 patients (including ours) were HIV positive, and no specific risk factor could be associated to the occurrence of pneumococcal appendicitis, even those historically recognized as predisposing factors for pneumococcal infections.

Information regarding previous respiratory infections was not available for all cases, but no patient questioned by this has reported previous infection [5–9], and only 1 presented pneumococcal nasopharynx colonization [7]. We have neither assessed the occurrence of previous infection nor previous administration of antipneumococcal vaccine.

Bacteriologic study of appendicitis has not reported pneumococci, but they may conceivably constitute a part of the not fully identified group of nonhemolytic and viridans streptococci [10,11]. Indeed, the actual incidence of pneumococcal appendicitis is unknown because cultures of appendix specimens are not routinely performed. Furthermore, preoperative antibiotic therapy can interfere with culture results in many cases [9].

A careful prospective microbiologic study [12] identified pneumococci in peritoneal exudates of 5% of children who had appendicitis with perforation, suggesting that pneumococci might colonize bowel more often than has been recognized but may be overlooked when cultured with mixed colonic flora.

The etiology of appendicitis is usually polymicrobial and associated with common intestinal pathogens. It is intriguing, therefore, that only 1 case was associated with the expected enteric microorganisms [6,13]. In fact, in most cases (87.5%, 14/16), *S pneumoniae* was detected in pure cultures.

It is difficult to define the pathogenic process by which *S pneumoniae* causes such focused intraabdominal infection. Bowel colonization may be the source of the pathologic process [6]. However, the intrinsic pneumococcal susceptibility to acid environment supports the protective role of gastric acid against significant bowel colonization. Hematogenic dissemination from the upper respiratory tract is also a possible situation, especially in children, which is densely colonized by pneumococci in the nasopharynx [14] or in HIV/acquired immunodeficiency syndrome patients, when invasive pneumococcal infections commonly present concomitant bacteremia [15].

Although 2 patients presented mild complications, most (93.7%, 15/16) were readily discharged. However, a 9-year-old boy [4] had more severe complication because he presented meningitis 26 hours postoperatively, with *S pneumoniae* being recovered from blood and spinal fluid [16].

<sup>☆</sup> Conflict of interest: All authors declare no conflict of interest.

**Table**  
Clinical and microbiological features of reported pneumococcal appendicitis

Age in years (sex)	Underlying condition	Specimen for culture	Culture findings	Serotype	Clinical/pathologic findings	Complication/outcome	Ref
9 (M)	No	Peritoneal and spinal fluid; blood	<i>S pneumoniae</i>	ND	Cloudy, odorless exudate surrounded and acutely suppurative appendix	Meningitis/cure	4
25 (F)	Corticoid replacement therapy postadrenalectomy	Appendiceal pus	<i>S pneumoniae</i>	ND	Appendiceal abscess	Cure	16
30 (M)	No	Appendix	<i>S pneumoniae</i>	19A	Acute appendicitis	Cure	5
31 (F)	No	Appendix	<i>S pneumoniae</i>	23 F	Acute appendicitis	Cure	5
1 (F)	No	Peritoneal swab	<i>S pneumoniae</i> , <i>E coli</i> , Bacteroides, microaerophilic streptococci	19C	Acute appendicitis mucosal ulceration, heavy polymorphonuclear infiltration	Prolonged postoperative fever/cure	6
12 (M)	No	Peritoneal swab	<i>S pneumoniae</i>	12A	Acute appendicitis, patchy necroses, polymorphonuclear infiltration	Cure	6
14 (M)	No	Peritoneal swab	<i>S pneumoniae</i>	23A	Acute appendicitis, mucosal erosion, inflammation decreasing toward periphery	Prolonged postoperative fever; inflamed abdominal mass postoperative/cure	6
23 (F)	No	Periappendicular pus	<i>S pneumoniae</i>	3	Acute/chronic appendicitis and periappendicitis, mucosal ulceration, polymorphonuclear infiltration	Cure	6
78 (M)	Diabetes mellitus	Peritoneal swab	<i>S pneumoniae</i>	6A	Acute appendicitis, local peritonitis, polymorphonuclear infiltration	Cure	6
80 (F)	No	Periappendicular pus	<i>S pneumoniae</i>	ND	Acute appendicitis, periappendicular abscess, polymorphonuclear infiltration, nonmalignant hyperplastic polyp in the proximal appendix	Cure	6
4 (M)	Intermittent abdominal pain for 1 year; pharyngeal adenoid vegetation removed right before	Appendix secretion	<i>S pneumoniae</i> ; <i>Haemophilus influenzae</i>	8	Acute nonsuppurative endoappendicitis	Cure	7
28 (M)	HIV (CD4 <sup>+</sup> 390/mm <sup>3</sup> )	Appendix secretion	<i>S pneumoniae</i>	19	Gangrenous appendicitis	Cure	13
12 (M)	No	Periappendicular pus	<i>S pneumoniae</i>	ND	Acute appendicitis	Cure	8
41 (M)	Alcoholism; HIV	Appendiceal pus	<i>S pneumoniae</i>	ND	Acute appendicitis with perforation, appendiceal abscess and peritonitis	Cure	3
12 (F)	No	Inflamed appendix	<i>S pneumoniae</i>	ND	Acute appendicitis	Cure	9
43 (F)	HIV	Appendiceal pus	<i>S pneumoniae</i>	3	Acute appendicitis	Cure	This case

Abbreviation: *E coli*, *Escherichia coli*; ND, not defined.

Microbiological characteristics are poorly explored in case reports. Indeed, only 1 study refers antimicrobial susceptibility information limited to penicillin [8]. Our isolate was submitted to a complete susceptibility test, showing in vitro susceptibility to all drugs tested. Because of the limited number of cases and the wide distribution of serotypes, it is impossible to correlate a specific serotype with the clinical condition, although among the 10 isolated in which the serotype was defined, the serogroup 19 was the most prevalent, followed by serotype 3.

In conclusion, we reported a rare case of pneumococcal appendicitis complicated with secondary peritonitis, with good outcome after surgery and ampicillin therapy. Literature review indicates that secondary peritonitis is frequently associated with *S pneumoniae* appendicitis. Although our patient was an HIV/acquired immunodeficiency syndrome patient, no risk factor associated with pneumococcal appendicitis has been clearly identified, not even microbiological features, such as serotype.

Juliana Caierão PhD

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre  
2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil

Ana Flor Hexel Cornely MD

Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil

Gabriela Rosa da Cunha Msc

Mariana Mott Msc

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2350 Ramiro  
Barcelos St, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil

Alexandre P. Zavascki MD, PhD

Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil

Cícero Dias PhD

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre  
2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil

Corresponding author at: 245, Sarmento Leite St, Porto Alegre, RS, Brazil  
Tel.: +55 51 33038739

E-mail address: cicero@ufcspa.edu.br

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajem.2014.12.051>

## References

- [1] Dias CA, Teixeira LM, Carvalho Mda G, Beall B. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J Med Microbiol* 2007;56:1185–8.
- [2] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-third informational Supplement. M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
- [3] Dugi III DD, Musher DM, Clarridge III JE, Kimbrough R. Intraabdominal infection due to *Streptococcus pneumoniae*. *Medicine* 2007;80:236–44.
- [4] Hugh H, Hussey MD. Pneumococcal appendicitis and cecitis. *JAMA* 1976;236:1388.
- [5] Denis F, Mounier M, Descottes B, Cubertafond P, Catanzano G. Abdominal infections caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol* 1984;3:443.
- [6] Heltberg O, Korner B, Schouenborg P. Six cases of acute appendicitis with secondary peritonitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol* 1984;3:141–3.
- [7] Astagneau P, Goldstein FW, Francoual S, Baviera E, Barthalon M, Acar JF. Appendicitis due to both *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:559–60.
- [8] Bhattacharya S, Kanungo R, Natarajan MK, Mahalakshmi VN, Srinivasan K. Unimicrobial appendicitis due to non-vaccine serotype of *Streptococcus pneumoniae*: implications for and management and prevention. *Indian J Med Microbiol* 2001;19:59–61.
- [9] Miron D, Dashkovsky I, Zuker M, Szvalb S, Cozacov C. Primary *Streptococcus pneumoniae* appendicitis in a child: case report and review. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:282–4.
- [10] Brook I. Bacterial studies of peritoneal cavity and postoperative surgical wound drainage following perforated appendix in children. *Am Surg* 1980;192:208–12.
- [11] Chen CY, Chen YC, Pu HN, Tsai CH, Chen WT, Lin CH. Bacteriology of acute appendicitis and its implication for the use of prophylactic antibiotics. *Surg Infect (Larchmt)* 2012;13:383–90.
- [12] Haecker FM, Berger D, Schumacher U, Friess D, Schweizer P. Peritonitis in childhood: aspects of pathogenesis and therapy. *Pediatr Surg Int* 2000;16:182–8.
- [13] Clark JA, Keroack MA. Pneumococcal appendicitis in a man with HIV infection. *N Engl J Med* 1993;328:1282.
- [14] Scott JAG. The preventable burden of pneumococcal disease in the developing world. *Vaccine* 2007;25:2398–405.
- [15] Ash SY, Sheffield JV. *Pneumococcus*. *Med Clin North Am* 2013;97:647–66.
- [16] Mutton KJ. Intra-abdominal pneumococcal abscess. *Med J Aust* 1983;8:36–7.

### 7.2.2 Trabalhos apresentados em eventos científicos

- 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia  
Natal, RN

Resumo: Avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em isolados de *Streptococcus pneumoniae* recuperados de pacientes com doença invasiva e não invasiva.

MOTT, M., CUNHA, GR, D'AZEVEDO, P, CAIERÃO, J, DIAS, C.

Resumo: Diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes ao sorotipo 19A, utilizando como ferramenta a técnica de MLVA.

CUNHA, GR, MOTT, M.P., PINTO, T.C.A, CAIERÃO, J, D'AZEVEDO, P.A, TEIXEIRA, L.M, DIAS, C.A.G.

- 9th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases  
Hyderabad, India

Resumo: Genetic diversity of *Streptococcus pneumoniae* belonging to non-vaccine serotype.

G.R.CUNHA, G.G.VIREIRA, M.P.MOTT, T.C.A. PINTO, J. CAIERÃO, P.HAWKINS, P.A.d'AZEVEDO, L.M.TEIXEIRA, L. McGree, C.A.G.DIAS.

- XIX LANCEFIELD International symposium on streptococci and streptococcal diseases  
Bueno Aires, Argentina

Resumo: Genotypic characteristics of serotype 20 *Streptococcus pneumoniae* isolates obtained from invasive disease in the Southern region of Brazil.

GR CUNHA, MP MOTT, R el KADRI, TCA PINTO, PA d'AZEVEDO, D FALCI, J CAIERÃO, LM TEIXERA, M McGree, C DIAS.

- 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia  
Florianópolis, SC

Resumo: Serotype 19A: Prevalence and antimicrobial resistance in the pre and post-PCV10 period in Southern Brazil.

MOTT, M.P., CUNHA, G.R., DEL MASCHI, M.M., ISHIKAWAJIMA, N., CAIERÃO, J., D'AZEVEDO, P.A., DIAS, C.A.G.

Resumo: Genetic Diversity of serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* isolates in the post vaccine period in Southern region of Brazil.

CUNHA, G.R., MOTT, M.P., CHRISTOPHE, B.L., URGELL, A.F., NOLL, G., CAIERÃO, J., D'AZEVEDO, P.A., DIAS, C.A.G.

- I Mostra de trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA  
Porto Alegre, RS

Resumo: Doença pneumocócica invasiva: sorotipo bacteriano e condições de base do paciente.

Marine Del Maschi, Marcella Garcia, Kauana Pizzuti, Mariana Mott, Gabriela R da Cunha, Diego Falci, Cícero Dias.

Resumo: Diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 19A através da técnica de MLVA.

Adriana Urgell, Giovani Noll, Luiza Sandrin, Maurício Nunes, Bernard Louizette, Mariana Mott, Gabriela R da Cunha, Cícero Dias.

[Skip to Main Content](#)



## Epidemiology and Infection Instructions for Contributors (HYG)

Epidemiology and Infection publishes original reports and reviews on all aspects of infection in humans and animals. Particular emphasis is given to the epidemiology, prevention and control of infectious diseases. The scope covers the zoonoses, outbreaks, food hygiene, vaccine studies, statistics and the clinical, social and public-health aspects of infectious disease, as well as some tropical infections. It has become the key international periodical in which to find the latest reports on recently discovered infections and new technology. For those concerned with policy and planning for the control of infections, the papers on mathematical modelling of epidemics caused by historical, current and emergent infections are of particular value. Papers that do not fall exactly within the main themes of the scope should be discussed in advance with the Senior Editor. All papers need to be of very high quality and global relevance to be considered for publication.

The requirements of the journal are in accordance with the International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts submitted to biomedical journals [British Medical Journal 1991; 302: 338–341 and New England Journal of Medicine 1991; 324: 424–428.]. Particular attention is drawn to the sections on originality, copyright, prior and duplicate publication, and ethical guidelines.

### Submission of manuscripts

Epidemiology and Infection only accepts electronic submission of manuscripts, allowing authors to benefit from faster review and earlier, online publication. Authors should submit their manuscripts online to <http://mc.manuscriptcentral.com/hyg>.

The preferred file format for uploading your submission is as a Word document. LaTeX files (.tex) may only be submitted where a paper contains significant mathematical content. LaTeX files should be accompanied by any files referenced by the .tex file (such as image files and bibliographic files). Please do not try to upload PDF files of your text. The system will automatically convert your files to a PDF. All files should be named in a logical way (e.g. [firstauthorlastname]Fig1.tif).

Authors who are unable to submit online should contact the Editorial Office ([epidemiologyandinfection@cambridge.org](mailto:epidemiologyandinfection@cambridge.org)) for assistance. For the purposes of reviewing, high-resolution graphics for figures are not necessary; authors may submit low-resolution versions of figures, but you should ensure that they are of sufficient quality for viewing on-screen. On submission of your revised manuscript, high-resolution versions saved in the specified formats should be uploaded. Full instructions and a Help function are available on the site.

Please note the journal will be published online-only from January 2015

During the submission process, you may specify preferred or non-preferred reviewers. You may propose preferred reviewers who are especially qualified to referee the work, who are not close colleagues and who would not have a conflict of interest. If you suggest more than one preferred reviewer, the suggested reviewers must have an international geographical spread. If you would prefer that particular reviewers do not evaluate a paper, you may indicate them as non-preferred reviewers and this will be treated confidentially. Suggestions regarding reviewers will be considered by the Associate Editors and taken into account; it is however the decision of the Editors whether or not to use them.

**Covering letter:** Manuscripts must be accompanied by a covering letter. This must include (a) information on prior or duplicate publication or submission elsewhere of any part of the work; (b) a statement of financial or other relationships that might lead to a conflict of interests; (c) a statement that the manuscript has been read and approved by all authors; (d) the name and address (including email address) of the corresponding author, who is responsible for communicating with the other authors about revisions and final approval of the proofs. It is important to include a short summary of why the paper is thought to be important and original, and relevant to *Epidemiology and Infection*.

**Originality:** To be published in *Epidemiology and Infection*, a manuscript cannot have been published previously, nor can it be under review for publication elsewhere. On submission, you will be asked to confirm that the information in the manuscript is new and original, and that the manuscript has been submitted solely to this journal and is not published, in press, or submitted elsewhere. Papers with multiple authors are reviewed on the assumption that all authors have contributed materially to the research, have approved the submitted manuscript and concur with its submission to *Epidemiology and Infection*. You are asked to confirm these points on submission.

**Copyright and permissions:** The manuscripts must be accompanied by copies of any permissions to reproduce published material, to use illustrations, to report sensitive personal information of identifiable persons, or to name persons for their contributions. These must be sent as hard copies by ordinary non-urgent post, signed by the submitting author. The electronic version of the paper submitted should state that these are in the post. Authors of articles published in the journal assign copyright to Cambridge University Press (with certain rights reserved) and you will receive a copyright assignment form for signature on acceptance of your paper. You can find further information about how to request permission to use third-party copyrighted material at the following link: <http://www.journals.cambridge.org/artworkguide>.

**Ethical and regulatory guidelines:** All research must meet ethical and regulatory guidelines, including adherence to the legal requirements of the study country. The Editors may ask for written confirmation of this when considered necessary.

### Preparation of manuscript files

Manuscripts must be in English and typed double-spaced. Allow margins of at least 1" (25 mm); do not hyphenate words at the end of lines and do not justify right margins. Include a title page, summary, text, acknowledgements, declaration of interest, references, tables, and legends for illustrations. Number the lines in your submission. Number the pages consecutively, beginning with the title page. Type the page number in the upper or lower right-hand corner of each page. Numbers should be spelled out when they occur at the beginning of a sentence; use Arabic numerals elsewhere. Abbreviations should be used sparingly and non-standard abbreviations should be defined at their first occurrence. Metric system (SI) units should be used. Manuscripts that do not conform to the style of *Epidemiology and Infection* will be returned without review.

### Title page

The title page should carry (a) the title of the article, which should be concise, but informative; (b) initials and last name of each author; (c) name of department(s) and institution(s) to which the work should be attributed; (d) disclaimers, if any; (e) name, mailing address and email address of author responsible for correspondence about the manuscript; (f) name and address of author to whom correspondence and requests for reprints should be addressed or statement that reprints will not be available from the author; (g) a short running head of no more than 40 characters (counting letters and spaces) placed at the foot of the title page and identified.

Authors are to be listed as initials and surname (family name) in the style A. B. SMITH (with full stops after initials). Do not spell out forenames and do not include degrees, status or position. Identify each author's institution by a superscript number (e.g. A.B. SMITH<sup>1</sup>) and list the institutions underneath and after the final author.

### Authorship

All persons designated as authors should qualify for authorship. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content. A paper with corporate (collective) authorship must specify the key persons responsible for the article; others contributing to the work should be recognized separately (see 'Acknowledgements'). Editors may require authors to justify the assignment of authorship.

### Summary

The second page should carry a summary of 150-200 words. The summary should state the purposes of the study or investigation, basic procedures (selection of study subjects or experimental animals; observational and analytical methods), main findings (give specific data and their statistical significance, if possible), and the principal conclusions. The summary should be one continuous paragraph which highlights the importance of the findings outlined in the study.

You will also be asked within the online submission system to outline your key results and their importance in 3-5 short bullet points

### Text

**Original Papers:** The text of articles should normally be divided into sections with the headings Introduction, Methods, Results and Discussion. Papers should be only as long as they need to be, and preferably between 2000 and 4000 words. Please keep the number of references below 40.

**Short Reports:** The journal also publishes Short Reports in the form of a continuous narrative with the only separate section being the Summary. These short reports are not published more rapidly but are intended to be the vehicles for valuable but limited or preliminary observations. The number of words should be below 3000, and we would normally expect not more than one table or figure, and up to 10 references.

**Review Articles:** The journal welcomes Review Articles, Editorials and leading articles on recent developments, controversial issues and other aspects of infectious disease epidemiology. These are usually commissioned, but unsolicited papers are also welcomed. Preliminary discussion by email or letter with the Editor-in-Chief is advised. All papers in this category, including those commissioned, are peer reviewed.

#### Systematic Reviews and Meta-analyses

For authors wishing to submit papers on systematic reviews and meta-analyses to *Epidemiology and Infection*, please follow the PRISMA guidelines. These are described on their website: <http://www.prisma-statement.org>. *Epidemiology and Infection* also subscribes to the STROBE initiative for observational studies [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).

Those intending to submit a review or meta-analysis are invited to discuss objectives and content with the Editor-in-Chief before submission.

**Letters to the Editor:** *Epidemiology and Infection* only accepts letters related to papers published by the journal. These should be sent, as a letter, to the Editor-in-Chief ([norman.noah@lshtm.ac.uk](mailto:norman.noah@lshtm.ac.uk)) stating clearly the paper to which the letter applies. All letters are sent to the corresponding author of the original paper for response or comment; no further correspondence is generally allowed. If possible, the letter should be sent as soon as possible after electronic publication of the paper in question. *Epidemiology and Infection* will then endeavour to publish the paper, letter and response together in the same online issue. The Editor's decision on whether or not to publish the correspondence is final.

**General:** All manuscripts should be submitted in English using English spellings. Manuscripts written by those whose primary language is not English should be edited carefully for language prior to submission. Authors who are not fluent in written English are encouraged to seek assistance in this regard before submitting their manuscripts. The journal aims to communicate and educate across disciplines, and many of its readers do not have English as their first language, so plain language is always preferred.

#### Acknowledgements

You may acknowledge individuals or organisations that provided advice, support (non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section.

#### Financial support

Please provide details of the sources of financial support for all authors, including grant numbers. For example,

"This work was supported by the Medical Research Council (grant number XXXXXX). Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency the different agencies should be separated by a semi-colon, with "and" before the final funder. Grants held by different authors should be identified as belonging to individual authors by the authors' initials. For example, "This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, YYYY), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH)". Where no specific funding has been provided for research, please provide the following statement: "This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors."

#### Conflict of interest

Please provide details of all known financial, professional and personal relationships with the potential to bias the work. Where no known conflicts of interest exist, please include the following statement: "None."

#### Ethical standards

Where research involves human and/or animal experimentation, the following statements should be included (as applicable): "The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional committees on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008." and "The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional guides on the care and use of laboratory animals."

#### Journal style: Guidance to authors

**Spelling:** It is the convention of *Epidemiology and Infection* to use '-ize', and not '-ise', e.g. characterize, immunize. The following spelling is used for words that frequently appear:

programme (but program for computer software), diarrhoea, faeces, aetiology, centre, paediatric, titre, litre, analyse, epidemiological (not epidemologic), and similarly, microbiological, serological, etc. Upper case in first letter and italics is used only for a microorganism when it is specified e.g. *Campylobacter* sp. or *Campylobacter jejuni*, not when otherwise used, e.g. '... following culture, campylobacter were isolated .....

**Dates:** The format '26 January 1993' is used, and year durations are not elided, e.g. '1993–1996' not '1993–6'.

**Percentages:** Use 'per cent' when following a figure that is spelt (e.g. at start of sentence 'Twelve per cent ....') and % when in text following numeral (e.g. 12%).

**Numerals:** Use numerals for figures over 10, and spell out figures one to ten. Note, however, that all time durations are numerals e.g. 1 h, 3 days, 5 weeks (unless beginning a sentence). Numerals are also used when numbers appear closely together, e.g. '3 of 11, 6 of 9, 14 of 21', as this convention improves the visual appearance of the text. Thousands and millions are not separated by commas e.g. '1200000' not '1,200,000', but will be separated by half spaces during printing. Avoid beginning a sentence with numbers over ten or decimal/fraction numbers. Spell out any numbers that are used to begin a sentence, e.g. Five...; Nineteen...; One hundred and twenty-four...

#### References

Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables and legends by Arabic numerals in square brackets (not superscript numbers). References cited only in tables or in legends to figures should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification in the text of the particular table or illustration.

Use the style of the examples below, which are based on the formats used by the US National Library of Medicine in Index Medicus. The titles of journals should be spelled out in full. Consult List of Journals Indexed in Index Medicus, published annually as a separate publication by the library and as a list in the January issue of Index Medicus.

Try to avoid using abstracts as references; 'unpublished observations' and 'personal communications' may not be used as references, although references to written, not oral, communications may be inserted (in parentheses) in the text. Include among the references papers accepted but not yet published, or published online only [supply Digital Object Identifier (doi) reference, if known]; designate the journal and add '(in press)'. Information from manuscripts submitted but not yet accepted should be cited in the text as 'unpublished observations'.

The references must be verified by the author(s) against the original documents.

Do not insert full stops after author initials, commas after author surnames, or 'and' between last two authors.

Only use upper case first letters for the first word of the title of a paper or when a proper noun, e.g. 'Isolation from rabbits trapped in Australia', not 'Isolation from Rabbits Trapped in Australia' (even if this was the presentation in the journal of source).

Do not include issue number of a journal after volume e.g. '1994; 10: 183–188.' not '1994; 10 (12): 183–188'.

Do not elide page numbers e.g. '183–188; 11–18' not '183–8; 11–8'.

Ensure when giving a reference to a book that the town/city/country of the publisher is given in addition to their name.

Examples of correct forms of references are given below.

#### Journals

## (1) Standard journal article –

List all authors when three or fewer; when four or more, list only first author and add et al.

Wrensch M, et al. History of chickenpox and shingles and prevalence of antibodies to varicella-zoster virus and three other herpesviruses among adults with glioma and controls. *American Journal of Epidemiology* 2005; 161: 929–938. Example of an article published online (but not yet in a printed issue):

Kiely RA, et al. Emergence of group B *Streptococcus* serotype IV in women of child-bearing age in Ireland. *Epidemiology and Infection*. Published online: 7 June 2010. doi:10.1017/S0950268810001275.

## (2) Corporate author

National Institutes of Health. Consensus Development Conference Statement. Management of hepatitis C: 2002, 10–12 June 2002. *Hepatology* 2002; 36: S3–S20.

## (3) No author given

Anon. Coffee drinking and cancer of the pancreas [Editorial]. *British Medical Journal* 1981; 283: 628.

## (4) Journal supplement

Mastri AR. Neuropathy of diabetic neurogenic bladder. *Annals of Internal Medicine* 1980; 92 : 316–318.

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan [Abstract]. *Blood* 1979; 54 (Suppl. 1): 26a.

## (5) Journal paginated by issue

Seaman WB. The case of the pancreatic pseudocyst. *Hospital Practice* 1981; 16: 24–25.

## Books and other monographs

## (6) Personal author(s)

Eisen HN. *Immunology: An Introduction to Molecular and Cellular Principles of the Immune Response*, 5th edn. New York: Harper and Row, 1974, pp. 406.

## (7) Editor, compiler, chairman as author

Dausset J, Colombani J (eds). *Histocompatibility Testing 1972*. Copenhagen: Munksgaard, 1973, pp. 12–18.

## (8) Chapter in book

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman Jr. WA, Sodeman WA, eds. *Pathologic Physiology: Mechanisms of Disease*. Philadelphia: Saunders, 1974, pp. 457–472.

## (9) Published proceedings paper

Dupont B. Bone marrow transplantation in severe combined immuno-deficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. *Proceedings of the Third Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology*. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974, pp. 44–46.

## (10) Monograph in a series

Hunninghake GW, et al. The human alveolar macrophage. In: Harris CC, ed. *Cultured Human Cells and Tissues in Biomedical Research*. New York: Academic Press, 1980, pp. 54–56. (Stoner GD, ed. *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol. 1.)

## (11) Agency publication

Ranofsky AL. *Surgical operations in short-stay hospitals: United States – 1975*. Hyattsville, MD, USA: National Center for Health Statistics, 1978; DHEW publication no (PHS) 78–1785. (Vital and health statistics; series 13; no. 34.)

## (12) Dissertation or thesis

Cairns RB. *Infrared spectroscopic studies of solid oxygen (dissertation)*. Berkeley, CA, USA: University of California, 1965, 156 pp.

## Other articles

## (13) Newspaper article

Shaffer RA. Advances in chemistry are starting to unlock mysteries of the brain: discoveries could help cure alcoholism and insomnia, explain mental illness. How the messengers work. *Wall Street Journal* 1977; 12 August.

## (14) Magazine article

Roueche B. Annals of medicine: the Santa Claus culture. *The New Yorker* 1971; 4 September: pp. 66–81.

## (15) Citation of databases or other sources from the internet

These should be included in the numbered list of References at the end of the article in the following format:

Full name of database [www address(URL)]. Date accessed.

See example below:

1. Swiss Life Sciences (SLS) database (<http://www.swisslifesciences.com/swisslifesciences/db/>). Accessed 7 April 2005.

The text should contain a shortened version of the database title (for example, an acronym) and a numerical indicator linking it to the Reference section. See example below:

...details can be found in the SLS database [1]. More information is...

## Tables

Type each table double spaced on a separate sheet. Tables should be placed in the main manuscript file at the end of the document, not within the main text. Do not submit tables as pictures or photographs. Number tables consecutively in the order of their first citation in the text and supply a brief title for each. Give each column a short or abbreviated heading. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table. Identify statistical measures of variations such as standard deviation, standard error of the mean. Do not use internal horizontal or vertical rules. Be sure that each table is cited in the text. If you use data from another published or unpublished source obtain permission and acknowledge fully.

## Figures

You can find further information about how to prepare your figures at the following link: <http://www.journals.cambridge.org/artworkguide>.

Figures should be prepared electronically, or scanned from high-quality originals: freehand or typewritten lettering is unacceptable. Letters, numbers and symbols should be clear and even throughout and of sufficient size so that when reduced for publication each item will still be legible. 9pt Arial font is ideal. Titles and detailed explanations belong in the legends for illustrations, not on the illustrations themselves.

At initial submission, figures may be submitted as TIF, JPG, GIF, EPS or PNG files. Please note that figures saved as PDF, PPT and DOC files are not accepted. When you submit your revised manuscript, figures should be submitted as TIF or EPS files at 100% of final size and at appropriate resolution (1000–1200 dpi for line drawings, 300 dpi for photographs and halftone images, and at least 600dpi for combination figures). Other file formats or figures 'pasted' into Word files are not accepted. Colour figures should be saved in CMYK (not RGB, except for Supplementary files).

Photomicrographs must have internal scale markers. Symbols, arrows or letters used in the photomicrographs should contrast with the background. If composite or multiple electronmicrographs, electrophoresis patterns, etc. are to be included, authors are requested to ensure that all the original photographic plates are of matched densities and contrast. If photographs of persons are used either the subjects must not be identifiable or their pictures must be accompanied by written permission to use the photograph. Figures should be numbered consecutively according to the order in which they have been first cited in the text. If a figure has been published, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce the material. Permission is required irrespective of authorship or publisher, except for documents in the public domain. Figures such as pie charts, histograms and bar charts that are drawn in three dimensions without three-dimensional graph axes are not accepted. Only figures in which the axes have three dimensions will be considered for publication in three dimensions.

Colour figures will be published online free of charge

### Legends for figures

Type legends for illustrations double spaced, starting on a separate page, with arabic numerals corresponding to the illustrations. When symbols, arrows, numbers or letters are used to identify parts of the illustrations, identify and explain each one clearly in the legend. Explain the internal scale and identify method of staining in photomicrographs. If your figure contains third-party copyrighted material, you should include a credit in your figure caption.

### Units of measurement

Measurements of length, height, weight and volume should be reported in metric units (metre, kilogram, litre) or their decimal multiples. The terms kilobases and base pairs (abbreviations kb and bp) should be used when referring to nucleic acid sequences and the molecular mass of proteins and peptides should be given in kilodaltons (kDa). Temperatures should be given in degrees Celsius. Blood pressures should be given in millimetres of mercury (mmHg). All haematological and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Editors may request that alternative or non-SI units be added by the authors before publication.

### Abbreviations and symbols

Use only standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title and abstract. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. Do not use ampersands (&) unless part of a formal name, e.g. Procter & Gamble.

### Online supplementary material

The online platform gives authors the opportunity to include material that it would be impossible or impractical to include in the printed version, for example, extensive datasets, complex mathematical calculations, 3D-structures, 3D-images or video files. You must upload Supplementary Material at the same time as you submit your manuscript, and you must give details in your cover letter of all supplementary files uploaded. If accepted, this material will be placed in the Cambridge University Press Supplementary Material data archive, and it will be accessible online. Authors should ensure that they mention within their article that Supplementary Material is available on the Cambridge Journals Online website.

At the head of the first page of your Supplementary Material file, type 'Epidemiology and Infection', the article title, the names of the authors, the heading 'Supplementary Material', and then the relevant inclusions. Please note that (unlike figures included in the printed article) captions or legends should be included for all figures and tables in Supplementary Material. You should number figures or tables with the prefix 'S', e.g. Supplementary Figure S1, Supplementary Table S1. Colour images for online publication as Supplementary Material must be saved in RGB format (not CMYK).

Although Supplementary Material is peer reviewed, it is not checked, copyedited or typeset after acceptance and it is loaded onto the journal's website exactly as supplied. You should check your Supplementary Material carefully to ensure that it adheres to journal styles. Corrections cannot be made to the Supplementary Material after acceptance of the manuscript. Please bear this in mind when deciding what content to include as Supplementary Material.

### Open Access

Authors have the option to publish their paper under a fully Open Access agreement, upon payment of a one-off Article Processing Charge. In this case, the final published Version of Record will be made freely available to all in perpetuity under a creative commons license, enabling its re-use and re-distribution. This Open Access option is only offered to authors upon acceptance of an article for publication.

Authors choosing the Open Access option are required to complete the Open Access License to Publish form. More information about Open Access, including the current Article Processing Charge, can be found on our website.

### Author Language Services

Cambridge recommends that authors have their manuscripts checked by an English language native speaker before submission; this will ensure that submissions are judged at peer review exclusively on academic merit. We list a number of third-party services specialising in language editing and / or translation, and suggest that authors contact as appropriate. Use of any of these services is voluntary, and at the author's own expense.

## Log in now or Register for online Access

Click below if you have a personal subscription

[User Login](#)

Click below if you have institutional off-campus access

[Institutional Login](#)

[Register](#) if you do not have an existing account