



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



DIÊGO RODRIGO SANTOS RAMOS RIOS

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
***STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* DIRETAMENTE DE**
FLUIDOS CORPÓREOS

Salvador – Bahia

2014

DIÊGO RODRIGO SANTOS RAMOS RIOS

Detecção e Caracterização molecular de *Streptococcus pneumoniae* diretamente de fluidos corpóreos.

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós – Graduação em Farmácia, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como pré – requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof^ª Dr^ª Joice Neves Reis
Pedreira

Salvador – Bahia

2014

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Rios, Diêgo Rodrigo Santos Ramos.
Detecção e caracterização molecular de *Streptococcus pneumoniae* diretamente de fluidos corpóreos / Diêgo Rodrigo Santos Ramos Rios. - 2014.
70 f.: il.

Inclui anexos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Joice Neves Reis Pedreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador,
2012.

1. *Streptococcus pneumoniae*. 2. Bactéria. 3. Diagnóstico molecular. 4. Vírus. 5. Vacinas.
I. Pedreira, Joice Neves Reis. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia.
III. Título.

CDD - 616.01
CDU - 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

TERMO DE APROVAÇÃO

DIÉGO RODRIGO SANTOS RAMOS RIOS

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE DIRETAMENTE DE FLUIDOS CORPÓREOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Aprovada em 04 de outubro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a Joice Neves Reis Pedreira
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Dr. Luciano Kalabric Silva
Fundação Oswaldo Cruz

Dr.^a Marilda de Souza Gonçalves
Universidade Federal da Bahia

Aos meus pais, por todo incentivo e
carinho sempre.

E aos meus grandes amigos, por todo o
apoio dado naqueles momentos em que pensei
desacreditar no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Grande Arquiteto do Universo, que a tudo criou e deu sentido com as suas mais variadas leis de necessidade e amor, permitindo que tudo resultasse neste trabalho. Também ao meu anjo da guarda, meus guias e mentores espirituais.

Aos meus pais, Ana Cristina e Evandro Rios, por todo o amor e sacrifício. Todo carinho e atenção. Todo suporte, direto ou indireto. Pela educação, pelo bom gosto, pelos princípios.

A minha orientadora, Professora Dra. Joice Neves, por ter sido uma das pessoas a me apresentar o maravilhoso mundo da microbiologia e bacteriologia, bem como pela oportunidade de ingressar e integrar uma equipe de pesquisa, unida e excelente. Pelo exemplo em pesquisa e pensamento científico, sempre com clareza e objetividade, corrigindo a minha insistência em romancear o que deve ser objetivo.

A Dr. Mitermayer Reis e o Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (FIOCRUZ), pela possibilidade de realização de todos os meus experimentos, da concepção à análise, e todo o suporte em dias úteis, fins de semana e feriados, e também pelos momentos de lazer e integração entre colegas e suas diferentes equipes.

A equipe do laboratório de bacteriologia do Hospital Couto Maia: Bioquímicos Dra. Neide Oliveira e Dr. Marcelo Telles, pelos ensinamentos que nenhum livro me daria de forma tão didática e perfeita, e com quem tive o prazer de conviver e aprender desde o meu estágio extracurricular, em especial a Dr. Marcelo Telles, pelo aprendizado de todo dia, pela oportunidade de me sentir bioquímico responsável de tão importante setor de um tão distinto hospital, e pela sua confiança em meu trabalho. Também ao coordenador do laboratório, Dr. Ronaldo, grande amigo. Obrigado pela sua confiança em meu trabalho, e também pelo carinho desde a minha recepção à minha despedida. Ao corpo técnico desde laboratório maravilhoso, meus agradecimentos por tantas manhãs agradáveis e divertidas a Marijan, Helenita, Simone, Edileuza, Geórgia, Celidalva. Sempre digo e sempre direi que, se tive um

ambiente de trabalho bom e que me dava gosto de ir trabalhar todas as manhãs, fizesse chuva ou sol, e do qual tive e tenho orgulho de dizer que fiz parte, este lugar foi o Laboratório de Bacteriologia do Hospital Couto Maia. Foi um prazer enorme ter todos vocês em minha vida. O período de quase dois anos e meio foi curto, mas permanecerá fixado em minha memória. Muito Obrigado!

A minha equipe de trabalho, a equipe meningites, uma equipe unida e com foco na excelência, onde fiz bons amigos e contatos. Milena Soares, Ana Paula Menezes, Mariela Correia, Vivian Galvão, Eliane Escobar, Eder Silva, André Silvani, Lorena Galvão, Paulo Lobo, Soraia Cordeiro, Jailton Azevedo, Leila Campos. Com uns, um pouco mais, com outros um pouco menos, mas em todos os casos, foram boas interações e que serviram para o meu crescimento de alguma forma. Obrigado a todos, por toda a ajuda e companheirismo.

A alguns amigos especiais, agradecimentos especiais...

Fernanda Albuquerque, grande amiga, incentivadora e motivadora. Uma verdadeira cientista, culta e inteligente, mas que acima de tudo sabe viver o seu lado mais humano. Apoio e ombro amigo sem os quais a jornada poderia ter sido muito mais pesada. Muito obrigado pelo carinho e amizade hoje e sempre.

Vivian Galvão, pelos desabafos conjuntos, tanto de alegrias quanto de momentos mais tensos. Pela companhia de todos os dias, não só durante o expediente, mas também na saída dele. Muito obrigado pela amizade e companheirismo.

Nadja Gonçalves, pela amizade, carinho e companheirismo. Pelo suporte quando ameacei fraquejar e pelas palavras ternas e leais.

Artur Trancoso, meu caro amigo, pela ajuda de valor inestimável na análise das minhas sequencias para o MLST. Sua ajuda foi fundamental para o sucesso. Muito obrigado!

Eder Silva, obrigado pela companhia até mesmo nos dias em que praticamente só havíamos nós em todo o Centro de Pesquisa (feriados, greves, finais de semana...).

Mariela Leite, querida amiga, companheira de tardes e tardes. Sempre simples, sempre doce, sempre você. Obrigado pelo carinho, sempre.

Milena Soares e Ana Paula Menezes, amigas e professoras. Aprender a analisar as sequencias do MLST jamais teria sido tão fácil e divertido como foi com a ajuda de vocês.

Soraia Machado, muito obrigado pela ajuda na extração e no Real Time. Foi muito trabalho, mas nem por isso deixou de ser leve e divertido. Foram tardes e tardes divertidas e leves.

Jailton Azevedo, obrigado por ter me instruído logo em meu ingresso na equipe, pois para todo começo sempre se faz necessário o primeiro passo, e este foi muito bem dado. Obrigado!

Luis Morais, uma pessoa maravilhosa que tive o prazer de conhecer, pela ajuda em alguns experimentos.

A alguns outros amigos que não contribuíram diretamente na composição deste trabalho, mas que ficaram na torcida sincera: Selton Diniz, Mariangela Solano, Rafael Avelar, Vanessa Meneses, Milena Lima, e outros que porventura posso ter - me esquecido de mencionar aqui, mas que fazem parte da minha vida e tornam-na mais leve e bela. Muito obrigado!

À **Plataforma de Sequenciamento da FIOCRUZ - Silvana Paz**, pela paciência e ajuda com as minhas amostras urgentes e difíceis.

A **CAPES**, pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

“Onde há muita luz, as sombras são mais profundas”

Goethe

“De que vale o eterno criar, se a criação em nada adiantar?”

Goethe (extraído de “Fausto”)

RIOS, Diêgo Rodrigo Santos Ramos. **Detecção e Caracterização molecular de *Streptococcus pneumoniae* diretamente de fluidos corpóreos.** 70 f. Dissertação (Mestre em Farmácia) Universidade Federal da Bahia (UFBA), 2014.

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é um dos principais agentes causadores de doenças invasivas graves como: pneumonia, meningite e septicemia. Estima-se o óbito em cerca de 2,0 milhões de crianças em países em desenvolvimento. O padrão ouro para diagnóstico é a cultura, mas a sua sensibilidade é baixa e por isso o aprimoramento no diagnóstico dos casos continua um desafio. O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de técnicas moleculares diretamente em líquido visando detectar e caracterizar genotipicamente *Streptococcus pneumoniae* em casos de meningite. Um estudo prospectivo de corte transversal foi realizado no Hospital Couto Maia, no período entre abril de 2006 a dezembro de 2010. As amostras de líquido foram selecionadas de acordo com critérios de inclusão como celularidade superior a 100 células/mm³ e/ou Glicorraquia inferior a 40 mg/dl e/ou Proteinorraquia superior a 65 mg/dl, e foram submetidas a análises de rotina do hospital, e posteriormente testadas por técnica de PCR em tempo real para detecção de *S. pneumoniae*, usando como alvo o gene *lytA* e a reação de PCR-Multiplex para a dedução do sorotipo capsular. A caracterização genotípica foi realizada através da técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Foram analisadas 1141 amostras de líquido provenientes de pacientes com suspeita clínica de meningite bacteriana. Destas, 92 amostras foram positivas para *S. pneumoniae* por PCR em tempo real. Das quais, 68 amostras (73,9%) foram cultura positiva e 24 (26,1%) cultura negativa. Os sorotipos de 21 dos 24 casos cultura negativa foram deduzidos. Cerca de 46% dos sorotipos encontrados nos casos cultura negativa, foram não vacinais. Dentre os sorotipos vacinais mais frequentes estavam o **6A/B/C** com 6 casos (25%), **14** com 3 casos (12,5%), **23F** com 2 (8,3%), **18A/B/C** com 1 caso (4,2%) e **4** com 1 caso (4,2%). Do total de 24 casos cultura negativa, três casos (12,5%) não apresentaram positividade para qualquer dos 40 sorotipos testados, embora tenham apresentado positividade para o gene *cpsA*, permanecendo então como não determinados. Seis amostras (25%) tiveram genótipo caracterizado por MLST, sendo definidos os STs 750, 6403 e 2814. Este estudo conclui que as técnicas moleculares de PCR em tempo real e Multiplex PCR podem ser bastante úteis quando aplicadas diretamente em espécimes clínicos, possibilitando uma melhor detecção e diagnóstico dos casos, mesmo quando todas as outras técnicas diagnósticas convencionais não são capazes de fazê-lo, além de proporcionar um ganho de informações epidemiológicas que não seriam possíveis de serem obtidos por métodos convencionais, devido à ausência de positividade das culturas bacteriológicas.

Palavras chaves: *Streptococcus pneumoniae*, diagnóstico molecular, sorotipos, MLST, vacinas.

RIOS, Diêgo Rodrigo Santos Ramos. **Detection and molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* directly de fluidos tangibile**. 70 f. Dissertation (Master of Pharmacy) Federal University of Bahia (UFBA), 2014.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a major cause of severe invasive diseases such as pneumonia, meningitis and bacteremia. It is estimated death in about 2.0 million children in developing countries. The gold standard for diagnosis of this agent is the culture, but its sensitivity is low and therefore the accurate diagnosis of cases of pneumococcal meningitis remains a challenge. The aim of this study was to evaluate the use of molecular techniques to detect directly in CSF samples, and genotype *Streptococcus pneumoniae* in meningitis cases. A prospective cross-sectional study was conducted at Hospital Couto Maia, in the period from April 2006 to December 2010. The CSF samples were selected according to inclusion criteria as cellularity above 100 cells/mm³ and / or CSF glucose less than 40 mg/dl and / or protein levels over than 65 mg / dl, and were submitted to routine hospital and subsequently tested by PCR in real time for the detection of *S. pneumoniae*, using targeting the *lytA* gene and PCR-Multiplex for the deduction of capsular serotype. The genotypic characterization was performed by Multilocus Sequence Typing technique (MLST). One amount of 1141 CSF samples were collected from patients with suspected bacterial meningitis and submitted for analysis. Of these, 92 samples were positive for *S. pneumoniae* by real-time PCR. Of which, 68 samples (73.9%) were culture positive and 24 (26.1%) culture negative. The serotypes of 21 of the 24 culture-negative cases were found. About 46% of the serotypes found in culture-negative cases were non – vaccine types. Among the most common vaccine serotypes were the **6A/B/C** with 6 cases (25%), **14** with 3 cases (12.5%), **23F** with 2 (8.3%), **18A/B/C** with one case (4.2%) and **4** with 1 case (4.2%). Of the total of 24 culture-negative cases, three cases (12.5%) showed positivity for any of the 40 serotypes tested, although they presented positive result for the gene *CPSA* amplification and remain as not determined. Six samples (25%) had the genotype characterized by MLST, the STs being set 750, 6403 and 2814. This study concludes that the molecular techniques of real-time PCR and multiplex PCR can be useful when applied directly on clinical specimens, enabling better detection and diagnosis of cases, even when all other conventional diagnostic techniques are not able to do it, and provide a gain of epidemiological information that would not be possible to obtain by conventional methods, due to the absence of positive bacterial cultures.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, molecular diagnostics, serotypes, MLST, vaccines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Principais fatores de virulência de *S. pneumoniae*: A autolisina LytA, as proteínas de superfície A e C (PspA e PspC), as proteínas ligadoras de metal, em especial o antígeno de superfície A (PsaA). 23**
- Figura 2: Distribuição dos sorotipos capsulares pneumocócicos por reação de dedução capsular por Multiplex PCR. 37**
- Figura 3: Distribuição dos sorotipos capsulares dos casos de meningite pneumocócica identificados no Hospital Couto Maia, no período de Abril de 2006 a Dezembro de 2010. 43**
- Figura 4: Distribuição dos tipos capsulares de pneumococos em casos de meningite cultura negativa identificados no Hospital Couto Maia, no período de Abril de 2006 a Dezembro de 2010. 43**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Características clínicas e epidemiológicas dos casos de meningite pneumocócica identificados no Hospital Couto Maia, por Real Time PCR.... 41**
- Tabela 2: Resultados dos métodos de diagnóstico utilizados para identificar os casos de meningite pneumocócica em Salvador, Bahia (N=59). 42**
- Tabela 3: Características gerais dos casos de meningite pneumocócica dentre os quais todos os testes convencionais de diagnóstico laboratorial foram negativos (N=7/59)..... 44**
- Tabela 4: Perfil genotípico de *Streptococcus pneumoniae* caracterizados diretamente de amostras de LCR cultura negativa, provenientes de casos de meningite pneumocócica. 45**

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

- DNA: do inglês “desoxiribonucleic acid” – (Ácido desoxirribonucleico)
- MLST: do inglês “multi locus sequencetyping”
- HIV: do inglês “human immuno deficiency virus” – (Vírus da imunodeficiência humana)
- PCR: do inglês “polymerase chain reaction” - (Reação em cadeia da polimerase)
- PCV: do inglês “pneumococcal conjugated vaccine” - (Vacina conjugada pneumocócica)
- LCR: líquido cefaloraquidiano
- PFGE: do inglês “pulsedfield gel electrophoresis” – (Eletroforese em gel com campo pulsado)
- ST: do inglês “sequencetype”
- CC: do inglês “clonal complex”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	MENINGITE	17
2.2	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS MENINGITES BACTERIANAS	18
2.3	<i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	21
2.4	EPIDEMIOLOGIA DA MENINGITE PNEUMOCÓCICA	23
2.5	PREVENÇÃO.....	24
2.6	DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>S. PNEUMONIAE</i> E DIRETAMENTE DE FLUÍDOS BIOLÓGICOS	28
3	JUSTIFICATIVA	31
4	OBJETIVOS.....	32
4.1	OBJETIVO GERAL	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
5	MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1.	DESENHO DO ESTUDO	33
5.2	LOCAL DO ESTUDO.....	33
5.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	33
5.4	COLETA DE DADOS.....	34
5.5	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	34
5.5.1	Extração de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) das amostras de LCR.....	34
5.5.2	Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	35
5.6	DEDUÇÃO DO SOROTIPO CAPSULAR POR MULTIPLEX PCR	36
5.7	MULTI – LOCUS SEQUENCE TYPING (MLST).....	37
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5.9	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	39
6	RESULTADOS	40
7	DISCUSSÃO.....	46
8	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	APÊNDICES:	57

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria que normalmente coloniza o trato respiratório superior, sendo um dos principais responsáveis pelos casos de pneumonia adquirida na comunidade, meningite e sepse (PELTOLA, 2010). As faixas etárias mais acometidas por doenças pneumocócicas invasivas são as crianças menores de cinco anos e adultos maiores de 65 anos (LYNCH; ZHANEL, 2009). Estima-se o óbito de cerca de 1,6 milhões de crianças menores de cinco anos por doença pneumocócica todos os anos no mundo, sendo a maior concentração destes casos nos países em desenvolvimento (WHO, 2007).

Por definição, doença pneumocócica invasiva é a infecção onde a bactéria é encontrada em fluidos corpóreos normalmente estéreis como: sangue, líquido, líquido pleural, líquido ascítico e sinovial (PLETZ *et al.*, 2008). Dentre as formas invasivas da doença pneumocócica, a meningite é considerada uma importante causa de morbi – mortalidade no mundo, em especial em países em desenvolvimento, onde as vacinas contra *Haemophilus influenzae* tipo b e contra a doença meningocócica não foram implantadas no calendário nacional de imunização (THIGPEN *et al.*, 2011).

O diagnóstico laboratorial de meningite é realizado através da análise bioquímica, citológica e microbiológica do líquido cefalorraquidiano (LCR). A cultura é considerada o padrão ouro para a identificação do agente etiológico (FITCH; BEEK, VAN DE D., 2007), entretanto este método apresenta uma baixa sensibilidade, o que pode contribuir para subestimar a incidência da meningite pneumocócica (AZZARI *et al.*, 2008). Uma cultura negativa compromete não apenas a detecção do agente, mas os dados relativos aos sorotipos capsulares, que por sua vez são importantes para adoção de medidas preventivas baseadas em vacinas. A utilização de técnicas moleculares para a obtenção dessas informações está sendo cada vez mais aplicada (SAHA *et al.*, 2008).

A sorotipagem de pneumococos tem como padrão ouro a aglutinação com anti – soros capsulares específicos, conhecida por reação de Quellung. No entanto, os reagentes para a reação de Quellung apresentam alto custo e exigem o isolado clínico viável para sua execução. O que vem a ser uma limitação do método, especialmente quando o paciente faz uso de antimicrobianos antes da assistência médica, o que pode inviabilizar a positividade da cultura (RESTI *et al.*, 2009). Técnicas moleculares baseadas na reação de polimerase em cadeia (PCR) que permitam detectar e deduzir o sorotipo capsular dos pneumococos, independente da positividade das culturas, contribuem para a aquisição de dados importantes

para a compreensão da epidemiologia da doença e para subsidiar estudos de composição vacinal (SAHA *et al.*, 2008).

Conhecer o perfil genotípico dos pneumococose a sua disseminação, também é importante do ponto de vista epidemiológico local e global, e para isso, ao longo dos anos, diversas técnicas com alto poder discriminatório foram utilizadas, mas por serem técnicas com baixa reprodutibilidade intra e inter – laboratorial, a comparação entre os resultados de diferentes laboratórios no mundo tornava-se difícil (MAIDEN *et al.*, 1998). Neste contexto desenvolveu-se a técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST), tendo como princípio o sequenciamento de genes conservados e o depósito destas sequencias (ST's) na rede mundial de computadores. A técnica de MLST foi inicialmente validada para *Neisseriameningitidis* (MAIDEN *et al.*, 1998), e posteriormente adaptada para *Streptococcus pneumoniae* (ENRIGHT & SPRATT, 1998) e outros agentes bacterianos. A metodologia para MLST também se encontra adaptada para aplicação direta em fluídos corpóreos (ENRIGHT *et al.*, 2000), abrindo precedentes para a sua aplicação nos casos em que a obtenção do lado bacteriano é inviável (XU *et al.*, 2011).

No Brasil, entre os anos de 2007 e 2010, foram notificados 4.317 casos de meningite pneumocócica, sendo que apenas 68,6% destes casos foram cultura positiva. Os demais casos foram diagnosticados por reação de aglutinação em látex (23%) (BRASIL, 2010). Além do diagnóstico inconclusivo, os dados relativos aos sorotipos, importantes à epidemiologia local e também num contexto global, são prejudicados, sendo recomendado o uso de uma abordagem através de técnicas moleculares baseadas na reação da polimerase em cadeia (PCR) (AZZARI *et al.*, 2008, 2010) e/ou sequenciamento (MLST) (XU *et al.*, 2011).

Neste estudo foram aplicadas três técnicas moleculares diretamente no líquido: PCR em tempo real, multiplex PCR e *MLST*, de forma a detectar o agente *Streptococcus pneumoniae*, deduzir o sorotipo capsular deste agente e por fim, obter a caracterização do genótipo. Este conjunto de informações é de considerável importância, haja vista que o Ministério da Saúde introduziu em 2010 a vacina pneumocócica de cavalete no calendário do Programa Nacional de Imunizações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MENINGITE

A meningite é um processo inflamatório das leptomeninges dentro do espaço subaracnoide. Em geral é causada por uma infecção, porém pode ocorrer em resposta a um irritante não bacteriano introduzido no espaço aracnoide. A meningite infecciosa é classificada em piogênica aguda (meningite bacteriana), asséptica (meningite aguda viral) e crônica (tuberculosa, sífilítica, criptocócica) (BRASIL, 2010). A suspeita clínica de meningite geralmente ocorre quando o paciente apresenta alguns sinais clínicos como o de Kernig (resistência e dor quando o joelho é estendido com o quadril totalmente flexionado), Brudzinski (o levantamento involuntário das pernas em irritação meninge a quando levantada a cabeça do paciente) e rigidez de nuca (MAGAZZINI *et al.*, 2012). Estes sinais e sintomas variam conforme a idade dos indivíduos, e se manifestam nas primeiras 24 a 48 horas, sendo frequentemente associados a: febre (75 – 95% dos casos), dor de cabeça (80 – 95%), vômito (90% em crianças, 10% em adultos), rigidez de nuca (50 – 90%) e confusão mental (75 – 85%). Em recém – nascidos, outros sinais e sintomas patognomônicos, como abaulamento da fontanela, irritabilidade e diminuição do nível de consciência são observados (SCARBOROUGH; THWAITES, 2008). A presença da tríade de sinais e sintomas (rigidez de nuca, sinal de Kernig e sinal de Brudzinski) é específica, mas não sensível, significando que a sua ausência não exclui a possibilidade da presença de um quadro de meningite (MAGAZZINI *et al.*, 2012).

Dentre as meningites de etiologia bacteriana, o *Streptococcus pneumoniae*, e a *Neisseriameningitidis* são os seus principais agentes. Outras bactérias também podem estar implicadas como: o *Haemophilus influenzae*, o *S. agalactiae* (associado à meningite em neonatos), a *Listeriamonocytogenes* (neonatos, idosos e indivíduos imuno comprometidos), a *Salmonella sp.* não typhi (pacientes imuno comprometidos por HIV), dentre outras (SCARBOROUGH; THWAITES, 2008).

2.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS MENINGITES BACTERIANAS

Após a confirmação da suspeita de meningite através dos sinais e sintomas clínicos, é realizada a punção lombar e análises bioquímicas, citológicas e microbiológicas do LCR. Nos casos em que a punção lombar não pode ser realizada, alternativas podem ser utilizadas para o diagnóstico como a utilização de marcadores inflamatórios séricos, hemocultura, biópsia de lesões epiteliais e detecção de antígenos na urina (BROUWER *et al.*, 2010).Dentre as técnicas mais utilizadas, as microbiológicas, em especial a cultura bacteriológica é considerada padrão ouro para a identificação do patógeno, possibilitando informações importantes para a terapêutica do paciente e também para estudos epidemiológicos da doença em sistemas de vigilância epidemiológica (FITCH; BEEK, VAN DE D., 2007).

O diagnóstico laboratorial convencional da meningite, através do exame do LCR compreende algumas etapas e segue critérios e técnicas bem estabelecidos, cujos resultados devem ser avaliados e reunidos para a definição do diagnóstico, que são:

- a) **Aspecto:** O LCR normal é límpido, classicamente chamado de “água de rocha”. Pode também apresentar-se xantocrômico ou turvo. Este último normalmente associado ao quadro de meningite bacteriana já estabelecida e decorrente do grande número de leucócitos.
- b) **Citologia:** O LCR normal costuma apresentar uma celularidade inferior a 5 células/mm³ em adultos e inferior a 20 células/mm³ em recém-nascidos. A presença de um número de células superior a 100 células/mm³ sugere um quadro de meningite bacteriana. Uma meningite purulenta é definida com uma celularidade igual ou superior a 500 células/mm³. O predomínio de leucócitos polimorfo nucleares é típico de meningite bacteriana (CARBONNELLE, 2009).
- c) **Bioquímica:**
 1. **Glicorraquia:** O valor normal oscila em cerca de 2/3 da glicemia do indivíduo. Em meningite bacteriana, os valores tendem a baixar, mas este não é um parâmetro específico (CARBONNELLE, 2009).
 2. **Proteinorraquia:** Num LCR normal de um paciente adulto varia entre 0,15 – 0,45g/L, enquanto num recém-nascido atinge até 1,5g/L. Independentemente da etiologia, o valor encontra-se elevado em casos de meningite (CARBONNELLE, 2009).
 3. **Outros marcadores:**Alguns marcadores para o diagnóstico diferencial das meningites têm sido estudados. Viallon e colaboradores concluíram que os

níveis de lactato (sensibilidade 94% e especificidade 92%) e procalcitonina sérica (sensibilidade 95% e especificidade 100%) são bastante discriminatórios para o diagnóstico diferencial entre meningites bacterianas e meningites virais (VIALLO *et al.*, 2011).

d) Microbiologia:

- 1. Exame microscópico direto:** O exame direto do sedimento corado pelo método de coloração de Gram tem sensibilidade que varia de 50 a 90% e permanece positiva em cerca de 15% dos casos onde a cultura foi negativa, sendo extremamente útil para um direcionamento terapêutico inicial (SCARBOROUGH; THWAITES, 2008).
- 2. Cultura:** É o padrão ouro para o diagnóstico da meningite bacteriana, possibilita o isolamento, a identificação de microrganismos, bem como testes de susceptibilidade aos antimicrobianos. No entanto, possui baixa sensibilidade, exige infra estrutura para processamento e pessoal especializado para o manuseio e identificação dos isolados (CORLESS *et al.*, 2001).

e) Sorológicos:

- 1.** Os testes mais comuns baseiam-se na resposta antígeno – anticorpo específico. As reações de aglutinação, onde os anticorpos estão fixados em partículas de látex, apresentam sensibilidades variando entre 50 – 100% (GRAY; FEDORKO, 1992). Apresentam melhores performances quando em casos onde a celularidade líquórica é elevada (CARBONNELLE, 2009), mas apresenta resultados controversos nos casos onde foi empregada antibioticoterapia prévia (SCARBOROUGH; THWAITES, 2008).
- 2.** Testes imunocromato gráficos, são principalmente aplicados na detecção de antígeno urinário e apresentam valores de sensibilidade que variam entre 70 – 80% e especificidade superior a 90% (WERNO; MURDOCH, 2008), mas que tem como principal desvantagem a não distinção entre um paciente infectado e um indivíduo colonizado, o que pode ocasionar um falso diagnóstico (ADEGBOLA *et al.*, 2001; DOWELL *et al.*, 2001).

Uma abordagem molecular, nos casos onde a cultura foi negativa, faz-se necessária para determinar o agente etiológico. As técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando múltiplos primers (Multiplex), e a reação da PCR em tempo real, possuem maior sensibilidade e especificidade na detecção do patógeno, podendo ser utilizadas diretamente em espécimes clínicos, possibilitando a detecção dos casos, mesmo na ausência do patógeno viável em cultura (AZZARI *et al.*, 2010; SAHA *et al.*, 2008). A técnica de PCR em tempo real tem a vantagem de ser relativamente rápida, uma vez que dispensa a etapa de eletroforese em gel de agarose, e ao utilizar-se de primers específicos para cada agente etiológico que se deseja pesquisar, apresenta altas sensibilidade e especificidade. No que diz respeito à detecção dos principais agentes etiológicos da meningite bacteriana, a técnica de PCR em tempo real tem sido extensamente utilizada e com bons resultados (SACCHI *et al.*, 2011). Quando aplicada à detecção de pneumococos, a identificação é normalmente baseada na detecção do gene específico *lytA*, que codifica uma autolisina que é específica e naturalmente expressa em todos os isolados de pneumococos (KADIOGLU *et al.*, 2008).

Resti e colaboradores apresentaram um estudo onde, mesmo com antibiótico terapia prévia (igual ou superior a quatro dias) à admissão hospitalar, a técnica de PCR em tempo real apresentou 100% de especificidade e sensibilidade 2,6 vezes maior que a técnica de cultura, identificando o agente *Streptococcus pneumoniae* em diferentes formas de doença tais como: pneumonia, meningite e artrite (RESTI *et al.*, 2009). Azzari e colaboradores afirmam que a técnica de PCR em tempo real é mais sensível que a técnica de Multiplex PCR convencional, tanto diagnóstico quanto para a sorotipagem em casos de doença pneumocócica invasiva (AZZARI *et al.*, 2010).

Outra variação metodológica, a técnica de Multiplex PCR, tem sido utilizada para a detecção de patógenos com sucesso. Xu e colaboradores utilizaram a técnica de Multiplex PCR para a identificação de *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* diretamente em amostras de fluido de ouvido médio provenientes de pacientes diagnosticados com otite média aguda. Nesta metodologia, foram utilizados como gene alvo os genes codificantes da porção 16S dos patógenos investigados, gerando produtos de diferentes tamanhos. A técnica foi validada contra resultados obtidos através do uso da técnica em culturas puras dos patógenos. Os casos onde a cultura foi positiva tiveram a identificação 100% concordante entre cultura e Multiplex PCR (XU *et al.*, 2011).

As técnicas moleculares têm sido empregadas não apenas com finalidade diagnóstica, mas também epidemiológica (sorotipagem) aplicada a pneumococos, especialmente em casos onde a cultura é negativa, pois estas técnicas permitem a obtenção de informações que não seriam obtidas nestes casos através das técnicas convencionais. Em seu estudo, Saha e colaboradores propuseram o uso da técnica de Multiplex PCR convencional diretamente em espécimes clínicos nos casos onde a cultura foi negativa, como uma alternativa viável, relativamente simples e barata para estudos de vigilância e definição de composição vacinal (SAHA *et al.*, 2008). Azzari e colaboradores, por outro lado, testaram as técnicas de PCR em tempo real e Multiplex PCR convencional, para sorotipagem de casos de doenças pneumocócicas diversas, de forma a avaliar a aplicabilidade das mesmas e verificaram que a técnica de PCR em tempo real era mais sensível, pois foi capaz de deduzir o sorotipo capsular mesmo em amostras onde o Multiplex PCR convencional não foi capaz (AZZARI *et al.*, 2010).

Com a introdução da vacina conjugada pneumocócica de cavalete, se faz necessária a realização de estudos de vigilância para o constante monitoramento dos casos e os sorotipos implicados. No entanto com o uso de antibióticos previamente à admissão hospitalar e a baixa sensibilidade do isolamento em cultura, existe a necessidade de utilização de técnicas mais sensíveis e específicas que o método tradicional de cultura, e que sofram menos a interferência da introdução de antibióticos, de forma a se obter não apenas uma maior rapidez no diagnóstico, mas também avaliar a eficácia da vacina.

2.3 *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

OS. pneumoniae é uma bactéria, pertencente à família *Streptococcaceae*, que se apresenta em arranjos de diplococos Gram – positivos de aspecto lanceolado. São anaeróbios facultativos, não produtores de catalase e suas colônias produzem alfa hemólise quando cultivadas em meio de cultura TSA (*trypticsoyagar*) suplementado com 5% de sangue de carneiro. Sua identificação laboratorial é feita através do teste de susceptibilidade à optoquina, e também através do teste de bile solubilidade, pois os pneumococos são solúveis quando expostos a uma solução de desoxicolato de sódio a 2% (MURRAY, 2007). Seu principal reservatório é o homem, colonizando a nasofaringe e a partir deste local se dissemina para o trato respiratório inferior e/ou outros sítios, onde pode vir a causar infecção (LYNCH; ZHANEL, 2009).

As infecções causadas pelo *S. pneumoniae* podem ser não invasivas ou invasivas. Dentre as infecções não invasivas mais comuns estão conjuntivite (em especial os pneumococos não – tipáveis), otite e pneumonias adquiridas em comunidade. Enquanto dentre as manifestações invasivas, as mais frequentes são: meningite e bacteremia (LYNCH; ZHANEL, 2009; SÁ-LEÃO *et al.*, 2006). Sua disseminação comunitária ocorre principalmente por aerossóis provenientes de indivíduos colonizados ou doentes (LYNCH; ZHANEL, 2009).

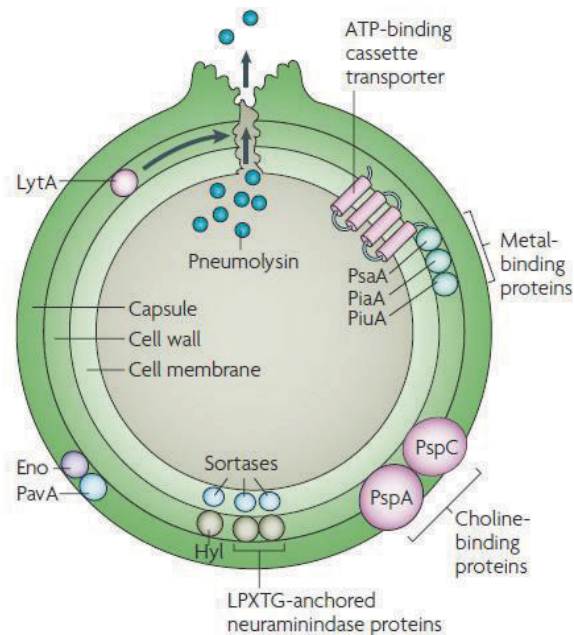
Um dos principais fatores de virulência dos pneumococos é a expressão da sua cápsula polissacarídica, sendo atualmente descritos 93 sorotipos (CALIX; NAHM, 2010). A cápsula atua impedindo ou dificultando a fagocitose pelo sistema imunológico do hospedeiro. Pela importância como fator de virulência e pelo papel desempenhado na proteção da bactéria contra o sistema imunológico, os pneumococos não encapsulados tem sido considerados como não patogênicos (PLETZ *et al.*, 2008). E embora muitos autores afirmem a não patogenicidade dos pneumococos não capsulados (sendo, portanto, não tipáveis), existem relatos na literatura citando-os como contagiosos e relacionando-os a grandes surtos de conjuntivite e ocasionalmente sendo também relacionados a outras patologias próprias de pneumococos como otites, infecções respiratórias, e outras doenças invasivas (SÁ-LEÃO *et al.*, 2006).

Além da cápsula polissacarídica, os pneumococos possuem outros importantes fatores de virulência (Figura1). Os genes que codificam alguns destes fatores tem sido explorados como genes alvo para a sua detecção, tal como o *lytA*, um gene codificante de uma autolisina que atua na parede celular dos pneumococos e que está relacionada ao fenômeno de autólise comum ao crescimento em meios de cultura sólidos e também relacionada à liberação de pneumolisinas. Cepas mutantes *lytA* negativas, tem virulência reduzida em modelos murinos de bacteremia e pneumonia (BERRY *et al.*, 1989). Outro exemplo de gene alvo para a detecção é o gene codificante das pneumolisinas (*ply*), que também tem importante papel na virulência, embora não tenham exibido a mesma especificidade que o *lytA* em ensaios de detecção, sendo positivo também em isolados de *S. pseudopneumoniae* (CARVALHO *et al.*, 2007). Outro fator de virulência importante e utilizado como alvo para ensaios de detecção, é o *psaA*, um antígeno de superfície pneumocócica, cuja deleção na bactéria ocasiona a perda total da sua virulência em modelos murinos de pneumonia, bacteremia e colonização (JOHNSON *et al.*, 2002; MARRA *et al.*, 2002). O *psaA* e o *lytA*, foram os genes alvo mais

promissores nos ensaios de detecção por PCR em tempo real, realizado por Carvalho e colaboradores, mostrando-se os mais específicos para a detecção dos pneumococos.

Alguns fatores de virulência são estudados como potenciais antígenos para composição de vacinas, por favorecerem o estímulo à formação de anticorpos opsonizantes, como é o caso das proteínas de superfície pneumocócicas PspA e PspC. A PspA interfere na fixação do componente C3 do complemento à superfície do pneumococo, mas estudos indicam que a sua virulência depende das propriedades da cápsula polissacarídica expressa pelo isolado. A PspC impede a formação do componente C3b do complemento, e a sua deleção em modelos experimentais ocasiona redução da colonização da nasofaringe (CARVALHO *et al.*, 2007; KADIOGLU *et al.*, 2008).

Figura 1: Principais fatores de virulência de *S. pneumoniae*: A autolisina LytA, as proteínas de superfície A e C (PspA e PspC), as proteínas ligadoras de metal, em especial o antígeno de superfície A (PsaA).



Fonte: (KADIOGLU *et al.*, 2008).

2.4 EPIDEMIOLOGIA DA MENINGITE PNEUMOCÓCICA

As doenças pneumocócicas são um problema de saúde pública disseminada mundialmente. Em 2005 a Organização mundial de Saúde estimou que cerca de 1,6 milhões de indivíduos morrem por doenças pneumocócicas (meningite, sepsis, pneumonia, otite média,

sinusite e bronquite) todos os anos, principalmente crianças com idade inferior a cinco anos, oriundas de países em desenvolvimento (WHO, 2007).

Nos Estados Unidos, no período entre 1998 – 1999, a incidência de casos de meningite pneumocócica foi estimada em 1.09 casos/100.000 habitantes (THIGPEN *et al.*, 2011). No Canadá, entre 1998 – 2001, a incidência de doenças pneumocócicas invasivas em crianças com idade inferior ou igual a dois anos era de 81,6 casos/100.000 habitantes (J.D. KELLNER, D.L. CHURCH, 2005). Segundo Quadros, em um levantamento do número de casos anuais de meningite pneumocócica em diferentes realidades globais, a América Latina apresenta o segundo menor número de casos, com cerca de 3.637 casos/ano, e que à despeito do uso de antibióticos, os índices de letalidade são altos, atingindo o nível de 60%. Na Ásia, o número de casos pode atingir a marca dos 25.865 ao ano, por conta da população estimada da Ásia que chega a ser sete vezes maior que a população da América Latina (QUADROS, DE, 2009).

No Brasil, entre os anos de 2007 – 2010 foram notificados 94.879 casos de meningite, sendo 4.317 casos (4,55%) de meningite pneumocócica. No que se refere à localização dos casos de meningite pneumocócica, São Paulo e Rio de Janeiro ocupam o primeiro e segundo lugar respectivamente, enquanto a Bahia está em 6º lugar, com 6,0% dos casos (BRASIL, 2010). Menezes e colaboradores relatam um declínio de 26% na incidência de meningite pneumocócica no período de 2000 a 2008 na cidade de Salvador sendo que esta redução ocorreu em todas as faixas etárias. Entretanto a letalidade da meningite pneumocócica continuou elevada, sendo de 42% no mesmo período (MENEZES *et al.*, 2011). Desta forma, é fundamental um rápido diagnóstico dos casos e adoção de medidas terapêuticas adequadas para minimizar a possibilidade de sequelas neurológicas e desfechos graves, como o óbito, nos casos de meningite pneumocócica.

2.5 PREVENÇÃO

Embora a busca por estratégias preventivas baseadas em vacinas para as doenças pneumocócicas tenha começado com a vacina polissacarídica, foi necessário o desenvolvimento de uma vacina mais eficaz devido à baixa imunogenicidade dos polissacarídeos em crianças com idade inferior a dois anos. Atualmente dois tipos de vacina são utilizados, com diferentes tecnologias e públicos alvos: A vacina polissacarídica 23 –

valente e as vacinas pneumocócicas conjugadas (10-valente e 13-valente)(LYNCH; ZHANEL, 2009; PLETZ *et al.*, 2008).

A primeira vacina, licenciada em 1983, foi a polissacarídica 23 – valente. Uma vacina composta dos polissacarídeos: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F. Nos países desenvolvidos, a sua composição abrange entre 85 – 90% dos sorotipos causadores de doenças invasivas e atualmente são comercializadas duas marcas, a Pneumovax[®] 23 (Merck & CO., INC., NJ, USA) e a Pneumo[®] 23 (Sanofi Pasteur AS, Lyon, França) (PITSIOU; KIOUMIS, 2011).

Apesar da ampla cobertura, a vacina polissacarídica 23 – valente não gera memória imunológica eficiente, pois ativa as células B, mas não as células T independentes. Por isso não é indicada para uso em crianças com idade inferior a dois anos (PITSIOU; KIOUMIS, 2011; PLETZ *et al.*, 2008). Além disso, a vacinação em adultos requer reforço da dose a cada 5 ou 6 anos e indivíduos “não responsivos” à imunização são particularmente frequentes dentro da população idosa (PLETZ *et al.*, 2008). O seu uso ficou restrito a determinados grupos de indivíduos, como: indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos, imunocompetentes portadores de doenças crônicas, crianças com idade igual ou superior a dois anos, asplênicos (CDC, 1997), indivíduos que vivem em ambientes onde o risco de aquisição de doença pneumocócica invasiva é maior (populações indígenas ou nativos do Alaska, por exemplo), ou que são imuno comprometidos (LYNCH; ZHANEL, 2009).

As vacinas pneumocócicas conjugadas a proteínas foram desenvolvidas no sentido de obter uma melhor imunogenicidade e resposta imunológica, especialmente para indivíduos com idade inferior a dois anos. Estas vacinas possuem os antígenos capsulares conjugados a proteínas carreadoras (Ex. Toxóide diftérico CRM197). Esta modificação permite que o sistema imunológico imaturo desenvolva uma melhor resposta de memória, por parte das células T dependentes. Atualmente existem duas formulações destas vacinas no mercado: Synflorix[®] (PCV10) e Prevnar 13[®] (PCV13) (FITZWATER *et al.*, 2012).

A vacina heptavalente foi licenciada em 2000, nos EUA, e posteriormente no Canadá e Austrália. Formulada com antígenos capsulares dos sorotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) até então os mais frequentes em casos de doença invasiva identificados naqueles países (superior a 80% dos casos) (ALBRICH *et al.*, 2007; PELTON, 2008). Nos EUA, após a implementação da PCV7, houve um declínio de 92% na incidência de doença pneumocócica invasiva por sorotipos vacinais. A incidência reduziu de 0,61 casos/100.000 habitantes em 1998 – 1999 para 0,05 casos/100.000 habitantes em 2000 – 2007, ao passo em que a

incidência da doença pneumocócica por soro tipos não vacinais (não – PCV7) aumentou em 61%, passando de 0,48 casos/100.000 habitantes para 0,77 casos/100.000 habitantes no mesmo período (THIGPEN *et al.*, 2011).

O Reino Unido introduziu a PCV7 em 2006 e experimentou uma redução significativa no número de casos de doenças pneumocócicas invasivas cuja incidência entre os anos de 2000 a 2006 era de 16,1 casos / 100.000 habitantes e sofreu um decréscimo de 34%, com 10,6 casos / 100.000 habitantes entre 2009 a 2010 (MILLER *et al.*, 2011), tanto em crianças com idade inferior a cinco anos, quanto em idosos com idade superior a 65 anos (no primeiro grupo, a redução foi maior). No entanto, houve o surgimento de novos casos relacionados a sorotipos não vacinais (fenômeno de *replacement*), principalmente no grupo de indivíduos maiores de 65 anos de idade (CHOI *et al.*, 2011).

Na França, a PCV7 foi introduzida no ano de 2002, reduzindo a incidência em crianças < 18anos de 1,65 casos/100.000 crianças em 2001, para 0,80 casos/100.000 crianças em 2005. Em crianças com idade inferior a dois anos, a incidência caiu de 8,9 casos para 1,8casos/100.000 crianças, mostrando um total de 82% de redução na incidência. Entretanto, um estudo de coorte realizado no período de 2005 a 2008, houve um aumento na incidência de meningite pneumocócica de 0,8 casos para 1,8 casos/100.000 crianças para o grupo com idade < 18anos, e de 1,8 casos para 11,9 casos/100.000 crianças, no grupo de indivíduos com idade inferior a dois anos. Este aumento registrado no período de 2005 a 2008 foi devido a ocorrência da doença por sorotipos não vacinais (ALEXANDRE *et al.*, 2010; DUBOS *et al.*, 2007).

No Brasil, a PCV7 foi introduzida em 2000 apenas na rede de saúde privada. Em 2003, tornou-se disponível gratuitamente apenas para grupos especiais, nos centros de referência para imunobiológicos especiais (CRIE). A vacina heptavalente tem sido aos poucos substituída pela PCV13, em virtude da sua menor abrangência em sorotipos capsulares, em diversos países que inicialmente haviam-na adotado, conforme tem sido relatado em literatura (FITZWATER *et al.*, 2012).

Uma vacina de polissacaríde-proteína conjugada contendo 10 polissacarídeos específicos por sorotipos de pneumococo (Synflorix, GSK) foi aprovada para uso em crianças brasileiras pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em junho de 2009e assim, no primeiro semestre de 2010, o Programa Nacional de Imunizações (PNI) introduziu a vacina pneumocócica decavalente no calendário básico de vacinação infantil. Além dos sorotipos presentes na PCV7, foram adicionados os sorotipos 1, 5 e 7F. Considerando os

casos de meningite pneumocócica identificados no sistema de vigilância em Salvador, estima-se uma redução de 77,4% dos casos de meningite pneumocócica em crianças com idade inferior a dois anos após a introdução da PCV10 (MENEZES *et al.*, 2011).

Além do favorecimento à resposta imunológica em crianças, as vacinas pneumocócicas conjugadas (PCV-10 e -13) induzem resposta imune humoral e com isso a produção de anticorpos da classe IgA, presentes em mucosas. Com a ativação desta resposta, portadores assintomáticos deixam de ser colonizados por sorotipos inclusos na vacina, erradicando-os, e por sua vez favorecendo também a imunidade de rebanho, que é a proteção para os indivíduos não vacinados, mas que em contato direto com indivíduos vacinados deixam de se comportar como reservatórios da bactéria (FITZWATER *et al.*, 2012; PITSIOU; KIOUMIS, 2011; PLETZ *et al.*, 2008).

Com a adoção das vacinas conjugadas e a erradicação dos sorotipos vacinais através também da eliminação dos portadores assintomáticos, um importante fenômeno tem sido descrito, que é o fenômeno de reposição ou substituição sorotípica (PLETZ *et al.*, 2008). Com isso, países que inicialmente adotaram a PCV7, estão agora adotando a PCV13, de forma a cobrir, além dos sorotipos presentes na PCV7 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) também os sorotipos 1, 5, 7F, 3, 6A e 19A.

Um sorotipo tem se destacado após a implementação da vacina heptavalente, o sorotipo 19A. Este sorotipo está relacionado a altos índices de resistência a antibióticos, e tem sido um dos principais sorotipos emergentes na era pós-vacinal (TECHASAENSIRI *et al.*, 2010). À despeito de pertencer ao mesmo sorogrupo do sorotipo 19F (presente na PCV7), os anticorpos induzidos pela vacina não exibem reação cruzada protetora sobre o sorotipo 19A. Estudos indicam que estes novos casos atribuídos ao sorotipo 19A, estejam relacionados a novos clones deste sorotipo (PLETZ *et al.*, 2008). Nos EUA, a incidência de casos relacionados ao sorotipo 19A aumentou de 0,8 – 2,5 casos/100.000 habitantes entre os anos de 1998 a 2005, enquanto a incidência geral de doença pneumocócica invasiva sofria um decréscimo. Ao mesmo tempo, a incidência dos casos não susceptíveis à penicilina atribuídos ao sorotipo 19A, aumentou de 6,7% para 35% (MOORE *et al.*, 2008).

Ainda nos EUA, dos 151 isolados de pneumococos não susceptíveis à penicilina do sorotipo 19A, 73% pertenciam ao complexo clonal emergente 320 (CC320), que está relacionado ao clone Taiwan^{19F} – 14, um clone multiresistente aos antimicrobianos. Os demais isolados pertenciam ao CC199. Até o ano de 1999, apenas o CC199 estava

relacionado ao sorotipo 19A, o que sugere uma expansão clonal e variabilidade genéticas que tornaram o sorotipo 19A bem-sucedido na era pós-vacinal (MOORE *et al.*, 2008).

2.6 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE S. PNEUMONIA E DIRETAMENTE DE FLUÍDOS BIOLÓGICOS

O isolamento em cultura é o padrão ouro para o diagnóstico de meningite bacteriana, entretanto apenas 68,6% dos casos de meningite bacteriana identificados no período entre 2007 e 2010 apresentaram cultura positiva, sendo que um considerável número de casos foi fechado como sendo de etiologia não especificada (BRASIL, 2010a). Estes dados reforçam a hipótese de que a incidência da doença pneumocócica invasiva, em especial a meningite, é subestimada não apenas no nosso país, mas globalmente (AZZARI *et al.*, 2008). Uma vez que nos casos onde a cultura foi negativa, a etiologia nem sempre pode ser esclarecida por outras técnicas que tenham adequada sensibilidade e especificidade, caso não haja disponibilidade para uma abordagem molecular (XU *et al.*, 2011).

Alguns fatores contribuem para o aumento do número de casos de meningite cultura negativa e conseqüentemente os casos de etiologia não especificada, tais como: antibioticoterapia empírica no tratamento; Uso indiscriminado de antibióticos (aquisição sem prescrição médica, ou prescrições inadequadas) (RESTI *et al.*, 2009); Pouco volume do espécime clínico para ser semeado em meio de cultura; Inóculo bacteriano insuficiente para crescimento em meio de cultura (estágio muito precoce da doença ou coleta e/ou acondicionamento inadequado da amostra). Na ausência dos dados fornecidos pela cultura, outros critérios devem ser utilizados para a escolha da medida terapêutica mais apropriada para o paciente, mas sem uma técnica sensível e específica o suficiente, fica difícil a definição da etiologia, e com isso, dados epidemiológicos importantes são perdidos (AZZARI *et al.*, 2008; SAHA *et al.*, 2008).

O método de PCR em tempo real tem uma elevada sensibilidade, podendo detectar até um mínimo de 10 cópias do genoma bacteriano em 200uL de LCR. A detecção pode ser feita utilizando qualquer gene alvo já conhecido ou que seja específico para a espécie que se deseja identificar, o que dá uma grande versatilidade à técnica. Carvalho e colaboradores realizaram ensaios com diferentes genes alvo (*ply*, *lytA* e *psa*), de forma a incrementar a aumentar a

sensibilidade e especificidade da técnica, usando novos conjuntos de primers específicos e sondas, mas preconiza ainda o uso daqueles que já estão bem estabelecidos (CARVALHO *et al.*, 2007).

A técnica de PCR em tempo real é um ensaio que não requer a bactéria viável, podendo ser utilizada no diagnóstico até mesmo em pacientes que foram admitidos na unidade de saúde e/ou foram previamente medicados com antimicrobianos, e ainda assim obter um resultado positivo. Azzari e cols. mostram que a detecção por crescimento em meio de cultura foi positiva somente em pacientes que receberam tratamento com antibióticos por no máximo dois dias, enquanto a técnica de PCR em tempo real foi capaz de detectar estes casos mesmo após 4 dias de antibioticoterapia (AZZARI *et al.*, 2008).

A técnica padrão ouro para a sorotipagem de *Streptococcus pneumoniae* é a reação de *Quellung*, que se caracteriza pelo intumescimento capsular do pneumococo quando exposto a antissoros capsulares específicos. Mas é uma técnica laboriosa, exige o isolado clínico para a sua realização, além de pessoal especializado para a execução e análise do teste (AZZARI *et al.*, 2010).

Uma alternativa ao uso da reação de *Quellung* foi criada, utilizando-se a técnica de PCR multiplex em um esquema diferenciado, para a sorotipagem capsular de *Streptococcus pneumoniae*, sendo muito mais simples e rápida e também com uma boa relação custo – benefício. Este esquema foi baseado em dados do CDC sobre a distribuição sorotípica dos pneumococos nos Estados Unidos, de forma que os conjuntos de primers específicos para cada sorotipo capsular foram arrumados de acordo com a sua maior prevalência, em reações distintas e progressivas, num total de sete reações com quatro sorotipos cada uma. Essa combinação permite que um maior número de amostras seja identificado logo nas primeiras reações (PAI *et al.*, 2006).

Diferentes métodos de tipagem molecular têm sido utilizados ao longo do tempo com diferentes propósitos, seja para avaliar a epidemiologia local quanto para a epidemiologia global de possíveis surtos e suas relações, ou de como determinados patógenos se comportam em diferentes situações ou locais e se pertencem a uma mesma linhagem (MAIDEN *et al.*, 1998). A técnica de MLST surgiu como uma alternativa à técnica de *multilocus enzyme eletroforese* (MLEE), que também possuía um bom poder discriminatório, mas dificilmente era tinha os seus resultados reproduzidos de forma idêntica entre laboratórios distintos, uma vez que esta é uma limitação do uso da eletroforese em géis de agarose. Da mesma forma ocorrendo com técnicas como a eletroforese em campo pulsado (PFGE). São técnicas com

alto poder discriminatório, e excelentes para estudos epidemiológicos de surtos, pois são capazes de detectar mudanças sutis na variedade genética dos patógenos (ENRIGHT, M C; SPRATT, B G, 1999).

A aplicabilidade direta da técnica de MLST em fluidos corpóreos em casos onde a cultura foi negativa permite a caracterização molecular dos casos de meningite pneumocócica de uma forma mais completa, identificando ou esclarecendo o referido caso num contexto epidemiológico em termos locais e globais, verificando a sua inserção num clone já conhecido e disseminado, ou não.

3 JUSTIFICATIVA

As doenças pneumocócicas invasivas são importantes causas de morbi – mortalidade no mundo, e por esta razão fazem parte dos objetivos do milênio, propostos pela Organização Mundial de Saúde, em pelo menos duas das suas categorias: A redução da mortalidade infantil e o combate a doenças infecto – contagiosas imuno preveníveis (WOLFSON, 2008). Para isso, faz-se necessário o diagnóstico rápido para uma terapêutica eficaz e de dados epidemiológicos que auxiliem na adoção das melhores medidas preventivas bem como para avaliar as de uso corrente.

O presente estudo visa utilizar uma abordagem molecular para diagnóstico e tipagem dos casos de meningite pneumocócica, sobretudo cultura negativa, realizada diretamente no espécime clínico. Uma combinação de métodos moleculares como a detecção do agente bacteriano através de PCR em Tempo Real, a dedução capsular por Multiplex PCR e a genotipagem por MLST, oferecem a confirmação do agente etiológico (diagnóstico) e a caracterização do perfil genético é importante para o controle da disseminação geográfica do patógeno.

Com a implementação da vacina conjugada pneumocócica decavalente no calendário nacional de imunização, o Brasil avançou rumo aos objetivos do milênio traçados pela Organização Mundial da Saúde, no entanto este avanço só terá progresso através do constante monitoramento epidemiológico das doenças pneumocócicas invasivas, seja através de projetos de pesquisa ou de serviços de vigilância epidemiológica dos pneumococos circulantes e da sua caracterização molecular, podendo assim identificar eventuais mudanças no perfil do patógeno e o real impacto alcançado pelas medidas de prevenção implementadas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Detectar e caracterizar isolados de *S. pneumoniae* diretamente de amostras de LCR, de pacientes com diagnóstico de meningite bacteriana cultura negativa.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar através de PCR em tempo real, casos de meningite bacteriana cultura negativa.
- 2) Realizar a dedução do sorotipo capsular de *S. pneumoniae* diretamente de LCR.
- 3) Caracterizar o perfil genético de *S. pneumoniae* através da técnica de *multilocus Sequence typing* diretamente de LCR.
- 4) Determinar o percentual de casos de meningite pneumocócica com cultura negativa, que são de sorotipos representados na vacina decavalente.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Este é um estudo de vigilância conduzido no período de abril de 2006 a dezembro de 2010.

5.2 LOCAL DO ESTUDO

As amostras de LCR deste estudo foram provenientes de pacientes atendidos no Hospital Couto Maia (HCM). Este é um hospital estadual de referência em doenças infecciosas, com 101 leitos, localizado em Salvador, Bahia. A Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB) recomenda que os casos suspeitos de meningite da região metropolitana da cidade de Salvador sejam referidos ao HCM, e mais de 95% dos casos da região são reportados (LIMA et al., 2010).

Todas as amostras de líquido foram transportadas em recipiente contendo nitrogênio líquido até o Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – (LPBM) FIOCRUZ, onde ficaram armazenadas em freezer -70°C até a execução dos protocolos deste estudo.

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo, pacientes com suspeita clínica de meningite (história aguda de febre, cefaléia, rigidez de nuca, vômitos, convulsões) atendida no HCM, submetidos à punção lombar para a coleta de LCR, conforme protocolo da instituição, e cujo perfil citoquímico líquórico fosse compatível com meningite bacteriana: pleocitose igual ou superior a 100 células/mm³ ou glicorraquia menor ou igual de 40 mg/dL ou proteinorraquia maior ou igual a 65 mg/dL. Todos os pacientes aceitaram participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

5.4 COLETA DE DADOS

As informações necessárias ao estudo foram obtidas por meio de entrevista com os pacientes internados no HCM. Um questionário epidemiológico (Apêndice 2), foi preenchido com informações demográficas, sintomas, tratamento prévio, antecedentes médicos, internações prévias e resultados dos exames laboratoriais. Posteriormente, foi realizada a revisão de prontuários para que todas as informações clínicas de interesse ao estudo fossem coletadas. Vale ressaltar que foram incluídos no estudo aqueles pacientes provenientes de outros hospitais, mas que foram encaminhados ao HCM para realização da punção líquórica.

5.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

5.5.1 Extração de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) das amostras de LCR.

O DNA do genoma bacteriano foi extraído de 200 μ L da amostra de LCR usando o kit QI Amp DNeasy Bloodand Tissue kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o seguinte protocolo: Alíquotas de 200 μ L de LCR foram adicionadas a 100 μ L de tampão TE (10mM de Tris – HCl, 1mM de EDTA, pH8.0) contendo 0,04 g/mL de lisozima, 75U/mL de mutanolisina e homogeneizadas. O homogeneizado foi incubado em banho – maria à 37°C por uma hora. Após incubação, foram adicionados 20 μ L de Proteinase K sob agitação suave, e 200 μ L de Tampão AL seguido de uma nova incubação a 56°C por 30 minutos.

Após incubação, as amostras foram submetidas a uma rápida centrifugação, de modo a eliminar a água de condensação nas paredes do tubo, e a cada tubo foram adicionados 260 μ L de etanol (96 – 100%) seguido de homogeneização. As amostras foram então transferidas para as Colunas QIAamp (fornecidas no kit) e centrifugadas a 8000rpm por um minuto (temperatura ambiente), e posteriormente foi descartado o primeiro tubo coletor.

A coluna foi novamente posicionada num novo tubo coletor de 2mL, onde foram adicionados 500 μ L de Tampão AW1 a cada amostra, submetendo-os a centrifugação a 8000rpm por um minuto. Os tubos coletores foram novamente descartados e as colunas

recolocadas em novos tubos, sendo adicionados 500µL de Tampão AW2. O sistema foi então submetido à centrifugação em rotação de 14.000 rpm por três minutos. Os tubos coletores foram descartados e as colunas colocadas em tubos estéreis de 1,5mL, submetidos então a eluição com 100µL de tampão AE e incubados por cinco minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por um minuto a 8000rpm (temperatura ambiente) para a eluição do DNA, e os tubos contendo o DNA extraído foram então armazenados à - 20°C para a posterior análise.

5.5.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Os oligonucleotídeos (*primers*) e sonda, utilizados foram baseados na sequência que codifica o gene da autolisina do pneumococo, *lytA* (F373 – acgcaatctagcagatgaagca; R424 – tcgtgcgttttaattccagct; Pb400 – tgccgaaaacgcttgatacagggag). O fragmento amplificado foi de 75 pares de bases. A reação foi composta de TaqMan Universal Master Mix 2x (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), *primer* e sonda a uma concentração de 200nM, e água livre de DNase e RNase, para compor o volume final de 23µL. O tampão foi distribuído em placas ópticas de 96 poços, e a cada poço foram adicionados 2µl do DNA a ser analisado.

Foi utilizado em cada bateria de testes um controle positivo para cada reação, e quatro controles negativos. A amplificação foi processada no aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando ciclos com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos. Em seguida, 50 ciclos com dois estágios de temperatura de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos e uma temperatura final de 50°C por 2 minutos.

Ao término de cada análise, foram gerados gráficos referentes à amplificação, bem como os valores de C_t (Cycle threshold) para cada amostra e controles, que são valores baseados no sinal fluorescente emitido. Se não houver nenhuma mudança no sinal fluorescente após os 30 ciclos, a amostra é considerada negativa.

5.6 DEDUÇÃO DO SOROTIPO CAPSULAR POR MULTIPLEX PCR

Para a dedução do sorotipo capsular, foi empregado um protocolo desenvolvido pelo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*, Atlanta, EUA), disponível no site (www.cdc.gov/ncidod/biotech/files/pcr-Latin-Amer-clinical-specimens.pdf).

Este protocolo foi desenvolvido de forma a definir até 40 sorotipos/sorogrupos capsulares distribuídos em oito reações de PCR multiplex, utilizando para isto um conjunto de primers específicos (Apêndice 3), onde cada par de primers corresponde a um sorotipo/sorogrupo e um par de primers adicional corresponde ao gene *cpsA*, um gene codificante da cápsula polissacarídica pneumocócica, usado como controle positivo interno da reação. Para cada reação foram utilizados 20ul de Master Mix 2X PCR Buffer (Qiagen Hot Start Taq[®] Multiplex PCR máster mix, Hilden, Alemanha), contendo 12,5ul de 2X PCR Buffer, 3,5ul de água ultrapura, e quantidades equimolares dos pares de primers (0,1 – 0,5mM cada), acrescido de 5ul de DNA da amostra em estudo.

As amplificações foram executadas em um termociclador Gene Amp[®] PCR System 97000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com os seguintes parâmetros: ativação inicial de 15 minutos a 95°C seguida de 35 ciclos com 94°C por 30 segundos, 57°C por 90 segundos e 72°C por 60 segundos. Após os 35 ciclos, uma extensão a 72°C por 10 minutos. Um total de 10ul do produto amplificado, foi utilizado para revelação por eletroforese em gel de agarose Nu Sieve[®] (Seakem LE, EUA) a 2%, preparada com tampão TAE 1X (40mM Tris, 20mM de Ácido acético glacial, 1mMEDTA, pH 8.0). Para a visualização na etapa de revelação, foi utilizado 0,5ug/ml de brometo de etídio incorporados ao gel. Os parâmetros para a eletroforese foram: voltagem constante de 100V, por 1 hora e 30 minutos.

Os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados foram determinados por análise comparativa, utilizando-se o padrão de peso molecular de 50 pb DNA Ladder (Promega, Fitchburg, WI, EUA). O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc XR Chemi Doc – XRS (Bio Rad, Hercules, CA, EUA) e a imagem de cada experimento foi capturada e salva em arquivo de formato jpg para impressão e registro.

A determinação de cada sorotipo foi feita com base no tamanho do fragmento amplificado de acordo com cada reação do multiplex, conforme os dados do Quadro 1.

Figura 2: Distribuição dos sorotipos capsulares pneumocócicos por reação de dedução capsular por Multiplex PCR.

	Sorotipo	Tamanho (pb)		Sorotipo	Tamanho (pb)
CpsA		160			
Reação 1	14	189	Reação 5	7C/B/ 40	260
	6A/B/C	250		12F/A/44/46	376
	23F	384		11A/D	463
	19A	566		10A	628
	9V/A	816		23A	722
Reação 2	19F	304	Reação 6	21	192
	3F	371		33F/47F	338
	15B/C	496		15A/F	434
	18A/B/C	573		35F/33A/37	517
	17F	693		13	655
Reação 3	1	280	Reação 7	39	98
	5	362		23B	199
	9N/L	516		35A/C/42	280
	7F/A	599		38/25F	574
	16F	717		35B	677
Reação 4	8	201	Reação 8	24A/B/F	99
	2	290		10F	248
	4	430		34	408
	20	514		31	701
		22F/A	643	Reação 9	6C

5.7 MULTI – LOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

A técnica de *multilocus Sequence typing* (MLST) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por ENRIGHT & SPRATT, 1998, para todos os casos que foram identificados através da técnica de PCR em tempo real. A técnica é baseada no sequenciamento de sete genes altamente conservados, comumente chamados de *house-keeping genes* (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* e *ddl*) do DNA cromossômico de *S. pneumoniae*. As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados disponível no *site* (<http://www.mlst.net>) para determinar o ST.

O procedimento teve início com a reação de amplificação, a qual foi realizada com o volume de 25µl, utilizando-se o Master Mix Promega (Promega, Fitchburg, WI, EUA), a um volume de 12,5µl por amostra, e ao qual foram acrescentados 8,0µl de água ultrapura, 0,5µl dos *primers* específicos *forward* e *reverse*, e 3,5µl do DNA da amostra. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas no site (www.mlst.net).

A reação de amplificação foi realizada no termociclador Gene Amp[®] PCR System 97000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), foi realizada segundo protocolo descrito com os seguintes parâmetros: 94°C por 1 minuto, seguido de 10 ciclos de 94°C por 15 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, e segunda etapa a 94°C por um minuto seguido de 20 ciclos de 94°C por 15 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos com auto-extensão de 10 segundos a cada ciclo. Concluindo com uma extensão final à 72°C por 10 minutos.

A amplificação dos genes foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1X e tensão de 100 volts por 30 minutos. Os géis foram corados com brometo de Etídio para a visualização de uma banda, confirmando assim a amplificação. Cada gene gera um fragmento de tamanho conhecido conforme descrito a seguir: *aroE* 405pb, *gdh* 459pb, *gki* 483pb, *recP* 448pb, *spi* 472pb, *xpt* 486pb e *ddl* 441pb.

Após a confirmação da amplificação, o produto da reação foi submetido a um processo de purificação utilizando EXOSAP (GE Healthcare), realizada numa proporção de 3µl do produto de PCR para 4µl de EXOSAP. A purificação foi submetida a dois estágios: o primeiro a 37°C por 15 minutos e o segundo a 80°C por 15 minutos. Os produtos foram estocados em freezer -20°C até o momento da reação de sequenciamento. O sequenciamento foi realizado a partir dos produtos purificados e seguindo protocolos da plataforma de sequenciamento PDTIS FIOCRUZ.

As sequências consenso finais foram editadas a fim de se igualar o tamanho dos fragmentos aos alelos moldes disponíveis no www.spneumoniae.mlst.net utilizando-se o software BioEdit versão 7.0.9. As sequências finais dos genes foram então submetidas ao site do MLST para definição dos tipos de sequências (sequencetypes - STs), que foram obtidos automaticamente para os alelos já conhecidos. Os STs obtidos foram comparados com aqueles depositados no banco de dados para definição de complexos clonais (CC) com auxílio do programa eBURST versão 3. A visualização da população completa contida do banco de sequências de pneumococos também foi gerada pelo programa eBURST versão 3.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos, demográficos e epidemiológicos foram armazenados em bases de dados do programa Epi Info versão 3.5.1. Quando apropriado foram utilizados os testes do qui - quadrado com auxílio do programa Epi Info versão 3.5.1. Foram considerados como estatisticamente significativos os resultados que revelaram valores de $p < 0,05$.

5.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Apêndice4).

6 RESULTADOS

No período de janeiro de 2006 a dezembro de 2010 foram identificados 4.448 casos de meningite bacteriana no Hospital Couto Maia, de acordo com os critérios de inclusão empregados neste estudo. Um total de 1.141/4.448(25,7%) amostras de LCR, sendo uma única amostra de cada paciente, foi analisado por PCR em tempo real, sendo que 8% (92/1141) das amostras foram positivas para *S. pneumoniae*. Das 92 amostras positivas pela Reação de PCR em tempo Real, 68/92 (74%) apresentaram cultura positiva e 24/92(26%) cultura negativa.

Os pacientes com teste positivo para *S. pneumoniae* foram, na maioria (57%) proveniente de outras cidades do estado da Bahia. Entretanto, quando estratificamos pelo resultado da cultura foi possível observar que esta diferença foi maior entre os pacientes que apresentaram cultura negativa ($p=0,03$). A tabela 1 apresenta as características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com meningite pneumocócica, estratificados pelo resultado da cultura do LCR. Com exceção da procedência do paciente, e dos valores de Proteinorraquia não houve diferença estatística entre as populações comparadas. O uso prévio de antimicrobianos não foi uma variável importante no resultado da cultura do LCR, sendo que 53% dos casos de cultura positiva tiveram o teste microbiológico sugestivo da presença de antimicrobianos, não tendo diferença no grupo com resultado de cultura negativo (54%).

Os resultados dos testes convencionais de diagnóstico laboratorial encontram-se discriminados na tabela 2. Considerando o grupo de casos com cultura positiva, o exame bacterioscópico pela coloração de Gram foi sugestivo para pneumococos em 67 (98,5%) casos, enquanto que no grupo de cultura negativa apenas oito (33%) tiveram positividade no método de Gram. A reação de aglutinação por látex foi realizada em apenas 59 casos, sendo realizados 41 testes no grupo cultura positiva e 18 testes no grupo de cultura negativa. Sendo que este foi o teste que apresentou menor eficiência em detectar os casos de meningite pneumocócica, com 14 casos falsos - negativo. A reação de PCR em tempo real identificou sete casos que foram negativos em todos os testes convencionais de diagnóstico laboratorial e na tabela 3 encontram-se as características destes casos, que tiveram meningite bacteriana de etiologia não determinada ou meningite de etiologia não esclarecida como resultados diagnósticos finais.

Tabela 1: Características clínicas e epidemiológicas dos casos de meningite pneumocócica identificados no Hospital Couto Maia, por Real Time PCR.

Características	Cultura Positiva (n=68)	Cultura Negativa (n=24)	<i>P</i> ^{*****}
Sexo			
Masculino	47 (69%)	15 (62,5%)	
Idade em anos			
<2	16 (23,5%)	5 (20,8%)	
2 - 5	4 (5,9%)	2 (8,3%)	
5 - 15	11 (16,2%)	7 (29,2%)	
> 15	37 (54,4%)	10 (41,7%)	
Procedência			
Salvador	34 (50%)	6(25%)	0.0359
Interior	30 (44%)	16 (66,7%)	
Dados laboratoriais [*]			
Celularidade (células/mm ³)	2.825 (0 – 10.000)	5.350 (132 – 10.000)	
Glicose (g/dl)	20 (1 – 69)	25 (10 – 71)	
Proteínas (g/dl)	360 (28 – 1100)	300 (30 – 500)	0.0168
Gram ^{**}	67	8	
Reação de Látex (n=59) ^{***}	36 (87,8%)	9 (50%)	
Quadro Clínico na Admissão			
Dias com sintomas-mediana	3 (0 – 15)	5,5 (1 – 18)	
Alteração neurológica ^{****}	70,6%	50%	
Fonte de infecção da Meningite			
IVAS	17 (25%)	9 (37,5%)	
Pneumonia	4 (5,9%)	1 (4,2%)	
Trauma ou fratura	5 (7,4%)	0%	
Uso prévio de antibiótico ^{*****}			
Prontuário	8 (11,8%)	5 (20,8%)	
Laboratorial	36 (53%)	13 (54%)	
Antecedentes médicos			
Doença crônica	13 (19,1%)	5 (20,8%)	
Alcoolismo	8 (11,8%)	3 (12,5%)	
Meningite anterior	8 (11,8%)	2 (8,3%)	
Evolução Clínica			
Nº de dias internados - mediana	15 (1 – 108)	16,5 (6 – 100)	
Nº de dias na UTI - mediana	9 (1 – 100)	15 (4 – 29)	
Óbito	16 (23,5%)	1 (4,2%)	

* Foi utilizado a mediana e a amplitude do interquartil quando pertinente.

** Foi considerada a presença de diplococos Gram positivos como sugestivo de pneumococos

*** A reação de látex foi aplicada para 59 casos (41 foram cultura positiva e 18 foram cultura negativa).

**** Alteração do quadro neurológico inclui coma e alterações não especificadas.

***** Uso prévio de antibióticos refere-se à descrição no prontuário.

***** Valor de “p” calculado pelo método exato de Fischer, sendo considerado significativo quando seu valor for < 0.05.

Tabela 2: Resultados dos métodos de diagnóstico utilizados para identificar os casos de meningite pneumocócica em Salvador, Bahia (N=59).

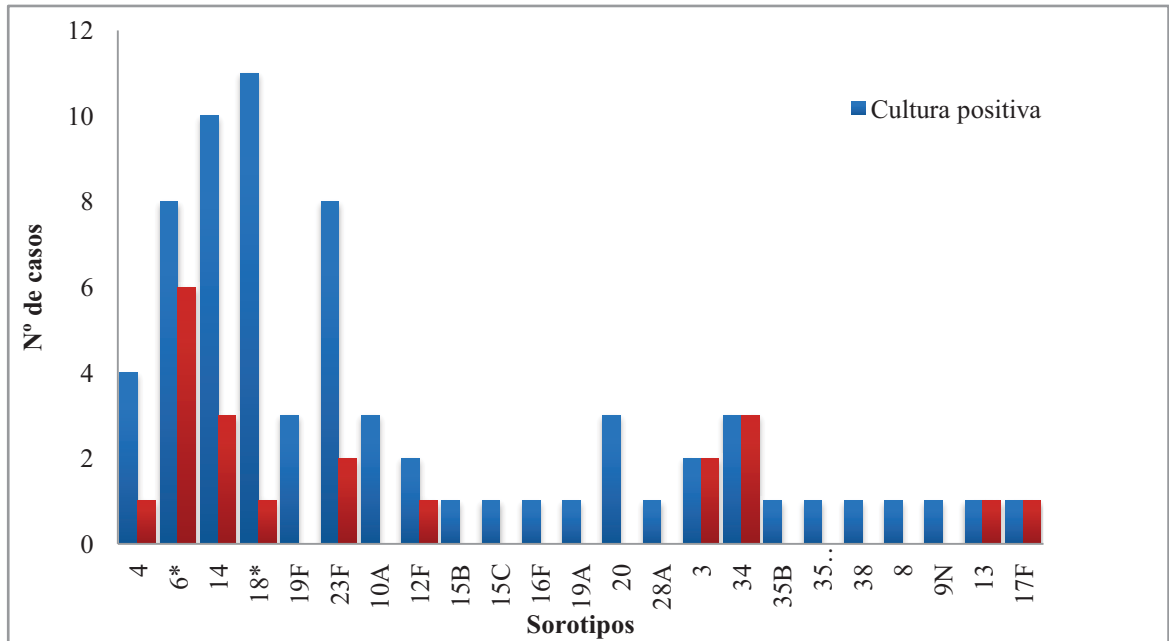
Cultura	Gram	Látex	PCR	n
-	-	-	+	7
+	+	-	+	5
-	+	+	+	7
-	-	+	+	2
-	+	-	+	2
+	+	+	+	36

Todos os 68 casos de meningite que foram cultura positiva tiveram o tipo capsular determinado diretamente do isolado clínico. Para os 24 casos, cuja cultura foi negativa, o tipo capsular foi determinado pela reação de multiplex PCR diretamente do DNA extraído do LCR. Dentre os casos onde a cultura foi negativa, 21/24 casos (87,5%) tiveram o sorotipo capsular deduzido e três casos (12,5%) não apresentaram positividade para qualquer dos 40 sorotipos testados, embora tenham apresentado positividade para o gene *cpsA*, permanecendo então com sorotipo não determinado. Os sorotipos mais frequentes foram: **6A/B/C** (25%), **14** (12,5%), **34** (12,5%), **23F**(8,3%) e **3** (8,3%). Dentre os sorotipos vacinais mais frequentes estavam o **6A/B/C**, **14**, **23F**, **18A/B/C** e **4** (Figuras 2 e 3).

Considerando os sorotipos identificados neste estudo de forma geral, estimamos que 76% dos casos (19 casos) em crianças menores que cinco anos poderiam ser preveníveis através do uso da vacina conjugada 10-valente (PCV-10) e de 95% para a vacina conjugada 13-valente (PCV-13). Para os 21 casos cuja cultura foi negativa e que foi possível determinar o tipo capsular, 52,4% (11 casos) é de sorotipos inclusos na vacina decavalente. Para os sete casos em que o diagnóstico positivo foi possível apenas pelo uso do método de PCR em Tempo real, nós identificamos que 71% (5/7) dos casos foram por sorotipos não vacinais.

Nós submetemos 16 casos cuja a cultura foi negativa e havia DNA ou LCR suficiente para tipificação molecular por MLST. Dos 16 casos submetidos, foi possível completar a análise do perfil alélico de seis casos, sendo três deles Single Locus Variante, e outros três com perfil alélico completo. Dentre os ST's com perfil alélico completo, foram encontrados os STs 750, 6403 e o 2814, enquanto os Single Locus Variante foram os STs 4913, 756 e um terceiro caso com três ST's possíveis (66 / 785 / 7038), o qual precisa da sequência do gene *spi* para definição (Tabela 4).

Figura 3: Distribuição dos sorotipos capsulares dos casos de meningite pneumocócica identificados no Hospital Couto Maia, no período de Abril de 2006 a Dezembro de



2010.

Figura 4: Distribuição dos tipos capsulares de pneumococos em casos de meningite cultura negativa identificados no Hospital Couto Maia, no período de Abril de 2006 a Dezembro de 2010.

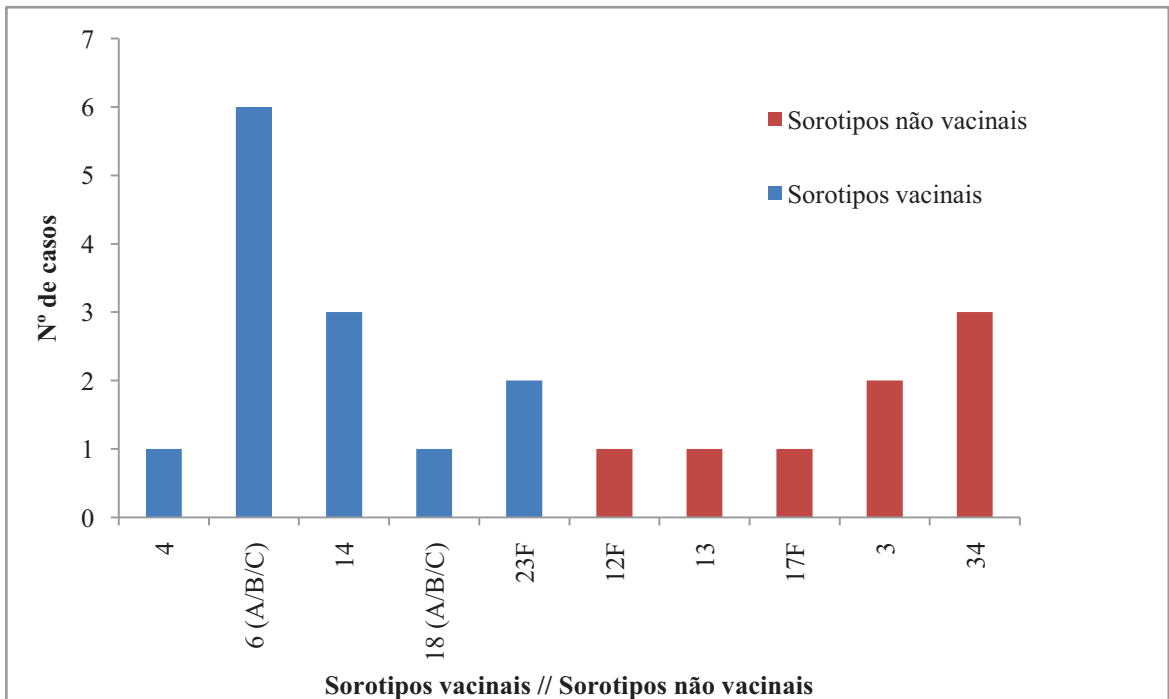


Tabela 3: Características gerais dos casos de meningite pneumocócica dentre os quais todos os testes convencionais de diagnóstico laboratorial foram negativos (N=7/59).

No. Caso	Idade em Anos	Procedência	Sexo	Nível de Proteína	Nível de Glicose	Celularidade	Aspecto líquido	Evolução final	Uso Prévio de Atb	Diagnóstico final
11.0346	13	Não	M	300	20	10000	Turvo	Curado	sim	MBENE
13.0338	9	Sim	F	200	55	7200	Turvo	Curado	não	MBENE
13.0580	63	Sim	F	400	35	10000	Turvo	Curado	sim	MEND
14.0657	2	Não	M	300	25	4500	Turvo	Curado	não	MBENE
15.0375	24	Não	F	380	49	2200	Turvo	Curado	sim	MBENE
15.0671	6	Não	F	120	30	3200	opalescente	Curado	não	MBENE
15.0746	3	Sim	F	32	71	500	opalescente	Curado	não	MBENE

MBENE = Meningite Bacteriana de etiologia não especificada

MEND= Meningite de etiologia não definida

Tabela 4: Perfil genotípico de *Streptococcus pneumoniae* caracterizados diretamente de amostras de LCR cultura negativa, provenientes de casos de meningite pneumocócica.

Amostras	Sorotipo	Perfil Alélico							MLST
		aroE	gdh	gki	recP	spi	xpt	ddl	
11,0047	ND	-	8	2	4	-	1	1	
11,005	4	5	5	4	5	-	-	7	
11,0071	34	-	-	-	-	-	-	-	
11,0163*	ND	11	16	4	1	-	1	1	4913
11,0192*	6A/B/C	12	62	1	2	-	102	14	756
11,0264	6A/B/C	13	5	9	50	-	±	14	
11,0346	13	-	-	-	-	7	-	-	
11,0347	6A/B/C	-	-	-	-	-	-	-	
11,0358*	14	2	8	2	4	-	1	1	66 / 785 / 7038
12,0074	3	2	-	9	47	-	-	17	
12,0275	34	-	-	-	-	9	-	-	
12,0349	23F	-	-	-	-	-	-	-	
13,0338	3	-	-	-	-	-	-	-	
13,058	ND								
14,014	34	-	-	-	-	-	-	-	
14,0462	6A/B/C	-	-	1	2	-	1	-	
14,0657	14	1	-	-	5	5	3	8	
14,0713	14	-	-	-	-	-	-	-	
15,0359	6A/B/C	7	47	1	37	6	1	14	750
15,0375	6A/B/C	-	-	-	-	-	-	-	
15,0519	17F	1	16	71	1	6	17	6	6403
15,0532	18	13	10	2	16	1	26	1	2814
15,0671	23F	-	-	-	6	-	-	-	
15,0746	12F	-	-	14	-	-	-	29	

* A não amplificação de todos os genes que compõem o perfil alélico não permitiu chegar a um ST, de forma que os ST's reportados foram Single Locus Variante.

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi apresentada a caracterização molecular quanto ao sorotipo e ao genótipo de *Streptococcus pneumoniae* diretamente de fluidos corpóreos de pacientes com suspeita de meningite bacteriana, bem como o diagnóstico molecular frente a outras técnicas laboratoriais diagnósticas convencionais, em cinco anos de vigilância, entre abril de 2006 a dezembro de 2010.

A proporção de casos confirmados por cultura neste estudo (68 casos - 74%) é concordante com os dados encontrados em outras cidades do país, conforme dados do SINAM NET – Ministério da Saúde. Dentre os grupos diagnosticados com cultura positiva ou cultura negativa, não houve diferenças significativas na distribuição por gênero, embora tenha havido predominância do sexo masculino em ambos os grupos com os percentuais de 69% e 62,5% respectivamente, e que estes dados sejam concordantes com dados dos EUA (THIGPEN *et al.*, 2011), onde o sexo masculino foi acometido em aproximadamente 50% dos casos de meningite pneumocócica em adultos, e aproximadamente 55% dos pacientes pediátricos, também com dados da Grécia, onde 57,2% dos casos acometeram o sexo masculino (KARANIKI *et al.*, 2009).

A distribuição dos casos por faixas etárias entre os grupos diagnosticados com cultura positiva ou cultura negativa não apresentou diferenças significativas entre si, entretanto observou-se a formação de dois grupos etários distintos representando a maior incidência da doença. O primeiro e maior grupo etário era o de indivíduos com idade > 15 anos, cujos percentuais foram de 54,4% dos casos no grupo cultura positiva e 41,7% no grupo cultura negativa, de forma que este achado é discordante da maior parte da literatura corrente no mundo. O fato provavelmente deve-se a uma menor procura por assistência médica diante dos primeiros sintomas das doenças fonte de infecção por parte deste grupo, o que termina por permitir a evolução da doença, culminando em uma entidade mais grave como a meningite pneumocócica. A literatura aponta como o principal grupo etário acometido o de crianças com idade < 2 anos, sendo então concordante com os nossos achados referentes ao segundo grupo etário com maior número de casos, responsável por 23,5% dos casos no grupo cultura positiva e 20,8% dos casos no grupo cultura negativa. Os dados referentes ao segundo maior grupo etário são concordantes com diversos estudos em diferentes países tais como: EUA (THIGPEN *et al.*, 2011), França (DUBOS *et al.*, 2007), Grécia (KARANIKI *et al.*, 2009),

Ásia (SAHA *et al.*, 2008, 2009) e América Latina (QUADROS, DE, 2009; VALENZUELA *et al.*, 2009).

Este estudo identificou que no que diz respeito à procedência do paciente que ingressa no Hospital existe diferença significativa entre os grupos cultura positiva e cultura negativa. Observou-se que no grupo em que o resultado da cultura foi negativo, um total de 66,7% dos pacientes vinha do interior do Estado para serem atendidos no Hospital Couto Maia, contra 44% apenas no grupo em que o resultado da cultura foi positivo. Pacientes que vem de localidades distantes da capital costumam ser medicados, muitas vezes de forma empírica, para evitar ou retardar o agravamento do quadro clínico, o que resultaria numa maior possibilidade de inviabilização no crescimento das culturas, conforme o demonstrado em estudo na Itália (RESTI *et al.*, 2009) e no Brasil (SACCHI *et al.*, 2011), este último aponta que o uso de antibióticos pode aumentar em até 16 vezes a possibilidade de negatificação do resultado da cultura. No entanto, na casuística deste estudo, não houve diferença significativa quanto ao uso de antibióticos (relatado ou testado) entre os grupos cultura positiva e cultura negativa, não sendo possível correlacionar com os dados relativos à procedência.

Os antecedentes médicos dos pacientes no que diz respeito a doenças crônicas, tanto do grupo diagnosticado por cultura positiva (19,1%), quanto do grupo com cultura negativa (20,8%), embora não tenha sido um dado estatisticamente relevante, corroboram o já descrito em literatura quanto a doenças como diabetes melitus, asma, doenças cardíacas e pulmonares crônicas, e o maior risco de doenças pneumocócicas invasivas em quaisquer faixas etárias (LYNCH; ZHANEL, 2009). Neste estudo, o segundo maior fator de risco foi o alcoolismo, tendo sido reportado em 11,8% do grupo cultura positiva, e 12,5% do grupo cultura negativa.

Quanto à fonte de infecção da meningite, também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, no entanto a infecção das vias aéreas superiores foi a mais relatada tanto no grupo diagnosticado com cultura positiva (25%), quanto no grupo com cultura negativa (37,5%).

Não foram observadas diferenças significativas na contagem de leucócitos das amostras de LCR, bem como na determinação das taxas de Glicorraquia em nenhum dos dois grupos, entretanto a Proteinorraquia do grupo de casos em que a cultura foi negativa (301,25g/dl) foi significativamente menor que no grupo de casos onde a cultura foi positiva (398,37g/dl) e corroboram a literatura quanto ao fato de ser um bom marcador para diferenciar os quadros entre meningites virais e bacterianas (CARBONNELLE, 2009; BRIVET *et al.*, 2005). O

aumento da Proteinorraquia está normalmente relacionado à celularidade, inclusive as sanguíneas (em casos de punção traumática existem fatores de correção que podem ser utilizados para uma melhor estimativa) e bacterianas, então uma possível explicação para os valores elevados no grupo onde a cultura foi positiva pode ser devido a uma maior carga ou inóculo bacteriano na amostra, que no caso onde a cultura foi negativa eram possivelmente menores ou foram reduzidos pela possível introdução de antibióticos anteriormente à internação em unidade médica de referência.

Quanto à detecção dos casos, no grupo onde o resultado da cultura foi positivo, observou-se que o exame bacterioscópico pela coloração de Gram apresentou um bom desempenho ao exibir resultado sugestivo de pneumococos em cerca de 98,5% dos casos (67/68 casos), ao passo em que a aglutinação em látex se mostrou uma importante ferramenta de suporte diagnóstico na confirmação dos casos onde a cultura foi positiva corroborando a literatura e seus achados em outros países (CARBONNELLE, 2009; SCARBOROUGH; THWAITES, 2008), que justificam o bom desempenho destas técnicas como dependentes da carga do inóculo bacteriano presente na amostra de LCR obtida, numa relação diretamente proporcional. Entretanto, nos casos onde a cultura apresentou-se negativa, a técnica de PCR em tempo real foi a única capaz de identificar todos os casos (24 casos), sendo que em sete destes casos (29,2%), a técnica foi a única capaz de identificar o patógeno, uma vez que todos os outros testes foram negativos. Uma observação mais minuciosa destes sete casos levou a constatação de que a técnica de PCR em tempo real conseguiu exibir positividade para pneumococos nas mais variadas situações de celularidade (500 – 10.000 células/mm³), valores de Glicorraquia (20 – 71 mg/dl) e Proteinorraquia (32 – 400 mg/dl), e mesmo em pacientes que já haviam utilizado antibióticos, sendo portanto concordante com o já descrito em literatura mundial corrente (AZZARI *et al.*, 2008, 2010; RESTI *et al.*, 2009; SACCHI *et al.*, 2011).

Num período pós – vacina se faz necessário acompanhar a composição sorotípica e suas tendências, no maior número de casos possível. Neste estudo, a utilização da técnica de PCR em tempo real para a detecção dos casos diretamente das amostras de LCR, foi possível a identificação de 92 casos (92/ 1141), cerca de 8%. O não uso da técnica de PCR em tempo real, baseando-se apenas no resultado da cultura, reduziria a identificação para apenas 68 (68/1141) casos (6%). Observa-se então, que a técnica utilizada para a detecção permitiu um ganho de 2% em termos de diagnóstico dos casos, detectando-os mesmo quando a cultura não pôde ser útil. E vale a pena ressaltar que este ganho só não pôde ser maior, porque está

relacionado ao número de amostras de LCR que foi possível armazenar (1141 amostras / 4448 casos), de forma que, se fossem captadas mais amostras dentro do número total de casos identificados pela Vigilância no Hospital Couto Maia, provavelmente haveria um maior número de casos positivos para *S. pneumoniae*, mas que por não terem sido investigados por técnicas mais sensíveis, foram concluídos como casos de meningite bacteriana de etiologia não esclarecida ou indeterminada.

Da mesma forma, a utilização da técnica de dedução capsular por Multiplex PCR, tão extensamente utilizada em diversos estudos, aplicada diretamente em isolados (DIAS *et al.*, 2007; MORAIS *et al.*, 2007; SAHA *et al.*, 2009), foi utilizada neste estudo para os 68 casos onde a cultura foi positiva e conforme visto na figura 2, houve um predomínio dos sorotipos vacinais na composição sorotípica destes casos. Neste estudo a adaptação e utilização desta técnica, aplicada diretamente em espécimes clínicos (amostras de LCR), possibilitando ganhos também na identificação ou dedução dos sorotipos capsulares de mais 21 casos, onde o resultado da cultura foi negativo (24 casos), equivalendo a cerca de 23% de ganho em resultados em relação ao número total de casos positivos para *S. pneumoniae* (92 casos), e sendo portanto concordante com o já afirmado em literatura, sobre a importância do uso de ferramentas moleculares para a identificação do perfil sorotípico em casos onde o resultado da cultura é negativo, partindo-se diretamente dos espécimes clínicos (AZZARI *et al.*, 2008, 2010; SAHA *et al.*, 2008).

Quanto à distribuição sorotípica dos casos onde o resultado da cultura foi negativo, observou-se através das figuras 2 e 3, que houve uma maior distribuição de sorotipos vacinais, cerca de 66%. Entretanto, observou-se que dentre estes casos, oito (33%) foram identificados como não vacinais, e somando-se a estes aqueles três casos onde não foi possível determinar o sorotipo, mas que são, portanto também não vacinais, o percentual passa para cerca de 46% (11 casos) de sorotipos não vacinais como o **12F**, **13**, **17F**, **3** e **34**. O fato de este estudo ter trabalhado com casos onde a detecção e dedução dos sorotipos capsulares terem sido feitos diretamente do espécime clínico, e de que os seus resultados poderiam ser maiores caso mais amostras tivessem sido armazenadas e investigadas, permite a observação de que é preocupante o número de casos provocados por sorotipos não vacinais, especialmente considerando que uma vacina foi recentemente implementada, e que muito embora seja estimada uma cobertura de cerca de 75,7% para a cidade de Salvador e região metropolitana (MENEZES *et al.*, 2011) estes dados baseiam-se apenas naqueles que foram identificados por cultura. É portanto preocupante, a possibilidade de haver desde já um alto percentual de casos

sendo provocados por sorotipos não vacinais, e que não foram levados em consideração quando na escolha da vacina implementada pelo fato de não terem sido investigados.

O uso da técnica de MLST diretamente em amostras de LCR, como foi utilizado neste estudo, constitui uma prática pouco explorada, não havendo outras citações na literatura corrente, muito embora um protocolo já tivesse sido descrito (ENRIGHT, M C *et al.*, 2000). Dentre as 24 amostras submetidas à técnica de MLST, apenas de três foi possível a obtenção do perfil alélico completo (ST), e outras três tiveram o ST deduzido como Single Locus Variante (falta de um dos alelos) do alelo spi. O baixo rendimento em termos de resultados para o uso da técnica de MLST diretamente em espécimes clínicos já havia sido relatado (XU *et al.*, 2011), e acredita-se que se deva a uma degradação prévia do DNA no espécime clínico, impossibilitando a amplificação dos sete genes de estudo. Uma outra possível causa para o baixo rendimento, pode decorrer do fato de que os primeiros protocolos desenvolvidos para a técnica de MLST em espécimes clínicos utilizavam a técnica de PCR do tipo Nested, para a amplificação dos genes, o que elevava a sensibilidade da técnica, permitindo a amplificação mesmo com um número muito reduzido de cópias de DNA (ENRIGHT, M C *et al.*, 2000).

8 CONCLUSÕES

Segundo resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

1. A técnica de PCR em tempo real pode ser uma importante aliada na detecção e diagnóstico dos casos de meningite pneumocócica nos casos em que a cultura bacteriológica apresenta-se negativa, tanto em quadros iniciais de infecção e quanto nos casos em que o paciente fez uso de antimicrobianos previamente à admissão na unidade de referência.
2. A técnica de Multiplex PCR para sorotipagem de *S. pneumoniae* adaptada ao uso direto em espécimes clínicos permitiu um ganho de cerca de 23% em resultados, que não poderiam ser obtidos sem o uso da referida técnica, sendo portanto importante em estudos de vigilância e observação da composição sorotípica local e suas tendências.
3. A técnica de MLST, apesar de importante para a obtenção de dados do perfil genotípico de *S. pneumoniae* nos casos onde a cultura apresentou resultado negativo, apresentou um baixo rendimento quando aplicada diretamente a espécimes clínicos de acordo com o protocolo utilizado neste estudo.
4. Dos 24 casos onde o resultado da cultura foi negativo, 87,5% tiveram o sorotipo capsular deduzido, sendo oito (33,3%) não vacinais e três (12,5%) de sorotipo não definido, mas provavelmente não vacinais, elevando o percentual de sorotipos não vacinais para cerca de 46%.
5. Uma vez que apenas 25,7% do total de casos de meningite bacteriana identificados no hospital tiveram amostra de LCR armazenadas e analisadas neste estudo, o percentual alto de sorotipos não vacinais (46%) entre os casos cultura negativa pode estar sendo subestimado.

REFERÊNCIAS

- ADEGBOLA R.A., OBARO S.K., BINEY E., G. B. M. Evaluation of Binax now Streptococcus pneumoniae urinary antigen test in children in a community with a high carriage rate of pneumococcus. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 20, n. 7, p. 718 - 719, 2001.
- ALBRICH, W. C.; BAUGHMAN, W.; SCHMOTZER, B.; FARLEY, M. M. Changing characteristics of invasive pneumococcal disease in Metropolitan Atlanta, Georgia, after introduction of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 44, n. 12, p. 1569-76, 15 jun 2007.
- ALEXANDRE, C.; DUBOS, F.; COUROUBLE, C.; PRUVOST, I.; VARON, E. Rebound in the incidence of pneumococcal meningitis in northern France : effect of serotype replacement. **Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)**, v. 99, n. 19, p. 1686-1690, 2010.
- AZZARI, C.; MORIONDO, M.; INDOLFI, G. *et al.* Molecular detection methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by Streptococcus pneumoniae in Italian children. **Journal of medical microbiology**, v. 57, n. Pt 10, p. 1205-12, out 2008.
- AZZARI, C.; MORIONDO, M.; INDOLFI, G. *et al.* Realtime PCR is more sensitive than multiplex PCR for diagnosis and serotyping in children with culture negative pneumococcal invasive disease. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9282, jan 2010.
- BERRY, A M.; LOCK, R. A; HANSMAN, D.; PATON, J C. Contribution of autolysin to virulence of Streptococcus pneumoniae. **Infection and immunity**, v. 57, n. 8, p. 2324-30, ago 1989.
- BRASIL. **Brasil - Ministério da Saúde/SVS SINAN NET**. Disponível em: <www.saude.gov.br>.
- BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8. ed. [S.l: s.n.], 2010b.
- BROUWER, M. C.; TUNKEL, A. R.; BEEK, D. V. D. Epidemiology , Diagnosis , and Antimicrobial Treatment of Acute Bacterial Meningitis. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 3, p. 467-492, 2010.
- CALIX, J. J.; NAHM, M. H. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated wcjE gene. **The Journal of infectious diseases**, v. 202, n. 1, p. 29-38, 1 jul 2010.
- CARBONNELLE, E. [Laboratory diagnosis of bacterial meningitis: usefulness of various tests for the determination of the etiological agent]. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 39, n. 7-8, p. 581-605, 2009.
- CARVALHO, M. D. G. S.; TONDELLA, M. L.; MCCAUSTLAND, K. *et al.* Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2460-6, ago 2007.

CHOI, Y. H.; JIT, M.; GAY, N. *et al.* 7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccination in England and Wales : Is It Still Beneficial Despite High Levels of Serotype Replacement ? **PloS one**, v. 6, n. 10, 2011.

CORLESS, C. E.; GUIVER, M.; BORROW, R.; FOX, A. J.; KACZMARSKI, E. B. Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in Suspected Cases of Meningitis and Septicemia Using Real-Time PCR. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 39, n. 4, p. 1553-1558, 2001.

DIAS, C. A.; TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, M. D. G.; BEALL, B. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. Pt 9, p. 1185-8, set 2007.

DOWELL, S. F.; GARMAN, R. L.; LIU, G.; LEVINE, O. S.; YANG, Y. H. Evaluation of Binax NOW, an assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, performed among pediatric patients. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 32, n. 5, p. 824-5, 1 mar 2001.

ENRIGHT, M C; KNOX, K.; GRIFFITHS, D.; CROOK, D. W.; SPRATT, B G. Molecular typing of bacteria directly from cerebrospinal fluid. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 627-30, ago 2000.

ENRIGHT, M C; SPRATT, B G. Multilocus sequence typing. **Trends in microbiology**, v. 7, n. 12, p. 482-7, dez 1999.

ENRIGHT, MARK C; SPRATT, BRIAN G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae* : identification of clones associated with serious invasive disease. **Microbiology**, v. 144, p. 3049-3060, 1998.

F. DUBOS, I. MARECHAL, M.O. HUSSON, C. COUROUBLE, M. AUREL, A. M. Decline in pneumococcal meningitis after the introduction of the heptavalent-pneumococcal conjugate vaccine in northern France. **Archive of Diseases in Childhood**, v. 92, p. 1009-1012, 2007.

FITCH, M. T.; BEEK, VAN DE D. Emergency diagnosis and treatment of adult meningitis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 191 - 200, 2007.

FITZWATER, S. P.; CHANDRAN, A.; SANTOSHAM, M.; JOHNSON, H. L. The Worldwide Impact of the Seven-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine. **The Pediatric infectious disease journal**, 9 fev 2012.

FRANÇOIS G. BRIVET, SOPHIE DUCUING, FRÉDÉRIC JACOBS, ISABELLE CHARY, ROGER POMPIER, DOMINIQUE PRAT, B. D. G. AND P. N. Accuracy of clinical presentation for differentiating bacterial from viral meningitis in adults: a multivariate approach. **Intensive care medicine**, v. 31, n. 12, p. 1654 - 1660, 2005.

GRAY, L. D.; FEDORKO, D. P. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. **Clinical microbiology reviews**, v. 5, n. 2, p. 130-45, abr 1992.

J.D. KELLNER, D.L. CHURCH, J. M. Progress in the prevention of pneumococcal infection. **Canadian Medical Association Journal**, v. 173, n. 10, p. 1149-1151, 2005.

JOHNSON, S. E.; DYKES, J. K.; JUE, D. L. *et al.* Inhibition of pneumococcal carriage in mice by subcutaneous immunization with peptides from the common surface protein pneumococcal surface adhesin a. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 4, p. 489-96, 15 fev 2002.

KADIOGLU, A.; WEISER, J. N.; PATON, JAMES C; ANDREW, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 288-301, abr 2008.

KARANIKA, M.; VASILOPOULOU, V. A; KATSIOLIS, A. T. *et al.* Diagnostic clinical and laboratory findings in response to predetermining bacterial pathogen: data from the Meningitis Registry. **PloS one**, v. 4, n. 7, p. e6426, jan 2009.

LYNCH, J. P.; ZHANEL, G. G. *Streptococcus pneumoniae* : Epidemiology , Risk Factors , and Strategies for Prevention. **SEMINARS IN RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE**, v. 30, n. 2, p. 189-209, 2009.

MAGAZZINI, S.; NAZERIAN, P.; VANNI, S. *et al.* Clinical picture of meningitis in the adult patient and its relationship with age. **Internal and emergency medicine**, n. January 2002, 15 mar 2012.

MAIDEN M.C.J. , BYGRAVES J.A., E. FEIL, G. MORELLI, J.E. RUSSELL, R. URWIN, Q. ZHANG, J. ZHOU, K. ZURTH, D.A. CAUGANT, I.M. FEAVERS, M. ACHTMAN, B. G. S. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Microbiology**, v. 95, n. March, p. 3140-3145, 1998.

MARRA, A.; LAWSON, S.; ASUNDI, J. S.; BRIGHAM, D.; HROMOCKYJ, A. E. In vivo characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. **Microbiology (Reading, England)**, v. 148, n. Pt 5, p. 1483-91, maio 2002.

MENEZES, A. P.; CAMPOS, L. C.; SANTOS, M. S. DOS; *et al.* Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007. **Vaccine**, v. 29, n. 6, p. 1139-44, 1 fev 2011.

MILLER E, ANDREWS N.J, WAIGHT P.A, SLACK M. P.E, G. R. C. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, p. 760 - 768, 2011.

MOORE, M. R.; GERTZ, R. E.; WOODBURY, R. L. *et al.* Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 7, p. 1016-27, 1 abr 2008.

MORAIS, L.; CARVALHO, M. D. G.; ROCA, A. *et al.* Sequential multiplex PCR for identifying pneumococcal capsular serotypes from South-Saharan African clinical isolates. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. Pt 9, p. 1181-4, set 2007.

- MURRAY P.R.; BARON E.J.; JORGENSEN J.H.; LANDRY M.L.; PFALLER M.A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th. ed. Washington, DC: ASM Press, 2007. p. 412 - 429
- PAI, R.; GERTZ, R. E.; BEALL, B. Sequential Multiplex PCR Approach for Determining Capsular Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* Isolates. v. 44, n. 1, p. 124-131, 2006.
- PELTOLA, V. Pneumococcal meningitis still with us in the era of conjugate vaccines. **Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)**, v. 99, n. 11, p. 1600-1, nov 2010.
- PELTON, S. I. Replacement pneumococcal disease in perspective. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, n. 9, p. 1353-5, 1 maio 2008.
- PITSIOU, G. G.; KIOUMIS, I. P. Pneumococcal vaccination in adults: does it really work? **Respiratory medicine**, v. 105, n. 12, p. 1776-83, dez 2011.
- PLETZ, M. W.; MAUS, U.; KRUG, N.; WELTE, T.; LODE, H. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. **International journal of antimicrobial agents**, v. 32, n. 3, p. 199-206, set 2008.
- QUADROS, C. A DE. From global to regional: the importance of pneumococcal disease in Latin America. **Vaccine**, v. 27 Suppl 3, p. C29-32, 21 ago 2009.
- RESTI, M.; MICHELI, A.; MORIONDO, M. *et al.* Comparison of the effect of antibiotic treatment on the possibility of diagnosing invasive pneumococcal disease by culture or molecular methods: a prospective, observational study of children and adolescents with proven pneumococcal infection. **Clinical therapeutics**, v. 31, n. 6, p. 1266-73, jun 2009.
- SACCHI, C. T.; FUKASAWA, L. O.; GONÇALVES, M. G. *et al.* Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e20675, jan 2011.
- SAHA, S. K.; DARMSTADT, G. L.; BAQUI, A. H. *et al.* Identification of serotype in culture negative pneumococcal meningitis using sequential multiplex PCR: implication for surveillance and vaccine design. **PloS one**, v. 3, n. 10, p. e3576, jan 2008.
- SAHA, S. K.; NAHEED, A.; EL ARIFEEN, S. *et al.* Surveillance for invasive *Streptococcus pneumoniae* disease among hospitalized children in Bangladesh: antimicrobial susceptibility and serotype distribution. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 48 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S75-81, 1 mar 2009.
- SCARBOROUGH, M.; THWAITES, G. E. The diagnosis and management of acute bacterial meningitis in resource-poor settings. **Lancet neurology**, v. 7, n. 7, p. 637-48, jul 2008.
- SÁ-LEÃO, R.; SIMÕES, A. S.; NUNES, S. *et al.* Identification, prevalence and population structure of non-typable *Streptococcus pneumoniae* in carriage samples isolated from preschoolers attending day-care centres. **Microbiology (Reading, England)**, v. 152, n. Pt 2, p. 367-76, fev 2006.
- TECHASAENSIRI, C.; MESSINA, A. F.; KATZ, K. *et al.* Epidemiology and evolution of invasive pneumococcal disease caused by multidrug resistant serotypes of 19A in the 8 years

after implementation of pneumococcal conjugate vaccine immunization in Dallas, Texas. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 29, n. 4, p. 294-300, abr 2010.

THIGPEN, M. C.; WHITNEY, C. G.; MESSONNIER, N. E. *et al.* Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 21, p. 2016-25, 26 maio 2011.

VALENZUELA, M. T.; O'LOUGHLIN, R.; LA HOZ, F. DE; *et al.* The burden of pneumococcal disease among Latin American and Caribbean children: review of the evidence. **Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health**, v. 25, n. 3, p. 270-9, mar 2009.

VIALON, A.; DESSEIGNE, N.; MARJOLLET, O. *et al.* Meningitis in adult patients with a negative direct cerebrospinal fluid examination: value of cytochemical markers for differential diagnosis. **Critical care (London, England)**, v. 15, n. 3, p. R136, jan 2011.

WERNO, A. M.; MURDOCH, D. R. Medical microbiology: laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, n. 6, p. 926-32, 15 mar 2008.

WHO. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. **Weekly epidemiological record**, v. 82, n. 12, p. 93-104, 2007.

WOLFSON, L. Estimating the costs of achieving the WHO-UNICEF Global Immunization Vision and Strategy, 2006-2015. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, n. 1, p. 27-39, 1 jan 2008.

XU, Q.; KAUR, R.; CASEY, J. R. *et al.* Identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in culture-negative middle ear fluids from children with acute otitis media by combination of multiplex PCR and multi-locus sequencing typing. **International journal of pediatric otorhinolaryngology**, v. 75, n. 2, p. 239-44, fev 2011.

CDC – Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recomm Rep** 1997;46 (RR-8):1–24.

Center for Disease Control and Prevention. *S. pneumoniae* Serotyping – Clinical specimen – Latin America set. www.cdc.gov/ncidod/biotech/files/pcr-Latin-Amer-clinical-specimens.pdf

APÊNDICES

APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Página 1 de 2

Hospital Couto Maia/Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

Título do Projeto: Meningite Bacteriana em Salvador, Brasil.

Paciente: _____ **No. de estudo:** _____

Para ser lido a todos os pacientes adultos e responsáveis legais dos pacientes menores:

As informações que se seguem descrevem o estudo de pesquisa e o seu papel como participante. O entrevistador responderá a quaisquer perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo de pesquisa. Por favor, ouça com atenção e não hesite em fazer qualquer pergunta sobre a informação que está sendo fornecida.

Objetivo do Estudo de Pesquisa:

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

Procedimento:

Se você voluntariamente decidir participar deste estudo de pesquisas após ter lido este formulário de consentimento, o investigador lhe fará perguntas relacionadas ao local onde você mora, sua ocupação (trabalho) e sua história médica. Irá ainda examiná-lo (a) buscando sinais da doença e lerá seu prontuário médico para obter os resultados de seus exames no hospital. O investigador, a partir de então, irá lhe fazer uma breve visita diária no período em que você estiver no hospital, lhe fará perguntas relativas ao seu estado de saúde e fará em pequeno exame. Não há nenhum risco na participação desse estudo de pesquisas.

Sigilo:

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

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo de pesquisas é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir de participar em qualquer momento do estudo de pesquisas se você quiser. Você não precisa responder a qualquer pergunta durante a entrevista ou avaliação diária. Sua recusa em participar no estudo de pesquisas ou em parte do mesmo, ou sua decisão de interromper sua participação, não afetará seu cuidado futuro de nenhuma forma, nem prejudicará suas relações com o

Hospital Couto Maia no presente ou no futuro. Uma cópia deste formulário lhe será dada para você. Você não será responsável por nenhuma despesa associada a este estudo de pesquisas, nem receberá compensação financeira.

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

Com quem contatar:

Se você tiver qualquer pergunta futura sobre sua participação neste estudo, ou sobre seus direitos como participante desta pesquisa, por favor, entre em contato com a Dra. Miralba Oliveira Silva pelo telefone: (071) 312-0084 ou diretamente no Hospital Couto Maia cujo endereço é Rua São Francisco, s/n, Monte Serrat, no. 40, CEP 40.425-001, Salvador, Bahia. Caso você tenha alguma pergunta no que se refere a você como indivíduo pesquisado, por favor, entre em contato com a Dra. Marilda Gonçalves, Presidente da Comissão de Ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 3356 4320.

Consentimento:

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

Assinatura do paciente (Incluindo Menores)

Data

Hora



Impressão datiloscopia do paciente

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

Assinatura do pai ou mãe ou responsável legal

Data

hora



Impressão datiloscopia do pai ou mãe ou guardião legal

Assinatura do Investigador

Data

Hora

Assinatura da testemunha

Data

Hora

Hospital Couto Maia/Secretaria da Saúde do Estado da Bahia
Assentimento para Menores na Investigação Clínica: Pág. 1

Título do Projeto: Meningite Bacteriana em Salvador, Brasil.

Paciente: _____ **Nº de Estudo:** _____

Para ser lido a todos os pacientes menores de idade: As informações que seguem serão para um estudo que estamos realizando. Será feita uma entrevista na qual você deverá responder algumas perguntas. Por favor, escute cuidadosamente e pergunte sobre qualquer dúvida que você tenha.

Nós estamos pedindo para você nos ajudar porque você tem uma infecção. Muitos sinais desta infecção são similares à doença causada por uma infecção nos tecidos que circundam o cérebro que se chama meningite. Nós gostaríamos de conseguir o máximo de informações possíveis para determinar a melhor maneira que podemos tratar e prevenir essa doença. Futuramente, suas informações ajudarão outras pessoas com esse problema.

Se você concordar em ajudar, nós faremos a você e a seus pais algumas perguntas. Nós só iremos te fazer algumas perguntas se você e seus pais concordarem.

Consentimento: Eu ouvi e entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Eu, voluntariamente, concordo em participar:

Assinatura do Paciente Menores de Idade	Data	Hora
<div style="border: 1px solid black; width: 80px; height: 60px; margin: 0 auto;"></div> Impressão Digital do Paciente		
Assinatura da Testemunha	Data	Hora
Assinatura do Investigador	Data	Hora

APÊNDICE II - QUESTIONÁRIOS DA PESQUISA



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Mon

Questionário M01IND01
Projeto: Meningite Bacteriana

Meningite Bacteriana em Salvador – Brasil				
Questionário de Dados Pessoais				
Etiqueta	1ª Digitação		2ª Digitação	
	D	D	D	DD
	GIND	DGIND	G2IND	G2IND

PARA PROTEGER A CONFIDENCIALIDADE DO PACIENTE, ESTE QUESTIONÁRIO DEVERÁ SER DESTACADO PELO GESTOR DO PROJETO OU INVESTIGADOR PRINCIPAL DEPOIS DA ENTREVISTA E ANTES QUE OS DADOS SEJAM DIGITADOS. TODOS OS QUESTIONARIO DO MESMO PACIENTE DEVEM TER NUMERO DE IDENTIFICAÇÃO UNICO (MB)

Data da Entrevista:	DEIND _ / _ / _
Iniciais do Entrevistador:	EIND _ _ _ _

I. IDENTIFICAÇÃO:

1.1	Nº de Identificação MB:	MB _ _ _ _ _
1.2	Termo de consentimento: Sim: <input type="checkbox"/> 1 Não: <input type="checkbox"/> 0	CONS <input type="checkbox"/>

2.1	Nome: _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	
2.2	Nº de Registro ou PA: Obs. 99 999 (não sabe PA) e 88 888 (outro hospital)	IDR _ _ _ _ _
2.3	Data de Admissão no HCM:	DA _ / _ / _
2.4	O paciente foi de outro hospital? Sim: <input type="checkbox"/> 1 Não: <input type="checkbox"/> 0 Se sim, Qual (QOUTROH): _ _ _ _ _ Obs. Se sim e não sabe 99 e se não 88	OUTROH _ _
2.5	Data de Nascimento:	NASC _ / _ / _

II. ENDEREÇO:		
3.1	Rua / N° (END): <input type="text"/> <input type="text"/> Obs. Não sabe 99 (PA) e não se aplica 88 (outro hospital)	
3.2	Telefone (n° e nome de contato): Obs. Não sabe 9999-9999 (PA) e não se aplica 8888-8888 (outro hospital)	TEL <input type="text"/> <input type="text"/>
3.3	Ponto de Referência (REF): <input type="text"/> <input type="text"/> Obs. Não sabe 99 (PA) e não se aplica 88 (outro hospital)	
3.4	Bairro (BAI): <input type="text"/> <input type="text"/> Obs. Não sabe 99 (PA) e não se aplica 88 (outro hospital)	
3.5	Cidade (CID): <input type="text"/> <input type="text"/> Obs. Não sabe 99 (PA) e não se aplica 88 (outro hospital)	
3.6	Mora em Pau da Lima/São Marcos Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não se aplica 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9 Obs: Não sabe 9 (PA) e não se aplica 8 (outro hospital)	PLM <input type="checkbox"/>

III. USO PRÉVIO DE ANTIBIÓTICOS:		
Obs. Se a pergunta 3.1 for não sabe (9) ou não (0), preencher as outras perguntas com não se aplica (8 ou 88, no caso de resposta escrita).		
3.1	O paciente usou antibióticos no último mês: (Resposta do Paciente) Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	AM3 <input type="checkbox"/>
3.2	Se usou, por quantos dias o paciente fez uso?	TEMPDIAS2 <input type="text"/> <input type="text"/>
3.3	Se usou, qual a data da última dose?	DAANT2 <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
3.4	Qual a via de administração? Oral <input type="checkbox"/> 1 Injetável <input type="checkbox"/> 0 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	ADM2 <input type="checkbox"/>
3.5	Se fez uso de antibióticos, onde adquiriu? Hospital <input type="checkbox"/> 1 Posto de Saúde <input type="checkbox"/> 2 Consultório médico <input type="checkbox"/> 3 Farmácia <input type="checkbox"/> 4 Família <input type="checkbox"/> 5 Outros <input type="checkbox"/> 6 NSA <input type="checkbox"/> 8	LAM2 <input type="checkbox"/>
3.6	Qual(is) antibióticos que o paciente usou no último mês (QA2): <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
3.7	Paciente tomou bactrim ou similares nos últimos 6 meses: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	BCT2 <input type="checkbox"/>
3.8	Qual a classe do antibiótico? Penicilinas <input type="checkbox"/> 1 SULFAS <input type="checkbox"/> 2 Cefalosporinas <input type="checkbox"/> 3 Quinolonas <input type="checkbox"/> 4 Macrolídeos <input type="checkbox"/> 5 Outro <input type="text"/> <input type="checkbox"/> 6 NSA <input type="checkbox"/> 8	QANT2 <input type="checkbox"/>



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Mon

Questionário M01EPI01
Projeto: Meningite Bacteriana
Parte: 1 de 2

Nº de MB : _____

Meningite Bacteriana em Salvador – Brasil					
Questionário Epidemiológico – preenchido para todos os pctes					
	Etiqueta	1ª Digitação		2ª Digitação	
		DGIND	DDGIND	DG2IND	DDG2IND
	Data do Preenchimento:				DEEPI / /
	Iniciais do Entrevistador:				EEPI _ _ _ _

I. IDENTIFICAÇÃO:

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

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

II. DADOS DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL:

2.1	Aspecto do líquido: Límpido <input type="checkbox"/> 1 Opalescente <input type="checkbox"/> 2 Purulento <input type="checkbox"/> 3 Hemorrágico <input type="checkbox"/> 4 Levemente hemorrágico <input type="checkbox"/> 5 Não sabe <input type="checkbox"/> 9 Xantocrômico <input type="checkbox"/> 7 Outro <input type="checkbox"/> 6	LIQASP	_ _
2.2	Dados líquóricos prejudicados: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0	PREJ	_ _
2.3	Contagem de leucócitos: (88888=não se aplica)	LLEU	_ _ _ _ _
2.4	Presença de hemácias: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8	LHEM	_ _
2.5	Predominância de PMNs (>50%): Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8	LPMN	_ _
2.6	Glicose: (888 =não sabe)	GLI	_ _ _ _
2.7	Proteínas: (888 =não sabe)	PROT	_ _ _ _

2.8	Resultado da Coloração pelo Gram:				DGC
	Não observou bactérias	<input type="text" value="0"/>	Observou bactérias	<input type="text" value="1"/>	<input type="text"/>
	Não realizado	<input type="text" value="8"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>	<input type="text"/>
2.9	Exame Direto pelo Gram:				GRAM
	não foram observadas bactérias	<input type="text" value="0"/>			<input type="text"/>
	cocos Gram positivos em cadeia	<input type="text" value="1"/>			<input type="text"/>
	cocos Gram positivos aglomerados	<input type="text" value="2"/>			<input type="text"/>
	cocos Gram positivos	<input type="text" value="3"/>			<input type="text"/>
	diplococos Gram positivos	<input type="text" value="4"/>			<input type="text"/>
	diplococos Gram negativos	<input type="text" value="5"/>			<input type="text"/>
	bacilos Gram negativos tipo <i>Haemophilus</i>	<input type="text" value="6"/>			<input type="text"/>
	bacilos Gram negativos	<input type="text" value="7"/>			<input type="text"/>
	bacilos Gram positivos	<input type="text" value="8"/>			<input type="text"/>
	outro _____	<input type="text" value="10"/>			<input type="text"/>
	não sabe	<input type="text" value="99"/>			<input type="text"/>
2.9.1	Cultura do Líquor:				CULT
	Negativo após 48h	<input type="text" value="0"/>	<i>N. meningitidis</i>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text"/>
	<i>S. pneumoniae</i>	<input type="text" value="2"/>	<i>Haemophilus sp.</i>	<input type="text" value="3"/>	<input type="text"/>
	<i>S. agalactiae</i>	<input type="text" value="4"/>	<i>Streptococcus sp.</i>	<input type="text" value="5"/>	<input type="text"/>
	<i>Staphylococcus sp.</i>	<input type="text" value="6"/>	<i>E. coli</i>	<input type="text" value="7"/>	<input type="text"/>
	<i>L. monocytogenes</i>	<input type="text" value="10"/>	<i>Salmonella sp.</i>	<input type="text" value="11"/>	<input type="text"/>
	<i>Shigella sp.</i>	<input type="text" value="12"/>	Outro _____	<input type="text" value="13"/>	<input type="text"/>
	não sabe	<input type="text" value="99"/>	não se aplica	<input type="text" value="88"/>	<input type="text"/>
2.9.2	Resultado da Hemocultura:				HP
	Negativa	<input type="text" value="0"/>	Positiva	<input type="text" value="1"/>	<input type="text"/>
	Não realizado	<input type="text" value="8"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>	<input type="text"/>
2.9.3	Se Hemocultura foi positiva, bactéria identificada:				HEMO
	Negativo após 48h	<input type="text" value="0"/>	<i>N. meningitidis</i>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text"/>
	<i>S. pneumoniae</i>	<input type="text" value="2"/>	<i>Haemophilus sp.</i>	<input type="text" value="3"/>	<input type="text"/>
	<i>S. agalactiae</i>	<input type="text" value="4"/>	<i>Streptococcus sp.</i>	<input type="text" value="5"/>	<input type="text"/>
	<i>Staphylococcus sp.</i>	<input type="text" value="6"/>	<i>E. coli</i>	<input type="text" value="7"/>	<input type="text"/>
	<i>L. monocytogenes</i>	<input type="text" value="10"/>	<i>Salmonella sp.</i>	<input type="text" value="11"/>	<input type="text"/>
	<i>Shigella sp.</i>	<input type="text" value="12"/>	Outro _____	<input type="text" value="13"/>	<input type="text"/>
	não sabe	<input type="text" value="99"/>	não se aplica	<input type="text" value="88"/>	<input type="text"/>
2.9.4	Aglutinação com Látex:				LATEX
	Negativo	<input type="text" value="0"/>	<i>N. meningitidis</i>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text"/>
	<i>S. pneumoniae</i>	<input type="text" value="2"/>	<i>H. influenzae</i>	<input type="text" value="3"/>	<input type="text"/>
	<i>Streptococcus</i> do grupo B	<input type="text" value="4"/>	<i>E. coli</i>	<input type="text" value="5"/>	<input type="text"/>
	Não sabe	<input type="text" value="9"/>	Não realizada	<input type="text" value="8"/>	<input type="text"/>

IV. INCLUSÃO EM OUTROS ESTUDOS:

4.1	Participa de outro estudo do grupo? Sim : <input type="text" value="1"/> Não: <input type="text" value="0"/>	ESTUDO1
4.2	Participa do estudo de pneumococos? Sim : <input type="text" value="1"/> Não: <input type="text" value="0"/>	SPN1
4.3	Nº no estudo de pneumococos?	SP1 <input type="text"/>
4.4	Participa do estudo de meningococos? Sim : <input type="text" value="1"/> Não: <input type="text" value="0"/>	SNM1
4.5	Nº no estudo de Meningiococos?	NM1 <input type="text"/>
4.6	Participa do estudo de Haemofilos? Sim : <input type="text" value="1"/> Não: <input type="text" value="0"/>	SHI1
4.7	Nº no estudo de Haemofilos?	HI1 <input type="text"/>
4.8	Participa no estudo de Outras Bactérias? Sim : <input type="text" value="1"/> Não: <input type="text" value="0"/>	SBAC1

4.9	Nº no estudo de outras bactérias?	NOBAC1	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
4.9.1	O liquor foi armazenado? Sim : <input type="checkbox"/> 1 Não: <input type="checkbox"/> 0	ALCR	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

V. DETECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NO LCR:

5.1	Detecção de antibiótico no LCR? Não <input type="checkbox"/> 0 Sim <input type="checkbox"/> 1 Não realizado <input type="checkbox"/> 2 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	LATB	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
5.2	Se sim, qual o tam do halo em mm?(88=Não se aplica, 99= Não sabe)	LHALO	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

VI. RESULTADO RT-PCR:

6.1	Foi feito RT-PCR Sim : <input type="checkbox"/> 1 Não : <input type="checkbox"/> 0	RTPCR	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>																		
6.2	Qual foi o resultado? <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td><i>S.pneumoniae</i></td><td>1</td></tr> <tr><td><i>N.meningitidis</i></td><td>2</td></tr> <tr><td><i>H.influenzae</i></td><td>3</td></tr> <tr><td>Outro</td><td>4</td></tr> <tr><td>Não se aplica</td><td>8</td></tr> <tr><td>Não Sabe</td><td>9</td></tr> </table>	<i>S.pneumoniae</i>	1	<i>N.meningitidis</i>	2	<i>H.influenzae</i>	3	Outro	4	Não se aplica	8	Não Sabe	9	RRTPCR	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>						
<i>S.pneumoniae</i>	1																				
<i>N.meningitidis</i>	2																				
<i>H.influenzae</i>	3																				
Outro	4																				
Não se aplica	8																				
Não Sabe	9																				
6.3	Qual o CT? (99,99=inconclusivo) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> , <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	QCT	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> , <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>																		
6.4	Se for <i>N.meningitidis</i> , qual o sorogrupo? <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td>A</td><td>1</td><td>B</td><td>2</td><td>C</td><td>3</td></tr> <tr><td>Y</td><td>4</td><td>W135</td><td>5</td><td>Outro</td><td>6</td></tr> <tr><td>Não se aplica</td><td>8</td><td>Não sabe</td><td>9</td><td></td><td></td></tr> </table>	A	1	B	2	C	3	Y	4	W135	5	Outro	6	Não se aplica	8	Não sabe	9			SORTPCR	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
A	1	B	2	C	3																
Y	4	W135	5	Outro	6																
Não se aplica	8	Não sabe	9																		



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Mon

Questionário M01EPI01
Projeto: Meningite Bacteriana

Parte: 2 de 2

Nº de MB : _____

Meningite Bacteriana em Salvador – Brasil				
Etiqueta	1ª Digitação		2ª Digitação	
	DGEPI2	DDGEPI2	DG2EPI2	DDG2EPI2

	Data de Revisão:	DEEPI2
	Iniciais do Entrevistador:	EEPI2
	Data de admissão no HCM:	
	Nº de registro no HCM:	

III. HISTÓRIA CLÍNICA:

3.1	Fonte de Infecção da Meningite: Pneumonia <input type="checkbox"/> 1 Otite Média <input type="checkbox"/> 2 Sinusite <input type="checkbox"/> 3 Sepsis ou Bacteremia <input type="checkbox"/> 4 Endocardite <input type="checkbox"/> 5 Abscesso <input type="checkbox"/> 6 T.C. E. ou fratura craniana <input type="checkbox"/> 7 I.V.AS <input type="checkbox"/> 8 Não identificado <input type="checkbox"/> 0 Não Sabe <input type="checkbox"/> 9 Outro _____ <input type="checkbox"/> 10 Não se aplica <input type="checkbox"/> 88			FIN <input type="checkbox"/>
	Se souber a fonte, qual foi a evidencia? (FINEVID) _____ Obs. Não sabe colocar 99 (PA); não se aplica colocar 88 (outro hospital)			
3.2	Antecedentes Médicos: 1=Sim/0=Não/8=NSA/9=Não sabe a) Tem doença crônica (CI): <input type="checkbox"/> Qual? (QCI) _____ b) Alcoolismo (AL) <input type="checkbox"/> c) Meningite anterior (MEN) <input type="checkbox"/> d) Imunodeficiência (IMD) <input type="checkbox"/> Qual?(QIMD) _____ Obs. Quando preencher as sentenças com 8 (outro hospital), qual deverá ser 88 Quando preencher as sentenças com 9 (pronto atendimento), qual deverá ser 99			
3.3	Foi hospitalizado no último mês: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9		PHP <input type="checkbox"/>	
	Se sim, onde?(LPHP) _____			

APÊNDICE III - LISTA DE PRIMERS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

Table 1: List of oligonucleotide primers used for pneumococcal serotype deduction

Primers*	GenBank accession no.	Primer sequence (5'-3')	Gene	Nucleotide position	Product size (bp)	Reference
1-f	CR931632	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA	wzy	9935	280	Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
1-r		CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C		10181		
2-f	CR931633	TAT CCC AGT TCA ATA TTT CTC CAC TAC ACC	wzy	10271	290	Carvalho <i>et al.</i> 2010, J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
2-r		ACA CAA AAT ATA GGC AGA GAG AGA CTA CT		10531		
3-f	CR931634	ATG GTG TGA ITT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G	gal U	9020	371	
3-r		CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G		9360		
4-f ²	CR931635	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G	wzy	9596	430	Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
4-r		GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G		9995		
5-f	CR931637	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG	wzy	6123	362	
5-r		GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG		6450		
6A/6B/6C/6D-f	CR931639	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG	wci P	8656	250	
6A/6B/6C/6D-r		TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA		8877		
6C/6D-f	EU714777.1	CAT TTT AGT GAA GTT GGC GGT GGA GTT	wci Nbeta	1441	727	Carvalho <i>et al.</i> 2009, J. Clin. Microbiol. 47: 557-559
6C/6D-r		AGC TTC GAA GCC CAT ACT CTT CAA TTA		2141		
7C/(7B/40)-f	CR931642	CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC GGG A	wcw L	9438	260	Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
7C/(7B/40)-r		GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC		9665		
7F/7A-f	CR931643	TCC AAA CTA TTA CAG TGG GAA TTA CGG	wzy	14683	599	Carvalho <i>et al.</i> 2010, J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
7F/7A-r		ATA GGA ATT GAG ATT GCC AAA GCG AC		15256		
8-f	CR931644	GAA GAA ACG AAA CTG TCA GAG CAT TTA CAT	wzy	11193	201	
8-r		CTA TAG ATA CTA GTA GAG CTG TTC TAG TCT		11364		
9N/9L-f	CR931647	GAA CTG AAT AAG TCA GAT TTA ATC AGC	wzx	11948	516	Dias <i>et al.</i> 2007, J. Med. Microbiol. 56: 1185-1189
9N/9L-r		ACC AAG ATC TGA CGG GCT AAT CAA T		12439		
9V/9A-f	CR931648	GGG TTC AAA G TC AGA CAG TG A ATC TTA A	wzy	9966	816	Carvalho <i>et al.</i> 2010, J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
9V/9A-r		CCA TGA ATG A AA TCA ACA TT G TCA GTA GC		10753		
10A-f	CR931649	GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC	wcr G	12423	628	Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
10A-r		GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C		13020		

10F(10C/33C)-f	CR931652	GGA GTT TAT CGG TAG TGC TCA TTT TAG CA	wzx	12403	248	Carvalho <i>et al.</i> 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
10F(10C/33C)-r		CTA ACA AAT TCG CAA CAC GAG GCA ACA		12624		
11A/11D-f	CR931653	GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G	wzy	11640	463	Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
11A/11D-r		GAT TAT GAG TGT AAT TTA TTC CAA CTT CTC CC		12071		
12F(12A/44/46)-f	CR931660	GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G	wzx	14407	376	Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
12F(12A/44/46)-r		CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC		14753		
13-f	CR931661	TAC TAA GGT AAT CTC TGG AAA TCG AAA GG	wzx	14005	655	Carvalho <i>et al.</i> 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
13-r		CTC ATG CAT TTT ATT AAC CG C TTT TTG TTC		14630		
14-f	CR931662	GAA ATG TTA CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT	wzy	7959	189	Dias <i>et al.</i> 2007, J. Med. Microbiol. 56: 1185-1189
14-r		GCC AAT ACT TCT TAG TCT CTC AGA TGA AT		8119		
15A/15F-f	CR931663	ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C	wzy	7804	434	Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
15A/15F-r		GAT CTA GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC		8212		
15B/15C-f	CR931665	TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA	wzy	7314	496	Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
15B/15C-r		CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C		7779		
16F-f ₁	CR931668	GAA TTT TTC AGG CGT GGG TGT TAA AAG	wzy	11679	717	Carvalho <i>et al.</i> 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
16F-r		CAG CAT ATA GCA CCG CTA AGC AAA TA		12371		
17F-f	CR931670	TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG	wci P	10484	693	Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
17F-r		GAT GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC		11145		
18/(18A/18B/18C/18F)-f	CR931673	CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC	wzy	12687	573	Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
18/(18A/18B/18C/18F)-r		TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC		13230		
19A-f	CR931675	GAG AGA TTC ATA ATC TTG CAC TTA GCC A	wzy	9603	566	Pimenta <i>et al.</i> 2009. J. Clin. Microbiol. 17: 2353-2354
19A-r		CAT AAT AGC TAC AAA TGA CTC ATC GCC		10142		
19F-f	CR931678	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C	wzy	11135	304	Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
19F-r		GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG		11407		
20-f	CR931679	GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G	wci L	9567	514	Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
20-r		CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC		10048		
21-f	CR931680	CTA TGG TTA TTT CAA CTC AAT CGT CAC C	wzx	13247	192	Carvalho <i>et al.</i> 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
21-r		GGC AAA CTC AGA CAT AGT ATA GCA TAG		13412		
22F/22A-f	CR931682	GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA TTG TC	wci V	11055	643	Pai <i>et al.</i> 2006, J.

22F/22A-r		CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC		11666			Clin. Microbiol. 44: 124-131
23A-f	CR931683	TAT TCT AGC AAG TGA CGA AGA TGC G	wzy	7739	722		
23A-r		CCA ACA TGC TTA AAA ACG CTG CTT TAC		8434			Carvalho <i>et al.</i> 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
23B-f	CR931684	CCA CAA TTA G CG CTA TAT TCA TTC AAT CG	wzx	13227	199		
23B-r		GTC CAC GCT GAA TAA AAT GAA GCT CCG		13399			
23F-f*	CR931685	GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC	wzy	8768	384		Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
23F-r		CAC AAC ACC TAA CAC TCG ATG GCT ATA TGA TTC		9119			
24/(24A, 24B, 24F)-f	CR931688	GCT CCC TGC TAT TGT AAT CTT TAA AGA G	wzy	11701	99		Carvalho <i>et al.</i> 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
24/(24A, 24B, 24F)-r		GTG TCT TTT ATT GAC TTT ATC ATA GGT CGG		11770			
31-f	CR931695	GGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGT GC	wzy	9144	701		
31-r		CCG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC		9815			
33F/(33A/37)-f	CR931702	GAA GGC AAT CAA TGT GAT TGT GTC GCG	wzy	11129	338		Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
33F/(33A/37)-r		CTT CAA AAT GAA GAT TAT AGT ACC CTT CTA C		11436			
34-f	CR931703	GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC	wzy	7350	408		
34-r		CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC		7725			
35A/(35C/42)-f	CR931704	ATT ACG ACT CCT TAT GTG ACG CGC ATA	wzx	14394	280		Carvalho <i>et al.</i> 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
35A/(35C/42)-r		CCA ATC CCA AGA TAT ATG CAA CTA GGT T		14646			
35B-f	CR931705	GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG	wcr H	10556	677		
35B-r		CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G		11199			
35F/47F-f	CR931707	GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A	wzy	7374	517		Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
35F/47F-r		GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC		7858			
38/25F/25A-f	CR931710	CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG	wzy	13848	574		
38/25F/25A-r		ATG TTT GAA TTA AAG CTA ACG TAA CAA TCC		14392			
39-f	CR931711	TCA TTG TAT TAA CCC TAT GCT TTA TTG GTG	wzy	12289	98		Carvalho <i>et al.</i> 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
39-r		GAG TAT CTC CAT TGT ATT GAA ATC TAC CAA		12357			
cps A-f	CR931662	GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC	wzg	1473	160		Pai <i>et al.</i> 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
cps A-r		GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC		1607			

*All serotypes that are co-detected are listed

APÊNDICE IV - AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

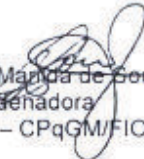
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

PARECER Nº 70/2005**Protocolo: 170****Projeto de Pesquisa: Meningite Bacteriana em Salvador, Brasil****Pesquisador Responsável: Dra. Joice Neves Reis Pedreira****Instituição ou Departamento: LPBM/FIOCRUZ****Considerações:**

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados pelo responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador, 10 de agosto de 2005



Dra. Mariana de Souza Gonçalves
Coordenadora
CEP - CPqGM/FIOCRUZ

Comitê de Ética em Pesquisa - Rua Waldemar Falcão, nº 121, Brotas, Salvador, Bahia, CEP 40295-001, Brasil

Tel: (71) 3356-8785 ramal. 239 Fax: (71) 3356-2155
e-mail: cep@cpqgm.fiocruz.br