



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

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E
MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA COLONIZAÇÃO NASOFARINGEANA POR *Streptococcus
pneumoniae* EM CRIANÇAS COM SUSPEITA CLÍNICA DE PNEUMONIA**

JAILTON DE AZEVEDO SILVA JÚNIOR

**Salvador-Bahia-Brasil
2011**

JAILTON DE AZEVEDO SILVA JÚNIOR

ESTUDO DA COLONIZAÇÃO NASOFARINGEANA POR *Streptococcus pneumoniae* EM CRIANÇAS COM SUSPEITA CLÍNICA DE PNEUMONIA

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz com requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Joice Neves Reis Pedreira
Co-orientadora: Dra Leila Carvalho Campos

**Salvador
2011**

*Dedico este trabalho a Sara Menezes
Reis, a melhor parte de mim em outro
ser.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, porque foi Ele quem me permitiu ingressar na pós-graduação e me deu inteligência, graça e perseverança durante toda minha caminhada.

À minha orientadora, Dra Joice Neves Reis, pelo zeloso instinto maternal e, em todo o tempo, por toda instrução e orientação logânima e pela importância de seus ensinamentos em minha formação científica.

À minha co-orientadora, Dra Leila Carvalho Campos, por me animar nos momentos difíceis, pelo valioso suporte nas padronizações experimentais e pelas exímias colaborações nos escritos.

Aos meus pais, Jailton Azevedo e Norma Dias, pela educação, amor e limites todos esses anos, esta conquista também é deles.

Aos meus irmãos Patrick e Peter Souza e suas respectivas esposas, pelo apoio e por acreditarem no meu potencial.

Aos amigos e colegas de equipe, Milena Soares, Ana Paula Menezes, Sara Lacerda, Viviane Maynard, Diego Rios, Lorena Galvão e André Silvany pela colaboração durante as etapas de execução deste trabalho.

Às minhas amigas Soraia Machado, companheira de todas as horas e que conquistou a minha amizade, e Vívian Galvão, meu braço direito no laboratório e nos experimentos realizados.

Às estudantes de iniciação científica Eliane Escobar e Mariela Correia, pelo apoio durante as atividades no laboratório.

Ao Professor Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, chefe do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular - LPBM, por permitir e dar suporte às etapas de execução laboratoriais deste trabalho.

Aos colegas do LPBM que vivenciaram todas as etapas do estudo e que de alguma forma colaboraram neste processo.

Aos meus amigos Éder Fialho, Luis Moraes e Carlos Kléber, por todos os bons momentos de convivência durante este período.

Aos parceiros da Unidade de Saúde de São Marcos, pelo esforço e dedicação e colaboração que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pacientes e os seus responsáveis legais, os quais, sem esta cooperação, este estudo não poderia ser concretizado.

Aos professores do corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa - PPgBSMI pelas contribuições no meu aprendizado e na minha formação ao longo do curso.

A todos os funcionários e servidores do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM que, de alguma forma, colaboraram durante a execução deste trabalho.

Às instituições que fomentaram com recursos financeiros todo o processo de execução e todas as etapas do estudo: a FAPESB [Convênio nº 1431040054051 e termo de outorga nº 075/2004 de 02/12/2004] e o CNPq [CNPq Universal nº 478685/2007].

Ao CPqGM, pela oportunidade de realização do mestrado, pelo financiamento da minha bolsa e pela estrutura física que permitiu a realização do trabalho.

*“Se julgo saber alguma coisa, com efeito
ainda, não aprendi como convém saber.”*

Apóstolo Paulo

RESUMO

Streptococcus pneumoniae constitui um dos mais importantes patógenos bacterianos do trato respiratório, podendo causar infecções invasivas e não invasivas, levando a altas taxas de morbi-mortalidade, particularmente em crianças menores de cinco anos de idade. A bactéria ganha acesso ao hospedeiro através da colonização da nasofaringe, que representa um importante reservatório para a transmissão deste patógeno na comunidade, contribuindo para a disseminação horizontal de *S. pneumoniae* entre os indivíduos de uma população. No presente estudo, procuramos caracterizar o perfil de colonização nasofaringeana por *S. pneumoniae* em pacientes menores de cinco anos de idade com suspeita clínica de pneumonia, atendidos na Unidade de Saúde de São Marcos, Bairro de Pau da Lima, Salvador, no ano de 2009. Um total de 205 swabs foram coletados entre as crianças consideradas elegíveis para o estudo. Os isolados de *S. pneumoniae* foram identificados através de métodos microbiológicos clássicos e a determinação do sorogrupo/sorotipo foi realizada empregando-se a técnica de Multiplex-PCR. A sensibilidade a sete antimicrobianos foi testada através da técnica de microdiluição em caldo, sendo que os isolados com CIM para penicilina $\geq 0,125 \mu\text{g/mL}$ foram considerados não-susceptíveis. A técnica de PFGE foi realizada para 26 isolados correspondentes aos sorotipos mais frequentes e associados a não-sensibilidade à penicilina (sorotipos 14, 19F e 23F). Um total de 72 (35,1%) crianças foram diagnosticadas com pneumonia, sendo 39 (54,2%) menores de dois anos de idade. A taxa de colonização geral foi de 50,2%, não havendo diferença entre essas taxas quando se considerou o grupo de crianças confirmadas e suspeitas para pneumonia. Crianças na faixa etária de 36 a 47 meses formaram o grupo com maior risco de ter pneumonia bacteriana (OR: 3.17 [1.29-7.88]). Entre os sorotipos encontrados, o sorogrupo 6 (6A/6B) (17,3%) foi predominante, seguido dos sorotipos 14 (15,4%), 19F (10,6%), sorogrupo 15 (15B/15C) (9,6%), 23F (6,7%) e o sorotipo 19A (6,7%). Os demais sorotipos e sorogrupos compreenderam 33,7%. O padrão de sorotipos foi semelhante aqueles encontrados nos casos de meningite pneumocócica na cidade de Salvador. Um total de 41 isolados (39,8%) apresentaram CIM $\geq 0,125 \mu\text{g/mL}$ para penicilina e a resistência a SMX-TMP foi identificada em 69,2% dois isolados. A tipagem por PFGE identificou 11 padrões eletroforéticos, sendo que a maioria dos isolados do sorotipo 14 estavam relacionados a clones amplamente disseminados entre os casos de doença pneumocócica ("A" e "GK"). Um total de 50,5% dos isolados foram de sorotipos inclusos na vacina decavalente (PCV10) e considerando os isolados não-susceptíveis à penicilina, esta representatividade foi de 90,2%. O estudo ressalta a importância de um contínuo monitoramento do perfil de sorotipos na colonização nasofaringeana por *S. pneumoniae*, no período pós-vacina e da necessidade de busca de novos métodos de diagnóstico que otimizem a definição da pneumonia.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*; colonização nasofaringeana; pneumonia; PCV10; vigilância.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is one of the most important bacterial pathogens of the respiratory tract, causing invasive and noninvasive infections, leading to high rates of morbidity and mortality, particularly among children under five years old. The bacterium gains access to the host by colonizing the nasopharynx, which represents an important reservoir for transmission of this pathogen in the community, contributing to the horizontal spread of *S. pneumoniae* among individuals in a population. In this study, we sought to characterize the profile of nasopharyngeal colonization by *S. pneumoniae* in patients under five years of age with clinical suspicion of pneumonia seeking medical care at the Unidade de Saúde de São Marcos, District of Pau da Lima, Salvador, in 2009. A total of 205 swabs were collected from children eligible for the study. The isolates of *S. pneumoniae* were identified by classical methods and the determination of the serogroup / serotype was performed using the technique of multiplex-PCR. The sensitivity to seven antibiotics was tested by the microdilution broth method, and strains with MIC for penicillin \geq 0.125 mg/mL were considered non-susceptible. The PFGE technique was performed for 26 strains corresponding to serotypes more frequent and associated with non-susceptibility to penicillin (serotypes 14, 19F and 23F). A total of 72 (35.1%) children were diagnosed with pneumonia, 39 (54.2%) less than two years old. The overall colonization rate was 50.2%, with no difference between those rates when considering the children's group confirmed and suspected to pneumonia. Children aged 36 to 47 months formed the group with higher risk for bacterial pneumonia (OR: 3.17 [1.29-7.88]). Among the serotypes, serogroup 6 (6A/6B) (17.3%) predominated, followed by serotypes 14 (15.4%), 19F (10.6%), serogroup 15 (15B/15C) (9.6%), 23F (6.7%) and serotype 19A (6.7%). The other serotypes and serogroups comprised 33.7%. The pattern of serotypes was similar to those found in cases of pneumococcal meningitis in Salvador. A total of 41 isolates (39.8%) had MIC \geq 0.125 mg / mL and resistance to TMP-SMX was identified in 69.2% of isolates. Molecular typing identified 11 electrophoretic patterns, whereas most isolates of serotype 14 was associated with widespread clones among cases of pneumococcal disease ("A" and "GK"). The 10-valent conjugate vaccine (PCV10) implemented in Brazil shows a coverage of 50.5% from serotypes in the population and 90.2% for isolates not susceptible to penicillin. The study underscores the importance of continued monitoring of the prevalence of serotypes in nasopharyngeal colonization by *S. pneumoniae*, in the post-vaccine era, and the need to search for new methods for diagnosing pneumonia.

Key-words: *Streptococcus pneumoniae*; nasopharyngeal colonization; pneumonia; PCV10; surveillance.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Características gerais dos pacientes com suspeita clínica de pneumonia atendidos na UESM, de março a dezembro de 2009, estratificados pela confirmação do diagnóstico ($N=205$).	53
Tabela 2. Tabela 2 - Distribuição dos sorotipos/sorogrupos de <i>S. pneumoniae</i> isolados da nasofaringe de crianças com suspeita clínica de pneumonia, 2009, estratificados pela confirmação do diagnóstico ($n=104$).	55
Tabela 3. Perfil de Sensibilidade antimicrobiana dos 103 isolados de <i>S. pneumoniae</i> obtidos da nasofaringe de crianças com suspeita clínica de pneumonia, 2009.	59
Tabela 4. . Associação entre sorotipos/sorogrupos e perfil de sensibilidade à penicilina nos isolados de <i>S. pneumoniae</i> da nasofaringe de crianças com suspeita clínica de pneumonia.	60
Tabela 5. Frequência dos sorotipos/sorogrupos dos isolados de <i>S. pneumoniae</i> da nasofaringe de crianças com pneumonia e crianças saudas da comunidade, 2008/2009.	62

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Coloração de Gram de secreção respiratória, mostrando diplococos Gram positivos característicos de pneumococos e células polimorfonucleares (PMN).	18
Figura 2. Morfologia macroscópica das colônias do <i>Streptococcus pneumoniae</i> em meio ágar sangue, demonstrando a α -hemólise.	19
Figura 3. Micrografia eletrônica do <i>Streptococcus pneumoniae</i> destacando um dos fatores de virulência mais importantes: a cápsula polissacarídica.	20
Figura 4. Distribuição global da letalidade por pneumonia em crianças menores de cinco anos.	25
Figura 5. Dendrograma comparativo dos isolados de <i>Streptococcus pneumoniae</i> da nasofaringe com isolados de meningite pneumocócica.	65

LISTA DE GRÁFICOS

Página

Gráfico 1. Frequência de atendimento de crianças menores de cinco anos na UESM durante o período do estudo - Março a Dezembro de 2009. 50

Gráfico 2. Perfil dos sorotipos predominantes de *S. pneumoniae* isolados de três grupos: crianças saudáveis, crianças doentes e pacientes com meningite pneumocócica. 57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BTS	<i>British Thorax Society</i>
CDC	Centers for Diseases Control
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DATP	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP	Deoxicitidina trifosfato
dGTP	Deoxiguanosina trifosfato
dNTP	Deoxirribonucleotídeo trifosfato
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
FR	Frequência Respiratória
HCM	Hospital Couto Maia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPD	Doença Pneumocócica Invasiva
IRA	Infecção Aguda do Trato Respiratório
LEMB	Laboratório de Epidemiologia Molecular e Bioestatística
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
NEB	Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística
NS	Não-susceptível
NT	Não-tipável
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Razão de Odds
PAC	Pneumonia Adquirida na Comunidade

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCV7	Vacina Pneumocócica Conjugada 7-Valente
PCV10	Vacina Pneumocócica Conjugada 10-Valente
PCV13	Vacina Pneumocócica Conjugada 13-Valente
PFGE	Eletroforese em Campo Pulsátil
PPV	Vacina Pneumocócica Polissacarídica (23-Valente)
RSV	Vírus Respiratório Sincicial
S	Sensível
SLV	Do inglês, <i>Single Locus Variant</i>
ST	Sequência Tipo
STX-TMP	Sulfametoxazol-trimetoprim
TE	Tris-EDTA
TSA	<i>Ágar Trypticato de Soja</i>
UESM	Unidade de Saúde de São Marcos
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE GRÁFICOS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
INTRODUÇÃO	17
1.1 – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	17
1.2 – Colonização	21
1.3 – Emergência de <i>Streptococcus pneumoniae</i> Resistentes à Penicilina	22
1.4 – Epidemiologia das Infecções Respiratórias	23
1.5 – Métodos de Diagnóstico das Pneumonias	25
1.6 – Vacinas Pneumocócicas	28
1.7– Sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> Associados à Colonização Nasofaringeana	30
1.8 – Justificativa	31
OBJETIVOS	34
2.1 – Geral	34
2.2 – Específicos	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 – Desenho do Estudo Epidemiológico	35
3.1.1 – Tipo e Local do Estudo	35

3.1.2 – População Estudada	35
	Página
3.1.3 – Coleta de Dados Epidemiológicos	37
3.2 – Caracterização Microbiológica	38
3.2.1 – Coleta das Amostras	38
3.2.2 – Isolamento e Identificação	39
3.2.2.1 – Teste de Sensibilidade à Optoquina	39
3.2.2.2 – Teste de Solubilidade em Bile	40
3.2.3 – Conservação dos Isolados de <i>S. pneumoniae</i>	40
3.3 – Sorotipagem de <i>S. pneumoniae</i> através de Multiplex-PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)	41
3.4 – Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos	43
3.5 – Caracterização Genotípica de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	44
3.5.1 – Eletroforese em campo pulsátil (<i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i> , PFGE)	44
3.5.1.1 – Preparo do DNA em Blocos de Agarose e Digestão	45
3.5.1.2 – Tratamento enzimático	46
3.5.1.3 – Eletroforese	46
3.5.1.4 – Análise dos Padrões Eletroforéticos e Determinação dos Clones	47
3.6 – Análise dos Dados	47
3.7 – Aspectos Éticos do Estudo	48
RESULTADOS	49
4.1 – Caracterização dos Pacientes Atendidos na UESM e Incluídos no Estudo	49

4.2 – Caracterização dos Sorogrupos/Sorotipos de <i>S. pneumoniae</i>	54
4.3 – Caracterização dos isolados de <i>S. pneumoniae</i> quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos	58
4.4 – Perfil de Colonização das Crianças Sadias	61
4.5 – Tipagem Molecular	63
DISCUSSÃO	66
CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	80
Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	
Anexo II – Questionários Individuais e Epidemiológicos do Estudo	
Anexo III – Lista de <i>primers</i> utilizados no Multiplex-PCR	
Anexo IV – Critérios do CLSI 2010 para determinação da sensibilidade antimicrobiana do <i>Streptococcus pneumoniae</i> e <i>breakpoints</i> do CLSI 2010 da cepa de controle de qualidade <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	
Anexo V – Folha de aprovação do Comitê de ética - Fiocruz	

INTRODUÇÃO

1.1 – *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é o agente infeccioso mais frequente em doenças invasivas e infecções do trato respiratório, tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento (OBARO & ADEGBOLA, 2002). Se apresenta como cocos Gram positivos encapsulados com um diâmetro de 0,5-1,25 µm, dispondo-se aos pares ou em cadeias curtas, com as bordas circunvizinhas achatadas e às vezes com extremidades lanceoladas, forma reconhecida como “chama de vela” ou “lanceta” (Figura 1) (KADIOGLU *et al.*, 2008). Este patógeno é responsável por altas taxas de mortalidade em todo o mundo, principalmente em grupos de risco como crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Estima-se que o *S. pneumoniae* seja responsável por 2 milhões de pneumonias fatais por ano em todo o planeta, o que corresponde a cerca de metade das mortes por pneumonia em crianças com idade menor que cinco anos. Nos países em desenvolvimento, *S. pneumoniae* causa 70.000 mortes/ano por meningite e semelhante número de óbitos por sepse em crianças (OBARO & ADEGBOLA, 2002).

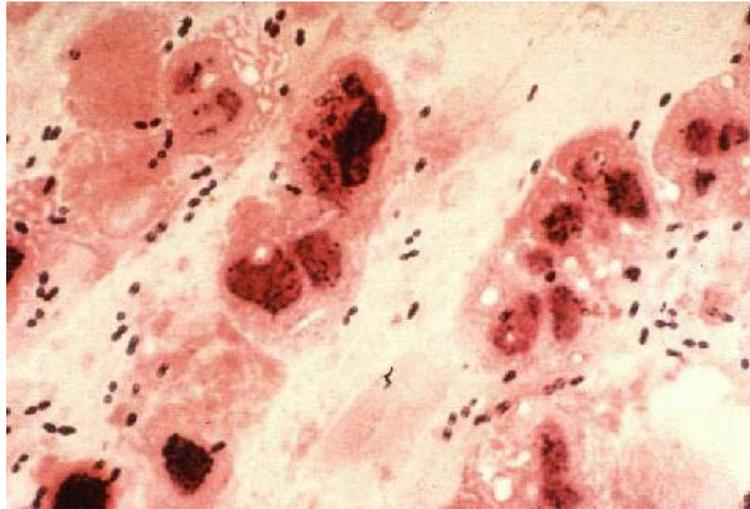


Figura 1. Coloração de Gram de secreção respiratória, mostrando diplococos Gram positivos característicos de pneumococos e células polimorfonucleares (PMN).

Fonte: www.bact.wisc.edu/.../S.pneumoniae.jpg

Esta bactéria foi descoberta por dois pesquisadores quase que simultaneamente, Sternberg em setembro de 1880 nos Estados Unidos da América e Pauster em dezembro do mesmo ano na França, através do isolamento do microrganismo em ratos inoculados com saliva humana. Sendo a princípio denominado de “*Micrococcus Pasteuri, Sternberg*”, no decorrer de alguns anos, passou a ser chamado de *Streptococcus pneumoniae*, “*Streptococcus*” por apresentar pelo método do Gram a mesma estrutura dos estreptococos e “*pneumoniae*” por ser considerado agente etiológico da pneumonia. Carl Friedländer o relacionou à pneumonia em 1882 quando examinava cortes histológicos de pulmões de oito pacientes; depois outros pesquisadores relacionaram esse patógeno com outras doenças como a meningite, artrite, bacteremia e sinusite (AUSTRIAN, 1985).

Similar às demais espécies do gênero *Streptococcus*, estas bactérias são anaeróbias facultativas, não produzem catalase e crescem bem em ágar sangue em atmosfera enriquecida com CO₂. Quando cultivada em ágar sangue de carneiro a 5%,

as colônias são brilhantes, translúcidas ou mucóides, promovendo α -hemólise, que é evidenciada pela cor esverdeada do meio de cultivo (Figura 2) (KADIOGLU *et al.*, 2008). A estrutura bioquímica do *S. pneumoniae* consiste basicamente na sua membrana celular com dupla camada lipídica envolvida por uma parede bacteriana, que é formada de peptídeoglicano associado ao polissacarídeo C, sendo este último idêntico a todos os sorotipos da bactéria e induzindo anticorpos não-protetores. A característica desta biomolécula foi originalmente utilizada na detecção da proteína C reativa no soro humano (OBARO & ADEGBOLA, 2002; KADIOGLU *et al.*, 2008).



Figura 2. Morfologia macroscópica das colônias do *Streptococcus pneumoniae* em meio ágar sangue, demonstrando a α -hemólise.

Muitos fatores de virulência têm sido descritos e associados ao potencial de patogenicidade do *S. pneumoniae*, podendo-se destacar as pneumolisinas, moléculas de superfície tais como neuraminidasas, autolisinas, proteínas ligadoras de colina, entre outros fatores que favorecem a invasão (KADIOGLU *et al.*, 2008). Além disso, *S. pneumoniae* possui uma cápsula polissacarídica (Figura 3) que constitui um importante fator de virulência para a doença pneumocócica invasiva, conferindo atributos fundamentais que garantem a sua permanência no hospedeiro e sua posterior invasão. De acordo com sua estrutura molecular, os pneumococos podem ser classificados em diversos sorotipos diferentes (PARK *et al.*, 2007) e até o

momento, existem 48 sorogrupos e 92 sorotipos identificados (CALIX & NAHM, 2010). A cápsula é caracterizada como um polímero de alto peso molecular, composto de subunidades oligossacarídicas repetitivas, que se apresentam em número de uma a oito moléculas cada. A sua função principal é proteger a bactéria da fagocitose e, além disso, esta estrutura é considerada o principal fator de virulência deste patógeno (KADIOGLU *et al.*, 2008).

Esta grande variedade de sorotipos é distinguida por características de virulência, potencial de invasibilidade, entre outros fatores (ROBINSON *et al.*, 2001). A prevalência dos tipos capsulares varia com a idade, tempo e região geográfica (BOGAERT *et al.*, 2004). De modo geral, cerca de 20 sorotipos estão associados com > de 80% dos casos de doença pneumocócica invasiva que ocorre em todas as faixas etárias (HAUSDORFF *et al.*, 2000; WHITNEY *et al.*, 2003). Na América Latina, 13 sorotipos mais frequentes são responsáveis por cerca de 85% das doenças invasivas (DI FABIO *et al.*, 2001; GARCIA *et al.*, 2006; LAVAL *et al.*, 2006).

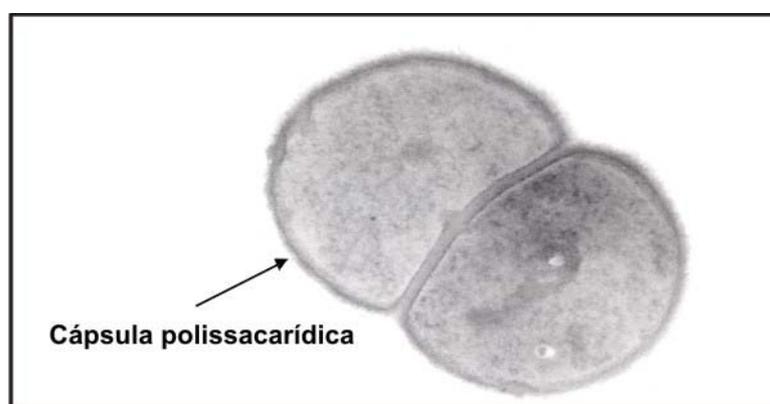


Figura 3. Micrografia eletrônica do *Streptococcus pneumoniae* destacando um dos fatores de virulência mais importantes: a cápsula polissacarídica (seta). Fonte: PLETZ M. W. *et al.*, (2008)

1.2 – Colonização

A colonização é uma condição necessária para ocorrência da doença (BOGAERT *et al.*, 2004). A bactéria ganha acesso ao hospedeiro através da colonização da nasofaringe e o sucesso deste processo depende tanto da virulência do sorotipo colonizante quanto da eficiência do sistema imune do hospedeiro (WOODS, 2008). A partir da nasofaringe, a bactéria pode se espalhar para a mucosa adjacente e causar doença invasiva. Entretanto, a maioria dos indivíduos colonizados por esta bactéria permanece assintomática, sendo o *S. pneumoniae* considerado um componente comum da flora nasofaringeana em indivíduos saudáveis (BOGAERT *et al.*, 2004).

A maioria das crianças é colonizada durante os primeiros dois anos de vida e podem apresentar diversos eventos de colonização na nasofaringe até os cinco anos de idade, de modo que um indivíduo também pode ser colonizado por mais de um sorotipo simultaneamente (GRAY *et al.*, 1982; MEATS *et al.*, 2003). De fato, a colonização nasofaringeana em crianças menores de cinco anos representa um importante reservatório para a transmissão deste patógeno na comunidade (BOGAERT *et al.*, 2004). Apenas uma pequena proporção das crianças colonizadas desenvolve uma infecção invasiva, mas os pneumococos isolados da nasofaringe representam as amostras circulantes na comunidade (FADEN *et al.*, 1997). Este fato contribui para a disseminação horizontal de pneumococos entre os indivíduos de uma população. Ao mesmo tempo, condições precárias de vida, número de crianças nos domicílios e infecções frequentes no trato respiratório são fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento da doença invasiva (PETROSILLO *et al.*, 2002; PETTIGREW *et al.*, 2008). Fatores inerentes ao hospedeiro também influenciam nas

taxas de colonização, entre eles, idade, gênero, perfil genético, amamentação e exposição a ambientes com tabagistas, o que diferencia o perfil epidemiológico deste patógeno (PETTIGREW *et al.*, 2008).

1.3 – Emergência de *S. pneumoniae* Resistentes à Penicilina

Nos últimos anos, a importância deste microrganismo tem aumentado devido ao surgimento de cepas resistentes aos principais antimicrobianos de uso para tratamento de infecções adquiridas na comunidade, como os β -lactâmicos e macrolídeos (KO *et al.*, 2000; MONACO *et al.*, 2005; BRANDILEONE *et al.*, 2006). No período pré-antimicrobiano, as formas mais graves de infecção por *S. pneumoniae* eram responsáveis por taxas de mortalidade de 80-100% (MANTESE, 1999). Este quadro mudou significativamente com redução da taxa de mortalidade para 30% após a introdução da penicilina na terapêutica médica (MANTESE, 1999; BEREZIN *et al.*, 2007). Entretanto, a partir dos anos 80, têm ocorrido um aumento do número de casos de infecção por *S. pneumoniae* resistentes à penicilina em diversas regiões do mundo, ameaçando os benefícios alcançados durante o período pós-antimicrobiano.

O aumento da incidência de infecções pneumocócicas causadas por cepas resistentes aos antimicrobianos tem sido atribuído a um limitado número de sorotipos e clones multiresistentes do patógeno que se dispersaram ao longo do tempo (KO *et al.*, 2000; MCGEE *et al.*, 2001; KLUGMAN, 2002). De modo geral, as cepas resistentes aos antimicrobianos estão restritas a poucos sorotipos comumente associados com colonização nasofaríngea em crianças (CORSO *et al.*, 1998). O mecanismo de resistência aos antimicrobianos da classe das penicilinas e outros β -

lactâmicos está associado às modificações nos genes que codificam as proteínas ligadoras de penicilina e outras enzimas envolvidas na síntese do peptidoglicano, que são os sítios-alvo de ação desses antimicrobianos (MANTESE, 1999). Assume-se que a aquisição dos determinantes de resistência por alguns desses clones ocorre por pressão seletiva devido ao consumo indiscriminado de antimicrobianos.

No contexto brasileiro, a resistência à penicilina se evidenciou rapidamente após o surgimento do primeiro caso, relatado em 1988. Estudos colaborativos de vigilância laboratorial de cepas realizados em laboratórios de referência nacional apresentam um aumento de quase três vezes na proporção de isolados clínicos não-susceptíveis à penicilina. De 1993 a 2004, a taxa de *S. pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina (PNSP) aumentou de 10,2 para 27,8% (BRANDILEONE *et al.*, 2006). Já na cidade de Salvador, entre casos de meningite pneumocócica, no período de 1995 a 1999, a taxa de PNSP era de 15%, com susceptibilidade total à cefotaxima; resistência elevada foi encontrada para sulfametoxazol-trimetoprim (35%) e tetraciclina (28%) – considerando os intermediários e resistentes para os todos os pacientes incluídos nesta vigilância (REIS *et al.*, 2002). Estas evidências enfatizam a importância da prevenção da doença pneumocócica através da imunização.

1.4 – Epidemiologia das Infecções Respiratórias

Infecções agudas do trato respiratório (IRAs) permanecem como uma importante causa de mortalidade em crianças menores de cinco anos nos países em desenvolvimento e são definidas pela classificação internacional de doenças como infecções que atingem as vias aéreas seguindo a epiglote (WILLIAMS *et al.*, 2002;

RUDAN *et al.*, 2008). As manifestações agudas que englobam as IRAs são: traqueíte, laringite, infecções nos pulmões e também uma combinação destas com infecções das vias aéreas superiores, incluindo influenza (LANATA *et al* 2004; RUDAN *et al*, 2004).

Cerca de 80% das mortes por IRA são atribuídas à pneumonia, uma doença grave que atinge o trato respiratório inferior e que se dissemina especificamente nos pulmões (RUDAN *et al.*, 2004; RUDAN *et al.*, 2008; RANGANATHAN & SONNAPPA, 2009). Nos Estados Unidos e Europa, na era pré-vacinal, anualmente 36-40 casos de pneumonia/1.000 habitantes ocorriam em crianças menores de cinco anos e cerca de 11 a 16 casos entre aquelas de 5-14 anos de idade (JUVEN *et al.*, 2000). Por outro lado, nos países em desenvolvimento, as taxas de pneumonia podem ser consideravelmente mais altas, totalizando uma mortalidade global de dois milhões/ano de óbitos entre crianças menores de cinco anos (BRYCE *et al.*, 2005; RANGANATHAN & SONNAPPA, 2009) (Figura 4). No Brasil, uma vigilância de base populacional conduzida na região central demonstrou uma taxa de incidência de 566 casos/100.000 crianças menores de cinco anos com pneumonia por confirmação radiológica. Na Bahia, um estudo comunitário conduzido por Sant'anna *et al.* (2010) em uma unidade primária de saúde em Salvador relatou uma incidência de 38,4 casos/1.000 crianças menores que cinco anos.

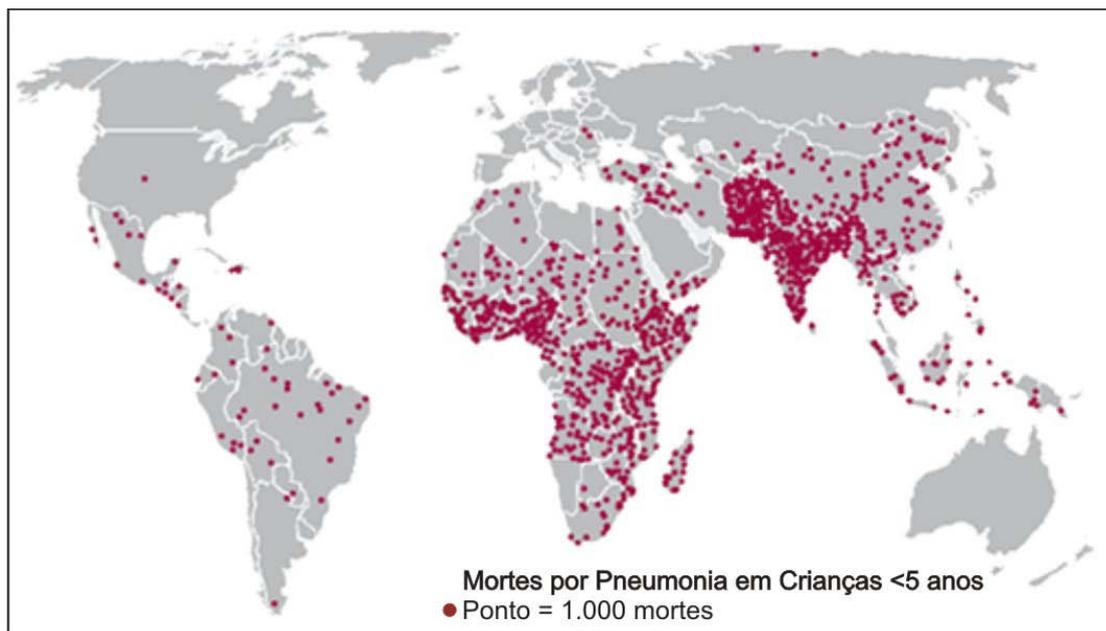


Figura 4. Distribuição global da letalidade por pneumonia em crianças menores de cinco anos. Adaptação: OMS, 2000.

1.5 – Métodos de diagnóstico das pneumonias

A pneumonia pode ser adquirida na comunidade (PAC) ou ser de origem nosocomial (RANGANATHAN & SONNAPPA, 2009). A PAC é definida clinicamente pela presença de sinais e sintomas de pneumonia em uma criança previamente sadia devido a uma infecção adquirida fora do ambiente hospitalar. A abordagem diagnóstica envolve os achados clínicos, radiológicos e microbiológicos ou a associação entre os três (UNICEF, 2006; CABRE, 2009; RANGANATHAN & SONNAPPA, 2009). Nos países em desenvolvimento é comum utilizar o termo infecção das vias aéreas do trato inferior, refletindo a dificuldade em se realizar a radiografia de tórax (BTS, 2002).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza que a investigação das manifestações clínicas nos pacientes pode detectar crianças com pneumonia. O

protocolo da OMS pode ser ordenado através de um simples fluxograma que compreende três etapas essenciais:

- I) Identificar as crianças suspeitas de pneumonia para serem examinadas;
- II) Identificar os casos de pneumonia (classificar o caso);
- III) Instituir o tratamento apropriado (tratamento no domicílio ou referenciar).

O protocolo da OMS define, ainda, dois sinais como “critério de entrada”, baseados no exame da criança para possível diagnóstico de pneumonia: tosse ou dificuldade de respirar e taquipnéia (WHO, 1995; BTS, 2002). Os critérios de detecção desses parâmetros clínicos baseiam-se na investigação da frequência respiratória (FR), a qual é atribuída de acordo com a faixa etária da criança: $FR > 50$ incursões/min para crianças \leq dois meses de idade e $FR > 40$ /min e presença de infiltrado no raio X de tórax para as crianças de 1-5 anos de idade. Também são levados em consideração os seguintes sinais para os maiores de dois meses até cinco anos de idade: dificuldade de deglutir ou amamentar, vômitos frequentes, convulsões, letargia e/ou perda da consciência (WHO, 1995). A efetividade da conduta do treinamento e supervisão que o profissional recebe pode interferir no impacto deste agravo na localidade (WHO, 1981).

A aplicação desta estratégia possibilita ao profissional de saúde identificar todas as crianças com algum sinal de infecção respiratória e classificá-la em termos de gravidade, aplicar o tratamento adequado e conduzir aquelas que podem ser tratadas no domicílio. Além disso, permite identificar quais crianças necessitam ser assistidas em ambulatório ou referenciadas para hospitalização e quais têm a necessidade de tratamento com antimicrobianos.

A grande maioria das infecções respiratórias em pacientes pediátricos tem sido associada a diversos agentes etiológicos virais, entre eles o vírus sincicial respiratório (RSV), principal vírus relacionado às PAC. Entre outros vírus, destacam-se: parainfluenza, adenovírus, rinovírus, varicela zoster vírus, influenza, citomegalovírus, herpes simples vírus e enterovírus (BTS, 2002; MICHELOW *et al.*, 2004; MULHOLLAND, 2007; PETTIGREW *et al.*, 2008; RANGANATHAN & SONNAPPA, 2009).

Embora os vírus respiratórios sejam a principal causa de infecções respiratórias em crianças nos primeiros 2-3 anos de vida, agentes bacterianos como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* representam a principal causa bacteriana das PAC (SHANN, 1986; JUVEN *et al.*, 2000; MICHELOW *et al.*, 2004; RUDAN *et al.*, 2008). Em torno de cinco milhões de crianças com idade inferior a cinco anos morrem anualmente por pneumonia pneumocócica (HAUSDORFF *et al.*, 2000; GARCIA *et al.*, 2006).

É difícil determinar o impacto destes dois agentes na doença porque as atuais técnicas para estabelecer a etiologia são de baixa sensibilidade e especificidade e os resultados de cultura de faringe nem sempre revelam o agente etiológico que está causando a doença. A cultura bacteriana de espécimes de aspirado dos pulmões é considerada padrão ouro, mas não é utilizada na rotina da prática médica em virtude da laboriosidade do método, aplicado somente em pacientes submetidos à hospitalização (SIMÕES *et al.*, 2006).

Um dos maiores desafios na abordagem das pneumonias é a identificação do agente etiológico, uma vez que em 20 a 60% dos casos não se consegue obter a etiologia. Devido a esta limitação, é extremamente difícil avaliar a eficácia das estratégias comumente adotadas e o seu conseqüente impacto em determinadas

populações. Em muitos países desenvolvidos, os diagnósticos são realizados por profissionais treinados e baseiam-se não somente em critérios clínicos, mas também em estudos radiológicos. Estas medidas são pouco frequentes na maioria dos países em desenvolvimento (SHAPIRO, 1998).

1.5 – Vacinas Pneumocócicas

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

Atualmente, existem duas classes de vacinas pneumocócicas que têm sido amplamente utilizadas: as polissacarídicas e as conjugadas. A vacina polissacarídica pneumocócica 23-polivalente (PPV) compreende 23 sorotipos de *S. pneumoniae* e foi disponibilizada nos Estados Unidos em 1983. No ano de 2003, a cobertura alcançada para esta vacina no grupo alvo – indivíduos maiores que dois anos com alguma doença de base ou com idade ≥ 65 anos – foi de 64% para os idosos e 37% para pessoas com 18 a 64 anos com diabetes (GARCIA *et al.*, 2006). No Brasil, a PPV foi implementada no mesmo público-alvo, sendo que os sorotipos da PPV representam 86,2% dos sorotipos de *S. pneumoniae* invasivos em todo o país e 85%

para os casos de meningite pneumocócica em Salvador (REIS *et al.*, 2002; FEIJO *et al.*, 2006).

As vacinas conjugadas têm como base na sua formulação os sorotipos mais frequentes na doença pneumocócica invasiva, particularmente associados à resistência às drogas comumente utilizadas na terapêutica. Além disso, esta classe de vacinas possui atributos que, ao contrário das vacinas polissacarídicas, induzem a memória imunológica do sistema de defesa humano, pela presença, na sua formulação, de moléculas que contribuem para este processo, denominadas adjuvantes.

A vacina pneumocócica conjugada heptavalente (PCV7) é constituída dos sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Nos Estados Unidos, a introdução da PCV7 no ano de 2000 resultou em um dramático declínio da doença invasiva causada por *S. pneumoniae* em crianças e também entre adultos, em função do efeito da “imunidade em rebanho” (WHITNEY *et al.*, 2003). Por outro lado, este declínio foi acompanhado, por um aumento na prevalência de alguns sorotipos não emergentes, não contidos na vacina PCV7, como o 19A (HICKS *et al.*, 2007).

No Brasil, em função dos esforços do Ministério da Saúde, a implantação da vacina pneumocócica conjugada decavalente (PCV10) no programa de imunização nacional ocorreu no ano de 2010 (BRASIL, 2010). Esta vacina possui os sorotipos da PCV7 acrescidos dos sorotipos 1, 5 e 7F.

Muitos estudos epidemiológicos têm sido focalizados na avaliação da eficácia das vacinas conjugadas implementadas nos países desenvolvidos e o que usualmente se têm observado é o aumento da incidência de IPD por sorotipos que não estão contidos nas vacinas PCV7 e PCV10, principalmente o 19A. (TECHASAENSIRI *et al.*, 2010; ANSALDI *et al.*, 2011; TARRAGO *et al.*, 2011).

Aliado a este fator, uma nova formulação da vacina conjugada foi construída: a vacina pneumocócica conjugada trisdecavalente (PCV13), que, além de englobar os sorotipos presentes na PCV7 e PCV10, têm em sua formulação os sorotipos 3, 6A e 19A.

1.6 – Sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* Associados à Colonização Nasofaringeana

Os tipos capsulares associados à nasofaringe dos portadores assintomáticos apresentam variações que são influenciadas por diversos fatores, tais como, região geográfica (intra e inter países), grupos etários e condições socioeconômicas dos indivíduos (OBARO & ADEGBOLA, 2002; BOGAERT *et al.*, 2004). Entretanto, de uma forma geral, a distribuição dos sorotipos nesses portadores é bastante semelhante, se considerarmos apenas os países industrializados. Nestes países podemos destacar o predomínio dos sorotipos 19F, 6B, 6A, 14, 18C e 23F colonizando crianças menores de três anos de idade (SYROGIANNOPOULOS *et al.*, 2000; BOGAERT *et al.*, 2001; SYRJANEN *et al.*, 2001; COLES *et al.*, 2002; COLES *et al.*, 2009). Por outro lado, nos países em desenvolvimento, a distribuição dos sorotipos é ligeiramente diferenciada, sendo adicionalmente importante os sorogrupos 15, 33, 12 e 3 (SZMIGIELSKA *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2008).

Na América Latina, a frequência de sorotipos é similar as encontradas em países americanos e europeus, com o predomínio dos sorotipos 14, 6A, 6B, 19F e 23F (GOMEZ-BARRETO *et al.*, 2002; LAVAL *et al.*, 2006; PARASKAKIS *et al.*, 2006; BEREZIN *et al.*, 2007; OZDEMIR *et al.*, 2008). Estudos de colonização conduzidos em algumas regiões do Brasil demonstram taxas de colonização nos

portadores que variam de 13,9% a 72%, com destaque para as crianças que frequentam creches (REY, WOLF, MOREIRA, MILATOVIC *et al.*, 2002; LUCAREVSCHI *et al.*, 2003; LAVAL *et al.*, 2006; CARDOZO *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2008; FRANCO *et al.*, 2010).

Em um estudo conduzido em um grupo de crianças menores que cinco anos com infecção respiratória aguda (IRA), em São Paulo, Ferreira e cols. (2001) observaram uma taxa de colonização de 34,8%. Já em Fortaleza, Rey e cols. (2002), trabalhando com um grupo de crianças com diagnóstico de pneumonia, descreveram uma taxa de 50% de portadores, inferior ao percentual (72%) encontrado em crianças de creches no mesmo estudo. Em Salvador, Reis e cols. (2008) verificaram um percentual de colonização de 66,6% em crianças saudáveis menores que cinco anos de idade, com predominância dos sorotipos 19F, 23F, 18C, 14, 6B e 6A.

1.7 – Justificativa

A colonização nasofaríngea consiste em uma via essencial e elementar para delinear o impacto da doença pneumocócica invasiva e sua consequente prevenção. Isso porque a colonização não é somente uma condição obrigatória para a ocorrência da doença, mas também é a base da disseminação horizontal deste patógeno. Embora todos os alvos dos programas vacinais estejam focados na redução da doença invasiva, eles também procuram prevenir a colonização por pneumococos, o chamado “objetivo secundário” ou “benefício indireto” dos programas vacinais.

Compreender as características epidemiológicas da doença pneumocócica dentro de uma população é importante para o desenho e avaliação de estratégias de

prevenção. Na era das vacinas conjugadas protéicas, um contínuo monitoramento sobre a distribuição de sorotipos na população é imprescindível para avaliação do impacto e adequação das vacinas conjugadas (GHAFAR *et al.*, 2004). Além disto, vários estudos demonstram que as vacinas conjugadas são efetivas na redução da colonização nasofaringeana podendo conferir proteção a populações não-alvo através da “imunidade por rebanho” (TAKALA *et al.*, 1991; BARBOUR, 1996; FORLEO-NETO *et al.*, 1999).

A incidência da doença e a distribuição de sorotipos são importantes parâmetros para se compreender a mudança epidemiológica da doença invasiva por *S. pneumoniae*. Alia-se a isto, a emergência da resistência aos antimicrobianos em amostras de *S. pneumoniae*, o que pode aumentar significativamente o custo do tratamento, a duração da hospitalização, o risco de mortalidade e a ocorrência de complicações em crianças com doença invasiva por esta bactéria.

Existem evidências demonstrando que portadores de doença pneumocócica invasiva carregam a mesma cepa de pneumococos na nasofaringe concomitante à manifestação clínica da doença (GIVON-LAVI *et al.*, 2002; DE ANDRADE *et al.*, 2003). Consequentemente, isolados de pneumococos da nasofaringe podem ser utilizados como parâmetro para predizer perfis de sensibilidade a antimicrobianos utilizados em abordagens terapêuticas na doença invasiva, bem como na formulação de vacinas, ressaltando o impacto epidemiológico do agravo em uma determinada comunidade.

Com o pressuposto de que embora a presença de pneumococos na nasofaringe e, mais particularmente, de um determinado sorotipo durante a pneumonia não evidencia o seu papel causal, é plausível supor que a doença pneumocócica seja causada pelo sorotipo presente na nasofaringe e assumir que o

potencial da doença em relação a um determinado sorotipo é proporcional ao risco de ser colonizado durante a doença ou não.

OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Caracterizar os isolados de *Streptococcus pneumoniae* em eventos de colonização uma população pediátrica com suspeita clínica de pneumonia.

2.2 – Objetivos Específicos

1. Determinar a taxa de colonização nasofaringeana por *S. pneumoniae* durante visitas ambulatoriais por suspeita clínica de pneumonia;
2. Determinar o perfil de sensibilidade de *S. pneumoniae* isolados da nasofaringe por suspeita clínica de pneumonia;
3. Determinar os sorotipos mais frequentes de *S. pneumoniae* isolados na nasofaringe dos pacientes com suspeita clínica de pneumonia;
4. Correlacionar o perfil de sorotipos de *S. pneumoniae* com os presentes na vacina pneumocócica decavalente na população estudada;
5. Determinar a composição clonal dos isolados de *S. pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Desenho do Estudo Epidemiológico

3.1.1 – Tipo e Local do Estudo

Estudo transversal que foi conduzido na Unidade de Emergência de São Marcos (UESM), Bairro de Pau da Lima e no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ. A UESM é a principal unidade pública de emergência referência para os moradores do Distrito Sanitário de Pau da Lima. De acordo com o censo demográfico do IBGE, realizado no ano de 2000, o Distrito Sanitário possui uma população de 190.776 habitantes e destes, 18.516 são crianças menores de cinco anos de idade, sendo que 7.395 crianças menores de cinco anos estão concentradas no bairro de Pau da Lima, localidade elegida para o desenvolvimento do estudo (IBGE, 2000).

Esta mesma comunidade foi escolhida para o desenvolvimento do estudo de coorte de 203 crianças menores de cinco anos e, no período de janeiro a dezembro de 2008, foram realizadas quatro coletas de seguimento trimestrais (MENEZES, em andamento)

3.1.2 – População Estudada

Crianças com Pneumonia

Todas as crianças menores de cinco anos que procuraram atendimento pediátrico na UESM com infecção aguda do trato respiratório (IRA) foram consideradas elegíveis para participarem do estudo. O recrutamento foi realizado no

período de março a dezembro de 2009, no horário das 8:00 às 16:00 horas (exceto nos finais de semana e feriados), após autorização do responsável legal através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO I). O recrutamento foi realizado por uma técnica em enfermagem devidamente treinada, na Sala de Espera da Unidade de Emergência, após consulta com o pediatra.

Os critérios de definição de caso suspeito de pneumonia infantil foram definidos de acordo com a OMS, ou seja: paciente com idade inferior a cinco anos que apresentava taquipnéia associada à tosse (< de uma semana de duração), verificada pela frequência respiratória acima de 50 incursões por minuto (ipm) em crianças de até 11 meses e 40 rpm em crianças acima de um ano. Associado a isto, foram adicionados os achados radiológicos compatíveis com pneumonia, pela confirmação do pediatra, de acordo com critérios da OMS (WHO, 1995).

Os pacientes com suspeita clínica de pneumonia e com solicitação de raio-X foram incluídos no estudo de colonização, sendo as imagens de raio-X digitalizadas e encaminhadas para avaliação secundária por um radiologista. O critério para confirmação de pneumonia foi: paridade entre diagnóstico do pediatra da UESM e do radiologista, por detecção de consolidação e/ou quaisquer presença de fluido pleural compatíveis com pneumonia. Os casos que não foram incluídos neste critério foram considerados como pneumonia não confirmada ou outras IRA's.

Crianças menores de 30 dias e/ou que não tiveram sinais clínicos de pneumonia e/ou que o responsável legal não permitisse a participação no estudo não fizeram parte da casuística final.

Recrutamento de Crianças Sadias

Em janeiro de 2008, 203 crianças menores de cinco anos de idade e sadias foram selecionadas de forma aleatória entre os residentes de uma área limitada do Bairro de Pau da Lima, Salvador (BA) para participarem do estudo de coorte de colonização nasofaringeana durante um ano. Foram realizadas um total de quatro coletas de *swab* de nasofaringe, com intervalos de 3 a 4 meses entre cada coleta. Para cada criança selecionada foi obtido o consentimento do responsável legal através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As crianças sadias foram recrutadas em seus domicílios, segundo amostra randômica estratificada para os 66 setores censitários de Pau da Lima, sendo um universo de 7.395 crianças menores de cinco anos. Os domicílios foram visitados e os critérios para inclusão das crianças foram: ser menor que cinco anos de idade, ser residente e domiciliada na comunidade de Pau da Lima. Os critérios de exclusão do estudo foram: estar com algum indício de doença infecciosa, tais como febre, tosse, irritabilidade e inapetência.

3.1.3 – Coleta de Dados Epidemiológicos

Informações demográficas e clínicas foram obtidas através de um questionário estruturado aplicado à mãe ou responsável pela criança nos locais de recrutamento (ANEXO II). Este questionário era composto de quatro páginas, subdivididas em cinco seções com variáveis que foram preenchidas utilizando informações da entrevista, do cartão vacinal do paciente e da revisão dos prontuários médicos. Foi realizado treinamento para os entrevistadores quanto ao

preenchimento dos formulários. Cada entrevista percorreu um tempo médio aproximado de 10 minutos.

3.2 – Caracterização Microbiológica

O processamento das culturas, os procedimentos microbiológicos de identificação, os testes de sorotipagem e os ensaios de sensibilidade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular - LPBM. Foi necessária a criação e manutenção de um banco de dados no programa EpiInfo, para serem utilizados para as análises, no Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística (NEB).

3.2.1 – Coleta das Amostras

Todos os pacientes elegíveis foram submetidos à coleta de material de nasofaringe. Uma haste flexível com ponta de alginato de cálcio estéril (*swab*), (Venturini Transystem[®] Sodium Thioglycollate 116C, COPAN, USA) foi introduzida cuidadosamente na fossa nasal da criança em repouso, até uma distância correspondente ao comprimento nariz-ouvido, ou menor, quando ocorresse resistência à penetração do *swab*. Uma vez retirado, este foi imediatamente colocado em um tubo plástico estéril contendo meio de transporte *Amies*, identificado e encaminhado para processamento no LPBM.

3.2.2 – Isolamento e Identificação

No laboratório, os *swabs* foram rolados levemente sobre a quarta parte de uma placa de ágar sangue (AS), TSA (ágar soja-tripcticase) (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado e de 5 µg/mL de gentamicina (Sigma – Aldrich, Germany). Utilizou-se uma alça bacteriológica para espalhar o material sobre a placa, de forma a permitir o crescimento individualizado de colônias. As placas foram então incubadas a 35°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24h a 48 horas.

Três colônias α-hemolíticas sugestivas de *S. pneumoniae* foram re-semeadas em nova placa de AS e incubadas a 35°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24h para realização dos testes de sensibilidade a optoquina e bile solubilidade (BOWEN *et al.*, 1957).

3.2.2.1 – Teste de Sensibilidade à Optoquina

Para a execução do teste de sensibilidade à optoquina, as colônias α-hemolíticas foram semeadas em placa de ágar sangue, em três direções e em seguida, foi colocado de forma estéril sobre a semeadura, um disco de 5µg de optoquina (BD – BBL Sensi – Disc, Becton Dickinson and Company, USA), com posterior incubação a 35° C em atmosfera de 5% de CO₂ (BOWEN *et al.*, 1957). A leitura do teste foi realizada após 24 horas com a medida do halo de inibição de crescimento. Os isolados que apresentaram diâmetro igual ou maior que 14 mm em volta do disco foram considerados sensíveis à optoquina, identificando-os como *S.*

pneumoniae. Os isolados mostrando zonas de inibição à optoquina entre 8 e 14 mm foram submetidos ao teste de solubilidade em bile para confirmação da espécie.

3.2.2.2 – Teste de Solubilidade em Bile

O teste de solubilidade em bile foi realizado empregando-se uma solução de desoxicolato de sódio a 2% (Sigma – Aldrich, Germany). As bactérias cultivadas em placas de AS foram suspensas em 2 mL de solução salina a 0,9%, com turvação ajustada para o padrão 1,0 da escala de McFarland (10^{16} UFC/mL). Alíquotas de 1,0 mL da suspensão foram distribuídas em dois tubos, sendo um teste e outro controle. Ao tubo teste foi adicionado 1,0 mL da solução de desoxicolato de sódio a 2% e ao tubo controle foi adicionado 1,0 mL de solução de salina. Os tubos foram agitados delicadamente e incubados a 35° C e observados a cada 15 minutos por um período de até duas horas quanto ao desaparecimento ou não da turvação no tubo teste (lise dos pneumococos no tubo contendo sal biliar).

3.2.3 – Conservação dos isolados de *S. pneumoniae*

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

3.3. - Sorotipagem de *S. pneumoniae* através de Multiplex-PCR

A sorotipagem capsular de *S. pneumoniae* foi realizada através da técnica de Multiplex PCR, padronizada e implementada pelo laboratório de *Streptococcus*, *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC), Atlanta, EUA (CDC, 2010). Esta metodologia pode definir até 40 sorotipos/sorogrupos em sete reações de PCR Multiplex com *primers* específicos (ANEXO III) para cada sorotipo/sorogrupo.

Para o preparo do DNA molde, todo o crescimento de cada amostra de *S. pneumoniae* em placa de AS foi suspenso em 300 µL de salina a 0,85% estéril, sendo logo após aquecido em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas por 5 minutos a 12.000 rpm a 4°C, descartando-se o sobrenadante. Ao *pellet*, foi adicionado 65 µL de solução de lise [tampão Tris-EDTA 25 mM, mutanolisina a 3.000 unidades/mL (Sigma Aldrich, Germany), hialuronidase a 30 mg/mL (Sigma Aldrich, Germany)] e incubados à 37°C por 2 horas. A solução de lise foi inativada incubando-se as preparações a 100°C por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm a 4°C, coletando-se o sobrenadante em novo tubo, o qual foi mantido a -20 °C até a realização das reações de PCR (como DNA molde).

Para cada reação de PCR foram utilizados os seguintes componentes: mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Biolabs *Inc.*, New England, USA) – 200 µM; tampão de reação (Promega[®], USA) – 1X; *Taq*-DNA-polimerase (Promega[®], USA) (2U); cloreto de magnésio (MgCl₂ – Promega[®], USA) – 3,5 mM, *primer* iniciador direto e *primer* iniciador reverso (Prodimol[®], Chile) – 25 µM de cada, de acordo com o conjunto de *primers* utilizados por reação descritos no Anexo IV; DNA molde – 2,5 µL

e água deionizada esterilizada em quantidade suficiente para completar 25 µL, volume total da reação. Todos os pares de *primers* utilizados nas reações, após sua diluição, foram testados com controles sabidamente positivos para cada sorotipo/sorogrupo específico antes de serem utilizados. Estes controles positivos foram os isolados com sorotipo previamente conhecido através da reação de *Quellung*. Paralelamente, em cada reação e eletroforese, utilizou-se um volume total de 25 µL sem adição do DNA molde, como controle negativo. Todas as reações continham o *primer cpsa*, que identifica 97% dos isolados de *S. pneumoniae*. Este *primer* foi utilizado como controle interno da reação.

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

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

O perfil dos sorotipos predominantes identificados neste estudo de colonização foi comparado com o perfil dos sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* isolados de pacientes com meningite pneumocócica de Salvador e região metropolitana atendidos no Hospital Couto Maia (HCM) nos anos de 2008 e 2009.

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

3.4 – Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

As amostras de *S. pneumoniae* foram submetidas aos testes de susceptibilidade através do método de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2010), empregando-se os seguintes antimicrobianos: cefotaxima (0,062 – 64µg/mL), clindamicina (0,016 – 32µg/mL), eritromicina (0,016 – 32µg/mL), penicilina (0,031 – 64µg/mL), sulfametoxazol/trimetoprim (0,125/2,375 – 64/1216µg/mL), tetraciclina (0,062 - 64µg/mL) e levofloxacina (0,016 - 32µg/mL) (SIGMA – ALDRICH, Germany).

Os testes foram realizados em placas com 96 orifícios e fundo em forma de “U” (Corning, New York, USA). As placas foram preparadas contendo o meio de Mueller-Hinton Broth (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) com ajuste de cátions e acrescido de 5% de sangue de cavalo lisado. Os antimicrobianos foram diluídos em cada poço da placa em ordem crescente de concentração. Uma vez preparadas, as placas foram estocadas por até dois meses em freezer a – 20°C.

O preparo do inóculo foi realizado a partir do cultivo da bactéria por 24 horas. O isolado foi suspenso em 0,9% de salina com uma turvação padrão equivalente à escala de 0,5 de McFarland. Após 15 minutos esta suspensão foi diluída na proporção de 1:100, utilizando o meio de *Agar Mueller - Hinton* com adição de cátions e acrescido de 5% de sangue de cavalo lisado, obtendo uma concentração equivalente a 1×10^6 UFC / mL. Adicionou-se 50 μ L desta suspensão ao poço da placa contendo 50 μ L da solução antibiótica, obtendo uma concentração final da bactéria de aproximadamente 5×10^5 UFC / mL. As placas foram incubadas a 35°C por 20 – 24 horas. A cepa padrão ATCC 49 619 foi utilizada como controle em todos os testes realizados.

A leitura para indicar a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento do microorganismo foi realizada visualmente a partir da detecção de turvação do meio de cultivo no poço ou formação de um botão de 2 mm, definida em comparação com controles através de poços sem antibiótico.

A definição de sensibilidade foi realizada com base na referência de valores indicados pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”, 2010 (CLSI, 2010) (ANEXO IV). Para a análise da sensibilidade à penicilina foram utilizados os breakpoints definidos para isolados de “meningite” (CLSI, 2010).

3.5 – Caracterização Genotípica de *Streptococcus pneumoniae*

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

A caracterização dos padrões clonais dos isolados de *S. pneumoniae* considerados mais frequentes e/ou comumente invasivos foi realizada através de

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

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

3.5.1.1 – Preparo do DNA em Blocos de Agarose e Digestão

As amostras de *S. pneumoniae* mantidas a -70° C passaram por dois cultivos consecutivos em ágar sangue a 35°C, por 18 horas cada um, em atmosfera de 5% de CO₂ e em seguida, com o auxílio de uma alça bacteriológica, foi preparada uma suspensão bacteriana em 1 mL de solução de cloreto de sódio estéril a 0,85% até atingir absorvância (OD_{650nm}) de 0,5 (5 x 10⁹ UFC/mL). Esta suspensão foi centrifugada por 2 minutos x 12.000 rpm, a 4° C e ressuspensa em tampão 300 µL PIV (Tris 10mM, pH 8,0; 1M NaCl). Em seguida, foi adicionado 300 µL de agarose *Low melting point* (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, USA) a 2,0%, preparada em

tampão PIV e mantida a 65°C. Após cuidadosa agitação, a suspensão foi dispensada nos moldes de blocos. Os blocos foram então incubados com solução de lise (tampão EC) contendo 1 mg/mL de lisozima e 5.000 U/mL de mutanolisina a 37°C por 18 horas; e depois de quatro lavagens consecutivas com TE (Tris 1M, pH 8,0; EDTA 0,5M pH 8,0) por 30 minutos, novamente incubadas em outra solução de lise (tampão ES) acrescido de 20 µL de proteinase K (Sigma Aldrich, Germany) a 25 mg/mL a 56°C por 24 horas. Após a lise do DNA, os blocos foram incubados à temperatura ambiente sob leve homogeneização com 10 mL de tampão TE por duas horas para lavagem. As lavagens foram repetidas por mais quatro vezes.

3.5.1.2 – Tratamento Enzimático

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

3.5.1.3 – Eletroforese

Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose a 1% utilizando o sistema CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, USA). A eletroforese foi processada em TBE 0,5% (Tris - borato 0,045M, EDTA 0,001M, pH 8,0), a 14°C em corrente 200 volts, com pulsos de tempo inicial de 1 segundo e tempo final de 20 segundos por 21 horas. Em cada gel foi utilizado um marcador externo de pares de

bases de 50-1,000 Kb (*Pulse Marker* - Sigma), aplicado nas extremidades. Após eletroforese os géis foram corados com brometo de etídio (10mg/mL) e as imagens foram digitalizadas pelo sistema de captura de imagem *Eagle Eye II* (Stratagene) e arquivadas como imagens em arquivos do tipo TIFF.

3.5.1.4 – Análise dos Padrões Eletroforéticos e Determinação dos Clones

Os padrões de restrição dos fragmentos foram analisados e comparados tendo por base os critérios de Tenover e cols. (1995), através da posição e número de bandas. O *software* utilizado foi o GelCompar II (Applied Maths, St. Martens, Belgium) de modo que os critérios para a definição dos padrões foram: **isolados indistinguíveis** - Quando possuíam o mesmo número e posição de bandas; **isolados clonalmente relacionados** - Quando possuíam três bandas ou menos de diferença, consistente como um único evento genético; **isolados possivelmente relacionados** – Quando possuíam de quatro a seis bandas de diferença, o que consiste com dois eventos genéticos independentes; **isolados não relacionados** - Quando possuíam mais de seis bandas de diferença, consistente com mais de três eventos genéticos.

3.6 – Análise dos Dados

O programa Epi INFO – *for Windows* versão 3.4 (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, GA, 2007) foi utilizado para o armazenamento e a análise dos dados. Teste de Qui – quadrado de Pearson (χ^2) foi utilizado para avaliar a

significância estatística entre as associações, bem como a medida de associação razão de ODDS (*odds ratio*-OR) foi empregada na análise univariada.

Os pacientes foram estratificados em dois grupos de pneumonia confirmada e não confirmada (considerando a paridade no diagnóstico do pediatra da UESM e do radiologista). Um valor de “*p*” < que 0,05 foi considerado como indicativo de significância estatística.

3.7 – Aspectos Éticos do Estudo

O estudo foi aprovado nos Comitês de Ética em Pesquisa do Monte Talbot – Hospital São Rafael, Conselho de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz e Conselho Nacional de Ética em Pesquisa sob o parecer Nº 041/10 CEP/CONEP (ANEXO V).

RESULTADOS

4.1 – Caracterização dos Pacientes Atendidos na UESM e Incluídos no Estudo

Durante o período de março a dezembro de 2009, foram atendidos na Unidade de Saúde de São Marcos, Pau da Lima, Salvador, 442 crianças com infecção respiratória aguda. Entre estas, 297 crianças foram submetidas ao raio-X de tórax por apresentarem sinais e sintomas clínicos compatíveis com pneumonia, tais como febre, tosse, dispnéia e rinorréia, sendo portanto, incluídas no estudo de colonização. Destes, 205 pacientes foram encaminhados para coleta do *swab* nasofaríngeo. Os 92 casos remanescentes não foram submetidos à coleta em função de fatores relacionados à recusa de participação no estudo, pelo responsável legal e/ou atendimento fora do horário do estudo. A distribuição das 442 crianças estratificadas por mês e por elegibilidade pode ser observada no Gráfico 1. No mês de junho o recrutamento dos pacientes foi reduzido em comparação com os demais meses do estudo em virtude de falha técnica no aparelho de raio-X, sendo o diagnóstico da pneumonia por raio-X impossibilitada neste período.

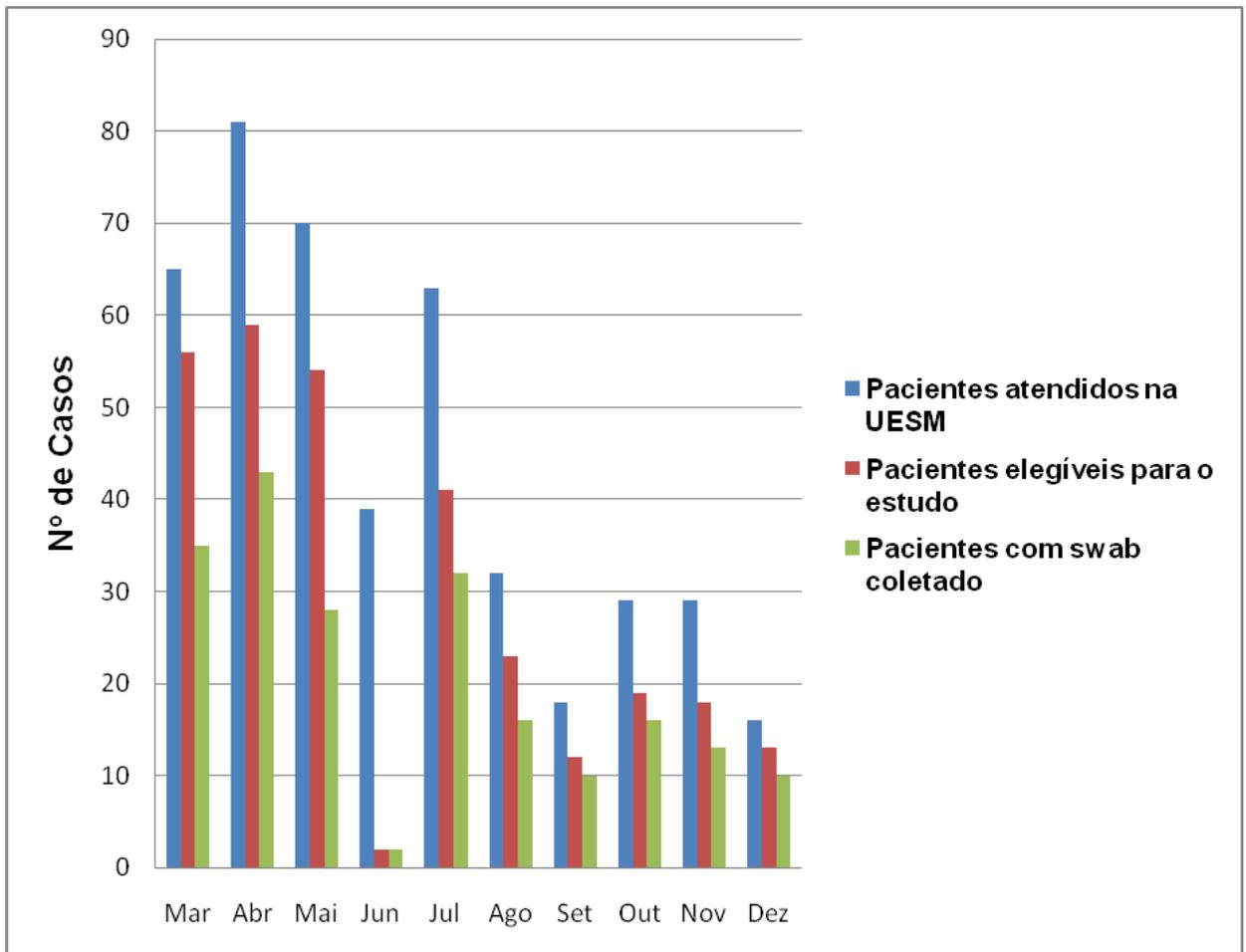


Gráfico 1. Frequência de atendimento de crianças menores de cinco anos na UESM durante o período do estudo - Março a Dezembro de 2009.

Na Tabela 1 são apresentadas as características gerais dos pacientes com suspeita clínica de pneumonia atendidos na UESM, de março a dezembro de 2009, estratificados pela confirmação do diagnóstico. Com base nos critérios clínicos e radiológicos, um total de 72/205 (35,1%) crianças foram diagnosticadas com pneumonia. A idade média destas crianças foi de 24 meses, sendo que 39/72 (54,2%) foram menores que dois anos de idade.

Das 133 crianças que não tiveram a confirmação de diagnóstico de pneumonia (casos suspeitos), a média de idade foi de 22 meses, sendo que 81/133 (60,9%) crianças eram menores de dois anos de idade.

Crianças na faixa etária de 36 a 47 meses formaram o grupo com maior risco de ter pneumonia bacteriana (OR: 3.17 [1.29-7.88]). O grupo de crianças que apresentou diagnóstico confirmado de pneumonia foi o que apresentou maior gravidade e permaneceu internado na unidade de saúde (OR: 4.11 [2.15-7.92]).

A taxa de colonização por *Streptococcus pneumoniae* para todos os participantes do estudo foi de 50,7% (104/205). Categorizando esses pacientes com relação à confirmação do diagnóstico de pneumonia, têm-se os grupos de pneumonia confirmada (72/205) e pneumonia suspeita (133/205), nos quais as taxas de colonização foram 52,8% (38/72) e 49,6% (66/133), respectivamente. A taxa de colonização não diferiu entre os grupos de casos confirmados e suspeitos, assim como as demais características clínicas e epidemiológicas (Tabela 1).

Entre os pacientes cujo responsável legal soube responder os questionamentos sobre medicações, o uso prévio de antimicrobianos foi referido por 198/205 (96,6%) pacientes, dos quais 39 (19,7%) apresentaram uso prévio. Entre estes, o antimicrobiano de uso mais frequente foi a amoxicilina (74,4%; [29/39]) seguida da penicilina e cefalexina, igualmente distribuídas (5,1% cada [2/39]); os

demais antimicrobianos somaram 7,8% (3/39). Três responsáveis legais não souberam informar qual antimicrobiano fora utilizado pela criança. Não houve diferença de uso prévio de antimicrobianos entre os grupos de pneumonia confirmada e suspeita.

Tabela 1. Características gerais dos pacientes com suspeita clínica de pneumonia atendidos na UESM, de março a dezembro de 2009, estratificados pela confirmação do diagnóstico ($n=205$)

Características	Casos confirmados ($n=72$)	Casos suspeitos ($n=133$)	Razão de Odds (OR) [IC 95%]
Demográficas			
Idade, Média (1 ^{qt} - 3 ^{qt}) ¹	24 (10-36)	22 (10-28)	-
Idade em Meses (%)			
0-11	18 (25,0)	41 (30,8)	0,75 [0,37-1,50]
12-23	21 (29,2)	40 (30,1)	0,96 [0,49-1,88]
24-35	12 (16,7)	29 (21,8)	0,72 [0,32-1,60]
36-47	16 (22,2)	11 (8,3)	3,17 [1,29-7,88]
48-59	5 (6,9)	12 (9,0)	0,83 [0,39-1,77]
Gênero masculino (%)	40 (55,6)	82 (61,7)	0,78 [0,42-1,45]
Clínicas (%)			
FR ² , Média (1 ^{qt} - 3 ^{qt})	45 (34-60)	43 (32-52)	-
Febre	59 (81,9)	122 (91,7)	0,41 [0,16-1,05]
Tosse	71 (98,6)	133 (100)	NC ⁷
Rinorréia	49 (68,1)	106 (79,7)	0,54 [0,27-1,09]
Dispnéia	47 (65,3)	86 (64,7)	1,05 [0,54-1,96]
Crepitações	20 (27,8)	40 (30,1)	0,89 [0,45-1,77]
Tiragem Intercostal	25 (34,7)	43 (32,3)	1,11 [0,58-2,13]
Leucograma			
$\geq 15.000/\text{mm}^3$	25 (41,7) ³	32 (35,2) ⁴	1,32 [0,64-2,72]
Internamento na UESM	46 (64,8)	40 (30,5)	4,11 [2,15-7,92]
Epidemiológicas (%)			
Frequência a creche	28 (38,9)	44 (33,3)	1,29 [0,68-2,44]
Contato com idosos	12 (16,7)	17 (12,8)	1,36 [0,57-3,26]
Convivência com fumantes	26 (36,1)	37 (27,8)	1,47 [0,76-2,83]
Uso de antibiótico no último mês	14 (19,7) ⁵	25 (19,7) ⁶	1,00 [0,45-2,20]
Colonizados por <i>S. pneumoniae</i>	38 (52,8)	66 (49,6)	1,13 [0,61-2,10]

¹qt= intervalo interquartilico; ²FR= frequência respiratória (incursões/minuto); ³ $n=60$; ⁴ $n=91$; ⁵ $n=71$; ⁶ $n=127$; ⁷NC: Não calculado

4.2 – Caracterização dos Sorogrupos/Sorotipos de *S. pneumoniae*

Todos os 104 isolados de *S. pneumoniae* foram submetidos à sorotipagem por multiplex PCR, sendo que o sorogrupo 6 (6A/6B) (17,3%) foi predominante, seguido dos sorotipos 14 (15,4%), 19F (10,6%), sorogrupo 15 (15B/15C) (9,6%), 23F (6,7%) e o sorotipo 19A (6,7%). Os demais sorotipos e sorogrupos (33,7%) incluem: 6C ($n=5$), 9 [9L/9N] ($n=5$), 11 [11A/11D] ($n=3$), 17F ($n=2$), 7C ($n=2$), 3 ($n=2$), 4, 34, 35F, 10A e 18 [18A/18B/18C/18F] ($n=1$, cada) (Tabela 2). Para 13 isolados (12,5%) não foi possível a caracterização do sorogrupo/sorotipo.

Com exceção da única amostra do sorogrupo 18 que ainda será submetida à reação de *Quellung* para a caracterização final do sorotipo, um total de 53 (51%) isolados possuem sorotipos considerados pertencentes ou associados à vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV-10). Neste cálculo, foram considerados também os isolados do sorogrupo 6 (6A/6B), uma vez que apesar do 6A não fazer parte da PCV-10, existe uma proteção cruzada para este sorotipo durante a imunização.

A distribuição destes sorotipos e sorogrupos estratificados por casos confirmados e suspeitos encontra-se discriminada na Tabela 2. Quatro crianças estavam colonizadas por mais de um sorotipo; isto é, co-colonizadas por 19F e 23F; 14 e 6; 19F e não-tipável; 18 e não-tipável.

Tabela 2. Distribuição dos sorotipos/sorogrupos de *S. pneumoniae* isolados da nasofaringe de crianças com suspeita clínica de pneumonia, 2009, estratificados pela confirmação do diagnóstico ($n=104$)

Sorotipo (Sorogrupo)	No. de casos (%)	Casos confirmados ($n=38$)	Casos Suspeitos ($n=66$)
6 (6A/6B)	18 (17,3)	4 (10,5)	14 (21,2)
14	16 (15,4)	6 (15,8)	10 (15,2)
19F	11 (10,6)	3 (7,9)	8 (12,1)
15 (15B/15C)	10 (9,6)	4 (10,5)	6 (9,1)
23F	7 (6,7)	3 (7,9)	4 (6,1)
19A	7 (6,7)	3 (7,9)	4 (6,1)
6C	5 (4,8)	-	5 (7,6)
9 (9L/9N)	3 (2,9)	1(2,6)	2 (3,0)
11(11A/11D)	3 (2,9)	2 (5,3)	1 (1,5)
17F	2 (1,9)	1 (2,6)	1 (1,5)
7C	2 (1,9)	2 (1,9)	-
3	2 (1,9)	1 (2,6)	1 (1,5)
18 (18A/18B/18C/18F)	1 (1)	-	1 (1,5)
34	1 (1)	-	-
35F	1 (1)	1 (1)	-
4	1 (1)	-	1 (1,5)
10A	1 (1)	-	1 (1,5)
NT¹	13 (12,5)	7 (18,4)	6 (9,1)
Cobertura geral (%)			
PCV10²	52 (51)	-	-

¹NT = não tipável pelo método;

²Sorotipos da PCV10: 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F.

O perfil dos sorotipos isolados da nasofaringe das crianças atendidas na UESM foi comparado com os sorotipos predominantes dos isolados de *S. pneumoniae* de crianças saudáveis da comunidade de Pau da Lima (2008) e aqueles identificados nos casos de meningite pneumocócica oriundos do Hospital Couto Maia no período de 1996 A 2008. Observa-se que a distribuição dos sorotipos 14, 19F, 23F e do sorogrupo 6A/6B é similar nos casos de colonização de crianças doentes (com pneumonia) e entre os isolados de meningite pneumocócica, distinguindo-se, entretanto, da distribuição encontrada entre as crianças saudáveis (Gráfico 2).

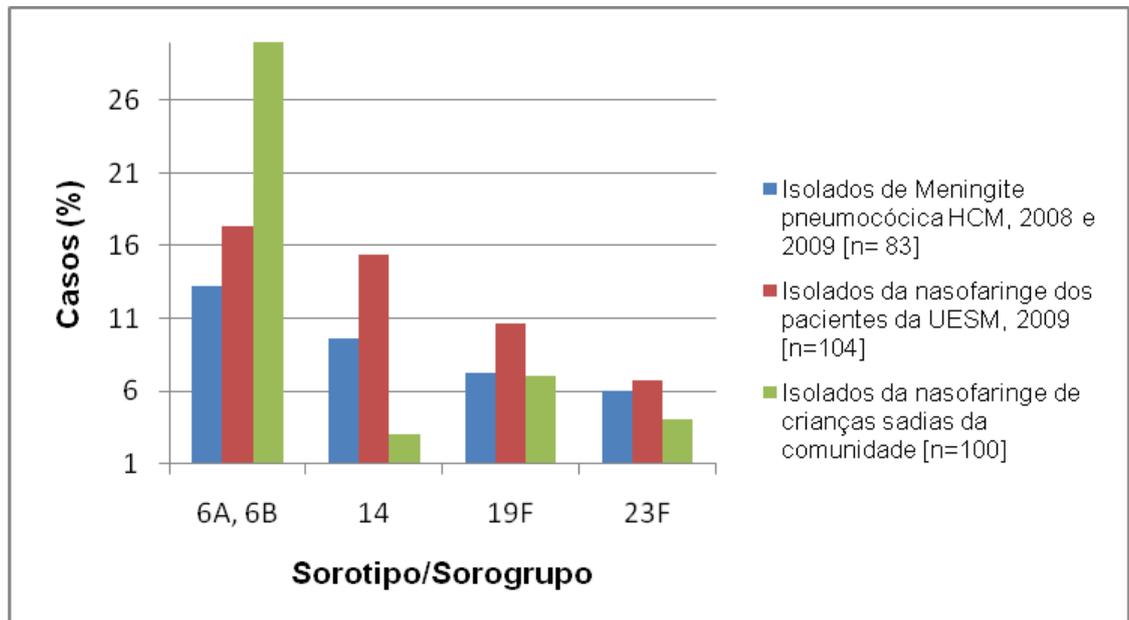


Gráfico 2. Perfil dos sorotipos predominantes de *S. pneumoniae* isolados de três grupos: crianças saudáveis, crianças doentes e pacientes com meningite pneumocócica.

4.3 – Caracterização dos isolados de *S. pneumoniae* quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

Com exceção de um isolado que não estava viável, 103 foram submetidos ao teste de sensibilidade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo (Tabela 3).

Um total de 41 isolados (39,8%) apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) de penicilina $\geq 0,125$ $\mu\text{g/ml}$. Resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim (SMX/TMP) foi identificada em 72 (69,2%) isolados de *S. pneumoniae*. Além disto, entre os isolados não susceptíveis à penicilina ($n=41$), 35 (85,4%) foram simultaneamente resistentes a SMX/TMP. Todos os isolados foram sensíveis à clindamicina, cefotaxima e levofloxacina. Três (2,9%) e quinze isolados (14,6%), foram, respectivamente, resistentes à eritromicina e tetraciclina.

Foi observada uma associação significativa entre os isolados dos sorotipos 14 e 19F e resistência à penicilina, uma vez que 29% e 19% destes sorotipos apresentaram não susceptibilidade a este antibiótico ($p < 0,005$), respectivamente. A não susceptibilidade à penicilina também foi identificada em apenas quatro casos (9,8%) de sorotipos não vacinais, dois do sorotipo 19A e dois não-tipáveis (Tabela 4).

É importante ressaltar ainda na Tabela 4 que mais de 90% dos sorotipos de isolados não-susceptíveis à penicilina são representados nas vacinas conjugadas PCV7, PCV10 e PCV13. Além disto, os sorotipos não-vacinais (não PCV10) foram predominantemente sensíveis à penicilina (39; 62,9%) ($p < 0,005$).

Tabela 3. Perfil de sensibilidade antimicrobiana dos 103 isolados de *S. pneumoniae* obtidos da nasofaringe de crianças com suspeita clínica de pneumonia, 2009.

Antimicrobiano	Concentração Inibitória Mínima (CIM [$\mu\text{g/mL}$]):															NS ¹ (%)
	0,016	0,031	0,0625	0,125	0,19	0,25	0,38	0,50	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0	64,0	
Penicilina	3	13	46	13	1	6	4	17	-	-	-	-	-	-	-	41 (39,8)
Cefotaxima	61	9	21	3	-	2	-	6	1	-	-	-	-	-	-	-
Levofloxacina	1	-	1	-	-	2	-	18	81	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	12	55	32	1	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	3 (2,9)
Clindamicina	25	58	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina	1	-	2	4	-	45	-	32	2	2	6	2	4	2	1	15 (14,6)
STX/TMP²	-	-	3	6	-	16	-	6	12	20	25	11	4	-	-	72 (69,2)

¹Os *breakpoints* utilizados para definir as categorias de susceptibilidade foram baseadas nas recomendações do *Clinical and Laboratories Standards Institute*, 2010 (em cinza).

²STX/TMP: Sulfametoxazol-Trimetoprim

NS: Não-susceptibilidade

Tabela 4. Associação entre sorotipos/sorogrupos e perfil de sensibilidade à penicilina nos isolados de *S. pneumoniae* da nasofaringe de crianças com suspeita clínica de pneumonia.

Sorotipo (Sorogrupo)	Total (n=103)	CIM ¹ Penicilina ²		Razão de Odds (OR) [IC 95%]
		≥0,125 (NS) ³	<0,06 (S) ⁴	
14	16	12 (29,3)	4 (6,5)	2,25 [1,49-3,39] ⁵
19F	11	8 (19,5)	3 (4,8)	2,03 [1,29-3,19] ⁵
23F	7	7 (17,1)	-	-
6 (6A/6B)	18	10 (14,4)	8 (12,9)	2,18 [0,70-6,87]
19A	7	2 (4,9)	5 (8,1)	0,70 [0,21-2,33]
18 (18A/18B/18C/18F)	1	-	1 (1,6)	-
3	2	-	2 (3,2)	-
NT⁶	13	2 (4,9)	11 (17,7)	NC ⁷
Outros**	28	-	28 (45,2)	-
Vacinais (PCV7)	55	37 (90,2)	18 (30,6)	8,07 [3,10-21,00] ⁵
Vacinais (PCV10)	60	37 (90,2)	23 (37,1)	6,63 [2,55-17,22] ⁵
Vacinais (PCV13)	63	39 (95,1)	24 (38,7)	12,38 [3,16-48,46] ⁵
Não-vacinais (PCV10)	42	3 (0,8)	39 (62,9)	0,11 [0,04-0,35] ⁵

¹ (n=103)

²NS= não-susceptível; ³S= Susceptível

⁴ CIM= Concentração inibitória mínima. ⁵ p<0,05 (teste qui-quadrado de Pearson)

⁶NT= não-típavel; ⁷NC= não calculado

4.4 – Perfil de Colonização das Crianças Sadias

No estudo de colonização de crianças sadias conduzidos na comunidade de Pau da Lima por Menezes *et al.* (em andamento) em 2008, 203 crianças foram recrutadas para seguimento e realização de quatro coletas de *swab* da nasofaringe. A taxa de colonização observada na primeira coleta foi de 49,3% (100/203), sendo que a média de idade das crianças recrutadas foi de 27 meses. Os isolados de *S. pneumoniae* apresentaram um perfil de sorotipos distintos quando comparados aos pacientes com pneumonia confirmada e suspeita atendidos na UESM em 2009. Na tabela 5 é apresentado o perfil dos sorotipos das crianças atendidas na UESM e das crianças sadias da mesma comunidade.

O sorotipo 14 apresentou uma maior frequência entre os pacientes atendidos na UESM quando comparado às crianças sadias portadoras do *S. pneumoniae*, o que é demonstrado na análise univariada (OR: 5,88 [1,54-26,33]). Observa-se também, uma maior proporção de isolados do sorogrupo 6 (6A/6B) colonizando as crianças saudáveis (OR: 0,49 [0,24-1,00]). Não houve diferença estatística entre os demais sorotipos identificados na análise univariada. Além disso, foi observada uma maior frequência de isolados não-tipáveis nas crianças saudáveis (21% vs 12,5%).

Tabela 5. Frequência dos sorotipos/sorogrupos dos isolados de *S. pneumoniae* da nasofaringe de crianças com pneumonia e crianças sadias da comunidade, 2008/2009.

Sorotipo (Sorogrupo)	Pacientes com pneumonia ¹ atendidos na UESM em 2009 n=104 (%)	Crianças sadias (n=100) ²	Razão de Odds (OR) [IC 95%]
6 (6A/6B)	18 (17,3)	30 (30,0)	0,49 [0,24-1,00] ⁴
14	16 (15,4)	3 (3,0)	5,88 [1,54-26,33] ⁴
19F	11 (10,6)	7 (7,0)	1,57 [0,53-4,72]
15 (15B/15C)	10 (9,6)	4 (4,0)	2,55 [0,70-10,05]
23F	7 (6,7)	4 (4,0)	1,27 [0,79-2,02]
19A	7 (6,7)	4 (4,0)	1,27 [0,79-2,02]
6C	5 (4,8)	8 (8,0)	0,74 [0,37-1,50]
9 (9L/9N)	3 (2,9)	1 (1,0)	1,49 [0,83-2,66]
11(11A/11D)	3 (2,9)	2 (2,0)	1,18 [0,57-2,45]
17F	2 (1,9)	-	-
7C	2 (1,9)	-	-
3	2 (1,9)	2 (2,0)	0,98 [0,36-2,64]
18 (18A/18B/18C/18F)	1 (1,0)	-	-
34	1 (1,0)	3 (3,0)	0,49 [0,09-2,66]
35F	1 (1,0)	-	-
4	1 (1,0)	-	-
10A	1 (1,0)	-	-
9V	-	1 (1,0)	-
31	-	1 (1,0)	-
16F	-	9 (9,0)	-
NT³	13 (12,5)	21 (21,0)	0,54 [0,24-1,21]

¹ Casos de pneumonia confirmada e suspeita, segundo os critérios do presente estudo;

² Menezes e cols. (em andamento);

³ NT = amostra não-tipável;

⁴ $p < 0,05$ (teste qui-quadrado de *Pearson*).

4.5 – Tipagem Molecular

A técnica de PFGE foi realizada para 26 isolados correspondentes aos sorotipos mais frequentes e associados a não-sensibilidade à penicilina, ou seja, 14 (14 amostras), 19F (6 amostras) e 23F (6 amostras). Oito isolados, compreendendo 2 amostras do sorotipo 14, 4 amostras do sorotipo 19F e 2 amostras do sorotipo 23F não puderam ser analisados por questões técnicas.

As análises foram realizadas tomando-se por base os grupos clonais pré-definidos para os isolados obtidos durante o estudo da vigilância epidemiológica das meningites pneumocócicas, realizado no Hospital Couto Maia, de 1996 a 2008.

No presente estudo foram encontrados 11 padrões eletroforéticos, sendo três padrões no sorotipo 14, quatro entre os isolados do sorotipo 19F e quatro entre os isolados 23F (Figura 7).

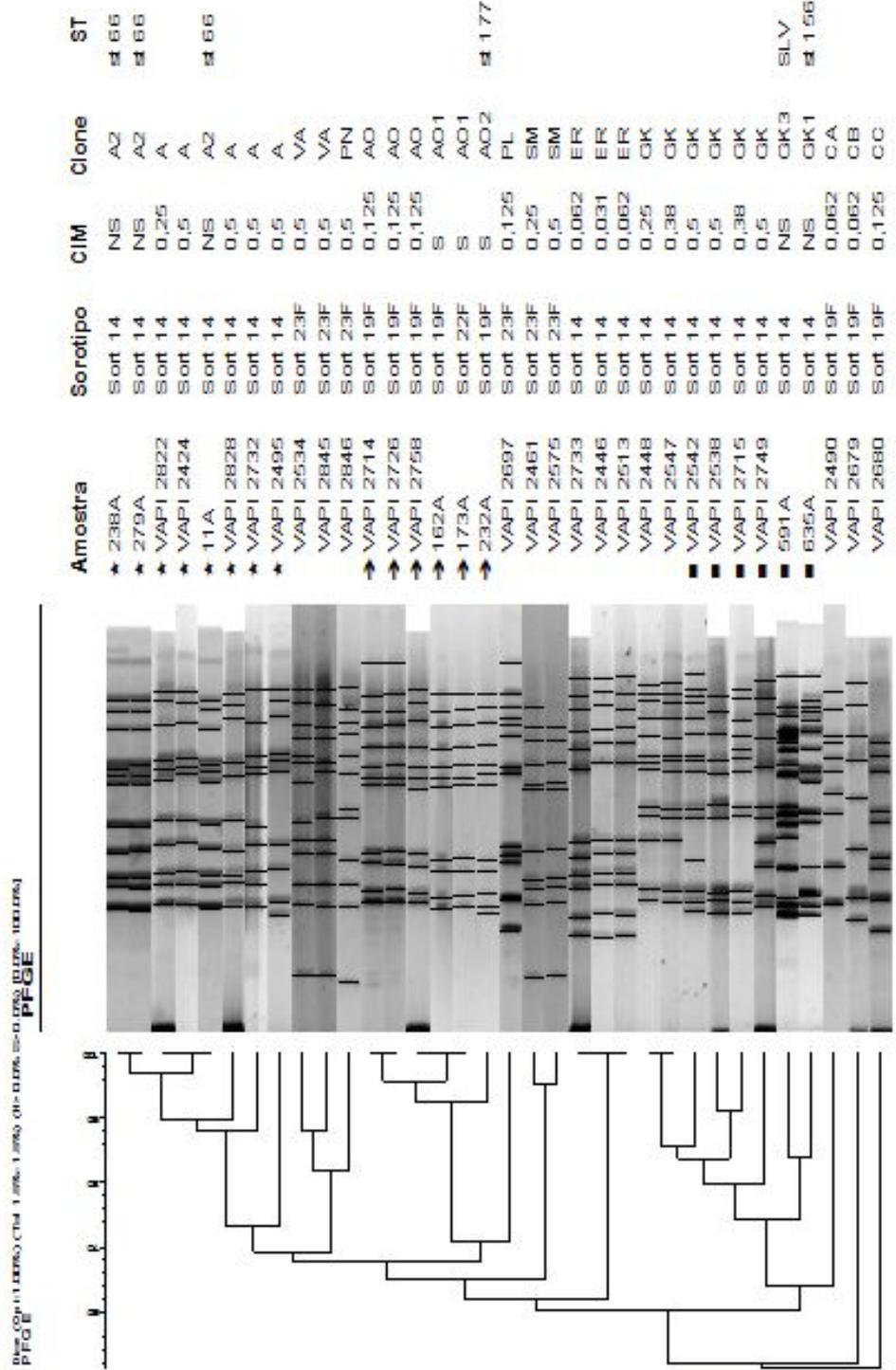
Os isolados da nasofaringe referentes ao sorotipo 14 (14/26) compreenderam dois grupos clonais bem definidos, quando comparados aos isolados de meningite pneumocócica: grupo “A” [(5/16; 31,2%) ST 66] e grupo “GK” [(6/16; 37,5%) ST 156]; as três amostras remanescentes formaram o grupo “ER”, um novo padrão identificado neste estudo e distinto dos isolados de meningite.

Entre os isolados do sorotipo 19F, três foram associados ao grupo clonal “AO” comum entre os padrões de meningite. Os outros três formaram padrões únicos e distintos denominados “CA”, “CB” e “CC”.

Os isolados 23F foram distribuídos da seguinte forma: dois grupos clonais com dois isolados cada (“SM” e “VA”), além de dois isolados com padrões eletroforéticos únicos. Não houve similaridade entre os padrões eletroforéticos

obtidos dos isolados do sorotipo 23F quando comparados aos de meningite pneumocócica.

Figura 5. Dendrograma comparativo dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* da nasofaringe com isolados de meninges pneumocócica.



ST: Sequence type; SLV: Single locus variant; CIM: Concentração inibitória mínima; NS: Não-susceptível

DISCUSSÃO

Embora a presença de *S. pneumoniae* na nasofaringe e, mais particularmente, de um determinado sorotipo durante a pneumonia não evidencia o seu papel causal, existem evidências demonstrando que portadores de doença pneumocócica invasiva carregam a mesma cepa de *S. pneumoniae* na nasofaringe concomitante à manifestação clínica da doença (GIVON-LAVI *et al.*, 2002; DE ANDRADE *et al.*, 2003). Conseqüentemente, isolados de *S. pneumoniae* da nasofaringe podem ser utilizados como parâmetro para predizer perfis de sensibilidade a antimicrobianos utilizados em abordagens terapêuticas na doença invasiva, bem como na formulação de vacinas, ressaltando o impacto epidemiológico do agravo em uma determinada comunidade (KOBAYASHI *et al.*, 2002; HANAGE *et al.*, 2011).

No presente estudo, procuramos caracterizar o perfil de colonização nasofaringeana por *S. pneumoniae* em 205 pacientes, menores de cinco anos de idade, com suspeita clínica de pneumonia, atendidos na Unidade de Saúde de São Marcos, Bairro de Pau da Lima, Salvador. Um total de 72 (35,1%) crianças foram diagnosticadas com pneumonia, sendo 39 (54,2%) menores de dois anos de idade. Estes dados corroboram outros achados da literatura mostrando que a pneumonia é uma importante enfermidade entre crianças de 0 a 24 meses (UNICEF, 2006; CABRE, 2009; RANGANATHAN & SONNAPPA, 2009).

Um aspecto que deve ser ressaltado, entretanto, é que quando comparamos a proporção das crianças diagnosticadas com pneumonia na faixa etária de menores de dois anos de idade (39/72; 54,2%), com aquelas com suspeita de pneumonia nesta mesma faixa etária, não observamos nenhuma diferença estatística (81/133; 60,9%), o que comprova a dificuldade em se definir o diagnóstico da pneumonia neste grupo

de risco (UNICEF, 2006; FERRERO *et al.*, 2010). O mesmo pode ser evidenciado em relação aos achados clínicos entre os dois grupos de pacientes (diagnosticados e suspeitos), ou seja, ambos apresentaram proporções similares de tosse, febre, dispnéia, etc., sinais clínicos de pneumonia preconizados pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1995).

Cabe ressaltar que entre as crianças que apresentaram confirmação de pneumonia, o risco de internamento na unidade foi maior, quando comparado aos casos não confirmados (OR 4.11 [2.15-7.92]). No Brasil, estima-se que os gastos anuais com internação por pneumonia na infância vêm crescendo substancialmente desde 1999, ultrapassando sessenta e quatro milhões de dólares em 2003 (FUCHS *et al.*, 2005).

Enquanto apenas 72 crianças tiveram o diagnóstico de pneumonia confirmado, o que foi estipulado pela segunda leitura da imagem do raio-X pelo radiologista, 133 foram agrupadas como não confirmadas para pneumonia, sugerindo que neste grupo os pacientes estão possivelmente acometidos com outras infecções agudas do trato respiratório que não a pneumonia. Por outro lado, no grupo de casos confirmados, estima-se que as crianças tinham a possibilidade de maior agravo da doença, o que foi confirmado pela maior proporção de internamentos, quando comparado ao grupo de casos não confirmados, nos quais as crianças voltaram para tratamento no domicílio. A faixa etária que compreendeu 36-47 meses apresentou maior risco de pneumonia bacteriana (OR 3.17 [1.29-7.88]), sendo confirmada pela maior proporção de confirmação de caso e conseqüente internamento neste grupo.

De modo geral, a taxa de colonização por *S. pneumoniae* obtida para todos os participantes do estudo foi de 50,5% (104/205). Uma proporção similar (55%) foi reportada por REY *et al.* (2002), em Fortaleza, uma região com características de desenvolvimento semelhantes a nossa. Por outro lado, na região central do Brasil, um

estudo realizado em 2006 demonstrou 35,8% de portadores, uma taxa inferior a encontrada em nosso estudo (LAVAL *et al.*, 2006). É importante ressaltar que uma vez que o território brasileiro possui extensões continentais, resultados obtidos de uma região em particular não podem ser generalizados para todo o país, mesmo porque existem inúmeros fatores sócio-econômicos que irão favorecer ou não a colonização por *S. pneumoniae*.

Outros estudos no Brasil demonstram a prevalência de colonização em crianças que variam de 13,9% a 72%, principalmente entre aquelas que frequentam creches ou berçários (REY, WOLF, MOREIRA, MILATOVIC *et al.*, 2002; LAVAL *et al.*, 2006).

Quando estratificamos a taxa de colonização nos dois grupos de pacientes, ou seja, com pneumonia confirmada (72/205) e com pneumonia suspeita (133/205), as taxas de colonização foram similares, 52,8% (38/72) e 49,6% (66/133), respectivamente, sem apresentar diferenças significativas. Infelizmente não podemos tirar nenhuma conclusão sobre este aspecto, apenas conjecturar que se o agente *S. pneumoniae* isolado da nasofaringe das crianças com pneumonia é responsável pelo quadro de pneumonia nesses pacientes, aqueles suspeitos de pneumonia estariam apresentando, de fato, uma pneumonia pneumocócica não confirmada pelos métodos usuais de diagnóstico. Mais uma vez enfatiza-se a necessidade da busca métodos alternativos de diagnóstico para os casos de pneumonia.

A literatura internacional destaca que os sorotipos 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F e 23F de *S. pneumoniae* que normalmente colonizam a nasofaringe e causam infecções em crianças, estão também associados à resistência a antibióticos (CORSO *et al.*, 1998; KO *et al.*, 2000; MCGEE *et al.*, 2001; KLUGMAN, 2002). Com relação aos sorotipos dos isolados no presente estudo, a grande maioria encontra-se

dentro dos acima mencionados, destacando-se os sorogrupos 6 (6A/B), 14, 19A, 19F e 23F, que contabilizaram 56,7% do total de isolados identificados (Tabela 5). Estes sorotipos, chamados “sorotipos pediátricos”, também foram reportados em outros estudos no país, tanto em estudos de colonização como de doença invasiva (REY, WOLF, MOREIRA, MILATOVIC *et al.*, 2002; REY, WOLF, MOREIRA, VERHOEF *et al.*, 2002; LUCAREVSCHI *et al.*, 2003). Todavia, é importante ter em mente que a distribuição de sorotipos não é exatamente a mesma entre as regiões, variando também com a idade, tempo e com outros fatores sociais e econômicos.

Neste estudo, os sorotipos 14 e 19F apresentaram uma associação significativa com a não susceptibilidade à penicilina. É importante destacar que na última década, o sorotipo 14 vem sendo associado com a transmissão de resistência à penicilina no Brasil (KO *et al.*, 2000; BRANDILEONE *et al.*, 2006) e a presença da bactéria na nasofaringe facilita este processo, bem como sua disseminação em uma determinada comunidade. Além disto, a resistência concomitante à sulfametoxazol-trimetoprim pode ser explicada, em parte, pelo fato de que até recentemente, esta associação era utilizada indiscriminadamente pela população, em quaisquer casos de infecção, sem a necessidade de prescrição médica.

De um modo geral, o perfil sorológico dos isolados de *S. pneumoniae* que colonizam as crianças na população estudada parece ter uma boa representatividade entre os sorotipos incluídos na vacina pneumocócica decavalente (PCV10). Além disto, os sorotipos inclusos nesta vacina representam 90,2% dos isolados não suscetíveis à penicilina na população estudada. Estes achados mostram que ao menos sob esse aspecto, a vacina PCV10 trará um grande impacto na redução da transmissão horizontal da bactéria, até mesmo por incluir os sorotipos associados com a resistência antimicrobiana.

A análise molecular por PFGE dos isolados associados à não-susceptibilidade à penicilina (14, 19F e 23F) demonstrou padrões eletroforéticos similares àqueles encontrados em isolados de meningite pneumocócica oriundos do HCM. No presente estudo encontramos isolados associados aos clones "A" [(5/16; 31,2%) ST 66] e "GK" [(6/16; 37,5%) ST 156] entre os pertencentes ao sorotipo 14. Estes clones encontram-se amplamente caracterizados e distribuídos entre os casos de meningite pneumocócica da cidade de Salvador, segundo estudos prévios (Soares *et al.*, dados não publicados; Reis, 2002). O clone "A" é o predominante entre os casos de meningite pneumocócica, representando o ST66 e vêm aumentando a sua prevalência nesta população a partir de 2000.

Para finalizar, a relevância deste trabalho também se deve ao fato de procurar relacionar as características de uma população de crianças com suspeita clínica de pneumonia com a de crianças saudáveis e ainda, em relação a casos de meningite pneumocócica de uma mesma região geográfica. Conforme foi assinalado no Gráfico 2, o perfil de sorotipos encontrado entre as crianças com suspeita de pneumonia atendidas na UESM foi muito mais semelhante ao perfil encontrado entre os isolados de meningite pneumocócica obtidos do HCM do que em relação isolados de crianças saudáveis na comunidade de Pau da Lima. Estes dados reforçam a hipótese da relação causal dos isolados nos casos de pneumonia identificados no presente estudo e a necessidade da busca de novos métodos de diagnóstico desta enfermidade.

O presente estudo reforça ainda a importância de um contínuo monitoramento do perfil de sorotipos na colonização nasofaríngea por *S. pneumoniae*, no período pós-vacina.

CONCLUSÕES

1. A taxa de colonização por *Streptococcus pneumoniae* entre as crianças que buscaram atendimento na UESM com pneumonia confirmada e suspeita foi de 52,8% e 49,6%, respectivamente; e em crianças saudáveis da mesma comunidade foi de 49,3%;
2. Os sorogrupos/sorotipos predominantes dos isolados de *S. pneumoniae* identificados foram semelhantes aqueles encontrados nos casos de doença pneumocócica invasiva: 6 (6A/6B), 14, 23F, 19F e 19A;
3. A não-susceptibilidade à penicilina foi evidenciada em 39,8% dos isolados de *S. pneumoniae* colonizando crianças com infecção respiratória, o que pode invalidar o tratamento empírico desta doença com penicilina;
4. Um total de 50,5% dos sorotipos encontrados na população estudada estão representados na PCV10, sendo que esta representatividade aumenta para 90,2% quando considerados apenas os isolados não-susceptíveis à penicilina;
5. Os padrões eletroforéticos dos isolados de *S. pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina foram similares aqueles oriundos de pacientes com meningite pneumocócica, em especial os do sorotipo 14.
6. É necessário um contínuo monitoramento do perfil de sorotipos na colonização nasofaríngea por *S. pneumoniae* no período pós-vacina, para avaliar as possíveis alterações advindas do programa de imunização;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSALDI, F. et al. Increasing incidence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A and emergence of two vaccine escape recombinant ST695 strains in Liguria, Italy, 7 years after implementation of the 7-valent conjugated vaccine. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 2, p. 343-5, Feb 2011.

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

BARBOUR, M. L. Conjugate vaccines and the carriage of *Haemophilus influenzae* type b. **Emerg Infect Dis**, v. 2, n. 3, p. 176-82, Jul-Sep 1996.

BEREZIN, E. N. et al. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in nasopharyngeal carriage and in invasive pneumococcal disease in Sao Paulo, Brazil. **Pediatr Infect Dis J**, v. 26, n. 7, p. 643-5, Jul 2007.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 3, p. 144-54, Mar 2004.

BOGAERT, D. et al. Pneumococcal carriage in children in The Netherlands: a molecular epidemiological study. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 9, p. 3316-20, Sep 2001.

BOWEN, M. K. et al. The Optochin sensitivity test: a reliable method for identification of pneumococci. **J Lab Clin Med**, v. 49, n. 4, p. 641-2, Apr 1957.

BRANDILEONE, M. C. et al. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 5, p. 567-74, May 2006.

BRASIL. **Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário básico de vacinação da criança incorporação março - 2010**
SAÚDE, M. D. Brasília: Secretaria de vigilância em saúde: 18 p. 2010.

BRYCE, J. et al. WHO estimates of the causes of death in children. **Lancet**, v. 365, n. 9465, p. 1147-52, Mar 26-Apr 1 2005.

BTS. British Thoracic Society Guidelines for the Management of Community Acquired Pneumonia in Childhood. **Thorax**, v. 57 Suppl 1, p. i1-24, May 2002.

CABRE, M. Pneumonia in the elderly. **Curr Opin Pulm Med**, v. 15, n. 3, p. 223-9, May 2009.

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

CARDOZO, D. M. et al. Prevalence and risk factors for nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among adolescents. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 2, p. 185-9, Feb 2008.

CDC. PCR Deduction of Pneumococcal Serotypes. Atlanta, 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>>. Acesso em: 20/03/2010.

CLSI. (Clinical and Laboratory Standards Institute) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. Approved Standard M100-S19. Wayne, PA 2010.

COLES, C. L. et al. Nasopharyngeal carriage of resistant pneumococci in young South Indian infants. **Epidemiol Infect**, v. 129, n. 3, p. 491-7, Dec 2002.

_____. Nasopharyngeal carriage of *S. pneumoniae* among young children in rural Nepal. **Trop Med Int Health**, v. 14, n. 9, p. 1025-33, Sep 2009.

CORSO, A. et al. Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing respiratory disease in the United States. **Microb Drug Resist**, v. 4, n. 4, p. 325-37, Winter 1998.

DE ANDRADE, A. L. et al. Genetic relationship between *Streptococcus pneumoniae* isolates from nasopharyngeal and cerebrospinal fluid of two infants with Pneumococcal Meningitis. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 8, p. 3970-2, Aug 2003.

DI FABIO, J. L. et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. PAHO Sireva-Vigia Study Group. Pan American Health Organization. **Pediatr Infect Dis J**, v. 20, n. 10, p. 959-67, Oct 2001.

FADEN, H. et al. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. Tonawanda/Williamsville Pediatrics. **J Infect Dis**, v. 175, n. 6, p. 1440-5, Jun 1997.

FEIJO, R. B.; CUNHA, J.; KREBS, L. S. Vaccination schedule for childhood and adolescence: comparing recommendations. **J Pediatr (Rio J)**, v. 82, n. 3 Suppl, p. S4-14, Jul 2006.

FERRERO, F. et al. Radiographic findings among children hospitalized with severe community-acquired pneumonia. **Pediatr Pulmonol**, v. 45, n. 10, p. 1009-13, Oct 2010.

FORLEO-NETO, E. et al. Decreased point prevalence of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) oropharyngeal colonization by mass immunization of Brazilian children less than 5 years old with Hib polyribosylribitol phosphate polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in combination with diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine. **J Infect Dis**, v. 180, n. 4, p. 1153-8, Oct 1999.

FRANCO, C. M. et al. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. **Pediatr Infect Dis J**, v. 29, n. 1, p. 77-9, Jan 2010.

FUCHS, S. C. et al. The burden of pneumonia in children in Latin America. **Paediatr Respir Rev**, v. 6, n. 2, p. 83-7, Jun 2005.

GARCIA, S. et al. Pneumococcal disease and vaccination in the Americas: an agenda for accelerated vaccine introduction. **Rev Panam Salud Publica**, v. 19, n. 5, p. 340-8, May 2006.

GHAFFAR, F. et al. Effect of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in the first 2 years of life. **Clin Infect Dis**, v. 39, n. 7, p. 930-8, Oct 1 2004.

GIVON-LAVI, N. et al. Spread of *Streptococcus pneumoniae* and antibiotic-resistant *S. pneumoniae* from day-care center attendees to their younger siblings. **J Infect Dis**, v. 186, n. 11, p. 1608-14, Dec 1 2002.

GOMEZ-BARRETO, D. et al. Carriage of antibiotic-resistant pneumococci in a cohort of a daycare center. **Salud Publica Mex**, v. 44, n. 1, p. 26-32, Jan-Feb 2002.

GRAY, B. M.; TURNER, M. E.; DILLON, H. C., JR. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants. The effects of season and age on pneumococcal acquisition and carriage in the first 24 months of life. **Am J Epidemiol**, v. 116, n. 4, p. 692-703, Oct 1982.

HANAGE, W. P. et al. Carried Pneumococci in Massachusetts Children: The Contribution of Clonal Expansion and Serotype Switching. **Pediatr Infect Dis J**, v. 30, n. 4, p. 302-308, Apr 2011.

HAUSDORFF, W. P. et al. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. **Clin Infect Dis**, v. 30, n. 1, p. 100-21, Jan 2000.

HICKS, L. A. et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. **J Infect Dis**, v. 196, n. 9, p. 1346-54, Nov 1 2007.

IBGE. **Resultado do Censo da População de Salvador, BA**. Salvador: Instituto Brasileiro de Geografia Econômica 2000.

JUVEN, T. et al. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. **Pediatr Infect Dis J**, v. 19, n. 4, p. 293-8, Apr 2000.

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

KLUGMAN, K. P. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**, v. 50 Suppl S2, p. 1-5, Dec 2002.

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

KOBAYASHI, K. I. et al. A case of retropharyngeal abscess caused by penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **J Infect**, v. 44, n. 4, p. 267-9, May 2002.

LAVAL, C. B. et al. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 1, p. 50-5, Jan 2006.

LUCAREVSCHI, B. R. et al. [Oropharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by children attending day care centers in Taubate, SP: correlation between serotypes and the conjugated heptavalent pneumococcal vaccine]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 79, n. 3, p. 215-20, May-Jun 2003.

MANTESE, O. C. [Penicillin-resistant pneumococcus: practical implications]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 75 Suppl 1, p. S74-90, Jul 1999.

MCGEE, L. et al. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 7, p. 2565-71, Jul 2001.

MEATS, E. et al. Stability of serotypes during nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 386-92, Jan 2003.

MENEZES, A. P. D. O. **Colonização nasofaríngea por *Streptococcus pneumoniae*: estudo comunitário em crianças menores de cinco anos**. em andamento. (Doutorado). Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador.

MICHELOW, I. C. et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. **Pediatrics**, v. 113, n. 4, p. 701-7, Apr 2004.

MONACO, M. et al. Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 2, p. 256-9, Feb 2005.

MULHOLLAND, K. Childhood pneumonia mortality--a permanent global emergency. **Lancet**, v. 370, n. 9583, p. 285-9, Jul 21 2007.

OBARO, S.; ADEGBOLA, R. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. **J Med Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 98-104, Feb 2002.

OZDEMIR, B. et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy Turkish infants. **J Infect**, v. 56, n. 5, p. 332-9, May 2008.

PARASKAKIS, I. et al. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of 1033 pneumococci isolated from children in Greece during 2001-2004. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 5, p. 490-3, May 2006.

PARK, I. H. et al. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 4, p. 1225-33, Apr 2007.

PASTORE, C. A. et al. Characterization of the electrocardiographic pattern of individuals with cerebral palsy. **J Electrocardiol**, v. 44, n. 2, p. 138-41, Mar-Apr 2011.

PETROSILLO, N. et al. Prevalence, determinants, and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* isolates colonizing the nasopharynx of healthy children in Rome. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 181-8, Mar 2002.

PETTIGREW, M. M. et al. Microbial interactions during upper respiratory tract infections. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 10, p. 1584-91, Oct 2008.

RANGANATHAN, S. C.; SONNAPPA, S. Pneumonia and other respiratory infections. **Pediatr Clin North Am**, v. 56, n. 1, p. 135-56, xi, Feb 2009.

REIS, J. N. et al. Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 1, p. 275-7, Jan 2002.

_____. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an urban slum community. **J Infect**, v. 57, n. 3, p. 204-13, Sep 2008.

REY, L. C. et al. Antimicrobial susceptibility and serotypes of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* in children with pneumonia and in children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 20, n. 2, p. 86-92, Aug 2002.

_____. [Nasopharyngeal isolates of *S. pneumoniae* from healthy carriers and children with pneumonia: colonization rates and antimicrobial susceptibility]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 78, n. 2, p. 105-12, Mar-Apr 2002.

RUDAN, I. et al. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. **Bull World Health Organ**, v. 86, n. 5, p. 408-16, May 2008.

_____. Global estimate of the incidence of clinical pneumonia among children under five years of age. **Bull World Health Organ**, v. 82, n. 12, p. 895-903, Dec 2004.

SHANN, F. Etiology of severe pneumonia in children in developing countries. **Pediatr Infect Dis**, v. 5, n. 2, p. 247-52, Mar-Apr 1986.

SYRJANEN, R. K. et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Finnish children younger than 2 years old. **J Infect Dis**, v. 184, n. 4, p. 451-9, Aug 15 2001.

SYROGIANNOPOULOS, G. A. et al. Carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Greek infants and toddlers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 19, n. 4, p. 288-93, Apr 2000.

SZMIGIELSKA, A. et al. [Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharynx in children with nephrotic syndrome aged 2-5 years in Poland]. **Pol Merkur Lekarski**, v. 24 Suppl 4, p. 32-4, 2008.

TAKALA, A. K. et al. Susceptibility to invasive *Haemophilus influenzae* type b disease and the immunoglobulin G2m(n) allotype. **J Infect Dis**, v. 163, n. 3, p. 637-9, Mar 1991.

TARRAGO, D. et al. Evolution of clonal and susceptibility profiles of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* among invasive isolates from children in Spain (1990-2008). **Antimicrob Agents Chemother**, Feb 22 2011.

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

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

UNICEF. **Pneumonia: the forgotten killer of children.** (WHO), T. U. N. C. S. F. U. W. H. O.: UNICEF's Division of Communication 2006.

WHITNEY, C. G. et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. **N Engl J Med**, v. 348, n. 18, p. 1737-46, May 1 2003.

WHO. **World Health Organization. The management of acute respiratory infections in children: practical guidelines for outpatient care.** Geneva: WHO 1995.

WILLIAMS, B. G. et al. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 1, p. 25-32, Jan 2002.

WOODS, C. R. Acute bacterial pneumonia in childhood in the current era. **Pediatr Ann**, v. 37, n. 10, p. 694-702, Oct 2008.

YU, S. et al. Serogroup distribution and antimicrobial resistance of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* among Beijing children with upper respiratory infections (2000-2005). **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 8, p. 649-55, Aug 2008.

ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Unidade de Emergência de São Marcos/Secretaria Municipal de Saúde – Salvador/BA - Página 78 de 89
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz-MS

Título do Projeto: Colonização por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* em crianças com infecção respiratória.

Pesquisador Responsável: Dra. Leila Carvalho Campos

Telefone: (071) 3176 2301

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Paciente: _____ **No. de Identificação:** _____

Para ser lido a todos os participantes e responsáveis legais dos pacientes menores: As informações que se seguem descrevem o estudo de pesquisa e o seu papel como participante. Antes de decidir participar ou dar autorização para o seu filho(a) participar, é importante que você entenda por quê a pesquisa está sendo realizada e o que ela envolve. Por favor, dedique um tempo para ler ou ouvir com atenção as informações seguintes e discutir isto com os seus familiares, amigos e seu médico. O entrevistador poderá responder todas as perguntas que você tiver sobre o estudo. Por favor, ouça com atenção e não hesite em fazer qualquer pergunta sobre a informação que está sendo fornecida.

Justificativa da Pesquisa: Nós estamos convidando sua criança para participar de um estudo, que está sendo realizado na Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde, sobre *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, bactérias que são encontradas no nariz das pessoas e que podem causar pneumonia. A pneumonia é uma infecção nos pulmões, na qual a criança apresenta tosse, febre e dificuldade para respirar. Alguns exames são normalmente realizados nos casos de suspeita de pneumonia, que podem dizer se a pessoa está com esta doença e permitir que se conheça quais as bactérias que estão circulando na nossa Cidade, contribuindo para o entendimento e controle desta doença. O objetivo deste estudo é determinar se estas bactérias estão no nariz das crianças e se elas são resistentes aos antibióticos, utilizados nos tratamentos. Obtendo estas informações teremos condições, no futuro, de adotar medidas para diminuir o número de crianças com pneumonia por esta bactéria. Seu filho(a) não sofrerá nenhum desconforto e não haverá nenhum risco para a saúde do mesmo.

Procedimento: Se você voluntariamente decidir participar deste estudo após ter lido este formulário de consentimento, uma enfermeira treinada lhe fará perguntas sobre o local onde você mora, sua ocupação (trabalho) e a história médica de seu filho (a). Após a entrevista ela vai coletar o material do fundo da cavidade nasal da criança utilizando um *swab* (espécie de cotonete grande) estéril e descartável. Após sua utilização no exame, o *swab* será descontaminado através da esterilização em autoclave e em seguida descartado em lixo de resíduo hospitalar. Posteriormente, após conversar com o(a) pediatra, a enfermeira irá no Serviço de Arquivos Médicos da Unidade (PASTORE *et al.*) para revisar a ficha médica do seu filho (a) para coletar os resultados dos exames realizados na unidade de atendimento.

Sigilo: Suas respostas durante a entrevista e os resultados dos exames serão confidenciais. Apenas você, os investigadores do grupo de estudo, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz terão acesso a estas informações. Você (ou seu filho) não será identificado em qualquer relatório ou publicação resultante deste estudo. O *swab* coletado será numerado e não conterá qualquer nome, para garantir o anonimato do seu (sua) filho (a).

Participação voluntária: Sua participação (ou de seu filho) neste estudo é voluntária, você pode se recusar a participar. Durante a entrevista, o entrevistador pode perguntar questões que você ache que não são adequadas e não queira responder. Se quiser, você tem o direito de recusar a respondê-las. Além disso, sua participação ou não neste projeto, não causará nenhuma diferença ou perda no atendimento de seus problemas de saúde neste ou em outros hospitais. Você não será responsável por nenhuma despesa, incluindo as análises laboratoriais de amostras, associadas com este estudo. Você não receberá compensação financeira para participar do estudo. Você receberá uma cópia deste termo de consentimento.

Benefícios: O paciente não terá um benefício direto na participação deste estudo, mas estará contribuindo para a coleta de informações sobre estas bactérias que causam doenças graves em crianças. Estas informações serão utilizadas para auxiliar o governo na adoção de medidas de prevenção como vacinas e de tratamento através da recomendação de antibióticos adequados a estes microrganismos.

Riscos: O risco na participação neste estudo é mínimo, sendo que o único inconveniente é que as crianças podem chorar durante a coleta do *swab*. A participação no estudo não vai interferir no tratamento das crianças. Caso ocorra algum dano ou complicações referentes à participação do paciente no estudo, o pesquisador responsável pela execução do projeto assume toda a responsabilidade de dar assistência integral ao paciente, bem como indenização.

Outras informações: É possível que as amostras bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* que porventura sejam isoladas da nasofaringe do seu (sua) filho (a) sejam enviadas para o Laboratório de *Streptococcus*, no CDC, Estados Unidos, para completar a sua identificação. Neste caso, as amostras serão enviadas exclusivamente para este fim e serão descartadas após identificação.

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. Leila Carvalho Campos pelo telefone: (71) 3176-2301 ou (71) 9977-1196 (a cobrar). Caso você tenha alguma pergunta no que se refere a você como indivíduo pesquisado, por favor, entre em contato com a Comissão de Ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone: (71) 3176-2285.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, eu voluntariamente consinto que o paciente do qual eu sou pai ou mãe ou guardião legal participe do estudo. Declaro ainda que recebi informações de forma clara, detalhada e livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, justificativa, riscos, desconfortos e benefícios do estudo, todos acima descritos.

Assinatura do pai, mãe ou responsável legal

Data

Hora



Impressão datiloscopia do pai ou mãe ou guardião legal

Investigador

Assinatura

Data

ANEXO II – Questionários Individuais e Epidemiológicos do Estudo

Vigilância Ativa para Pneumonia Infantil na UESM

Etiqueta	Codificado		1ª Digitação		2ª Digitação	
	CDIND	DCDIND	DGIND	DDGIND	DG2IND	DDG2IND

PARA PROTEGER A CONFIDENCIALIDADE DO PACIENTE, ESTE QUESTIONÁRIO DEVE RÁ 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 UM NUMERO DE IDENTIFICAÇÃO UNICO (VAPI)

Data da Entrevista:	DEIND
Iniciais do Entrevistador:	EIND

I. IDENTIFICAÇÃO:

1.1	Nº de Identificação VAPI:	VAPI
1.2	Termo de consentimento: Sim: <input type="checkbox"/> 1 Não: <input type="checkbox"/> 0	CONS
1.3	Nome:	NOME
1.4	Apelido:	APE
1.5	Nome da mãe/responsável pela criança:	
1.6	Nº de Registro na UESM:	REG
1.7	Data de Atendimento na UESM:	DATM
1.8	O paciente já foi atendido em outro posto ou hospital? Qual: _____ Sim: <input type="checkbox"/> 1 Não: <input type="checkbox"/> 0	POH POH1
1.9	Data de Nascimento:	DNAS

II. Dados Demográficos:

2.1	Rua / Nº:	END
2.2	Telefone (nº e nome de contato):	TEL
2.3	Ponto de Referencia:	REF
2.4	Bairro:	BAI
2.5	Cidade:	CID
2.6	Mora em Pau da Lima/São Marcos Sim : <input type="checkbox"/> 1 Não : <input type="checkbox"/> 0	PLM
2.7	Mora na área de estudo para Leptospirose?	AREA

	Sim : <input type="text" value="1"/> Não : <input type="text" value="0"/>	
2.8	Até que série a mãe/responsável pela criança estudou? Nunca estudou <input type="text" value="0"/> 1º grau incompleto <input type="text" value="1"/> 1º grau completo <input type="text" value="2"/> 2º grau incompleto <input type="text" value="3"/> 2º grau completo <input type="text" value="4"/> Universidade <input type="text" value="5"/>	ESTUDO
2.9	Qual é a renda mensal da família da criança? (<input type="text" value="renda atual"/> de todos os moradores do domicílio que possuem remuneração)	

Indivíduos

1				
2				
3				
4				
5				
6				

R\$

Indivíduos

7				
8				
9				
10				
11				
12				

R\$

R\$

R\$

R\$

R\$

R\$

3.0	Renda total:
3.1	Total de moradores no domicílio:

RENDT
INDIV

Vigilância Ativa para Pneumonia Infantil na UESM

Etiqueta	Codificado	1ª Digitação	2ª Digitação						
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;">CDEPI</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">DCDEPI</td> </tr> </table>	CDEPI	DCDEPI	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;">DGEPI</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">DDGEPI</td> </tr> </table>	DGEPI	DDGEPI	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;">DG2EPI</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">DDG2EPI</td> </tr> </table>	DG2EPI	DDG2EPI
CDEPI	DCDEPI								
DGEPI	DDGEPI								
DG2EPI	DDG2EPI								

	Data da Entrevista:		DEEPI
	Iniciais do Entrevistador:		EEPI
	Data da Digitação:		DTDIGI

I. IDENTIFICAÇÃO:

1.1	Data de Atendimento na UESM: ___/___/___	DATM
1.2	Horário de Atendimento na UESM:	HADM
1.2	Nº de registro na UESM:	REG
1.3	Idade em anos (se <1ano, coloque 0): _ _ Se <2 anos, idade do paciente em meses: _ _	AGE AGE2
1.4	Sexo: Masculino _ Feminino _ Não sabe _	SEXO
1.5	Grupo Racial Observado: _ (1=branco, 2=mulato, 3=negro)	RACE
1.6	Grupo Racial Referido: _ (1=branco, 2=mulato, 3=negro, 4=pardo, 5=Outra, 6= Não sabe)	RACERE

II. Dados Clínicos:

2.1	Data de início dos sintomas: ___/___/___	DINIS
2.2	Frequência Respiratória por minuto: _ _	TAQ
2.3	Frequência Cardíaca (bpm): _ _ _	CAR
2.4	Temperatura na Admissão: _ _ _ °C	TEMP
2.5	Pressão Arterial: sistólica: _ _ _ diastólica: _ _ _	CIS DIAS
2.6	Letargia ou Inconsciência: _ (1=sim; 0=não)	LETA
2.7	Cianose ou Toxemia: _ (1=sim; 0=não)	CIA
2.8	Batimento de Asa de Nariz: _ (1=sim; 0=não)	ASA
2.9	Tiragem Intercostal ou Diafragmática: _ (1=sim; 0=não)	INTER
2.10	Crepitações: _ (1=sim; 0=não)	CRE
2.11	Ausência de Estridor: _ (1=sim; 0=não)	AES
2.12	Dispnéia: _ (1=sim; 0=não)	DISP
2.13	Cefaléia: _ (1=sim; 0=não)	CEF
2.14	Vômitos: _ (1=sim; 0=não)	VOM
2.15	Fraqueza: _ (1=sim; 0=não)	FRAQ
2.16	Tosse: _ (1=sim; 0=não)	TOS
2.17	Expectoração: _ (1=sim; 0=não): Se Sim, Tipo: _ (1=Mucosa 2=Muco-purulenta 3=Purulenta, 4=Sanguinolenta)	EXP TIP
2.18	Irritabilidade: _ (1=sim; 0=não)	IRRIT

2.19	Inapetência: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não)	INAP
2.20	Dificuldade para Deglutir: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não)	DEG
2.21	O responsável relatou Febre?: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não)	FEB
2.22	Diarréia: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não)	DIAR
2.23	Dor Torácica: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não)	DORT
2.24	Rinorréia: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não)	RINO
2.25	Outros: _____	OUT

III. Co-Morbidades:

3.1	Esplenectomia: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não)	ESPL
3.2	Diabetes: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não)	DM
3.3	AIDS: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não)	AID
3.4	Malformação: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não) Tipo: _____	MALF TIP2
3.5	Câncer: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não) Tipo: _____	CAN QCAN
3.6	Doença Cardíaca: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não) Tipo: _____	CARDIO QCARDIO
3.7	Doença Pulmonar: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não) Tipo: _____	DPUL QDPUL
3.8	Doença Hepática: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não) Tipo: _____	DHEP QDHEP
3.9	Doença Hematológica (ANEMIA): <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não) Tipo: _____	DHEMATO QDHEMATO
3.10	Doença Renal: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não) Tipo: _____	DREN QDREN
3.11	Outras: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não) Qual: _____	OUTR QUA

IV. Fatores de Risco:

4.1	O paciente esteve doente no último mês (30 dias anterior): Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	DP
4.2	Se sim, o que sentiu? (1=sim, 0=não) Febre <input type="checkbox"/> Dor de ouvido <input type="checkbox"/> Tosse produtiva <input type="checkbox"/> Dor de garganta <input type="checkbox"/> Corrimento nasal <input type="checkbox"/> Sinusite <input type="checkbox"/> Dificuldade para respirar <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/> Se sim, qual? _____	FEBRE TOSSE CORRIM DIFRES OTITE FARING SINUSI OUTFR OUTFR1
4.3	Procurou atendimento médico? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9 Se sim, onde? _____	ATM QATM
4.4	O paciente usou antibióticos no último mês: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	AM
4.5	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	LAM
4.6	Qual(is) antibióticos que o paciente usou no último mês (30 dias anterior): _____	QAM1

4.7	Qual(is) antibióticos que o paciente usou no último mês (30 dias anterior): _____	QAM
4.8	Paciente tomou bactrim ou similares no último mês? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	BCT
4.9	Se for criança < 2 anos. A criança está sendo amamentada? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	ALEI
4.10	Se for criança < 2 anos. Durante quantos meses amamentou no total: _ _	TALEI
4.11	A criança frequenta creche ou escola? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	CREQ
4.12	Moram outras crianças menores de 15 anos na casa: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	COCR
4.13	Existe alguma pessoa que fuma morando na mesma casa que a criança? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	CFUM
4.14	A criança tem contato prolongado (4 horas ou mais por dia) com idosos (> 65anos)? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	IDOSO

V. Antecedentes de Vacinação: consulta no cartão

5.1	Vacinação anti - <i>H. influenzae</i> : _ (1=sim; 0=não) Data da última dose: ____/____/____ Número de Doses: _	VAHIN QUAND3 NDOSEH
5.2	Vacinação Anti-Pneumocócica: _ (1=sim; 0=não) Data da última dose: ____/____/____ Número de Doses: _	VAPNEU QUAN1 NDOSEP
5.3	Vacinação Anti-Meningocócica: _ (1=sim; 0=não) Data da última dose: ____/____/____ Número de Doses: _	VAMEN QUAN2 NDOSEM
5.4	Vacinação Anti-Influenza (Gripe): _ (1=sim; 0=não) Data da vacinação: ____/____/____	VAINF QUAN3

VI. Resultados e Diagnóstico Final:

6.1	Hemograma: _ (1=sim; 0=não) Data: ____/____/____ Hemácias: _____ Hemoglobina: _____ Hematócrito: _____ (valor em %) VHS: _____ Leucócitos: _____ Neutrófilos: _____ Bastões: _____ Monócitos: _____ Eosionófilos: _____ Linfócitos: _____	HEMO HEMOD CHEMA HGLOB HT VHS1 LEU NEU BAS MONC EOSINF LINF
6.2	RAIO X: _ (1=sim; 0=não) Data do RX: ____/____/____ Resultado: Consolidado Lobar direita: _ Consolidado Lobar esquerda: _ Broncograma aéreo _ Derrame Pleural _ Normal _ Infiltrado _ Condensação _	RX DARX RXCONSD RXCONSE RXBA RXDP RXNOR RXINF RXCONDE

6.3	Hemocultura: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não) Se teve pneumonia e não fez hemocultura, porque? Evadiu <input type="checkbox"/> 1 Transferido <input type="checkbox"/> 2 Não autorizou <input type="checkbox"/> 3 Diagnóstico após alta <input type="checkbox"/> 4 Acesso difícil <input type="checkbox"/> 5 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Volume do inoculo em ml: _____ No momento da coleta o paciente estava em uso de Antibiótico? <input type="checkbox"/> Se fez hemocultura, qual o resultado?: <input type="checkbox"/> (1=Positivo; 0=Negativo) Se positivo, qual o agente? _____	HEMOC HEMOCN VINOC HEMOCATB HEMOP HEMOBAC
6.4	Coletou soro do paciente? <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não)	SORO
6.5	Volume do soro em ml: _____	VSORO
6.6	Coletou swab de nasofaringe? <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não)	SWAB
6.7	Paciente teve diagnóstico de pneumonia: <input type="checkbox"/> (1=sim; 0=não), se não qual foi o outro diagnóstico: _____	Pneumo QDIAG

VII. Tratamento do paciente na UESM:

7.1	Qual o antibiótico prescrito para o paciente 1: _____	QAtB1
7.2	Qual o antibiótico prescrito para o paciente: _____	QAtB

VIII. EVOLUÇÃO CLÍNICA:

8.1	Tipo de alta: Casa <input type="checkbox"/> 1 Observ./Transferido <input type="checkbox"/> 2 Observ./Alta casa <input type="checkbox"/> 3 Óbito <input type="checkbox"/> 4	EVOLC
8.2	Data da alta: ___/___/___	DALTA
8.3	Hora da alta: _____	HALTA
8.4	Se transferido qual o hospital: _____	NHOSP
8.5	Quanto tempo permaneceu na emergência (em horas): <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	TPESM

ANEXO III – Lista de *primers* utilizados no Multiplex-PCR

Sorotipo/sorogrupo	Sequência (5'-3')	Gene	Tamanho do produto
1-f	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA	<i>wzy</i>	280
1-r	CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C		
2-f	TAT CCC AGT TCA ATA TTT CTC CAC TAC ACC	<i>wzy</i>	290
2-r	ACA CAA AAT ATA GGC AGA GAG AGA CTA CT		
3-f	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G	<i>galU</i>	371
3-r	CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G		
4-f a	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G	<i>wzy</i>	430
4-r	GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G		
5-f	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG	<i>wzy</i>	362
5-r	GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG		
6A/6B/6C-f	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG	<i>wciP</i>	250
6A/6B/6C-r	TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA		
6C-f	CAT TTT AGT GAA GTT GGC GGT GGA GTT	<i>wciNbeta</i>	727
6C-r	AGC TTC GAA GCC CAT ACT CTT CAA TTA		
7C/(7B/40)-f	CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC GGG A	<i>wcwL</i>	260
7C/(7B/40)-r	GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC		
7F/7A-f	TCC AAA CTA TTA CAG TGG GAA TTA CGG	<i>wzy</i>	599
7F/7A-r	ATA GGA ATT GAG ATT GCC AAA GCG AC		
8-f	GAA GAA ACG AAA CTG TCA GAG CAT TTA CAT	<i>wzy</i>	201
8-r	CTA TAG ATA CTA GTA GAG CTG TTC TAG TCT		
9N/9L-f	GAA CTG AAT AAG TCA GAT TTA ATC AGC	<i>wzx</i>	516
9N/9L-r	ACC AAG ATC TGA CGG GCT AAT CAA T		
9V/9A-f	GGG TTC AAA G TC AGA CAG TG A ATC TTA A	<i>wzy</i>	816
9V/9A-r	CCA TGA ATG A AA TCA ACA TT G TCA GTA GC		
10A- f	GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC	<i>wcrG</i>	628
10A- r	GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C		
10F/(10C/33C)- f	GGA GTT TAT CGG TAG TGC TCA TTT TAG CA	<i>wzx</i>	248
10F/(10C/33C)- r	CTA ACA AAT TCG CAA CAC GAG GCA ACA		
11A/11D-f	GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G	<i>wzy</i>	463
11A/11D-r	GAT TAT GAG TGT AAT TTA TTC CAA CTT CTC CC		
12F/(12A/44/46)-f	GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G	<i>wzx</i>	376
12F/(12A/44/46)-r	CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC		
13-f	TAC TAA GGT AAT CTC TGG AAA TCG AAA GG	<i>wzx</i>	655
13-r	CTC ATG CAT TTT ATT AAC CG C TTT TTG TTC		
14-f	GAA ATG TTA CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT	<i>wzy</i>	189
14-r	GCC AAT ACT TCT TAG TCT CTC AGA TGA AT		
15A/15F-f	ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C	<i>wzy</i>	434
15A/15F-r	GAT CTA GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC		
15B/15C-f	TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA	<i>wzy</i>	496
15B/15C-r	CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C		
16F-f	GAA TTT TTC AGG CGT GGG TGT TAA AAG	<i>wzy</i>	717
16F-r	CAG CAT ATA GCA CCG CTA AGC AAA TA		
17F-f	TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG	<i>wciP</i>	693

Sorotipo/sorogrupo	Sequência (5'-3')	Gene	Tamanho do produto
18/(18A/18B/18C/18F)-f	CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC	<i>wzy</i>	573
18/(18A/18B/18C/18F)-r	TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC		
19A-f	GAG AGA TTC ATA ATC TTG CAC TTA GCC A	<i>wzy</i>	566
19A-r	CAT AAT AGC TAC AAA TGA CTC ATC GCC		
19F-f	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C	<i>wzy</i>	304
19F-r	GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG		
20-f	GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G	<i>wciL</i>	514
20-r	CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC		
21-f	CTA TGG TTA TTT CAA CTC AAT CGT CAC C	<i>wzx</i>	192
21-r	GGC AAA CTC AGA CAT AGT ATA GCA TAG		
22F/22A-f	GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA TTG TC	<i>wcwV</i>	643
22F/22A-r	CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC		
23A-f	TAT TCT AGC AAG TGA CGA AGA TGC G	<i>wzy</i>	722
23A-r	CCA ACA TGC TTA AAA ACG CTG CTT TAC		
23B-f	CCA CAA TTA G CG CTA TAT TCA TTC AAT CG	<i>wzx</i>	199
23B-r	GTC CAC GCT GAA TAA AAT GAA GCT CCG		
23F-f a	GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC	<i>wzy</i>	384
23F-r	CAC AAC ACC TAA CAC TCG ATG GCT ATA TGA TTC		
24/(24A, 24B, 24F)-f	GCT CCC TGC TAT TGT AAT CTT TAA AGA G	<i>wzy</i>	99
24/(24A, 24B, 24F)-r	GTG TCT TTT ATT GAC TTT ATC ATA GGT CGG		
31-f	GGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGT GC	<i>wzy</i>	701
31-r	CCG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC		
33F/(33A/37)-f	GAA GGC AAT CAA TGT GAT TGT GTC GCG	<i>wzy</i>	338
33F/(33A/37)-r	CTT CAA AAT GAA GAT TAT AGT ACC CTT CTA C		
34-f	GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC	<i>wzy</i>	408
34-r	CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC		
35A/(35C/42)-f	ATT ACG ACT CCT TAT GTG ACG CGC ATA	<i>wzx</i>	280
35A/(35C/42)-r	CCA ATC CCA AGA TAT ATG CAA CTA GGT T		
35B-f	GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG	<i>wcrH</i>	677
35B-r	CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G		
35F/47F-f	GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A	<i>wzy</i>	517
35F/47F-r	GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC		
38/25F-f	CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG	<i>wzy</i>	574
38/25F-r	ATG TTT GAA TTA AAG CTA ACG TAA CAA TCC		
39-f	TCA TTG TAT TAA CCC TAT GCT TTA TTG GTG	<i>wzy</i>	98
39-r	GAG TAT CTC CAT TGT ATT GAA ATC TAC CAA		
cpsA-f	GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC	<i>wzg</i>	160
cpsA-r	GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC		

ANEXO IV – Critérios do CLSI 2010 para determinação da sensibilidade antimicrobiana do *Streptococcus pneumoniae* e breakpoints do CLSI 2010 da cepa de controle de qualidade *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

	MIC breakpoints (µg/mL)			<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619
	R	I	S	
cefotaxima	≥ 2	1	≤ 0,5	0,03 – 0,125
clindamicina	≥ 1		≤ 0,25	0,03 – 0,125
cloranfenicol	≥ 8		≤ 4	2 – 8
eritromicina	≥ 1	0,5	≤ 0,25	0,03 – 0,125
penicilina (meningite)	≥ 0.125		≤ 0,06	0,25 – 1
levofloxacina	≥ 8		≤ 2	0,5 – 2
rifampicina	≥ 4		≤ 1	0,015 – 0,06
tetraciclina	≥ 8	4	≤ 2	0,06 – 0,5
trimetoprim- sulfametoxazol	≥ 4/76		≤ 0,5/9,5	0,125/2,4 - 1/19
vancomicina	-	-	≤ 1	0,125 – 0,5

R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível;

Anexo V – Folha de aprovação do CEP/FIOCRUZ



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Comitê de Ética em Pesquisas – CPqGM/FIOCRUZ

PARECER Nº 108/2006

Protocolo: 164

Projeto de Pesquisa: “Transmissão de Streptococcus pneumoniae resistente aos antimicrobianos no Brasil”.

Pesquisador Responsável: Drª Joice Neves Reis Pedreira

Instituição ou Departamento: LPBM / FIOCRUZ

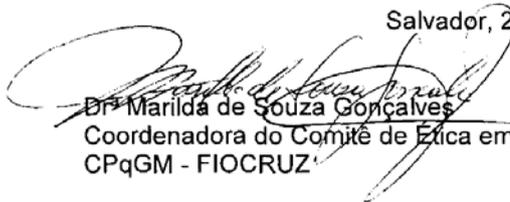
Considerações:

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 Pesquisa 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 em 25/02/2005 que está licenciado e tem validade até 25/02/2010.

The present study, entitled “Transmission of Drug-Resistant S. pneumoniae in Brazil” with protocol number 164 has been approved by the Gonçalo Moniz Research Center of the Oswaldo Cruz Research Foundation (FIOCRUZ) Ethical Committee on Human Subject (IORG00002090 / IRB000026120) in February 25th 2005 meeting and in the Brazilian National Ethical Committee on Human Subject (CONEP) with protocol number 25000.045797/2005-18. The protocol and procedures presented in the project are in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human subject (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. In the present version, this project is licensed and valid until February 25th 2010.

Salvador, 25 de fevereiro de 2005.


 Dr. Marilda de Souza Gonçalves
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 CPqGM - FIOCRUZ