



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

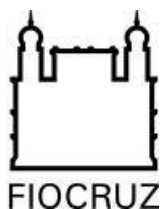
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Streptococcus pneumoniae*
CAUSADORAS DE DOENÇA INVASIVA NA CIDADE DE
SALVADOR, BAHIA.

VÍVIAN SANTOS GALVÃO

Salvador – Bahia – Brasil
2012



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Streptococcus pneumoniae*
CAUSADORAS DE DOENÇA INVASIVA NA CIDADE DE
SALVADOR, BAHIA.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz como
requisito para obtenção do título de mestre
em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa.

Orientadora: Dra. Joice Neves Reis Pedreira

VÍVIAN SANTOS GALVÃO

Salvador – Bahia – Brasil
2012

*Dedico este trabalho a meus pais,
por quem serei eternamente grata.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sempre em primeiro lugar, porque é Ele o responsável por tudo que consegui alcançar até hoje e é quem me faz ter força de continuar nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Vicente e Ana Lúcia Galvão, minhas razões de viver. Não poderia existir melhor presente da vida do que a honra de ser filha de vocês. Obrigada por abdicar de tanta coisa em prol do meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus tios Enéas e Ana, meus pais aqui em Salvador, por todo apoio e carinho oferecidos e à minha grande família, meu alicerce da vida.

À minha orientadora, Dra Joice Neves Reis, por todo conhecimento a mim instruído, fundamental para realização desse trabalho.

Aos queridos colegas da equipe de Meningite, Milena Soares, Ana Paula Menezes, Eliane Escobar, Mariela Correia, Leila Campos, Lorena Galvão, André Silvany e Paulo Lobo, pelos anos de convívio e por cada contribuição e ajuda.

A Soraia Cordeiro, pelas contribuições, idéias e dicas dadas em vários momentos, sempre marcadas com muito bom humor.

A Eder Silva e Eliane Escobar, pelos auxílios constantes nos experimentos realizados. E a Jailton Azevedo, por me incluir na listinha especial de orações e por todas as opiniões e ajuda na escrita.

A Diego Rios e Fernanda Albuquerque, não só pelas discussões laborais, mas principalmente pela amizade construída, indispensável nos momentos mais complicados que vivemos juntos.

Aos meus queridos amigos, pela certeza de que nunca estarei sozinha e por entender minha ausência em alguns momentos especiais.

Ao Professor Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, chefe do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular – LPBM e ao Professor Albert Ko pela contribuição e suporte oferecidos na execução dos procedimentos laboratoriais deste trabalho.

Aos colegas do LPBM que fizeram parte dessa jornada comigo.

Aos bioquímicos Goreth Barberino, Neide Oliveira, Sidinei Lima e Corine Sampaio pela dedicação e colaboração que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa - PPgBSMI pelos ensinamentos preciosos a mim ofertados.

À Plataforma de Sequenciamento do CPqGM e à Silvana pela ajuda com todo o carinho e atenção intrínsecos à sua personalidade.

A todos os funcionários e servidores do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

À CAPES e FAPESB pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao CPqGM, pela oportunidade de realização do Mestrado, por toda estrutura física oferecida e pelo financiamento da bolsa de Mestrado.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

A doença pneumocócica invasiva (DPI) continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, mesmo com a disponibilidade atual de terapias antimicrobianas e vacinas conjugadas. O objetivo desse estudo foi caracterizar o perfil fenotípico e genotípico das cepas invasivas de *Streptococcus pneumoniae* isoladas de diferentes sítos de infecção que circulam em hospitais públicos e privados da cidade de Salvador-Brasil no período de janeiro de 2008 a julho de 2011. Os isolados de *S. pneumoniae* de doença invasiva foram identificados por métodos microbiológicos clássicos e submetidos à determinação capsular através da técnica de Multiplex-PCR. A sensibilidade aos antimicrobianos foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo. A caracterização genotípica foi realizada por PFGE e MLST. No período do estudo foram identificados 75 casos de DPI com cultura positiva, sendo 82,7% provenientes de hemocultura, 9,3% de líquido pleural e 8,0% de líquido. As crianças representaram 37,9% e os idosos 24,0% da população em estudo. Os sorotipos mais prevalentes foram o 14 (14,7%), 19F (13,3%), 6B (10,7%), 23F (9,3%), 3 (9,3%) e 19A (6,7%). Um total de 57,3% dos sorotipos identificados estão representados na vacina PCV10. Não-susceptibilidade à penicilina (CIM $\geq 4\mu\text{g/mL}$) foi observada em 5,3% dos isolados. Para o SMX-TMP, tetraciclina e eritromicina, os índices de não-susceptibilidade foram de 55%, 15% e 11%, respectivamente. A tipagem por PFGE classificou 61,3% dos isolados de DPI como não-clonais e 29 (38,7%) em 10 perfis clonais. Quando comparados aos isolados de meningite isolados no Hospital Couto Maia, 22,7% apresentaram perfis semelhantes, que foram distribuídos em seis grupos clonais (quatro grupos clonais com isolados não-susceptíveis à penicilina e dois sensíveis). Foram encontrados 22 STs diferentes entre as 26 amostras caracterizadas por MLST. Quando comparado aos clones já caracterizados pelo PMEN, verificou-se que na cidade de Salvador circulam clones já identificados em outros países, a exemplo dos clones: Colombia^{23F}-26 (SLV 338), Portugal^{19F}-21 (ST 177), Spain^{9V}-3 (SLV 156) e Netherlands³-31 (ST 180). Os isolados de pneumococos deste estudo apresentam maior taxa de resistência, incluindo resistência a múltiplas drogas quando comparados aos dos casos de meningite identificados em casos de meningite, com exceção da penicilina. Embora os clones mais frequentemente associados aos casos de meningite pneumocócica em Salvador tenham sido identificados nesta casuística, os isolados de pneumococos provenientes de outras formas de doença invasiva apresentaram uma maior diversidade fenotípica e genotípica, ressaltando a importância do monitoramento contínuo das cepas invasivas nas diferentes manifestações da doença pneumocócica no tempo das vacinas conjugadas.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*, doença pneumocócica invasiva, resistência antimicrobiana, vacina decavalente

ABSTRACT

Invasive pneumococcal disease (IPD) remains one of the major causes of morbidity and mortality worldwide, even with the current availability of antimicrobial therapies and conjugate vaccines. The objective of the present study was to characterize the phenotypic and genotypic profiles of invasive pneumococcal isolates obtained from patients admitted to public and private hospitals in Salvador, from the period of Jan/2008 to Jul/2011. The pneumococcal isolates from invasive disease were identified by classical microbiological methods and submitted to capsular deduction by multiplex-PCR. The antimicrobial susceptibility was performed by broth microdilution method. The genotypic profile was accessed by PFGE and MLST. During the study period, 75 consecutive culture-positive cases of IPD were characterized, being 82.7% from blood, 9.3% from pleural fluid and 8.0% from CSF. The study population comprised of 37.9% of children (under 5 years old) and 24.0% of elderly (upper 64 years old). The most prevalent serotypes were: 14 (14.7%), 19F (13.3%), 6B (10.7%), 23F (9.3%), 3 (9.3%) and 19A (6.7%). A total of 57.3% of the serotypes identified are represented in the vaccine PCV10. Non-susceptibility to penicillin (MIC \geq 4 μ g/mL) was observed in 5.3% of the isolates. The non-susceptibility rate for SMX-TMP, tetracycline and erythromycin was found in 55%, 15% and 11% of the isolates, respectively. The PFGE pattern analysis classified 61.3% of IPD isolates as non-clonal and 29 (38.7%) isolates were clustered in ten PFGE profiles. When the clonal strains were compared with pneumococcal meningitis isolates from Hospital Couto Maia, 22.7% showed similar profiles by PFGE, being distributed into six clonal groups (four clonal groups of penicillin non-susceptible and two of penicillin susceptible). Twenty-two STs were observed among the 26 samples characterized by MLST. When compared to already characterized PMEN clones, it was found that some circulating clones in the city of Salvador have been identified in other countries, such as: Colombia^{23F}-26 (SLV 338), Portugal^{19F}-21 (ST 177), Spain^{9V}-3 (SLV 156) and Netherlands³-31 (ST 180). The pneumococcal strains in the study have a higher rate of resistance, including multidrug resistance when compared to cases of meningitis identified in the HCM, except for penicillin. Although the clones most frequently associated with cases of meningitis in Salvador have been identified in this study, isolates of pneumococci from other forms of IPD had a higher phenotypic and genotypic diversity, highlighting the importance of continuous monitoring of invasive strains in different manifestations of pneumococcal infection in the time of conjugate vaccines.

Key-words: *Streptococcus pneumoniae*, pneumococcal invasive disease, antimicrobial resistance, decavalent vaccine.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. A – Coloração de Gram demonstrando característica morfotintorial de <i>S. pneumoniae</i> numa amostra de secreção respiratória. B – Características macroscópicas da colônia de pneumococo em cultivo de agar sangue, evidenciando-se o aspecto esverdeado característico de α -hemólise promovido pela bactéria.	16
Figura 2. Impacto anual da doença pneumocócica nos Estados Unidos da América estratificado pelas formas clínicas.	19
Figura 3: Estimativa global da taxa de mortalidade para cada 100.000 crianças HIV-negativas/ano, com idade inferior a cinco anos.	21
Figura 4. Dendrograma dos padrões clonais apresentados pelos isolados de DPI através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) no período de 2008-2011.	58
Figura 5. Similaridade genética dos seis grupos clonais formados pelos isolados de DPI quando associados aos isolados de meningite da vigilância do Hospital Couto Maia (2008-2011).	59

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Distribuição dos casos de DPI identificados em Salvador no período de 2008 a 2011, de acordo com a faixa etária dos pacientes e origem dos isolados de pneumococos (n=65).	49
Gráfico 2. Distribuição dos sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> isolados de casos de DPI em Salvador (2008-2011), estratificado por grupos etários.	53

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Frequência dos sorotipos isolados de casos de DPI na cidade de Salvador, no período de 2008 a 2011.	51
Tabela 2. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de casos de DPI na cidade de Salvador (2008-2011).	55
Tabela 3. ST, sorotipo e perfil alélico dos isolados de doença pneumocócica invasiva caracterizados por MLST e associação com os clones já caracterizados pelo PMEN (n=26).	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDC	<i>Centers for Diseases Control</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
HCM	Hospital Couto Maia
DPI	Doença Pneumocócica Invasiva
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
NEB	Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística
NPCV10	Ausentes na Vacina Pneumocócica Conjugada 10-Valente
NS	Não-susceptível
NT	Não-tipável
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Razão de <i>Odds</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCV7	Vacina Pneumocócica Conjugada 7-Valente
PCV10	Vacina Pneumocócica Conjugada 10-Valente
PCV13	Vacina Pneumocócica Conjugada 13-Valente
PEN	Penicilina
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsátil
PMEN	<i>Pneumococcal Molecular Epidemiology Network</i>
PPV23	Vacina Pneumocócica Polissacarídica (23-Valente)
PNS	Não-Susceptível à Penicilina
S	Sensível
SLV	<i>Single Locus Variant</i>
DLV	<i>Double Locus Variant</i>
ST	Sequência Tipo
STX-TMP	Sulfametoxazol-trimetoprim
TE	Tris-EDTA
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

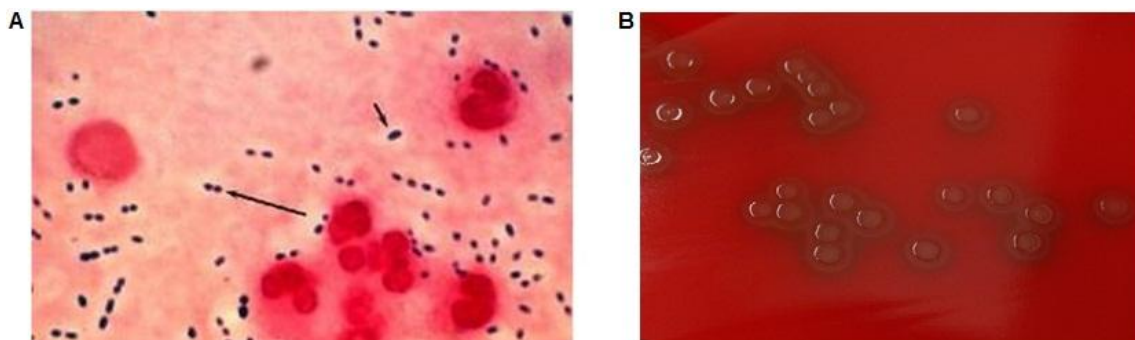
	Página
RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE GRÁFICOS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	13
INTRODUÇÃO	
1.1 – O patógeno	16
1.2 – Patogenicidade e Aspectos Clínicos da Infecção	18
1.3 – Aspectos Epidemiológicos da Doença Pneumocócica	19
1.4 – Fatores de Risco para a Infecção	22
1.5 – Perfil de Susceptibilidade	22
1.6 – Profilaxia	24
1.7 – Importância dos Estudos de Similaridade Genética de <i>S. pneumoniae</i>	28
JUSTIFICATIVA	31
OBJETIVOS	
3.1 – Geral	32
3.2 – Específicos	32
MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 – Tipo e Local de Estudo	33
4.2 – Período de Estudo	33
4.3 – Aspectos Éticos do Estudo	33

4.4 – Critérios de Inclusão	34
4.5 – Coleta de Dados	34
4.6 – Identificação dos Casos	34
4.7 – Estocagem/Armazenamento	35
4.8 – Amostras do Hospital Couto Maia	35
4.9 – Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos	36
4.10 – Dedução Capsular de <i>S. pneumoniae</i>	38
4.11 – Eletroforese em Gel de Campo Pulsátil (PFGE)	40
4.12 – Multi Locus Sequence Type (MLST)	44
ANÁLISE DE DADOS	48
RESULTADOS	
5.1 – Caracterização da População Estudada	49
5.2 – Perfil dos Sorotipos de <i>S. pneumoniae</i>	50
5.3 – Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana	53
5.4 – Caracterização Molecular	56
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS	
Anexo I – Relação contendo os 43 clones da coleção disponível no PMEN, com a caracterização molecular e perfil de susceptibilidade à penicilina e cefotaxima.	84
Anexo II – Lista de <i>primers</i> utilizados na reação de Multiplex-PCR para dedução capsular de <i>S. pneumoniae</i> , disponibilizada pelo CDC.	86
Anexo III – Folha de Aprovação do Comitê de Ética	88

INTRODUÇÃO

1.1 O patógeno

Streptococcus pneumoniae, ou pneumococo, pertence ao Reino Monera; Filo Firmicutes; Classe Bacilli; Ordem Lactobacillales; Família Streptococcaceae; Gênero Streptococcus (BERGEY, 2001). É uma bactéria anaeróbia facultativa, capsulada, que se apresenta na coloração de Gram como cocos Gram positivos, com diâmetro que varia entre 0,5 e 1,2 μm , lanceolados e quase sempre dispostos aos pares (Figura 1A). Como característica das bactérias que compõem o seu gênero, o pneumococo não produz catalase e quando cultivado em ágar suplementado com sangue produz α -hemólise, a qual é evidenciada pelo esverdeamento do ágar sangue (Figura 1B) e exige uma atmosfera enriquecida com 5% de CO_2 para um bom crescimento em cultura (KONEMAN, 2008).



Fontes: <http://www.bact.wisc.edu/.../S.pneumoniae.jpg>

<http://www.bacteriainphotos.com/Streptococcus%20pneumoniae.html>

Figura 1: A – Coloração de Gram demonstrando característica morfológica do *S. pneumoniae* em amostra de secreção respiratória. B – Características macroscópicas de colônias de pneumococo em cultivo em ágar sangue, evidenciando-se o aspecto esverdeado característico de α -hemólise.

A cápsula é responsável pela diferenciação de *S. pneumoniae* em sorotipos com base na sua composição química e antigenicidade. Atualmente são reconhecidos 93 diferentes sorotipos (HENRICHSEN, 1995; MITCHELL; MITCHELL, 2010; CALIX; NAHM, 2010). A distribuição dos tipos capsulares causadores de doença invasiva possuem variações geográficas, temporais e epidemiológicas, com associações específicas principalmente na pediatria.

A transmissão do pneumococo se dá através de gotículas suspensas no ar que contém a bactéria e entram em contato com o hospedeiro através da via respiratória (KADIOGLU *et al.*, 2008). Dessa forma, o pneumococo pode ser transmitido a um indivíduo que não alberga o mesmo, através do contato interpessoal, podendo ou não estabelecer a colonização.

Estando o indivíduo colonizado, o pneumococo geralmente reside na superfície da mucosa nasofaríngea e trato respiratório superior do hospedeiro durante os primeiros anos de vida, onde pode permanecer de forma comensal. Estudos realizados em Salvador indicam uma taxa de colonização em adultos de cerca de 20% enquanto em crianças com idade inferior a cinco anos essa taxa pode chegar a aproximadamente 60% (REIS *et al.*, 2008).

É importante salientar que a colonização é condição necessária à ocorrência da doença invasiva, que se desenvolverá ou não, a depender de uma combinação entre fatores de virulência inerentes ao microrganismo conjuntamente às condições do sistema imune do hospedeiro (KADIOGLU *et al.*, 2008). A Doença Pneumocócica Invasiva (DPI) define-se pela presença de achados clínicos compatível com infecção bacteriana associada ao isolamento de *S. pneumoniae* por cultura em qualquer líquido corporal normalmente estéril.

1.2 Patogenicidade e Aspectos Clínicos da Infecção

A presença da cápsula possibilita evasão ao sistema imune, impedindo que a bactéria seja reconhecida e conseqüentemente fagocitada. A cápsula também contribui para que a bactéria escape do mecanismo de defesa proporcionado pelo muco, sugerindo uma maior aderência do pneumococo à mucosa da nasofaringe no estabelecimento da colonização (NELSON, *et al.*, 2007).

Este patógeno possui outros fatores de virulência como pneumolisinas ou hemolisinas (Ply), lipoproteínas, proteínas ligadoras de colina (CbpA), outras proteínas existentes na superfície bacteriana, como a proteína A (PspA), antígeno A (PsaA) de superfície e o *pilus* (KADIOGLU *et al.*, 2008; MITCHEL; MITCHEL, 2010). Este último está presente na superfície de alguns pneumococos e acredita-se que os *pilli* podem estar relacionados com a aderência às células epiteliais em sua fase inicial, na promoção da colonização nasofaringeana (BAROCCHI, 2006).

S. pneumoniae representa a causa mais comum de infecção invasiva bacteriana em crianças, podendo se apresentar sob várias formas clínicas, incluindo principalmente bacteremia, pneumonia bacterêmica e meningite (HO *et al.*, 2004; WHO, 2007). Também se apresenta sob formas não-invasivas, causando frequentemente pneumonia, otite média aguda e sinusite (SHIBL *et al.* 2009; WHO, 2007).

Poucos dados encontram-se disponíveis na literatura em relação ao que se chama doença pneumocócica “não-pneumonia, não meningite” (O'BRIEN *et al.*, 2009). Na América do Norte e Europa, a incidência anual de bacteremia

pneumocócica está entre 15 e 40 casos para cada 100.000 habitantes (LYNCH; ZHANEL, 2009). Em 2008, o Manual de Vigilância sobre Doença Pneumocócica dos EUA estimou um número de casos de bacteremia nos EUA correspondente a 8.000 casos/ano (Figura 2).

As infecções invasivas, embora menos comuns que as não-invasivas, apresentam uma relação inversa em termos de gravidade da infecção e a sua incidência, ou seja, infecções de menor incidência culminam em uma maior gravidade e potencial de invasão.

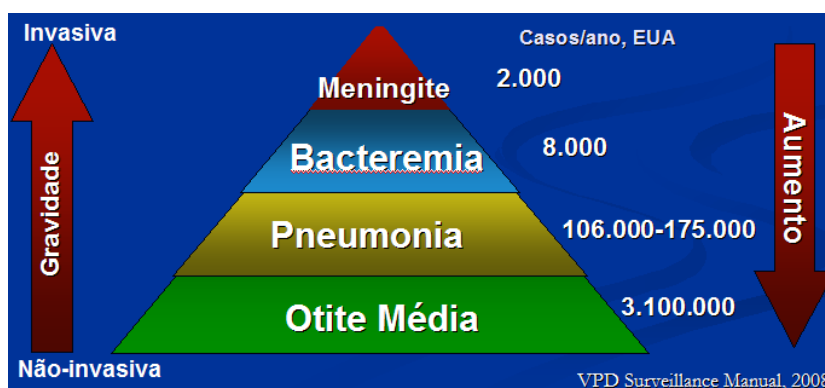


Figura 2: Impacto anual da doença pneumocócica nos EUA estratificado pelas formas clínicas.

Adaptado de *VPD Surveillance Manual*, 2008.

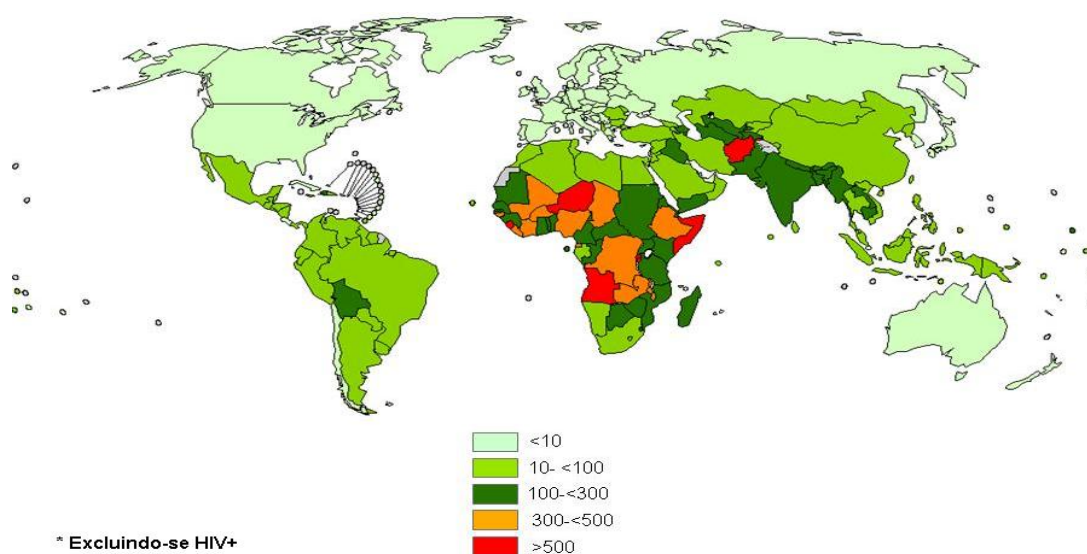
1.3 Aspectos Epidemiológicos da Doença Pneumocócica

O pneumococo é o agente infeccioso mais frequente em doenças invasivas e infecções do trato respiratório, tanto em países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento. Nesses últimos, a septicemia pneumocócica é uma das principais causas de mortalidade em crianças e corresponde a 25% de todas as mortes passíveis de prevenção na população com idade inferior a cinco anos (KADIOGLU *et al.*, 2008). *S. pneumoniae* também é o agente mais

freqüente em casos de pneumonia bacteriana. Estima-se que mais de 150 milhões de episódios de pneumonia ocorrem todos os anos entre crianças menores de cinco anos nos países em desenvolvimento, o que representa cerca de 95% dos novos casos em todo o mundo (UNICEF, 2006; OMS, 2008).

Em 2009, a Organização Mundial de Saúde fez uma estimativa da incidência/letalidade causada por pneumococo. Estimou-se 14,5 milhões de casos graves de doença pneumocócica e cerca de 735.000 mortes por ano em crianças menores de cinco anos, excluindo-se as soropositivas para o vírus do HIV (Figura 3). A nível global estima-se que o pneumococo seja responsável por cerca de 80.000 mortes/ano (70.000 – 1 milhão) (O'BRIEN *et al.*, 2009; WHO, 2007; JOHNSON *et al.*, 2010) e destas, aproximadamente 90% acometem os países em desenvolvimento. O patógeno é responsável por altas taxas de mortalidade, principalmente quando se trata de grupos de risco como crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos ou com doença crônica (BOGAERT *et al.*, 2004; OCHOA *et al.*, 2010). As taxas de pneumonia pneumocócica e bacteremia são significativamente mais elevadas em populações infectadas pelo vírus HIV (KADIOGLU *et al.*, 2008).

Mesmo com altas taxas de mortalidade, acredita-se que esses números estão subestimados devido à baixa sensibilidade diagnóstica dos métodos atualmente disponíveis (O'BRIEN *et al.*, 2009) e a dificuldade de acesso à saúde, ressaltando assim, a grande importância da vigilância ativa, principalmente nesses países em desenvolvimento.



Fonte: WHO, 2009

Figura 3: Estimativa global da taxa de mortalidade para cada 100.000 crianças HIV-negativas/ano, com idade inferior a cinco anos.

A vigilância em cada localidade se faz importante, devido às variações geográficas e temporais que influenciam a distribuição dos diferentes sorotipos de pneumococos (IMÖHL *et al.*, 2010b; ISAACMAN *et al.*, 2010) e associação seletiva da bactéria com a doença acometendo crianças ou adultos (HAUSDORFF *et al.*, 2000). Outro aspecto relevante é que a disponibilidade de dados geralmente está voltada às idades mais acometidas, ou seja, menores que 5 e maiores que 65 anos (IMÖHL *et al.*, 2010a), todavia é indispensável direcionar os estudos a todas faixas etárias para que se possa fazer uma melhor avaliação do perfil dessas cepas circulantes englobando toda a população da área em estudo.

1.4 Fatores de Risco para a Infecção

Uma série de fatores de risco para a ocorrência de doença pneumocócica têm sido descritos, sendo a idade inferior a dois anos e superior a 65 os mais comuns (LYNCH; ZHANEL, 2009). Aglomerações populacionais associadas à frequência escolar também constitui um fator de risco para colonização por pneumococo, sendo um fator importante para transmissão (REIS *et al.*, 2008; BRICKS; BEREZIN, 2006). No mesmo sentido, as estações do ano também têm sido associadas com uma relativa alteração na incidência da doença pneumocócica, sendo maior nas estações chuvosas e frias.

Acredita-se que a maior ocorrência de infecções virais neste período leva a um aumento na produção de citocinas que facilitam a invasão do epitélio da nasofaringe pelo pneumococo (ZHANG, *et al.*, 2000). Condições médicas subjacentes, como deficiências do sistema imune (a exemplo da infecção pelo HIV) ou presença concomitante de doenças crônicas (diabetes, cirrose, doença cardiorespiratória, nefropatias e outras) são também fatores predisponentes a aumentar o risco de bacteremia (O'BRIEN *et al.*, 2009), assim como portadores de anemia hemolítica e falciforme; fratura craniana e fístula liquórica (BRICKS; BEREZIN, 2006).

1.5 Perfil de Susceptibilidade

Desde a descrição da primeira cepa de *S. pneumoniae* não susceptível à penicilina na Austrália em 1967 (HANSMAN *et al.*, 1967), o crescente aumento

da resistência de pneumococos à penicilina e a outros antimicrobianos em várias partes do globo tornou-se uma preocupação da saúde pública mundial, devido à dispersão de cepas resistentes, com implicação direta na morbimortalidade da doença pneumocócica (APPELBAUM, 1992). Kellner e colaboradores (1998) relataram que o frequente e precoce uso de antimicrobianos em crianças, tem sido identificado como o maior fator de risco para seleção de cepas de pneumococos resistentes aos antimicrobianos.

Na Europa, estudos indicam uma taxa de 31% de não-susceptibilidade à penicilina (PNS) em isolados invasivos, embora esta taxa varie de 0% na Suécia e Finlândia a 52% na Espanha (ISAACMAN *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos, uma vigilância realizada no período de 1999 a 2007 revelou um índice de PNS de 48%, relatando um aumento de PNS associado aos sorotipos ausentes na PCV7, principalmente para os sorotipos 19A, 6C, 22F e o sorogrupo 15 (JACOBS *et al.*, 2008).

No Brasil, o primeiro isolado clínico de *S. pneumoniae* não sensível à penicilina foi reportado em 1988 (de SOUZA MARQUES *et al.*, 1988) e a partir deste período os laboratórios de referência relatam um aumento da não susceptibilidade de pneumococo ao sulfametoxazol/trimetoprim e referindo-se a isolados MDR em 5% dos isolados. Atualmente, a resistência à penicilina no Brasil varia de 7,9% a 28% a depender do estado (BRANDILEONE *et al.*, 2006; ALVARES *et al.*, 2011). Estes dados são preocupantes para países como o Brasil, onde a terapia recomendada para infecções pneumocócicas é baseada em antibióticos de baixo custo, como penicilina e sulfametaxazol/trimetoprim.

Nascimento-Carvalho e colaboradores (2003) conduziram um estudo sobre DPI em crianças e adolescentes na cidade de Salvador e encontraram

um índice de não-susceptibilidade à penicilina de 20%. Índices semelhantes também foram relatados em estudo de vigilância de sete anos na mesma cidade, de pacientes com meningite pneumocócica, onde os autores encontraram uma taxa de 22% de isolados não-susceptíveis à penicilina e 56% ao sulfametoxazol-trimetoprim (MENEZES *et al.*, 2011).

Embora a resistência alcance altos níveis, esta se encontra associada a um reduzido número de sorotipos, sendo vista principalmente relacionada com os sorotipos 6A/B, 9V, 14, 19A, 19F e 23F (IMÖHL *et al.*, 2010b; CASTAÑEDA *et al.*, 2009; JOHNSON *et al.*, 2010). Uma vigilância de seis anos (1994-2000) nos EUA identificou que estes sorotipos foram responsáveis por 92% das resistências encontradas, relacionadas principalmente com a penicilina e sulfametoxazol-trimetoprima (RICHTER *et al.*, 2002).

1.6 Profilaxia

Diante desse contexto, inúmeros esforços têm sido realizados no intuito de reduzir o impacto da doença pneumocócica invasiva em todo o mundo, com enfoque principal na prevenção, com o desenvolvimento e uso de vacinas polissacarídicas e conjugadas a proteínas.

Atualmente, encontra-se disponível e licenciada para uso nos EUA desde 1983 a vacina polissacarídica 23-valente (PPV23 - Pneumovax23, *Merck & Company Inc.*), composta por antígenos de 23 sorotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F) (CDC, 2010). Os polissacarídeos atuam induzindo primariamente uma

resposta imune via células B-dependentes, através da produção de IgM (STEIN, 1992), sendo portanto, uma vacina não recomendada a crianças menores de dois anos, por conta do sistema imunológico ainda imaturo não conferir uma proteção duradoura. A PPV23 geralmente é recomendada em casos de surtos para adultos e aos maiores de 65 anos, porém esta vacina requer revacinação dentro de um intervalo de 5-6 anos (PLETZ, 2008). No Brasil, a PPV23 encontra-se disponível desde o ano 2000 para adultos com idade igual ou superior a 60 anos e crianças maiores de 2 anos de idade com alguma condição crônica adjacente. Essa vacina vem ganhando uma maior importância, já que estudos têm chamado atenção para o risco aumentado de doença pneumocócica na população de indivíduos com 50 anos ou mais (JACKSON; JANOFF, 2008; PITSIU; KIOUMIS, 2011).

Já as vacinas conjugadas, oferecem uma proteção de maior duração pois encontram-se conjugadas a proteínas como: toxoides tetânicos, toxoide diftérico CRM197 (toxina mutante não tóxica), pneumolisina e proteínas da membrana externa de meningococos. Estas são proteínas altamente imunogênicas, capazes de gerar células de memória através do sistema imune via células T-dependentes (PLETZ *et al.*, 2008). A primeira vacina a ser disponibilizada com esta tecnologia foi a vacina pneumocócica heptavalente (PCV7 - Prevnar, *Pfizer*), contendo os sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F conjugada ao mutante da toxina diftérica – a proteína CRM 197, a qual começou a ser primeiramente utilizada nos EUA a partir do ano 2000 e substituída pela PCV13 em 2010. No Brasil, a PCV7 começou a ser disponibilizada em clínicas privadas e Centros de Referências para Imunobiológicos Especiais desde 2002. De acordo com OMS, a eficácia da

vacina em crianças é demonstrada com um esquema de administração aos dois, quatro e seis meses de idade, seguidas por uma dose de reforço aos 12-15 meses (PLETZ *et al.*, 2008).

A vacina pneumocócica decavalente (PCV10, Synflorix, GlaxoSmithKline) possui 3 sorotipos (1, 5, 7F) a mais que a vacina heptavalente, além disto ela difere nas proteínas utilizadas para a conjugação. A PCV10 possui 8 dos 10 polissacarídeos conjugados a uma proteína da membrana externa (proteína D) da bactéria *Haemophilus influenzae*, e os outros dois polissacarídeos (sorotipos 18C e 19F) são conjugados a um toxóide tetânico e um toxóide diftérico modificado, respectivamente. A PCV-10 foi licenciada para uso no Canadá, Austrália e Europa entre o final de 2008 e início de 2009 (JOHNSON *et al.*, 2010). No Brasil, no período entre março a setembro de 2010, o Ministério da Saúde por meio do Programa Nacional de Imunizações, implementou a PCV10 no calendário básico de vacinação da criança, em todo o território nacional. Na Bahia, a vacina decavalente foi instituída no calendário vacinal a partir de julho de 2010. O esquema de vacinação proposto para crianças de 2 – 6 meses foi de 3 doses com intervalo de 2 meses a cada dose e uma dose de reforço 6 meses após a última dose (preferencialmente entre os 12 – 15 meses de idade); para crianças de 7 – 11 meses, recomenda-se 2 doses com intervalos de 2 meses entre as doses e a dose de reforço entre 12 – 15 meses (se a criança receber a 2ª dose com 12 meses ou mais, não é necessário o reforço) e para crianças de 12 – 24 meses, recomenda-se apenas uma única dose, sem necessidade de reforço (BRASIL, 2010).

Por fim, a mais recente, a vacina conjugada pneumocócica tridecavalente (PCV13, *Prevnar13*, *Pfizer*), possui os sorotipos 3, 6A e 19A adicionais aos da vacina decavalente e foi licenciada para uso no Chile e também pela Agência Europeia de Medicina em 2009 e em 2010 foi licenciada pela *Food and Droug Administration* (FDA) para uso nos EUA, em substituição à PCV7 (CDC, 2010).

Após a implementação da vacina PCV7 nos EUA, a incidência de doença invasiva causada por pneumococos reduziu significativamente na população geral de 24,4 casos por 100.000 habitantes em 1999 para 13,5/100.000 habitantes em 2007 (PILISHVILI, 2010). Na Espanha, a incidência de DPI entre crianças menores de dois anos foi reduzida em 52% após a introdução da PCV7, caindo de 188 casos/100.000 habitantes para 90 casos de DPI para cada 100.000 habitantes (YU *et al.*, 2008).

Um estudo feito pela Organização Panamericana de Saúde, incluindo dez países da América Latina, associou os sorotipos encontrados àqueles presentes na vacina PCV7, encontrando um impacto de redução sob a doença que variou de 52,4% a 76,5% (CASTAÑEDA *et al.*, 2009), reforçando a necessidade de se desenvolver vacinas direcionadas a cada população-alvo de forma específica.

Além da redução direta dos casos de DPI, vários estudos mostram que a PCV7 também reduz a colonização nasofarigeana, contribuindo conseqüentemente para a queda na circulação deste patógeno entre as populações imunizadas e não imunizadas (OBARO; ADEGBOLA, 2002). Este fenômeno é denominado imunidade em rebanho, onde os sorotipos vacinais

passam a circular cada vez menos, beneficiando também os indivíduos não vacinados (EFFELTERRE *et al.*, 2010; PILISHVILI *et al.*, 2010)

Um outro evento tem preocupado os países onde a PCV7 já foi implantada há algum tempo, que é a substituição de sorotipos, onde sorotipos não vacinais têm emergido em detrimento da diminuição daqueles presentes na vacina (TAN, 2010). Nos EUA e Europa, isso vem acontecendo principalmente com os sorotipos 3 e 19A (PILISHVILI *et al.*, 2010).

1.7 Importância de estudos de similaridade genética de *Streptococcus pneumoniae*

Em 1998, Coffey e colaboradores demonstraram uma característica de versatilidade do pneumococo, onde foi mencionado o fenômeno de troca capsular, onde os genes capsulares podem ser transferidos ocasionalmente entre bactérias por eventos de transformação, alterando assim suas características genotípicas e/ou fenotípicas (sorotipo) de forma que diferentes clones podem ser encontrados expressando um mesmo tipo capsular ou cepas que apresentam grande similaridade clonal expressando polissacarídeos que determinam diferentes sorotipos capsulares (WOLF *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 2010).

A caracterização dos clones de *S. pneumoniae* pode ser feita através de eletroforese em campo pulsátil (PFGE), que identifica cepas que se encontram geneticamente relacionadas dentro de uma população (McGEE *et al.*, 2001) e atualmente é considerada a técnica padrão-ouro para estabelecer o padrão de similaridade entre clones. Também tem sido cada vez mais utilizado o *Multi-*

Locus Sequence Typing (MLST), que permite estabelecer relações entre os clones identificados e fazer a comparação interlaboratorial dos resultados obtidos com estudos realizados em nível mundial (ENRIGHT; SPRATT, 1998; MAIDEN *et al*, 1998).

Os estudos de tipagem molecular têm contribuído de forma significativa para realização de investigações epidemiológicas e são de extrema importância porque conseguem determinar o grau de diversidade genética, o surgimento de cepas hipervirulentas, a disseminação de clones resistentes à penicilina e, dentre outros fatores, também conseguem identificar o fenômeno *replacement*, ou seja, a reposição/substituição de cepas circulantes.

A criação do PMEN (*Pneumococcal Molecular Epidemiology Network*) em 1997, uma rede de vigilância global de cepas circulantes de pneumococos causadores de infecções invasivas, estabeleceu critérios e normas para definição de clones de pneumococos, o que permite atualmente comparações entre as mais diversas regiões geográficas (McGEE *et al.*, 2001). Até o momento, encontram-se disponíveis para análise e comparação, 43 clones já caracterizados, dos quais 15 são clones que possuem CIM para penicilina > 1 µg/mL (Anexo I). Entretanto, em todo o mundo o espectro de doença invasiva é restrito a um pequeno número de clones. Nos EUA, 12 grupos clonais resistentes à penicilina agrupavam 75% dos isolados de pneumococos derivados de DPI no período de 1994 a 2000 (RITCHER *et al.*, 2002).

No Brasil, quatro clones internacionais (Spain^{9V}-3, Spain^{23F}-1, Spain^{6B}-2, Sweden¹-40) têm sido identificados em várias localidades, associados à doença e colonização em crianças (BRANDILEONE *et al.*, 1998; WOLF *et al.*, 2000).

Estudos mostram que existe uma maior diversidade clonal entre isolados de colonização, enquanto observa-se uma homogeneidade maior entre isolados invasivos, principalmente entre as cepas resistentes aos antimicrobianos (BRUEGGEMANN *et al.*, 2003; REIS *et al.* 2008). No Brasil, vários estudos mostram a importância da caracterização molecular de isolados de pneumococos no que se refere ao surgimento e rápida disseminação de cepas não-susceptíveis à penicilina, principalmente relacionadas ao sorotipo 14, que apresentam relação de similaridade com um clone Spain^{9V}-3, o qual foi isolado pela primeira vez na Espanha expressando o sorotipo capsular 9V (BRANDILEONE *et al.*, 1998; SJÖSTRÖM *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2010).

Diante desse quadro observa-se que é necessário conhecer, além do sorotipo capsular, o DNA bacteriano, já que existe uma grande heterogeneidade e mudança por parte dos polissacarídeos que são expressos na superfície capsular dos pneumococos. As técnicas de genotipagem molecular permitem a análise de todo o genoma da bactéria, sendo de grande utilidade para estudos de epidemiologia. Assim, devido à heterogeneidade e dinamismo que *S. pneumoniae* pode apresentar frente ao hospedeiro, se faz importante o monitoramento molecular dos clones que podem emergir não apenas evidenciando-se a cápsula que é passível de alteração, mas permitindo a análise do genoma ou partes do genoma da bactéria.

JUSTIFICATIVA

Na cidade de Salvador a meningite pneumocócica tem uma incidência de 4,2 casos para cada 100.000 crianças menores de cinco anos de idade ao ano e 0,83 casos para cada 100.000 em pessoas de todas as faixas etárias (MENEZES *et al.*, 2011). Entretanto, a meningite representa apenas a ponta do *iceberg* na pirâmide das infecções pneumocócicas. O conhecimento sobre as outras formas de doença pneumocócica em nosso meio é uma lacuna que precisa ser preenchida, principalmente com a implantação da vacina pneumocócica conjugada (PCV10) no calendário vacinal a partir de julho de 2010 no Brasil.

Assim, o acréscimo de dados referentes à bacteremia causada por pneumococo e à associação/comparação desses dados com o que já se conhece a respeito da meningite pneumocócica é de fundamental importância para melhor compreensão da epidemiologia da doença pneumocócica invasiva na cidade de Salvador. Esses aspectos são fundamentais para o estabelecimento de estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes da doença pneumocócica invasiva.

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar através de métodos fenotípicos e genotípicos isolados invasivos de *S. pneumoniae* identificados em diversos hospitais da cidade de Salvador, Bahia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar os tipos capsulares mais frequentes de *S. pneumoniae* isolados de casos de DPI;
2. Correlacionar o perfil dos tipos capsulares de *S. pneumoniae* com a composição da vacina pneumocócica decavalente;
3. Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *S. pneumoniae* isolados de pacientes com DPI na cidade de Salvador;
4. Caracterizar os isolados de DPI através das técnicas de PFGE e MLST;
5. Correlacionar a distribuição dos tipos capsulares e perfis clonais com as amostras isoladas de casos de meningite identificados no Hospital Couto Maia no mesmo período.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo e Local de Estudo

Uma vigilância laboratorial do tipo corte transversal foi iniciada na cidade de Salvador em 2008, com o objetivo de identificar os casos de DPI atendidos em hospitais da rede pública e privada. Foram incluídos nesta análise, isolados de pneumococos obtidos de pacientes com doença invasiva atendidos em dois hospitais da rede pública e oito da rede privada.

Os hospitais enviavam os isolados de pneumococos ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), ou ao Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia – UFBA para processamento e armazenamento.

4.2 Período de Estudo

Foram incluídas neste estudo as amostras oriundas de casos de DPI, identificadas no período de 20 de abril de 2008 a 31 de julho de 2011. Aspectos Éticos.

4.3 Aspectos Éticos do Estudo

Esse projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz Fiocruz sob o parecer nº 164 (ANEXO III).

4.4 Critérios de Inclusão

O critério de definição de caso confirmado de Doença Pneumocócica Invasiva (DPI) foi o isolamento de *S. pneumoniae* de líquidos corpóreos normalmente estéreis (líquido pleural/sinovial, LCR, sangue) em associação com a suspeita clínica de infecção bacteriana.

4.5 Coleta de Dados

Dados referentes à idade, sexo, espécime clínico e tipo de infecção foram obtidos através do registro de laboratório.

4.6 Identificação dos Casos

Após o isolamento primário em cada hospital incluído no estudo, as placas com o cultivo primário da bactéria foram enviadas ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) acondicionadas em caixa adequada ao transporte de produtos biológicos. A partir do isolamento primário, foram feitos testes para confirmação da identificação da espécie, dedução capsular, avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos e testes de genotipagem bacteriana.

O cultivo secundário foi feito em placas de agar em base de *Tryptic Soy Agar* (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) preparado conforme

orientações do fornecedor, acrescido de 5% de sangue de carneiro. Os isolados foram submetidos à confirmação da espécie, através do teste de coloração de Gram, susceptibilidade à optoquina (cloridrato de etilhidrocupreína, BD – BBL Sensi-Disco Becton-Dickinson and Company, USA) e bile-solubilidade (desoxicolato de sódio a 2% - Sigma-Aldrich, Germany) (KONEMAN, 2008).

4.7 Estocagem/Armazenamento

Após confirmação, as culturas bacterianas receberam um número de estudo e foram estocadas em criotubos contendo um meio líquido estéril constituído de 50% de caldo *Tryptic Soy Broth* (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA), 40% de soro de cavalo e 10% de glicerol e foram então armazenadas em *freezer* a - 70°C.

4.8 Amostras do Hospital Couto Maia

O Hospital Couto Maia (HCM) é considerado um hospital de referência no diagnóstico e tratamento de doenças infecto-contagiosas no estado da Bahia. Nesse hospital, teve início em 1996 uma vigilância ativa para meningites bacterianas, incluindo a meningite pneumocócica.

Foram incluídos nesse estudo, com objetivo de comparação, os pacientes com diagnóstico de meningite pneumocócica confirmado através da cultura de líquor positiva para *S. pneumoniae*. Foram incluídos no estudo os pacientes admitidos no HCM no período de abril de 2008 a agosto de 2011. Os isolados

de meningite pneumocócica foram submetidos às mesmas técnicas laboratoriais dos isolados de doença pneumocócica invasiva obtidos nesse estudo e descritos a seguir.

Durante o período de estudo (abril de 2008 a julho de 2011) foram identificados 86 pacientes com meningite pneumocócica residentes em Salvador e Região Metropolitana. Os isolados clínicos destes pacientes foram utilizados como grupo comparativo aos isolados de doença invasiva neste estudo.

4.9 Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos

A susceptibilidade antimicrobiana foi determinada pelo método de microdiluição em caldo segundo as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011), para os seguintes agentes antimicrobianos: penicilina (0,031 – 64 µg/mL), levofloxacina (0,031 – 64 µg/mL), cefotaxima (0,062 – 64 µg/mL), cloranfenicol (0,031 – 64 µg/mL), tetraciclina (0,062 – 64 µg/mL), eritromicina (0,016 – 32 µg/mL), clindamicina (0,016 – 32 µg/mL), vancomicina (0,031 – 64 µg/mL) e trimetoprim/sulfametoxazol (0,125/2,375 – 64/1216 µg/mL) (*Sigma Aldrich*, Germany).

As soluções dos agentes antimicrobianos foram preparadas numa concentração inicial de 1.280 mg/mL. Para cada antimicrobiano foi utilizado um solvente ou diluente apropriado para o agente ativo, o qual varia de acordo com sua respectiva estrutura química. As soluções dos antimicrobianos foram mantidas em *freezer* a – 70°C por um período de até seis meses.

Os testes foram realizados em placas de 96 poços (12 x 8) com fundo arredondado (Corning, New York, USA). O meio utilizado para o preparo das placas foi o *Mueller-Hinton Broth* (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) com ajuste de cátions, no qual foi acrescentado 5% de sangue de equino lisado. Os antimicrobianos foram diluídos nas concentrações especificadas anteriormente e as placas preparadas foram estocadas num prazo máximo de dois meses em *freezer* a -20°C .

A partir de um cultivo recente (18 – 24 horas), foi feita uma suspensão em solução salina a 0,9%, na turvação correspondente ao padrão da escala 0,5 de McFarland, que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL. Depois de realizada a suspensão, esta foi diluída numa proporção de 1:100 em volume final de 10 mL, utilizando o caldo de *Mueller - Hinton* anteriormente citado, obtendo-se uma concentração equivalente a 10^6 UFC/mL. Uma alíquota de 50 μL desta suspensão foi adicionada em cada poço da placa que já continha 50 μL da solução antibiótica nas diferentes concentrações, obtendo-se então uma concentração bacteriana final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. As placas foram incubadas a 35°C por um período de 20 a 24 horas. Em cada placa foi incluída a cepa padrão de *S. pneumoniae* (ATCC 49619) como controle e validação do procedimento, assim como um controle negativo (onde foi colocado apenas o caldo utilizado no procedimento, sem bactéria) que serviu para confirmar a esterilidade do caldo e também da solução antimicrobiana em todos os testes realizados.

A leitura para obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi realizada visualmente a partir da detecção de turvação do meio de cultivo no

poço ou formação de um precipitado em forma de botão com no mínimo 2mm de diâmetro.

A definição de susceptibilidade/não-susceptibilidade para cada antimicrobiano seguiu os valores referenciados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011), de forma que os isolados com nível intermediário ou alto de resistência foram designados como não-susceptíveis.

Para caracterizar os isolados quanto a sensibilidade à penicilina, foi utilizado o critério padronizado pelo CLSI 2011 para isolados de LCR, de forma que o isolado foi considerado susceptível quando a CIM foi menor ou igual a 0,0625µg/mL quando isolados de líquido, ou menor ou igual a 2µg/mL para isolados dos demais sítios de infecção pelo teste de microdiluição em caldo. Essa classificação foi adotada em virtude do crescente número de isolados com sensibilidade reduzida a penicilina e os parâmetros do CLSI para isolados não-meningite que poderiam subestimar os dados de susceptibilidade antimicrobiana. Os isolados não-susceptíveis a três ou mais classes de antimicrobianos foram denominados multirresistentes.

4.10 Dedução Capsular de *S. pneumoniae*

A tipagem capsular dos pneumococos foi realizada através da técnica de multiplex-PCR (PAI *et al.* 2006), com modificações conforme procedimentos protocolados (CDC, 2009; DIAS *et al.*, 2007). Esta técnica permite a identificação de 40 sorogrupos/sorotipos através da utilização de *primers* específicos para cada sorotipo (ANEXO II).

Para obtenção do DNA, foi realizado uma semeadura em toda a superfície de uma placa de agar sangue a fim de se obter uma quantidade suficiente de massa bacteriana para ser suspensa em 300µL de solução salina 0,85% estéril. A suspensão foi aquecida a 65°C durante 30 minutos e em seguida centrifugadas por quatro minutos a 12.000 rpm em centrífuga refrigerada à 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 65µL de solução de lise contendo tampão Tris-EDTA 25mM, mutanolisina 3.000U/mL (*Sigma Aldrich*, Germany) e hialuronidase 30mg/mL (*Sigma Aldrich*, Germany). Após homogeneização, a suspensão foi incubada em banho-maria a 37°C durante duas horas, seguida de incubação à 100°C por dez minutos, a fim de inativar a ação enzimática. A suspensão foi centrifugada por cinco minutos nas condições anteriormente mencionadas e o sobrenadante (DNA) foi utilizado na execução da reação de PCR.

A reação foi realizada em um volume de 25 µL contendo 12,5 µL do Master Mix GoTaq (Promega, USA, 10 mM); uma quantidade específica de cada primer na concentração de 250 µM (direto e reverso) determinada pelo protocolo do CDC e o volume necessário de água estéril livre de DNase e Rnase foi adicionada para completar um volume final de 25 µL. A reação de amplificação foi realizada no termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700 (*Applied Biosystems*[®], USA) nas seguintes condições: um ciclo a 94°C por 4 minutos, seguidos de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos e 54°C por 45 segundos e um ciclo final de 65°C por 2 minutos e 30 segundos.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose NuSieve[®] a 2% (*SeaKem*[®] LE, USA) em TAE 1X a 100 volts por 90 minutos e o gel corado com solução de brometo de etídio a 10mg/mL para visualizações dos produtos da

PCR. Os géis foram fotografados no sistema gel doc (*Bio Rad Laboratories*, Califórnia, USA) para análise, que foi baseada no peso molecular das bandas, de acordo com cada sorotipo e sua reação específica. A validação de cada *primer* foi feita com utilização de amostras com sorotipagem conhecida (determinadas anteriormente através da reação de Quellung).

Como são conhecidos atualmente 93 sorotipos do pneumococo, para as amostras que não apresentaram especificação do sorotipo através da técnica de multiplex-PCR, os respectivos isolados foram encaminhados ao *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta, EUA e a determinação do tipo capsular foi realizada através da técnica de entumescimento capsular (Reação de Quellung), o qual emprega a utilização de anti-soros específicos para determinação do sorotipo.

Após determinação dos sorotipos, foi feita uma comparação do perfil de sorotipos obtido dos casos de DPI nesse estudo com o perfil dos isolados de pacientes com meningite pneumocócica identificados através da vigilância que vem sendo realizada desde 1996 no Hospital Couto Maia, um hospital de referência para doenças infecciosas na cidade de Salvador, considerando apenas os isolados do mesmo período (2008-2011).

4.11 Eletroforese em campo pulsátil (*Pulse Field Gel Electrophoresis-PFGE*)

O DNA genômico de *S. pneumoniae* foi digerido com a enzima de restrição *Sma I* e submetido à técnica de eletroforese em campo pulsátil (PFGE) utilizando o equipamento CHEF-DR II (*Bio Rad Laboratories*,

Califórnia, USA), disponível no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do CPqGM, seguindo o protocolo padronizado no mesmo laboratório conforme descrição a seguir.

Os isolados de *S. pneumoniae* foram descongelados e submetidos a dois cultivos sucessivos em agar sangue, incubados em condições ideais para o seu crescimento por um período de 14 a 16 horas, cada cultivo. Duas a quatro colônias do isolado, submetido ao segundo cultivo, foram repicadas em seis mL de caldo BHI (*Brain heart infusion* – DIFCO, Detroit, Mich.) enriquecido com 1% de soro de cavalo e incubadas por cinco horas a 35°C. A concentração da suspensão celular foi ajustada com solução salina até atingir uma leitura de densidade ótica entre 0,7 e 0,9. A suspensão de células ajustada foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante cuidadosamente aspirado. O sedimento foi resuspenso em 1 mL de tampão PIV (Tris 10 mM pH 8,0 NaCl 1 M), transferido para um tubo de microcentrífuga e novamente centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após o sobrenadante ter sido cuidadosamente desprezado, o sedimento foi resuspenso em 200 µL de tampão PIV e ajustado com o mesmo tampão por leitura em espectrofotômetro a 620 nm para obtenção da densidade ótica na faixa de 0,7 e 0,9. Uma alíquota de 300 µL da suspensão celular ajustada foi homogeneizada com 300 µL de gel de agarose a 2% (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, USA) preparada em solução PIV e mantida a 65°C. Esta mistura foi dispenada nos moldes para formação de pequenos blocos de agarose contendo a bactéria.

Após polimerização da agarose, os blocos foram removidos dos moldes e colocados em tampão EC (Tris HCl 6mM; NaCl 1M; EDTA 100mM; Brij-58 0,5%; desoxicolato de sódio 0,2%; lauril sarcosil 0,5%; pH=7,6), contendo

lisozima 1mg/mL e mutanolisina 5.000U/mL e mantidos à 37°C por um período de 18 horas. Após este período, os blocos de agarose foram lavados por cerca de 30 minutos, cinco a seis vezes em tampão TE (Tris-HCl 1M, pH 8,0; EDTA 0,5M, pH 8,0) e então submetidos à incubação em tampão ES (EDTA; lauril sarcosil de sódio, pH=9,0), contendo 25mg/mL de proteinase K (Sigma Aldrich, Germany) a 57°C por um período mínimo de 12 horas. Após a digestão enzimática com a proteinase K, os blocos de agarose foram lavados novamente com TE cerca de oito vezes/dia durante três dias.

Um bloco de cada isolado foi selecionado para digestão com a enzima de restrição *Sma* I, numa solução que continha 30µL de tampão 4 da enzima *Sma* I (Invitrogen nº. 15228-018, 10U/µL), 3 µL de BSA (soro albumina bovina) a 100µg/mL, 1µL de enzima *Sma* I (20U). Esta solução foi incubada a 25°C por um período de mínimo de 12 horas. O bloco foi então submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,2% e tampão TBE 0,5% (Tris - Borato 0,045M, EDTA 0,001M, pH 8,0) no sistema CHEF-DRII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) com corrente alternando de 2 a 30 segundos a 6 V/cm e temperatura de 14°C durante 19 horas. Os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL) por vinte minutos, descorados em água bidestilada por 30 minutos e fotografados sob luz ultravioleta no sistema *Eagle Eye* II (Stratagene) e o arquivo digitalizado e salvo como arquivo de extensão (TIF) para posterior análise.

A análise dos perfis de eletroforese (bandas) foi realizada visualmente utilizando os critérios sistematizados por Tenover e colaboradores (1995). Estes critérios norteiam a análise de parentesco entre as cepas, como: 1) cepas indistinguíveis – quando não há diferenças entre os padrões de bandas

comparados; 2) cepas relacionadas – quando a diferença varia entre 1 e 3 bandas; 3) Cepas possivelmente relacionadas – quando a diferença é de 4 a 6 bandas e 4) Cepas diferentes – quando o número de bandas divergentes entre os padrões das amostras analisadas é superior a 6.

As imagens dos geis de eletroforese obtidos pela técnica de PFGE foram armazenados e analisados no programa Gel Compar versão 4 (Applied Maths, St. Martens, Belgium), utilizando o método *unweighted pair-group* (UPGMA) para construção dos dendrogramas. Foram utilizados também, para análise e comparação entre os padrões das bandas, parâmetros como o coeficiente de similaridade de *Dice* e nível de tolerância de 1,5%. Dessa forma, foi possível a associação de cepas ou clones, com uma proximidade genética igual ou superior a 80% no dendrograma, tendo como base o perfil de bandas do PFGE.

Foi utilizado como padrão de peso molecular, o *Lambda DNA ladder* (New England Biolabs, EUA) na primeira e última coluna de cada gel. Cepas de pneumococos isoladas de casos de meningite na cidade de Salvador no período de 2008 a 2011 foram utilizadas para a comparação dos diferentes padrões genéticos entre as diversas formas de doença. Também foram incluídas na análise 11 amostras de *S. pneumoniae* representativas de clones internacionais, reconhecidos pelo Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (McGee *et al.*, 2001), as quais foram England-14, France 9V, Hungary-19A, South Africa-19A, South Africa-6B, Slovakia-19A, Slovakia-14, Spain-6B, Spain-14, Spain-23F e Tennessee-23F.

A nomenclatura adotada neste estudo foi a mesma já adotada pelo grupo de pesquisa e que encontra-se no banco de dados do Gel Compar para

identificação de perfis clonais de pneumococos, o qual é identificado com uma letra maiúscula do alfabeto, seguida de um número para as variações dentro do mesmo perfil clonal. Após utilização de todas as letras, novas nomenclaturas foram geradas com para de letras.

4.12 *Multi Locus Sequence Typing* (MLST)

A preparação do DNA, amplificação através da PCR e sequenciamento dos nucleotídeos por MLST foram realizadas como previamente descrito por Enright e Spratt (1998), onde sete fragmentos internos de genes constitutivos do DNA cromossomal de *S. pneumoniae* (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* e *ddl*) foram amplificados. As sequências obtidas do sequenciamento dos produtos de PCR em ambas as direções foram comparadas utilizando o sistema de *software* Vector NTI suíte 8. As sequências dos sete genes que não foram encontradas no *site* do MLST, foram enviadas para o curador responsável pelo banco de dados (www.mlst.net), que ao conferir os dados nomearam o novo ST.

Foram selecionadas 26 amostras representativas dos diferentes perfis de PFGE identificados nesse estudo para a análise de MLST pelo protocolo de Enright & Spratt (1998). Foram selecionados isolados com perfis clonais semelhantes que apresentavam diferentes padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos; perfis clonais que pertenciam a faixas etárias de maior risco de DPI; perfis clonais que pertenciam a sorotipos vacinais e não-vacinais; perfis

clonais de diferentes hospitais e perfis clonais de isolados MDR, assim como alguns isolados que foram não clonais pelo PFGE.

A extração do DNA das amostras de *S. pneumoniae* selecionadas foi feita a partir de colônias cultivadas em agar sangue a partir de um repique recente (18 horas). Para cada amostra, utilizou-se 100µL de água ultrapura onde foram suspensas cerca de dez colônias bacterianas. As suspensões foram incubadas a 95°C por dez minutos e então armazenadas a - 20°C até o momento de realização da PCR.

A PCR foi realizada através de uma primeira etapa de amplificação dos genes alvos, sendo utilizado para cada amostra o Master Mix Promega M750C a um volume de 12,5µL, acrescido 8,0µL de água livre de DNase e RNase, 0,5µL de cada *primer* específico (reverso e direto) e por fim, 3,5µL do DNA da amostra, totalizando uma reação de volume final igual a 25µL. Os pares de *primers* (reverso e direto) utilizados na reação de amplificação e sequenciamento foram:

***aroE-up*, 5'** - GCC TTT GAG GCG ACA GC

***aroE-dn*, 5'** - TGC AGT TCA (G/A)AA ACA T(A/T)T TCT AA

***gdh-up*, 5'** - ATG GAC AAA CCA GC(G/A/T/C) AG(C/T) TT

***gdh-dn*, 5'** - GCT TGA GGT CCC AT(G/A) CT(G/A/T/C) CC

***gki-up*, 5'** - GGC ATT GGA ATG GGA TCA CC

***gki-dn*, 5'** - TCT CCC GCA GCT GAC AC

***recP-up*, 5'** - GCC AAC TCA GGT CAT CCA GG

***recP-dn*, 5'** - TGC AAC CGT AGC ATT GTA AC

***spi-up*, 5'** - TTA TTC CTC CTG ATT CTG TC

***spi-dn*, 5'** - GTG ATT GGC CAG AAG CGG AA

xpt-up, 5' - TTA TTA GAA GAG CGC ATC C T

xpt-dn, 5' - AGA TCT GCC TCC TTA AAT AC

ddl-up, 5' - TGC (C/T)CA AGT TCC TTA TGT GG

ddl-dn, 5' - CAC TGG GT(G/A) AAA CC(A/T) GGC AT

A reação de PCR para amplificação comum a todos os genes foi realizada segundo protocolo disponível no *site* do MLST, sendo uma desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto, seguida de 10 ciclos a 94°C por 15 segundos, 54°C por 30 segundos e posteriormente 72°C por 45 segundos, entrando num segundo estágio de desnaturação à 94°C por 1 minuto, 20 ciclos a 94°C por 15 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos com 10 segundos de autoextensão. Ao término do último ciclo, foi realizada uma extensão final à 72°C por 10 minutos.

Os produtos da reação foram separados em eletroforese a 100 volts por um período 45 minutos em TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA) 1X e agarose a 1,2% acrescido de 5µL de brometo de etídio (para cada 100mL de gel). Em cada gel foi incluso o marcador de peso molecular de 250 pb. A amplificação dos genes foi confirmada pela detecção dos fragmentos com os seguintes pesos moleculares: *aroE* – 405pb; *gdh* – 459pb; *gki* – 483pb; *recP* – 448pb; *spi* – 472; *xpt* – 486pb e *ddl* – 441pb.

Os fragmentos de DNA foram purificados utilizando a enzima EXOSAP (*GE Healthcare*), adicionando 4µL da enzima para cada 3µL do produto da reação de PCR. Esta mistura foi incubada por 15 minutos à 37°C (temperatura ótima para atividade enzimática) e depois por 15 minutos à 80°C para sua inativação. Os produtos purificados foram armazenados a - 20°C até a reação de sequenciamento. O sequenciamento dos produtos foi realizado seguindo

protocolos da Plataforma de Sequenciamento PDTIS-FIOCRUZ, no sequenciador automatizado Applied Biosystems Prism 377 (Applied Biosystems ABI 3100).

Após sequenciados, foi feita a análise dos eletroferogramas das sequências através do *Software BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.0.9.0). Cada dupla de sequências (*forward* e *reverse*) foi comparada com a cepa padrão do seu respectivo gene e então editadas e alinhadas com o auxílio do programa. A sequência obtida foi então depositada na página do MLST para obtenção do valor alélico de cada um dos sete *loci* e essa sequência de sete números foi inserida no *site* do MLST que então forneceu o ST (*Sequence Type*) correspondente.

ANÁLISE DE DADOS

Os dados clínicos, demográficos e epidemiológicos que foram disponibilizados, foram armazenados e analisados em um banco de dados criado no programa EpiInfo Windows versão 3.5.1 (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, GA). O banco de dados gerado foi então analisado quanto à distribuição de frequência das variáveis de interesse e à tabulação das principais comparações. Medidas de tendência central (média, mediana e moda) foram estimadas conforme a situação. A significância estatística das diferenças entre duas ou mais proporções foi avaliada através do teste do Qui-quadrado ou, quando mais indicado, o teste de Fisher. Resultados com $p < 0,05$ (bi-caudal) foram considerados estatisticamente significativos. A medida de intensidade de associação entre duas variáveis foi realizada através do cálculo da *Odds Ratio* (OR).

A concordância entre os sorotipos incluídos na formulação das vacinas conjugadas 7-valente (sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F), 10-valente (PCV7 mais 1, 5 e 7F) e 13-valente (PCV10 mais 3, 6A e 19A) e aqueles encontrados em isolados invasivos foram usados como indicador da cobertura dos sorotipos da vacina.

RESULTADOS

5.1 Caracterização da População Estudada

Um total de 75 amostras de *S. pneumoniae* foi isolado de pacientes com doença invasiva atendidos em hospitais da cidade de Salvador no período de abril de 2008 a julho de 2011. Participaram desta vigilância laboratorial um total de dez hospitais, sendo dois da rede pública, os quais contribuíram com 25,3% isolados e oito hospitais privados que contribuíram com a identificação de 74,7% dos casos de DPI. Foram obtidos 20 isolados em 2008, 18 em 2009, 24 em 2010 e 13 em 2011. As amostras foram derivadas em sua grande maioria de casos de bacteremia, sendo 82,7% dos isolados derivados de hemoculturas; 9,3% de líquido pleural e 8,0% isolados de LCR.

A população do estudo foi representada por 38,5% de crianças com idade igual ou inferior a cinco anos e 24,6% de pacientes com idade igual ou superior a 65 anos (Gráfico 1). Não houve diferença significativa em relação ao gênero sendo que 53,6% dos pacientes pertenciam ao sexo feminino.

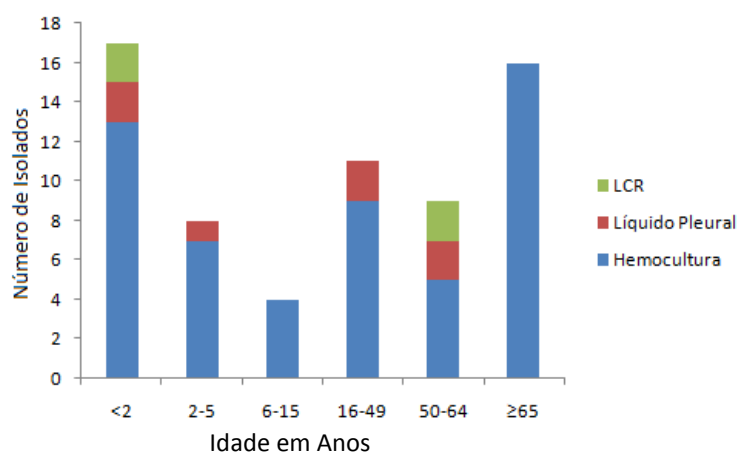


Gráfico 1. Distribuição dos casos de DPI identificados em Salvador no período de 2008 a 2011, de acordo com a faixa etária dos pacientes e origem dos isolados de pneumococos ($n=65$).

5.2 Perfil dos Sorotipos de *S. pneumoniae*

Todos os isolados foram submetidos à reação de multiplex-PCR para determinação do tipo capsular. Aqueles que não foram identificados pelo multiplex PCR tiveram a sorotipagem realizada através da reação de Quellung. O sorogrupo 6 (6A/6B) foi o mais frequente com 15,8% de todos os isolados, seguidos pelos sorotipos 14 (14,7%); 19F com 13,3%; 3 e 23F, com 9,7% dos isolados cada. O sorotipo 19A somou 6,7%, seguido do sorotipo 7C com 5,3% dos isolados. Os demais sorogrupos/sorotipos foram, em grande parte, sorotipos não-vacinais e compreenderam os sorotipos 10A, 12F, 17F, 18C e 34 com 2,7% dos isolados cada; os sorotipos 4, 9A, 6C, 15B, 16F, 18A, 20, 24F foram representados em 1,3% cada na amostragem (Tabela 1).

Ao fazer uma comparação do perfil de sorotipos dessa casuística com os sorotipos de pneumococos isolados de casos de meningite do Hospital Couto Maia no mesmo período, observamos uma distribuição semelhante, não apresentando diferença estatisticamente significativa, como explicitado na Tabela 1.

Considerando a composição da vacina conjugada decavalente, observa-se que 57,3% dos casos de doença invasiva documentados nesse estudo são de sorotipos presentes na PCV10. Para realizar essa análise, foram considerados vacinais os sorotipos 6A/6B por haver reação cruzada entre esses dois sorotipos. A proporção de sorotipos representados na PCV10 foi semelhante e sem diferença estatística, quando isolados provenientes de crianças/adolescentes (< 18 anos) foram comparados aos adultos: 56,7%

(17/30) dos episódios em crianças, enquanto que 57,1% (20/35) episódios foram identificados em adultos [OR=0,98 (0,33-2,95); $p=0,8$].

Tabela 1. Frequência dos sorotipos identificados em casos de DPI na cidade de Salvador, no período de 2008 a 2011.

Sorogrupo/Sorotipo	No. de Isolados de DPI em diferentes hospitais N = 75 (%)	No. de Isolados de meningite/HCM* N = 86 (%)
14	11 (14,7)	10 (11,6)
19F	10 (13,3)	3 (3,5)
6B	8 (10,7)	4 (4,7)
23F	7 (9,3)	7 (8,1)
18C	2 (2,7)	7 (8,1)
6A	4 (5,3)	5 (5,8)
4	1 (1,3)	6 (7,0)
7F	-	2 (2,3)
3	7 (9,3)	6 (7,0)
19A	5 (6,7)	3 (3,2)
7C	4 (5,3)	2 (2,3)
10A	2 (2,7)	-
12F	2 (2,7)	5 (5,3)
17F	2 (2,7)	3 (3,2)
34	2 (2,7)	1 (1,2)
18A	1 (1,3)	2 (2,3)
9N	1 (1,3)	2 (2,3)
18B	-	2 (2,3)
38	-	3 (3,5)
28A	-	3 (3,5)
Outros**	6 (8,0)	10 (11,6)
Sorotipos da PCV10***	43 (57,3)	45 (52,3)

* NT – isolados não-tipáveis pela técnica de multiplex-PCR

** Incluem os sorotipos

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

O mesmo percentual de sorotipos foi observado para a PCV7 (disponível no sistema privado desde 2002), já que os três sorotipos adicionais da PCV10 (1, 5 e 7F) não foram encontrados dentre os isolados de DPI identificados neste estudo. Ao relacionar os sorotipos encontrados com a composição da vacina conjugada tridecavalente (PCV13), observa-se uma representação maior, sendo de 73,3%. É importante salientar que observamos três pacientes acometidos pelo sorotipo 19A e três pacientes pelo sorotipo 3, (nos períodos pré e pós-vacinal) que tiveram DPI com idade inferior a cinco anos, compreendendo a faixa etária indicada à administração da vacina e ambos são sorotipos que não estão presentes na composição da vacina decavalente.

Dentre os pacientes com idade superior a 50 anos, observamos que 72,0% (20/25) tiveram DPI por sorotipos representados na vacina PPV23, indicada para prevenção de DPI nesta faixa etária (14/25 casos não associados à PCV10 e 9/25 casos não associados à PCV13).

A distribuição de sorotipos estratificada por faixa etária dos pacientes encontra-se representada no Gráfico 2. Os sorotipos vacinais encontram-se distribuídos nas três faixas etárias. Um total de 84,0% (21/25) dos isolados provenientes de crianças (idade igual ou inferior a cinco anos), encontra-se entre os sorotipos que estão presentes na vacina conjugada 13-valente.

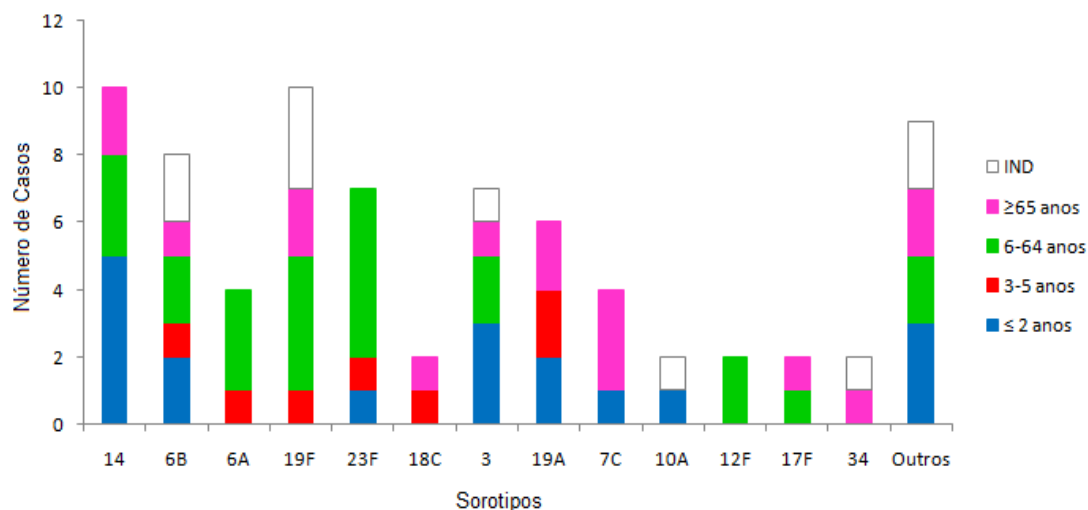


Gráfico 2. Distribuição dos sorotipos de *S. pneumoniae* isolados de casos de DPI em Salvador (2008-2011), estratificada por grupos etários.

IND: idade não-disponível

5.3 Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana

O CLSI 2011 recomenda a utilização do ponto de corte da CIM $\geq 4\mu\text{g/mL}$ para caracterizar como não susceptíveis à penicilina (PNS) os isolados obtidos de outras formas de infecção que não-meningite. Dessa forma, foi identificado um total de 3% (2/67) de casos de DPI por isolados não sensíveis à penicilina, considerando isolados de sangue e líquido pleural. Para os isolados de líquido (CIM $\geq 0,125\mu\text{g/mL}$), a taxa de resistência a penicilina foi de 33,3% (2/6) dos isolados. Um total de 5,3% dos isolados foram não-susceptíveis à penicilina (CIM variando de 0,125 a $4\mu\text{g/mL}$) e em relação ao SMX-TMP, 56,0% (42/75) foram não-sensíveis.

Todos os isolados foram sensíveis à levofloxacina, clindamicina, cloranfenicol e vancomicina (Tabela 2). No total, cinco isolados foram identificados como MDR. Destes, um isolado foi não-susceptível à cefotaxima, penicilina, SMX-TMP, tetraciclina e eritromicina, sendo pertencente ao sorotipo 19A, isolado de sangue. Os outros isolados MDR pertenceram ao sorogrupo

6A/B (isolado de sangue) com não-susceptibilidade à cefotaxima, SMX-TMP, tetraciclina e eritromicina; ao sorotipo 14 (isolado de líquido pleural) que apresentou não-susceptibilidade à penicilina, SMX-TMP e tetraciclina. Os dois isolados restantes pertenceram ao sorotipo 19A de um caso de bacteremia e ao sorogrupo 6A/B (isolado de líquido pleural) com perfil de resistência semelhante, sendo não-susceptíveis ao SMX-TMP, tetraciclina e eritromicina.

Devido ao aumento do número de isolados com índices de não-susceptibilidade entre 0,5 e 1,0 μ g/mL (MERA *et al.*, 2011), associamos os sorotipos e índices de susceptibilidade tomando como base também o ponto de corte de 0,125 μ g/mL. Dessa forma, quando foi associado o perfil de susceptibilidade aos sorotipos identificados, obteve-se 79,4% (27/34) dos sorotipos não-susceptíveis à penicilina são vacinais, sendo a não-susceptibilidade à penicilina mais frequente no sorotipo 14 (9/11) [$p=0,2$; teste de Fischer]. Em relação aos sorotipos não vacinais, o sorotipo 19A (4/5) estava associado com um fenótipo mais comum de resistência quando comparado aos demais sorotipos não vacinais. Quando avaliados sob o ponto de corte para isolados não relacionados a meningite não há associação de sorotipo com isolados PNS (os quatro isolados PNS pertenceram a diferentes sorotipos).

Os isolados de meningite provenientes do sistema de vigilância do Hospital Couto Maia, apresentaram-se mais sensíveis quando comparados ao perfil de sensibilidade dos isolados de DPI, excetuando-se a sensibilidade à penicilina. A taxa de PNS foi 5,3% (4/75) e 31,4% (27/86) entre os isolados de DPI e meningite, respectivamente ($p<0,005$). A taxa de resistência à eritromicina foi de 10,7% (8/75) entre os isolados de DPI enquanto os isolados de meningite foram 100% sensíveis ($p=0,002$).

Tabela 2: Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de casos de DPI na cidade de Salvador (2008-2011).

Antimicrobiano	Valores da CIM em µg/mL											NS ¹ (%)
	0,016	0,031	0,0625	0,125	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	
Penicilina	2	21	18	15	8	5	3	1	2	-	-	5,3
Levofloxacina	-	-	-	-	3	16	51	5	-	-	-	-
Eritromicina	5	41	16	4	1	3	1	-	1	-	3	10,7
Cefotaxima	29	9	13	13	5	4	2	-	-	-	-	2,7
Clindamicina	3	17	24	27	4	-	-	-	-	-	-	-
STX/TMP ²	-	-	4	10	8	11	10	13	14	4	1	56,0
Tetraciclina	1	1	2	3	4	9	8	36	3	4	4	14,7
Cloranfenicol	-	1	-	-	1	5	19	47	2	-	-	-
Vancomicina	-	-	1	22	41	11	-	-	-	-	-	-

NS: não-susceptibilidade

Não-susceptibilidade para isolados “não-meningite” (CLSI 2011): faixa cinza escuro

¹ Parâmetros de não-susceptibilidade seguindo o *Clinical and Laboratories Standards Institute*, 2011: faixa em cinza claro

² STX/TMP: Sulfametoxazol – trimetoprim (ilustrada apenas a concentração do TMP)

5.4 Caracterização Molecular

Todos os isolados de DPI foram submetidos à genotipagem pela técnica de eletroforese em campo pulsátil (PFGE) e o perfil clonal foi comparado com o perfil das amostras de meningite pneumocócica identificadas no mesmo período (abril de 2008 a julho de 2011) no Hospital Couto Maia e cepas de referência do PMEN.

Os isolados de DPI apresentaram uma heterogeneidade genética pelo método de PFGE, sendo que apenas 38,7% (29/75) dos isolados foram agrupados em 10 grupos clonais com dois ou mais isolados, enquanto 46 isolados foram não-clonais, apresentando perfil genético único quando comparado aos demais pelo método de PFGE (Figura 4).

Um total de 22,7% (17/75) dos isolados obtidos neste estudo apresentou o mesmo perfil clonal de isolados identificados entre os casos de meningite do HCM, com seis grupos clonais comuns às duas populações (Figura 5).

Os grupos clonais identificados foram: Clone “FE” formado por 12 isolados, sendo 7 de líquor e 5 de sangue, sorotipo 14, não-sensíveis à penicilina e ao SMX-TMP, exceto os isolados de sangue que só apresentaram resistência ao SMX-TMP (Figura 5A); o clone “BR” formado por sete isolados, todos pertencentes ao sorogrupo 18 e sensíveis à penicilina (Figura 5B); o clone “GK” com cinco isolados pertencentes ao sorotipo 14, não-sensíveis à penicilina (com exceção de dois isolados de sangue, ambos sorotipo 14, porém sensíveis à penicilina) (Figura 5C); o clone “L” formado por sete isolados pertencentes ao sorotipo 3, sensíveis à penicilina (Figura 5D); o clone “AO”, com quatro isolados, sendo um de LCR resistente à penicilina e sorotipo 19F

(Figura 5E) e o o clone “DV”, com três isolados do sorotipo 14, resistente à penicilina (Figura 5F).

Os isolados de meningite pneumocócica oriundos da vigilância realizada no mesmo período no Hospital Couto Maia, apresentam uma maior associação clonal quando comparados entre si e a maioria dos isolados 67/86 (77,9%) divergem seu perfil clonal dos isolados de DPI.

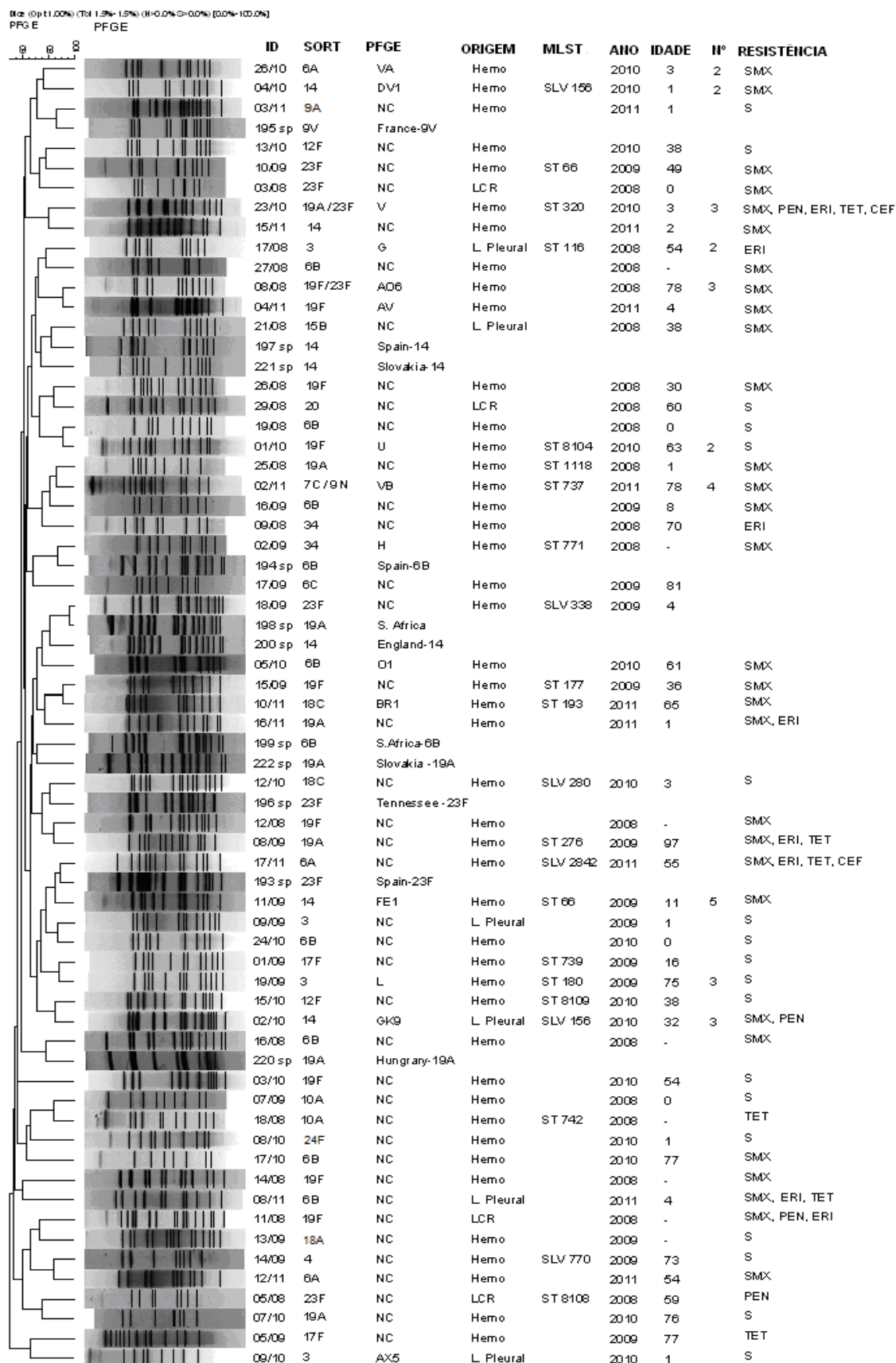


Figura 4. Dendrograma dos padrões clonais apresentados pelos isolados de DPI através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) no período de 2008-2011. **ID:** identificação; **SORT:** sorotipo; **NC:** isolados não clonais; **S:** sensível a todos os antimicrobianos testados.

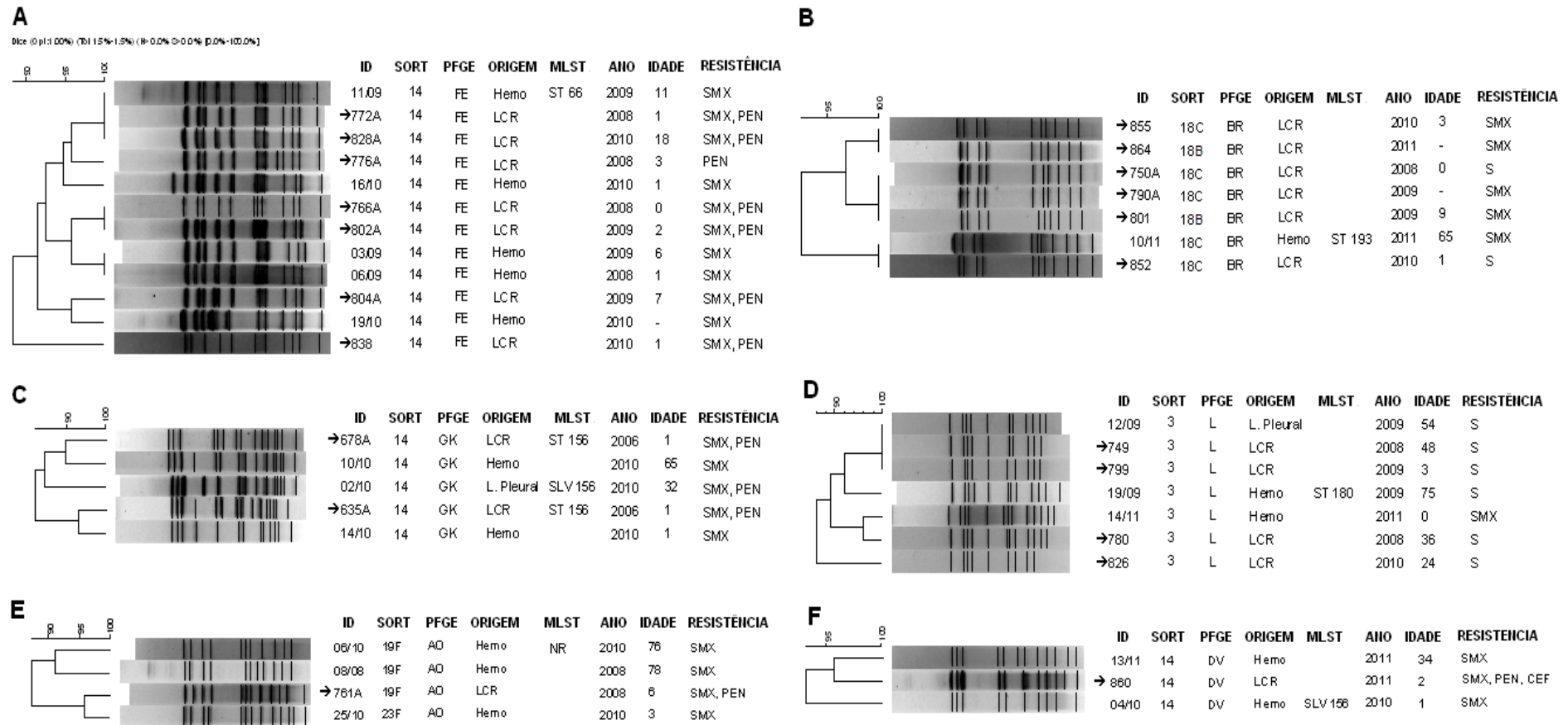


Figura 5. Similaridade genética dos grupos clonais formados pelos isolados de DPI quando associados aos isolados de meningite da vigilância do Hospital Couto Maia (2008-2011).

ID: identificação; **SORT:** sorotipo; **S:** sensível a todos os antimicrobianos testados; **NR:** Não realizado; **→:** Isolados de meningite do HCM.

Tabela 3. Características fenotípicas e genotípicas dos isolados de DPI identificados em Salvador e de clones previamente descritos e globalmente disseminados.

ST	Sorotipo	Perfil alélico dos genes							PMEN
		<i>aroE</i>	<i>gdh</i>	<i>gki</i>	<i>recP</i>	<i>Spi</i>	<i>xpt</i>	<i>ddl</i>	
8104 ¹	19F	7	5	1	1	13	1	8	
8108 ¹	23F	7	13	8	6	1	22	8	
8109 ¹	12F	7	5	4	18	10	3	18	
116	3	1	26	28	11	13	1	14	
742	10A	2	58	9	12	10	97	14	
1118	19A	2	5	29	12	14	3	6	
739	17F	2	13	1	1	6	31	44	
276	19A	2	19	2	17	6	22	14	
66	14	2	8	2	4	6	1	1	
177	19F	7	14	4	12	1	1	14	Portugal ^{19F} -21
180	3	7	15	2	10	6	1	22	Netherlands ³ -31
320	19A	4	16	19	15	6	20	1	
737	7C	2	8	2	16	6	1	1	
SLV 156 ²	14	7	11	10	1	-	8	1	Spain ^{9V} -3
SLV 338 ³	23F	7	13	8	6	-	6	8	Colombia ^{23F} -26
SLV 2781	6B	7	47	1	2	-	1	18	
SLV 280	18C	15	17	4	-	6	1	17	
SLV 751	6B	7	47	29	37	6	-	80	
SLV 770	4	5	-	4	5	6	1	7	
SLV 2842	6A	-	4	2	4	156	1	1	
SLV 49	3	1	26	28	11	-	1	14	
DLV 66	14	2	8	2	4	15	1	-	
DLV 315	6B	-	28	1	1	15	-	14	

¹ – STs novos

² – Dois isolados

³ – Três isolados

A partir da análise dos resultados obtidos pela técnica de PFGE, 26 amostras foram selecionadas para determinação do ST por meio do MLST. Entre as 26 amostras foram identificados 22 ST's (Tabela 3). Quando comparado aos clones já caracterizados pelo PMEN, verificou-se que na cidade de Salvador circulam *S. pneumoniae* com mesmo genótipo já identificado em outros países da América do Sul, a exemplo do clone Colombia^{23F}-26 e da Europa, como os clones Portugal^{19F}-21, Spain^{9V}-3 e Netherlands³-31.

DISCUSSÃO

O presente trabalho caracterizou o perfil fenotípico e genotípico de isolados de pneumococos obtidos de diferentes formas de doença pneumocócica invasiva na cidade de Salvador, a terceira maior cidade brasileira. A grande maioria dos casos notificados em Salvador está relacionada apenas aos casos mais graves, que correspondem ao quadro clínico de meningite pneumocócica e nessa casuística 82,7% dos isolados foram derivados de hemocultura, possibilitando obter um conhecimento mais amplo sobre a diversidade populacional deste patógeno.

As faixas etárias consideradas de maior risco para doença pneumocócica são os menores de cinco anos e maiores de 64 anos de idade. Esta distribuição por faixa etária vulnerável já foi observada em vários estudos brasileiros (REIS *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2008; MENEZES *et al.*, 2011; ALVARES *et al.*, 2011) e internacionais (LYNCH; ZHANEL, 2009; IMHÖL *et al.*, 2010b). A população deste estudo não difere das demais no que se refere à distribuição por faixa etária, já que 63,1% dos pacientes pertencem a essas faixas etárias de maior risco, sendo 38,5% (25/65) dos casos identificados em crianças menores de 5 anos e 24,6% (16/65) em pacientes maiores de 64 anos.

Dentre o grupo de crianças menores de cinco anos, foi observado que a doença pneumocócica invasiva acomete principalmente os indivíduos com idade até dois anos (18/25), o que também já foi descrito por outros autores em todo o mundo (ALVARES *et al.*, 2012; O'BRIEN *et al.*, 2009; OCHOA *et al.*, 2010; MUÑOZ-ALMAGRO *et al.*, 2011) e isso é importante uma vez que a

estratégia de prevenção (administração da vacina conjugada) é direcionada especialmente a essa faixa etária.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 85% das infecções causadas por *S. pneumoniae* em crianças são causadas pelos sorotipos/sorogrupos: 4, 6A/B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Nesse estudo foi confirmado o perfil de sorotipos mais frequente (14, 6A/6B, 5, 1, 19F/19A, 9N/9V e 23F) em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil e outros países da América Latina (ANDRADE *et al.* 2010; ALVARES *et al.*, 2011; CASTAÑEDA *et al.*, 2009) com exceção dos sorotipos 1 e 5. É importante destacar a elevada prevalência dos sorotipos 1 e 5 (8 a 12%) em outras regiões brasileiras (MANTESE *et al.*, 2009; ALVARES *et al.*, 2011), o que não foi encontrado no presente estudo, concordando com outros estudos realizados na cidade de Salvador, com isolados provenientes de pacientes com meningite, onde a prevalência destes sorotipos, quando existe, apresenta-se inferior a 2% (REIS *et al.*, 2002; MENEZES *et al.*, 2011), porém discordando de achados relatados por Nascimento-Carvalho e colaboradores (2003), que identificaram o sorotipo 5 como o segundo mais freqüente (10% dos isolados de DPI) na cidade de Salvador entre os anos de 1997 a 2002.

Nesta casuística não identificamos associação estatisticamente significativa entre sorotipos e idade, similar a outro estudo brasileiro conduzido num Hospital Universitário da cidade de São Paulo (MANTESE *et al.*, 2009). Entretanto, Reis e colaboradores (2008) identificaram que 97% dos isolados de pneumococos com sorotipo 14 foram provenientes de crianças com idade inferior a cinco anos. Um outro estudo conduzido na Alemanha por IMÖHL e colaboradores (2010a) numa vigilância realizada entre 1999 e 2007, identificou

os sorotipos 14, 6B, 19F, and 18C significativamente associados com DPI em crianças, enquanto os sorotipos 3 e 4 foram mais frequentes em adultos.

Apesar de nossa casuística ter predomínio de isolados de sangue, utilizamos para algumas análises também o ponto de corte de CIM $\geq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$ para definir isolados não susceptíveis à penicilina, conforme recomendado pelo CLSI para isolados provenientes de líquido. Consideramos que se adotássemos o ponto de corte para isolados de “não-meningite” estaríamos subestimando o fenômeno de resistência associado a diversos sorotipos que apresentam reduzida sensibilidade à penicilina, assim como feito em outros estudos que caracterizaram isolados invasivos (MUÑOZ-ALMAGRO *et al.*, 2011).

Segundo um estudo realizado nos EUA, houve um declínio de isolados com CIM para penicilina de a 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$, enquanto isolados com CIM entre 0,125 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ aumentaram, o que pode sinalizar que a adoção de ponto de corte de CIM $\geq 2\mu\text{g/mL}$ deixe de identificar sorotipos vacinais resistentes e sorotipos não vacinais que venham a adquirir resistência à penicilina no período pós-vacina (MERA *et al.*, 2011).

Entre os isolados de DPI caracterizados neste trabalho a não-sensibilidade à penicilina foi de 5,5%, semelhante ao encontrado em países europeus desenvolvidos, como por exemplo, a Alemanha (LOW, 2005). Um estudo realizado na Catalonia, Espanha, observou um índice de não-sensibilidade à penicilina de 0,2% quando analisou sob o ponto de corte adotado para isolados de não-meningite (CIM $\geq 4\mu\text{g/mL}$) e quando analisados como não susceptíveis a CIM $\geq 0,125\mu\text{g/mL}$, a taxa de isolados PNS observada foi de 18,7% (MUÑOZ-ALMAGRO *et al.*, 2011).

Considerando o ponto de corte de CIM $\geq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$, o índice de PNS foi 45%, índice maior do que o identificado entre isolados de casos de meningite na cidade de Salvador no período de 2000 a 2007 que mostrou 22% de não-susceptibilidade à penicilina (MENEZES *et al.*, 2011), e de 31% para os isolados de meningite identificados no período de 2008 a 2011.

Não-susceptibilidade à penicillina (CIM $\geq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$) esteve associada a alguns sorotipos, particularmente 14, 19A, 6A/B e 23F, similar ao encontrado em outros estudos brasileiros (CARVALHO-NASCIMENTO *et al.*, 2003; MENEZES *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012) e em outras partes do mundo (RICHTER *et al.*, 2002; QUIN *et al.*, 2006; REINERT *et al.*, 2007; SOGSTAD *et al.*, 2006).

A resistência a outros antimicrobianos também foi identificada, a exemplo da resistência à eritromicina (11%) que apresentou índices similares aos encontrados em em estudos realizados na cidade de Uberlândia-MG e Goiânia (MANTESE *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2012). Estes resultados corroboram os achados de outros países da América Latina, onde vem sendo observado um constante aumento nos índices de resistência aos macrolídeos (AGUDELO *et al.*, 2009). Em países como os EUA e em países Europeus, as taxas de resistência a macrolídeos vem aumentando desde 1990, atingindo atualmente, taxas em torno de 50% (HICKS *et al.*, 2011; CORNICK; BENTLEY, 2012; HORACIO *et al.*, 2012). Este aumento de resistência a macrolídeos tem sido associado ao aumento do uso desses antimicrobianos para o tratamento de infecções respiratórias, principalmente nas faixas etárias inferiores a cinco anos e maiores que 50 anos (HICKS; MONNET; ROBERTS, 2010). Os

isolados de pneumococos provenientes de casos de meningite identificados em Salvador no Hospital Couto Maia não apresentaram resistência à eritromicina, coincidindo com dados registrados também em outros estudos brasileiros (YOSHIOKA *et al.*, 2011; MENEZES *et al.*, 2011).

A taxa de cepas MDR nos casos de DPI foi de 6,7% (5/75), sendo maior que as taxas observadas na vigilância para meningite pneumocócica entre os anos de 2000 e 2007 (MENEZES *et al.*, 2011) que foi de 0,2% (1/397) ou quando comparado com o período de 2008 a 2011 da vigilância realizada no HCM (período equivalente ao do presente estudo), que apresentou uma taxa de MDR de 2,3% (2/86). Esses dados também permitem observar que a prevalência de cepas de pneumococos MDR em Salvador, embora ainda baixa, vem aumentando, o que ocorre não só aqui no Brasil como em outros países, a exemplo dos EUA (TECHASAENSIRI *et al.*, 2010; CORNICK; BENTLEY, 2012) e Japão (QUIN *et al.*, 2006; XIAO *et al.*, 2011). O principal sorotipo com múltipla resistência antimicrobiana foi O 19A, que corresponde a 50% das cepas MDR isoladas. Esta múltipla resistência associada ao sorotipo 19A também foi encontrada em outros estudos (PELTON *et al.*, 2007; JACOBS *et al.*, 2008; MUÑOZ-ALMAGRO *et al.*, 2009; TECHASAENSIRI *et al.*, 2010). No Japão, cepas pertencentes ao sorotipo 19A chegaram a alcançar índices de 87% de MDR (XIAO *et al.*, 2011). Isto corrobora com a hipótese de que este fenótipo de resistência esteja facilitando a emergência do sorotipo 19A nas comunidades vacinadas (PELTON *et al.*, 2007).

Diferentes perfis de resistência aos antimicrobianos estão associados principalmente ao uso indiscriminado dos mesmos (LINARES *et al.*, 2010; ANDERSSON; HUGHES, 2010). Nos EUA tem sido observado que a

proporção de DPI resistente aos antimicrobianos é proporcional ao número de prescrições de antibióticos, sendo assim, a prática de prescrições locais leva a padrões locais de resistência (HICKS *et al.*, 2011). Outra questão seria a exposição a concentrações antimicrobianas subclínicas, incapazes de inibir o crescimento bacteriano, que poderia selecionar mutantes que levariam à emergência/aumento do fenótipo de resistência em uma comunidade (CORNICK; BENTLEY, 2012). Sendo assim, confirma-se a importância de se adotar estratégias de utilização criteriosa dos antibióticos de forma contínua, visando impedir o aumento dos níveis de resistência aos antimicrobianos.

Um total de 57,3% dos casos de DPI avaliados neste estudo foi de sorotipos presentes na vacina decavalente, implementada no programa de imunização infantil da Bahia em julho de 2010. Dados semelhantes foram encontrados entre os casos de meningite na cidade de Salvador (MENEZES *et al.*, 2011). Esse percentual de sorotipos vacinais são inferiores aos encontrados no Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, e países da América Latina onde as taxas variam de 70 a 88% (ANDRADE *et al.*, 2012; ALVARES *et al.*, 2011), assim como em países da Europa e EUA, onde observou-se percentual de cobertura vacinal próximo a 90% (BETTINGER *et al.*, 2010; RUCKINGER *et al.*, 2009).

Os sorotipos 3 e 19A foram os mais frequentes entre os casos de DPI aqui avaliados, o que também vem sendo observado em muitos países principalmente após o uso da vacina conjugada heptavalente (RÜKINGER *et al.*, 2009; PILISHVILI *et al.*, 2010; ISAACMAN *et al.*, 2010; REINERT; JACOBS; KAPLAN, 2010; McINTOSH; REINERT, 2011) e que podem ser justificados pela imunidade em rebanho proporcionada a longo prazo pelo uso da vacina

(PILISHVILI *et al.*, 2010), já que a PCV7 vem sendo utilizada no Brasil desde o ano de 2002 em clínicas privadas e para grupos especiais.

Em Salvador, ainda não foi possível observar uma redução significativa de DPI por sorotipos presentes na vacina decavalente, uma vez que sorotipos vacinais ainda continuam prevalentes e uma redução da sua incidência não foi encontrada quando comparados os períodos pré e pós-vacinal (dados não mostrados). Acredita-se que essa redução ainda não foi confirmada, devido ao pouco tempo de implementação efetiva da vacina decavalente no calendário de imunizações, haja visto que uma redução significativa dos sorotipos vacinais foi observada em todos os países que inseriram a PCV7 no calendário vacinal (RÜCKINGER *et al.*, 2009; ISAACMAN *et al.*, 2009; TAN, 2010; HEATHER *et al.*, 2010; CDC, 2010).

Um aspecto relevante para a prevenção de DPI, tem sido o uso da vacina polissacarídica 23-valente em maiores de 60 anos, como preconiza a recomendação do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2010). Um total de 72% dos casos de IPD em pacientes com mais de 50 anos foi devido a sorotipos presentes na PPV23. Esta vacina tem sido recomendada para reduzir a incidência e mortalidade de doença pneumocócica em maiores de 50 anos em diferentes países (OVERMAN, 2011; BURCKHARDT *et al.*, 2010; ISTURIZ, *et al.*, 2010; PITSIU; KIOUMIS, 2011).

Com o uso das vacinas conjugadas, o monitoramento dos fenômenos de substituição dos sorotipos capsulares e o controle do surgimento e expansão dos clones se tornou ainda mais importante. No atual estudo, o PFGE permitiu identificar que existe uma diversidade muito grande entre os clones que causaram doença invasiva na população em estudo, sendo que 46 isolados

(61,3%) foram classificados como “não-clonais” e também, quando comparado às cepas que causaram meningite pneumocócica no mesmo período, apenas 17 casos (22,7%) estavam relacionados a clones previamente identificados como causadores de meningite no HCM. Esses dados sugerem que as diferentes formas de infecção e os diferentes hospitais dos quais foram oriundos os pacientes, possam influenciar esses achados.

Dos seis grupos clonais identificados, quatro foram compostos por cepas que apresentaram não-susceptibilidade a um ou mais antimicrobianos, reforçando a hipótese de que cepas resistentes aos antimicrobianos tendem a apresentar maior similaridade clonal do que cepas sensíveis (BRUEGGEMANN *et al.*, 2003; REIS *et al.* 2008). Dentre os clones identificados, destaca-se o grupo clonal FE, sorotipo 14 com isolados sensíveis e não-sensíveis a penicilina, pertencente ao ST66, com o maior número de isolados (12/38). Todos foram indistinguíveis/relacionados através da técnica de PFGE (Figura 5A). Outros estudos também identificaram o clone ST66 como sendo o principal e o mais prevalente entre cepas de doença invasiva em Salvador e no Brasil (BRANDILEONE *et al.*, 1998; SOGSTAD *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2008).

Também associado ao sorotipo 14 com não-susceptibilidade à penicilina, foi identificado o grupo clonal “GK” associado ao ST156. Este mesmo clone foi previamente identificado como clone Spain^{9V}-3, também relatado em estudos brasileiros (REIS *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2010; BARROSO *et al.*, 2012) e em todo o mundo (ALBARRACÍN ORIO *et al.*, 2008; COOKE *et al.*, 2010). Este clone Spain^{9V}-3 tem sido representado por outros sorotipos além do 14, como o 9A (na Alemanha), 19A (nos EUA, Kênia, Austrália), 19F (na Inglaterra, Suécia), 6B (em Israel) e 11A (Sri Lanka), reforçando a habilidade de S.

pneumoniae em realizar a substituição capsular através da recombinação de genes capsulares (SJÖSTRÖM *et al.*, 2007; BRUEGGEMANN *et al.*, 2007; ALBARRACÍN ORIO *et al.*, 2008).

Outros clones internacionais foram identificados dentre os casos de DPI caracterizados neste estudo. O SLV 338 (clone Colômbia^{23F}-26) foi encontrado em três isolados do sorotipo 23F. Este clone já foi identificado entre os isolados de meningite do Hospital Couto Maia (Salvador) e na cidade do Rio de Janeiro, sendo que todos apresentam o mesmo perfil de resistência antimicrobiana, apresentando-se não-susceptíveis à penicilina e ao SMX-TMP (BARROSO *et al.*, 2012). De considerável importância foi a identificação do ST 320 associado ao sorotipo 19A MDR, o qual é relevante por não ser representado na vacina PCV10. Este sorotipo tem sido descrito nos EUA e Europa como um sorotipo emergente na era pós-vacinal (MUÑOZ-ALMAGRO *et al.*, 2009; TECHASAENSIRI *et al.*, 2010; AGUIAR *et al.*, 2010; HANAGE *et al.*, 2011).

Dentre os isolados sensíveis a penicilina, foram identificados dois grupos clonais associados ao ST193 (sorogrupo 18) e ao ST180 (sorotipo 3). Estes clones são persistentes e identificados ao longo de mais de dez anos no Hospital Couto Maia como causadores de meningite, sendo o primeiro frequente em crianças e o segundo mais frequente em adultos (REIS *et al.*, 2008). Estes clones tem sido frequentes em casos de doença invasiva em outras localidades, como na América do Norte e Europa (KRONENBERG *et al.*, 2006; GHERARDI *et al.*, 2007). O recente relato de multi-resistência associada ao sorotipo 3 (MOTHIBELI *et al.*, 2010) reforça a importância da vigilância

laboratorial para identificar os sorotipos e clones associados a DPI na era vacinal.

Apesar da indisponibilidade de dados como fatores de risco, condições gerais de cada paciente, os dados clínicos associados, hábitos de vida, condições sócio-econômicas, o presente estudo acrescenta informações importantes que são necessárias para um melhor controle e monitoramento da doença pneumocócica invasiva.

CONCLUSÕES

1. A prevalência de sorotipos representados na vacina decavalente foi de 57%, restrita aos sorotipos 6A/B, 14, 19F, 23F, 18C e 4.
2. Os sorotipos 3, 19A e 7C (não-PCV10), corresponderam a 20% dos isolados. Nos 32% dos casos não-vacinais restantes, foi identificado um total de nove diferentes sorotipos.
3. Um total de 5,5% dos isolados foram não-susceptíveis à penicilina e associados a diferentes sorotipos, considerando a CIM > 4,0 µg/mL;
4. Um total de 6,7% dos isolados foram resistentes a múltiplas drogas incluindo: penicilina, SMX-TMP, tetraciclina, eritromicina e cefotaxima;
5. A resistência à eritromicina foi de 11%, contrastando com a ausência de resistência a este antibiótico entre os isolados de meningite do Hospital Couto Maia;
6. Os isolados de DPI foram heterogêneos em sua composição clonal (61,3%) e de limitada similaridade com isolados provenientes dos casos de meningite, sendo associada em maior parte com isolados que apresentaram não-susceptibilidade à penicilina (22/38);
7. Clones internacionais como o Colombia^{23F}-26 (SLV 338), Portugal^{19F}-21 (ST 177), Spain^{9V}-3 (SLV 156) e o Netherlands³-31 (ST 180) são clones que circulam em Salvador;
8. Identificamos três novos STs: ST 8104, ST 8108 e o ST 8109, associados a diferentes sorotipos (19F, 23F e 12F, respectivamente).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARRACÍN ORIO, A. G. *et al.* A new serotype 14 variant of the pneumococcal Spain9V-3 international clone detected in the central region of Argentina. **J Med Microbiol**, v. 57, p. 992-999, 2008.
- ALVARES, J. R. *et al.* Prevalence of pneumococcal serotypes and resistance to antimicrobial agents in patients with meningitis: ten-year analysis. **Infect Dis**, v. 15, p. 22-27, 2011.
- ANDRADE, A. L. S. *et al.* Population-based surveillance for invasive pneumococcal disease and pneumonia in infants and young children in Goiânia, Brazil. **Vaccine**, v. 30, p. 1901-1909, 2012.
- ANDRADE, A. L. S. *et al.* Non-typeable *Streptococcus pneumoniae* carriage isolates genetically similar to invasive and carriage isolates expressing capsular type 14 in Brazilian infants. **Journal of Infection**, v. 61, p. 314-322, 2010.
- APPELBAUM, P. C. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p: 77-83, 1992.
- AUSTRIAN, R. The pneumococcus at the millennium: not down, not out. **The J Infect Dis**, v. 179, p. S338-341, 1999.
- BAROCCHI, M. A. *et al.* A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. **PNAS**, v. 103, p. 2857-2862, 2006.
- BARROSO, D. E. *et al.* β -Lactam resistance, serotype distribution, and genotypes of meningitis-causing *Streptococcus pneumoniae*, Rio de Janeiro, Brazil. **Pediatr Infect Dis J**, v. 31, p. 30-36, 2012.
- BERGEY, D. H. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 3. New York: Springer, 2001.
- BETTINGER, J. A. *et al.* The effect of routine vaccination on invasive pneumococcal infections in Canadian children, Immunization Monitoring Program, Active 2000-2007. **Vaccine**, v. 28, p. 2130-2136, 2010.
- 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.
- BRASIL. Portaria nº 3.318, de 28 de outubro de 2010. Institui em todo o território nacional, o Calendário Básico de Vacinação da Criança, o Calendário do Adolescente e o Calendário do Adulto e Idoso. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/calendario_basico_vaciacao_2010.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2012.

BRANDILEONE, M. C. *et al.* Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. **Microb Drug Resist**, v. 4, p. 209-217, 1998.

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, p. 567-574, 2006.

BRICKS, L. F.; BEREZIN, E. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases. **J Pediatr (Rio J)**, v. 82, p. S67-S74, 2006.

BRUEGGEMANN, A. B. *et al.* Clonal Relationships between Invasive and Carriage *Streptococcus pneumoniae* and Serotype- and Clone-Specific Differences in Invasive Disease Potential. **J Infect Dis**, v. 187, n. 9, p. 1424-1432, 2003a.

BRUEGGEMANN, A. B.; SPRATT, B. G. Geographic distribution and clonal diversity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 4966-4970, 2003b.

BRUEGGEMANN, A. B. *et al.* Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. **PLoS Pathog**, v. 3, p. e168, 2007.

BOGAERT, D. *et al.* Molecular epidemiology of penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* among children in Greece. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 4361-4366, 2000.

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

BURCKHARDT, I. *et al.* Risk factor analysis for pneumococcal meningitis in adults with invasive pneumococcal infection. **Epidemiol Infect**, v. 138, p. 1353-1358, 2010.

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

CASTAÑEDA, E. *et al.* Laboratory-based surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin American countries, a SIREVA II project, 2000-2005. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 9, p. e265-e270, 2009.

Centers for Disease Control and Prevention. **Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases**. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 2008.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 49, 2000.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. *Streptococcus* Laboratory. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>>. Acesso em: 20 set. 2009.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Pneumococcal Disease Among Infants and Children - Use of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 59, 2010.

Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, fifteenth informational supplement, 15 th ed. M100-S15. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2010.

COFFEY, T. J. *et al.* Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. **Mol Microbiol**, v. 5, p.2255-2260, 1991.

COFFEY, T. J. *et al.* Multiply antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* recovered from Spanish hospitals (1988-1994): novel major clones of serotypes 14, 19F and 15F. **Microbiology**, v. 142, p. 2747-2757, 1996.

COFFEY, T. J. *et al.* Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Mol Microbiol**, v. 27, p. 73-83, 1998.

COOKE, B. *et al.* Antibiotic resistance in invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates identified in Scotland between 1999 and 2007. **J Med Microbiol**, v. 59, p. 1212-1218, 2010.

CORNICK, J. E.; BENTLEY, S. D. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. **Microbes Infect**, 2012. Review.

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

EFFELTERRE, T. *et al.* A dynamic model of pneumococcal infection in the United States: implications for prevention through vaccination. **Vaccine**, v. 28, p. 3650-3660, 2010.

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

FEIL, E. *et al.* Estimating recombinational parameters in *Streptococcus pneumoniae* from multilocus sequence typing data. **Genetics**, v. 154, p. 1439-1450, 2000.

FENOLL, A. *et al.* Temporal Trends of Invasive *Streptococcus pneumoniae* Serotypes and Antimicrobial Resistance Patterns in Spain from 1979 to 2007. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 4, p. 1012-1020, 2009.

FIGUEIREDO, A. M. Novel penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* in the Czech Republic and Slovakia. **Microb Drug Resist**, v. 1, p. 71-78, 1995.

GHERARDI, G. *et al.* Major related sets of antibiotic-resistant pneumococci in the United States as determined by pulsed-field gel electrophoresis and pbp1a-pbp2b-pbp2x-dhf restriction profiles. **J Infect Dis**, v. 181, p. 216-29, 2000.

GHERARDI, G. *et al.* Antibiotic-resistant invasive pneumococcal clones in Italy. **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 306-312, 2007.

HALL, L. M. *et al.* Genetic relatedness within and between serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from the United Kingdom: analysis of multilocus enzyme electrophoresis, pulsed-field gel electrophoresis and antimicrobial resistance patterns. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 853-859, 1996.

HANAGE, W. P. Clonal replacement among 19A *Streptococcus pneumoniae* in Massachusetts prior to 13 valent conjugate vaccination. **Vaccine**, v. 29, p. 8877-8881, 2011.

HANSMAN D.; BULLEN M. M. A Resistant pneumococi. **Lancet**, p. 264-265, 1967.

HARBOE, Z. B. *et al.* Pneumococcal Serotypes and Mortality following Invasive Pneumococcal Disease: A Population-Based Cohort Study. **PLoS Med**, v. 6, 2009.

HEATHER, E. H. *et al.* Effect of Pneumococcal Conjugate Vaccine on Pneumococcal Meningitis. **N Engl J Med**, v. 360, p. 244-256, 2009.

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

HENRICHSEN, J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 2759-2762, 1995.

- HENRIQUES, N. B. *et al.* Dynamics of penicillin-susceptible clones in invasive pneumococcal disease. **J Infect Dis**, v. 184, p. 861-869, 2001.
- HICKS, L. A.; MONNET, D. L.; ROBERTS, R. M. Increase in Pneumococcus Macrolide Resistance, USA. **Emerg Infect Dis**, v. 16, p. 896-897, 2010.
- HICKS, L. A. *et al.* Outpatient antibiotic prescribing and nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1996-2003. **Clin Infect Dis**, v. 53, p. 631-639, 2011.
- HO, P. L. *et al.* Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of nasopharyngeal and invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Hong Kong children. **Vaccine**, v. 22, p. 3334-3339, 2004.
- HORACIO, A. N. *et al.* Serotype changes in adult invasive pneumococcal infections in Portugal did not reduce the high fraction of potentially vaccine preventable infections. **Vaccine**, v. 30, p. 218-224, 2012.
- IMÖHL, M. *et al.* Association of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with age in invasive pneumococcal disease. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 4, p. 1291-1296, 2010a.
- IMÖHL, M. *et al.* Regional differences in serotype distribution, pneumococcal vaccine coverage, and antimicrobial resistance of invasive pneumococcal disease among German federal states. **Int J Med Microbiol**, v. 300, p. 237-247, 2010b.
- ISAACMAN, D. J. *et al.* Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. **Int J Infect Dis**, v. 14, p. e197-e209, 2010. Review.
- ISTURIZ, R. E. *et al.* Clinical and economic burden of pneumonia among adults in Latin America. **Int J Infect Dis**, v. 14, p. e852-e856, 2010. Review.
- JABES, D. Penicillin-binding protein families: evidence for the clonal nature of penicillin-resistance in clinical isolates of pneumococci. **J Infect Dis**, v. 159, p. 16-25, 1989.
- JACKSON, L. A.; JANOFF, E. N. Pneumococcal vaccination of elderly adults: new paradigms for protection. **Clin Infect Dis**, v. 47, p. 1328-1338, 2008.
- JACOBS, M. R. *et al.* Emergence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 19A, 6C, and 22F and serogroup 15 in Cleveland, Ohio, in relation to introduction of the protein-conjugated pneumococcal vaccine. **Clin Infect Dis**, v. 47, p. 1388-1395, 2008.

JIN, P. *et al.* First Report of Putative *Streptococcus pneumoniae* Serotype 6D among Nasopharyngeal Isolates from Fijian Children. **J Infect Dis**, v. 200, n. 9, p. 1375-1380, 2009.

JOHNSON, H. L. *et al.* Systematic Evaluation of Serotypes Causing Invasive Pneumococcal Disease among Children Under Five: The Pneumococcal Global Serotype Project. **PLoS Med**, v. 7, n. 10, 2010.

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

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, p. 78-86, 2000.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KRONENBERG, A. *et al.* Distribution and invasiveness of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in Switzerland, a country with low antibiotic selection pressure, from 2001 to 2004. **Clin Microbiol**, v. 44, p. 2032-2038, 2006.

LEE, C. *et al.* Association of Secondhand Smoke Exposure with Pediatric Invasive Bacterial Disease and Bacterial Carriage: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Med**, v. 7, n. 12, 2010.

LEFEVRE, J. C. *et al.* DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. **J Clin Microbiol**, v. 31, p. 2724-2728, 1993.

LEFEVRE, J. C. *et al.* Molecular analysis by pulsed-field gel electrophoresis of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Toulouse, France. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 14, p. 491-497, 1995.

LOW, D. E. Changing Trends in Antimicrobial-Resistant Pneumococci: It's Not All Bad News. **Clin Infect Dis**, v. 41, p. S228-S233, 2005.

LYNCH, J.P.; ZHANEL, G. G. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and strategies for prevention. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 30, p. 189-209, 2009.

MAIDEN, M. C. J. *et al.* Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **PNAS**, v. 95, p. 3140-3145, 1998.

MANTESE, O. C. *et al.* Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of pneumococcus in children: analysis of 9 years. **J Pediatr**, v. 85, p. 495-502, 2009.

MARTIN, M. *et al.* An outbreak of conjunctivitis due to atypical *Streptococcus pneumoniae*. **N Engl J Med**, v. 348, p. 1112-1121, 2003.

MARTON, A. *et al.* Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. **J Infect Dis**, v. 163, p. 542-548, 1991.

McDOUGAL, L. K. *et al.* Analysis of multiply antimicrobial-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the United States. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, p. 2176-2184, 1992.

McDOUGAL, L. K. *et al.* Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, p. 2282-2288, 1995.

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, p. 2565-2571, 2001.

McINTOSH, E. D.; REINERT, R. R. Global prevailing and emerging pediatric pneumococcal serotypes. **Expert Rev Vaccines**, v. 10, p. 109-129, 2011.

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

MERA, R. M. *et al.* Impact of new Clinical Laboratory Standards Institute *Streptococcus pneumoniae* penicillin susceptibility testing breakpoints on reported resistance changes over time. **Microb Drug Resist**, v. 17, p. 47-52, 2011.

MITCHELL, A. M.; MITCHELL, T. J. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, p. 411-418, 2010.

MOTHIBELI, K. M. *et al.* An unusual pneumococcal sequence type is the predominant cause of serotype 3 invasive disease in South Africa. **J Clin Microbiol**, v. 48, p. 184-191, 2010.

MUNOZ, R. *et al.* Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. **J Infect. Dis**, v. 164, p. 302-306, 1991.

MUNOZ, R. *et al.* Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterisation by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. **Clin Infect Dis**, v. 15, p. 112-118, 1992.

MUÑOZ-ALMAGRO, C. *et al.* Emergence of invasive pneumococcal disease caused by multidrug-resistant serotype 19A among children in Barcelona. **J Infect**, v. 59, p. 75-82, 2009.

MUÑOZ-ALMAGRO, C. *et al.* Serotypes and clones causing invasive pneumococcal disease before the use of new conjugate vaccines in Catalonia, Spain. **J Infect**, v. 63, p. 151-162, 2011.

NASCIMENTO-CARVALHO, C. M. Cepas invasivas de pneumococo isoladas de crianças e adolescentes em Salvador. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 3, p. 209-214, 2003.

NELSON, A. L. *et al.* Capsule Enhances Pneumococcal Colonization by Limiting Mucus-Mediated Clearance. **Infect Immun**, v. 75, p. 83-90, 2007.

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

O'BRIEN, K.L.; NOHYNEK, H. Report from a WHO Working Group: standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. **Pediatr Infect Dis J**, v. 22, n. 2, p. e1-11, 2003. Review.

O'BRIEN, K. L. *et al.* Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, v. 374, p. 893-902, 2009.

OCHOA, T. J. *et al.* Invasive pneumococcal diseases among hospitalized children in Lima, Peru. **Rev Panam Salud Publica**, v. 28, n. 2, p. 121-127, 2010.

OVERWEG, K. *et al.* Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Poland: identification of emerging clones. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 1739-1745, 1999.

PAI, R.; GERTZ, R. E.; BEALL, B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 124-131, 2006.

PANTOSTI, A. *et al.* A novel, multiple drug-resistant, serotype 24F strain of *Streptococcus pneumoniae* that caused meningitis in patients in Naples, Italy. **Clin Infect Dis**, v. 35, p. 205-208, 2002.

PELTON, S. I. *et al.* Emergence of 19A as virulent and multidrug resistant Pneumococcus in Massachusetts following universal immunization of infants with pneumococcal conjugate vaccine. **Pediatr Infect Dis J**, v. 26, p. 468-472, 2007.

PLETZ, M. W. *et al.* Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32, p. 199-206, 2008. Review.

PILISHVILI, T. *et al.* Sustained Reductions in Invasive Pneumococcal Disease in the Era of Conjugate Vaccine. **J Infect Dis**, v. 201, p. 32-41, 2010.

PITSIOU, G. G.; KIOUMIS, I. P. Pneumococcal vaccination in adults: Does it really work? **Respir Med**, v. 105, p. 1776-1783, 2011.

PORAT, N. *et al.* Persistence of two invasive *Streptococcus pneumoniae* clones of serotypes 1 and 5 in comparison to that of multiple clones of serotypes 6B and 23F among children in southern Israel. **J Clin Microbiol**, v. 39, p. 1827-1832, 2002.

QIN, L. *et al.* Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with community-acquired pneumonia and molecular analysis of multidrug-resistant serotype 19F and 23F strains in Japan. **Epidemiol Infect**, v. 134, p. 1188-1194, 2006.

REINERT, R. R. *et al.* Molecular epidemiology of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with invasive pneumococcal disease in Germany. **Clin Microbiol Infect**, v. 13, p. 363-368, 2007.

REINERT, R. R.; JACOBS, M. R.; KAPLAN, S. L. Pneumococcal disease caused by serotype 19A: review of the literature and implications for future vaccine development. **Vaccine**, v. 28, p. 4249-4259, 2010.

REIS, J. N. *et al.* Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 40, n.1, p. 275-277, 2002.

REIS, J. N. *et al.* Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an Urban Slum Community. **J Infect**, v. 57, p. 204-213, 2008.

RICHTER, S. S. *et al.* The molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1994-2000. **Clin Infect Dis**, v. 34, p. 330-339, 2002.

RÜCKINGER, S. *et al.* Reduction in the incidence of invasive pneumococcal disease after general vaccination with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in Germany. **Vaccine**, v. 27, p. 4136-4141, 2009.

SA-LEAO, R. *et al.* Carriage of internationally spread clones of *Streptococcus pneumoniae* with unusual drug resistance patterns in children attending day care centers in Lisbon, Portugal. **J Infect Dis**, v. 182, p. 1153-1160, 2000.

SHI, Z. Y. *et al.* Identification of the three major clones of multiply antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Taiwanese hospitals by multilocus sequencing typing. **J Clin Microbiol**, v. 36, p. 3514-3519, 1998.

SHIBL, A.; MEMISH, Z.; PELTON, S. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in the Arabian Peninsula and Egypt. **Int J of Antimicrob Agents**, v. 33, p. 410.e1-401.e9, 2009. Review.

- SIBOLD, C. Genetic relationships of penicillin-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated on different continents. **Infect Immun**, v. 60, p. 4119-4126, 1992.
- SJÖSTRÖM, K. *et al.* Clonal success of penicillin nonsusceptible pneumococci. **PNAS**, v. 104, p. 12907-12912, 2007.
- SLOAS, M. M. *et al.* Cephalosporin treatment failure in penicillin and cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* meningitis. **Pediatr Infect Dis**, v. 11, p. 662-666, 1992.
- SMITH, A. M.; KLUGMAN, K. P. Three predominant clones identified within penicillin-resistant South African isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Microb Drug Resist**, v. 3, p. 385-389, 1997.
- SOGSTAD, M. K. R. *et al.* Molecular Characterization of non-penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Norway. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 3225-3230, 2006.
- SOUZA, N. G. *et al.* Properties of novel international drug-resistant pneumococcal clones identified in day-care centers of Lisbon, Portugal. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 4696-4703, 2005.
- de SOUZA MARQUES, H. H. *et al.* Relatively penicillin-resistant pneumococcal meningitis in a Brazilian infant. **Pediatr Infect Dis J**, v. 7, p. 433-434, 1988.
- STEIN, K. E. Thymus-Independent and Thymus-Dependent Responses to Polysaccharide Antigens. **J Infect Dis**, v. 165, p. S59-S52, 1992.
- SYROGIANNOPOULOS, G. A. *et al.* Resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* from carriers attending day-care centers in southwestern Greece. **Clin Infect Dis**, v. 25, p. 188-194, 1997.
- SYROGIANNOPOULOS, G. A. *et al.* Mediterranean clone of penicillin-susceptible, multidrug-resistant serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* in Greece, Italy and Israel. **Int J Antimicrob Agents**, v. 16, p. 219-224, 2000.
- TAMAYO, M. *et al.* Dissemination of a chloramphenicol- and tetracycline-resistant but penicillin-susceptible invasive clone of serotype 5 *Streptococcus pneumoniae* in Colombia. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 2337-2342, 1999.
- TAN, T. Q. Serious and invasive pediatric pneumococcal disease: epidemiology and vaccine impact in the USA. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, p. 117-125, 2010. Review.
- TECHSAENSIRI, 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, p. 294-300, 2010.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v.33, p. 2233-2239, 1995.

TOMASZ, A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Clin Infect Dis**, v. 24, p. S85-S88, 1997.

XIAO, Y. H. et al. Epidemiology and characteristics of antimicrobial resistance in China. **Drug Resist Updat**, v. 14, p. 236-250, 2011.

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. 649-655, 2008.

YOSHIOKA, C. R. et al. Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. **J Pediatr (Rio J)**, v. 87, p. 70-75, 2011.

WOLF, B. et al. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children with community-acquired pneumonia and children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 46, p. 757-765, 2000.

World Health Organization - WHO. Pneumococcal conjugate vaccine for immunization – WHO position paper. **Weekly Epidemiol Rec**, v. 82, p. 93-104, 2007.

ZHANG, JR et al. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. **Cell**, v. 102, p. 827–837, 2000.

ANEXO I: Relação contendo os 43 clones da coleção disponível no PMEN, com a caracterização molecular e perfil de susceptibilidade à penicilina e cefotaxima.

No.	Clone	No. Referência	Sorotipo	MLST (ST)	CIM (µg/ml)		Referências
					PEN	CTX	
1	Spain ^{23F} -1	ATCC 700669	23F	81	1	1,5	Coffey <i>et al.</i> , 1991 McDougal <i>et al.</i> , 1992 Munoz <i>et al.</i> , 1991
2	Spain ^{6B} -2	ATCC 700670	6B	90	0,5	0,75	Munoz <i>et al.</i> , 1992
3	Spain ^{9V} -3	ATCC 700671	9V	156	1,5	0,75	Coffey <i>et al.</i> , 1991 Lêfevre <i>et al.</i> , 1995
4	Tennessee ^{23F} -4	ATCC 51916	23F	37	0,125	32	McDougal <i>et al.</i> , 1995 Sloas <i>et al.</i> , 1992
5	Spain ¹⁴ -5	ATCC 700902	14	18	1,5	1	Coffey <i>et al.</i> , 1996
6	Hungary ^{19A} -6	ATCC 700673	19A	268	1	0,75	Munoz <i>et al.</i> , 1992 Marton <i>et al.</i> , 1991
7	S.Africa ^{19A} -7	ATCC 700674	19A	75	0,19	0,094	Smith; Klugman, 1997
8	S.Africa ^{6B} -8	ATCC 700675	6B	185	0,19	0,125	Smith; Klugman, 1997
9	England ¹⁴ -9	ATCC 700676	14	9	0,016	0,016	Hall <i>et al.</i> , 1996
10	CSR ¹⁴ -10	ATCC 700677	14	20	8	1	Figueiredo <i>et al.</i> , 1995 Jabes <i>et al.</i> , 1989
11	CSR ^{19A} -11	ATCC 700678	19A	175	6	0,5	Fegueiredo <i>et al.</i> , 1995 Jabes <i>et al.</i> , 1989
12	Finland ^{6B} -12	ATCC 700903	6B	270	4	0,75	Sibold <i>et al.</i> , 1992
13	S.Africa ^{19A} -13	ATCC 700904	19A	41	1,5	0,5	Smith; Klugman, 1997
14	Taiwan ^{19F} -14	ATCC 700905	19F	236	2	0,75	Shi <i>et al.</i> , 1998
15	Taiwan ^{23F} -15	ATCC 700906	23F	242	0,75	0,75	Shi <i>et al.</i> , 1998
16	Poland ^{23F} -16	ATCC BAA-343	23F	173	8	4	Overweg <i>et al.</i> , 1999
17	Maryland ^{6B} -17	ATCC BAA-342	6B	384	1,5	1	Gherardi <i>et al.</i> , 2000
18	Tennessee ¹⁴ -18	ATCC BAA-340	14	67	4	12	Gherardi <i>et al.</i> , 2000
19	Colombia ⁵ -19	ATCC BAA-341	5	289	0,003	0,016	Tamayo <i>et al.</i> , 1999
20	Poland ^{6B} -20	ATCC BAA-612	6B	315	0,064	0,032	Overweg <i>et al.</i> , 1999
21	Portugal ^{19F} -21	ATCC BAA-657	19F	177	0,032	0,032	Sa-Leão <i>et al.</i> , 2000
22	Greece ^{6B} -22	ATCC BAA-658	6B	273	0,023	0,047	Syrogianopoulos <i>et al.</i> , 2000
23	N.Carolina ^{6A} -23	ATCC BAA-659	6A	376	1	0,75	Richter <i>et al.</i> , 2002
24	Utah ^{35B} -24	ATCC BAA-660	35B	377	1	0,75	Richter <i>et al.</i> , 2002
25	Sweden ^{15A} -25	ATCC BAA-661	15A	63	0,064	0,047	Sa-Leão <i>et al.</i> , 2000

26	Colombia ^{23F} -26	ATCC BAA-662	23F	338	0,064	0,094	Sa-Leão <i>et al.</i> , 2000
27	Sweden ¹ -27	PJ351/1	1	217	0,006	0,016	Porat <i>et al.</i> , 2002 Brueggemann; Spratt, 2003
28	Sweden ¹ -28	PJ755/1	1	306	0,006	0,016	Brueggemann; Spratt, 2003 Henriques <i>et al.</i> , 2001
29	USA ¹ -29	NCTC7465	1	615	0,012	0,016	Brueggemann; Spratt, 2003
30	Greece ²¹ -30	JJ273-21	21	193	0,016	0,094	Syrogianopoulos <i>et al.</i> , 1997 Bogaert <i>et al.</i> , 2000
31	Netherlands ³ -31	M264-3	3	180	0,023	0,023	Enright; Spratt, 1998
32	Denmark ¹⁴ -32	PN528	14	230	1	0,75	Pantosti <i>et al.</i> , 2002
33	Netherlands ⁸ -33	M270-8	8	53	0,016	0,023	Enright; Spratt, 1998
34	Denmark ^{12F} -34	M293-12F	12F	218	0,016	0,016	Enright; Spratt, 1998
35	Netherlands ¹⁴ -35	M269-14	14	124	0,016	0,023	Enright; Spratt, 1998
36	Netherlands ^{18C} -36	M241-18C	18C	113	0,023	0,023	Enright; Spratt, 1998
37	Netherlands ^{15B} -37	M254-15B	15B	199	0,012	0,023	Enright; Spratt, 1998
38	Sweden ⁴ -38	M5-4	4	205	0,012	0,016	Enright; Spratt, 1998
39	Netherlands ^{7F} -39	M248-7F	7F	193	0,012	0,016	Enright; Spratt, 1998
40	Sweden ¹ -40	PJ537-1	1	304	0,012	0,012	Brandileone <i>et al.</i> , 1998
41	Portugal ^{6A} -41	DCC501	6A	327	0,012	0,023	Souza <i>et al.</i> , 2005
42	Norway ^{NT} -42	1141/96	NT	344	0,094	0,125	Souza <i>et al.</i> , 2005
43	USA ^{NT} -43	SP165	NT	448	0,094	0,094	Martin <i>et al.</i> , 2003

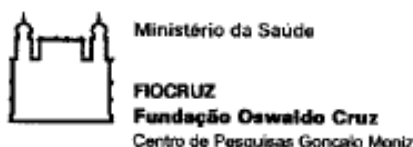
PEN – penicilina; CTX – cefotaxima; ST – *sequence typing*; CSR - The Czechoslovakian Republic.

ANEXO II: Lista de *primers* utilizados na reação de Multiplex-PCR, para sorotipagem capsular do *S. pneumoniae*, disponibilizada pelo CDC.

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		

Sorotipo/sorogrupo	Sequência (5'-3')	Gene	Tamanho do produto
17F-f	TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG	<i>wciP</i>	693
17F-r	GAT GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC		
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		
<i>cpsA</i> -f	GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC	<i>wzg</i>	160
<i>cpsA</i> -r	GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC		

Anexo III – Folha de Aprovação do Comitê de Ética - Fiocruz



Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ

Salvador, 08 de abril de 2009.

Ofício nº 006/2009

Para: Dr^a Joice Neves Reis Pedreira
Pesquisadora Responsável pelo Protocolo de Pesquisa CEP/CPqGM Nº 164
Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), com base na Resolução 196/96, atesta que o protocolo de pesquisa nº 164, intitulado "**Transmissão de *Streptococcus pneumoniae* resistente aos antimicrobianos no Brasil**" foi aprovado em 25/02/2005 e está licenciado e válido 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.

Atenciosamente,

Dr^a Maria Fernanda Rios Grassi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ
(IORG00002090 / IRB000026120)
Salvador – Bahia - Brasil