



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia



FIOCRUZ

Dissertação de Mestrado

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Streptococcus pneumoniae* RESISTENTE À PENICILINA EM SALVADOR - BA

JOICE NEVES REIS

Salvador - Bahia

1998



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

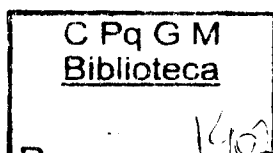
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Streptococcus pneumoniae* RESISTENTE À PENICILINA EM SALVADOR - BA

JOICE NEVES REIS

**PROFESSORES ORIENTADORES:
MITERMAYER G. REIS
ALBERT I. KO**

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de Mestre em Patologia, área de
concentração em Patologia Experimental



Salvador - Bahia
1998

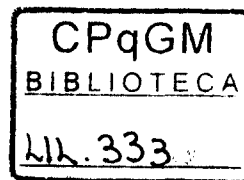
Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ -
Salvador - Bahia.

Reis, Joice Neves
R375e Epidemiologia molecular de *Streptococcus pneumoniae* resistente à
penicilina em Salvador - Bahia / Joice Neves Reis. - Salvador: Faculdade
de Medicina da UFBA / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 1998.
104p. : il.

Dissertação (Mestrado em Patologia)- Universidade Federal da Bahia /
CPqGM, 1998.

1. Streptococcus pneumoniae. 2. Resistência à penicilina. 3. Meningite
pneumocócica. 4. Bahia. I. Título.

CDU 616.981.21:577.182.22(813.8)



FOLHA DE APROVAÇÃO

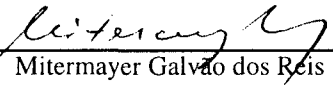
COMISSÃO EXAMINADORA



Lucia Martins Teixeira
Prof. Adjunto - UFRJ



Edson Duarte Moreira Jr.
Pesquisador Adjunto CPqGM



Mitermayer Galvão dos Reis
Prof. Adjunto
Faculdade de Medicina - UFBA

- pessimista se queixa do vento.
- otimista espera que ele mude.
- realista ajusta as velas.”

William George Ward (1812-1882)

Ao meu querido esposo, pelas muitas horas de colaboração, compreensão, e amor.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a Deus por permitir-me esta experiência, com a qual foi possível enriquecer meu espírito com várias formas de saber.

Desejo expressar o reconhecimento à todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho:

- Aos orientadores Dr. Mitermayer Reis e Albert Ko pela constante, solícita e firme orientação.
- Às professoras Hygia Guerreiro e Tânia Barros, exemplos de profissionalismo, orientadoras desde os primeiros passos na minha vida profissional, com amizade e carinho recebam meu especial agradecimento.
- Aos estudantes Adriano Queiroz , Edilane Gouveia e Sorala Machado Cordeiro que participaram desse trabalho com incansável dedicação.
- Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, que vivenciaram e compartilharam os momentos difíceis e vitoriosos.
- Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. Manoel Barral-Neto, pelo excelente trabalho que vem desenvolvendo.
- Aos professores e colegas do curso de mestrado, pela agradável vivência e amizade.
- Ao Prof. Dr. José Tavares-Neto pela ampla revisão dedicada a este trabalho.
- Ao corpo clínico do HC Maia, em especial à Dra. Cibele Dourado, coordenadora de Ensino e Pesquisa.
- À Kátia Salgado, chefe do Laboratório de Análises Clínicas do HC Maia pelo fornecimento das amostras bacterianas.
- Ao Dr. Warren Johnson Jr, Chefe da Divisão Internacional de Doenças Infecciosas da Universidade de Cornell, New York; e Dr. Lee Riley prof. da Escola de Saúde Pública da Universidade da Califórnia, Berkeley, pela disponibilidade de recursos que contribuíram para a realização deste trabalho.
- A Prof. Dra. Lúcia Martins Teixeira, Chefe do Laboratório de Apoio Biotecnológico do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo apoio e colaboração no desenvolvimento do método de eletroforese de campo pulsado.
- As amigas Maria da Glória Carvalho e Norma Santos pela amizade e apoio.
- As bibliotecárias do CPqGM, em especial, Ana Maria Fiscina pelo apoio na organização e consulta bibliográfica.
- A Rosália Oliveira da Silva, secretária do Curso de Pós-Graduação pela sua simpatia amizade e incansável colaboração.
- Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, Hospital Couto Maia e Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia pela disponibilidade de equipamentos, espaço físico, pessoal e recursos que possibilitaram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ANEXOS.....	4
RESUMO	5
SUMMARY	6
1 <u>INTRODUÇÃO</u>	7
1.1 IMPACTO DAS DOENÇAS PNEUMOCÓCICAS	7
1.2 PATOGENIA E COLONIZAÇÃO.....	8
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA	9
1.3.1 Cápsula Polissacarídica.....	9
1.3.2 Outros Fatores de virulência.....	11
1.4 HISTÓRIA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	12
1.5 EMERGÊNCIA GLOBAL DE RESISTÊNCIA À PENICILINA POR <i>S. pneumoniae</i>	14
1.6 EMERGÊNCIA DE <i>S. pneumoniae</i> RESISTENTES À PENICILINA NO BRASIL.....	15
1.7 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À PENICILINA.....	16
1.8 APLICAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DE <i>S. pneumoniae</i> RESISTENTES À PENICILINA.....	18
2 <u>OBJETIVOS</u>	22
2.1 GERAL	22
2.2 ESPECÍFICOS	22
3 <u>JUSTIFICATIVAS E RELEVÂNCIA</u>	23
4 <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	25
4.1 DESENHO DO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO	25
4.1.1 Local.....	25

4.1.2	População Estudada.....	25
4.1.2.1	<u>Critérios de Inclusão</u>	25
4.1.2.2	<u>Seleção dos Pacientes</u>	26
4.1.3	Coleta de Dados Epidemiológicos.....	26
4.1.4	Isolamento de <i>S.pneumoniae</i> de Líquor e sangue dos pacientes.....	27
4.1.5	Isolamento de <i>S. pneumoniae</i> dos contactantes.....	27
4.1.6	Identificação das Amostras.....	28
4.1.7	Estoque das Amostras.....	29
4.2	TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	29
4.2.1	Teste de difusão em ágar.....	29
4.2.2	E - Teste.....	30
4.2.3	Teste de microdiluição em caldo.....	31
4.2.4	Definição de caso.....	33
4.3	SOROTIPAGEM	34
4.4	ESTUDOS MOLECULARES	34
4.4.1	Reação de pmerase em cadeia (PCR).....	35
4.4.1.1	<u>Primer</u>	35
4.4.1.2	<u>Cepas</u>	35
4.4.1.3	<u>Extração de DNA</u>	36
4.4.1.4	<u>Preparo do Tampão</u>	36
4.4.1.5	<u>Eletroforese</u>	37
4.4.1.6	<u>Análise dos produtos amplificados e determinação dos padrões genéticos</u>	37
4.4.2	Eletroforese de Campo pulsado (PFGE).....	38
4.4.2.1	<u>Preparo dos blocos</u>	38

4.4.2.2	<u>Lavagem dos blocos</u>	38
4.4.2.3	<u>Tratamento enzimático</u>	39
4.4.2.4	<u>Condições de eletroforese</u>	39
4.4.2.5	<u>Análise e interpretação</u>	40
4.5	ANÁLISE DE DADOS.....	40
5	<u>RESULTADOS</u>	42
5.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES COM MENINGITE PNEUMOCÓCICA	42
5.2	PERFIL DE SENSIBILIDADE DAS AMOSTRAS AOS ANTIMICROBIANOS	46
5.2.1	Testes de difusão em agar.....	46
5.2.2	E - Teste.....	48
5.2.3	Microdiluição em caldo.....	49
5.3	TIPAGEM SOROLÓGICA	52
5.4	TIPAGEM MOLECULAR	55
5.4.1	PCR BOX A fingerprint.....	55
5.4.1.1	<u>Amostras isoladas de pacientes com meningite pneumocócica</u>	55
5.4.1.2	<u>Amostras isoladas dos contactantes domiciliares de pacientes com meningite pneumocócica</u>	63
5.4.2	Eletroforese de campo pulsado.....	65
6	<u>DISCUSSÃO</u>	67
7	<u>CONCLUSÕES</u>	77
8	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	78
9	<u>ANEXOS</u>	88

LISTA DE ANEXOS

Anexo I - TERMO DE CONSENTIMENTO.....	88
Anexo II - QUESTIONÁRIO DO ESTUDO DE MENINGITE PNEUMOCÓCIA NO HOSPITAL COUTO MAIA.....	90
Anexo III - FICHA DE DADOS DAS AMOSTRAS DE <i>S. pneumoniae</i>	96
Anexo IV - LAUDO DE RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE.....	98
Anexo V - LAUDO DE RESULTADO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	99
Anexo VI - CLASSIFICAÇÃO DOS <i>Streptococcus pneumoniae</i> DE ACORDO COM OS TIPOS SOROLÓGICOS.....	100
Anexo VII – CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SENSIBILIDADE (TESTE DE DIFUSÃO) PARA <i>S. pneumoniae</i>	101
Anexo VIII – CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SENSIBILIDADE PARA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA <i>S. pneumoniae</i>	102
Anexo IX – DIÂMETROS ACEITÁVEIS NO CONTROLE DE QUALIDADE PARA TESTE DE DIFUSÃO DE DISCO COM <i>S. pneumoniae</i>	103
Anexo X – VALORES ACEITÁVEIS PARA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA NO TESTE DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE CIM PARA <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	104

RESUMO

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Streptococcus pneumoniae* RESISTENTE À PENICILINA EM SALVADOR - BAHIA. [INTRODUÇÃO] A resistência à penicilina por *Streptococcus pneumoniae* é um problema mundial mais recentemente descrito no Brasil. Em Salvador - BA não existem dados sobre resistência à penicilina nas infecções pneumocócicas. [OBJETIVOS] Este trabalho tem como objetivo determinar a prevalência de resistência à penicilina em casos de meningite pneumocócica e caracterizá-la através de estudos epidemiológicos e de tipagens moleculares. [MATERIAL E MÉTODOS] A população do estudo foi formada por pacientes, do Hospital Couto Maia, que tiveram cultura de líquor positiva para *S. pneumoniae*. As amostras foram submetidas a testes de susceptibilidade a antimicrobianos, sendo definidas como sensíveis à penicilina quando a concentração inibitória mínima (CIM) foi $< 0,12 \mu\text{g/ml}$, nível intermediário de resistência ou não susceptível CIM entre $0,12 - 1,0 \mu\text{g/ml}$, e alto nível de resistência para CIM $>2,0 \mu\text{g/ml}$. Foram realizadas ainda caracterização fenotípica por sorotipagem e caracterização genotípica por Reação de Polimerase em Cadeia - PCR BOX A *fingerprinting* eletroforese de campo pulsado. [RESULTADOS] Durante o período de 12/95 a 10/97 foram incluídos neste estudo 150 pacientes com meningite pneumocócica, uma incidência anual de 1,6 casos por 100.000 habitantes em Salvador. A meningite pneumocócica ocorreu em todas as faixas etárias, embora tenha sido mais freqüente em crianças menores de dois anos de idade com 42% dos casos. A prevalência amostras causadoras de meningite pneumocócica não-susceptível à penicilina foi de 16,1% (24/149). Todas as amostras foram sensíveis a cefotaxima. Os casos de meningite com amostras não-susceptíveis à penicilina foram causados por sorogrupos presentes na vacina pneumocócica 23-valent: 6(6), 14(14), 19(2), 23(2). A genotipagem destas amostras demonstrou 95 padrões genéticos dentre as 149 amostras analisadas, sendo 14 idênticos e 81 não idênticos. A técnica de eletroforese de campo pulsado foi aplicada para as amostras de sorotipo 14. Este método permitiu identificar seis diferentes padrões, sendo um padrão para as amostras não-susceptíveis (14), e cinco padrões para as amostras susceptíveis (6) à penicilina. [CONCLUSÕES] A resistência à penicilina em Salvador está relacionada à presença de quatro padrões genéticos de *S. pneumoniae* na comunidade, sendo dois padrões do sorotipo 14, um do sorotipo 6B e um do sorotipo 23F. A predominância de clones nos casos de meningite pneumocócica em Salvador - BA sugere que eventos de mutação de ponto e conseqüente seleção natural são os prováveis mecanismos envolvidos na emergência de resistência à penicilina em nossa comunidade. Embora estejam incluídos na vacina 23-valent os principais sorogrupos responsáveis pelos casos de meningite detectados em Salvador, esta vacina não representa uma medida de prevenção adequada devido a sua ineficácia na faixa etária menor que 2 anos de idade. Outras alternativas como a vacinação pré-natal ou o uso de vacinas conjugadas a proteínas devem ser melhor analisadas para prevenção de meningite pneumocócica em nossa população.

SUMMARY

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *Streptococcus pneumoniae* RESISTANT TO PENICILLIN IN SALVADOR - BAHIA. [INTRODUCTION] *Streptococcus pneumoniae* penicillin resistance is a world problem that now involves Brazil. In Salvador - BA there is no available data on penicillin resistance in pneumococcal infections. [OBJECTIVES] The objective of this work was to determine the prevalence of penicillin resistance in cases of pneumococcal meningitis as well as characterize it through epidemiological and molecular typing studies. [MATERIAL AND METHODS] Patients from Couto Maia Hospital, the reference hospital for infectious disease in Bahia, with cerebrospinal fluid positive culture for *S. pneumoniae* constituted the study population. The strains were submitted to antimicrobial susceptibility tests, and were defined as sensitive to penicillin when MICs were $< 0.12 \mu\text{g/ml}$, relatively resistant or non susceptible when MICs were between $0.12 - 1.0 \mu\text{g/ml}$, and high resistance level when MICs were $> 2.0 \mu\text{g/ml}$. Phenotypical characterization was made by serotyping and genotypical by Polymerase Chain Reaction - PCR BOX A fingerprinting and Pulse Field Gel Electrophoresis. [RESULTS] From December 1995 to October 1997, 150 patients with pneumococcal meningitis were included in the study, representing an annual incidence of 1.6 cases for 100.000 inhabitants in Salvador. Pneumococcal meningitis occurred in all age groups, although it was more frequent in children less than two years old representing 44% of the cases. 16.1% (24/149) of the patients had non susceptible strains to penicillin and all samples were susceptible to cefotaxime. The non susceptible cases were from serogroups present in the 23-valent pneumococcal vaccine: 6 (6), 14 (14), 19 (2), 23 (2). The genotyping of these samples showed 95 fingerprintings among 149 samples analyzed, 14 of them were identical and 81 not identical. Pulse Field Gel Electrophoresis was performed to strain-type isolates of serotype 14. PFGE analysis identified six distinct pattern: all non-susceptible isolates shared a single pattern, whereas among six susceptible isolates, five distinct patterns were observed. [CONCLUSIONS] The resistance to penicillin in Salvador is related to the presence of four genotypes of *S. pneumoniae* in the community, two genotypes belonging to serotype 14, one to serotype 6B and one to serotype 23F. The predominance of clones in cases of pneumococcal meningitis in Salvador - BA suggests that events of point mutation and consequent natural selection are the probable mechanisms involved in the emergency of resistance to penicillin in our community. Although the main responsible serogroups for meningitis cases are included in the 23-valent vaccine, this vaccine doesn't represent a measure of appropriate prevention due to its inefficacy in the age group younger than 2 years of age. Other alternatives as the prenatal vaccination or the use of vaccines conjugated to proteins should be better analyzed for the prevention of pneumococcal meningitis in our population.

1 INTRODUÇÃO

Os *Streptococcus pneumoniae* são cocos Gram positivos, encapsulados ou não, conhecidos como diplococos por se encontrarem aos pares, possuem uma forma lanceolada, comparada a chama de vela, morfologia esta que ajuda na sua identificação preliminar. Os pneumococos foram isolados pela primeira vez em 1881 da saliva de uma pessoa saudável, por Pasteur, na França (*apud* Willett, 1992). Posteriormente foram reconhecidos como patógenos humanos, primariamente como o principal agente de pneumonia lobar, a qual foi referida como “Captain of the Men of Death” por Willian Osier (*apud* Austrian, 1994).

1.1 IMPACTO DAS DOENÇAS PNEUMOCÓCICAS

As infecções por *S. pneumoniae* são uma importante causa de morbidade e mortalidade no mundo, sendo este microrganismo considerado como o agente mais comum da pneumonia adquirida na comunidade, o terceiro entre os casos de meningite bacteriana, assim como o principal patógeno na etiologia de otite média (Alien, 1991). Somente nos Estados Unidos é estimado que os pneumococos causem anualmente mais de 500.000 casos de pneumonia, 55 mil casos de bacteremia, 6 mil casos de meningite e mais de seis milhões de casos de otite média, os quais resultam em mais de 40 mil mortes (Kronenberger e cols., 1996). Na era pré-antibiótica a mortalidade associada a infecções pneumocócicas era maior que 50% para pneumonia e 80% para meningite (Tomasz, 1997).

Existe indicações de que as pneumonias ocorrem em todas as faixas etárias, embora a sua incidência aumente em indivíduos com idade superior a 40 anos (Reichier e cols., 1992), enquanto a meningite pneumocócica ocorre,

particularmente, em crianças menores de dois anos de idade, decorrendo muitas vezes de infecção do ouvido médio (Poole, 1995).

Na atualidade, a meningite tem uma taxa de mortalidade de 19 a 26% e pode apresentar seqüelas neurológicas em 50% dos sobreviventes (Caputo e cols., 1993; Greene & Demasi, 1995). Outras infecções pneumocócicas, sistêmicas ou localizadas, como pneumonia, sepse, sinusite e endocardite também podem evoluir para um quadro de meningite apesar do foco principal ser as vias aéreas superiores (Caputo e cols., 1993).

1.2 PATOGENIA E COLONIZAÇÃO

A colonização da nasofaringe por *S. pneumoniae* é a principal porta de entrada das infecções pneumocócicas. É reconhecido que 40% dos indivíduos saudáveis possuem a nasofaringe colonizada por pneumococos, constituindo no principal foco de infecções, podendo adquirir a doença a partir deste foco através de contatos pessoa a pessoa por aerossóis (Cundell e cols., 1995). Evidências dos estudos mostram que a colonização da nasofaringe por *S. pneumoniae* em crianças ocorre logo no início da vida com idade de quatro dias a 18 meses, particularmente com os sorogrupos 6, 19, 23 e 14, em ordem de freqüência, os quais representam 65% das amostras isoladas de crianças menores de três anos de idade (Gray e cols., 1980) . Reaquisição e persistência de colonização ocorre em 30% das crianças (Gray e cols., 1980).

Normalmente a mucosa é resistente à invasão por *S. pneumoniae* funcionando como uma barreira, entretanto se há alguma lesão de mucosa por uma infecção viral ou agentes físicos e químicos, suas funções são alteradas e a invasão

bacteriana pode ocorrer. A ocorrência de infecções e sua gravidade dependem de fatores relacionados à patogenicidade e virulência da cepa, as quais são definidos por particularidades da cápsula e das condições do hospedeiro. Com relação ao hospedeiro deve-se considerar algumas condições especiais que o predispõem as infecções pneumocócicas, como: extremos de idade, síndrome de imunodeficiência adquirida; hipogamaglobulinemia; alcoolismo; má-nutrição; doenças crônicas do fígado; insuficiência renal; esplenectomia; diabetes; linfomas; mieloma múltiplo e, principalmente, anemia falciforme (Cundell e cols., 1995; Caputo e cols., 1993; Musher, 1992).

Embora os fatores descritos acima aumentem a susceptibilidade à infecção pneumocócica, estudos comprovam que esta está relacionada com a falta de resposta imunológica do hospedeiro, que não é capaz de produzir anticorpos funcionais contra o polissacarídeo capsular da cepa colonizadora (Musher, 1992).

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

1.3.1 Cápsula Polissacarídica

A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência dos pneumococos, composta de um polímero de polissacarídeo - açúcares neutros, aminos e álcoois (Salyers & Whitt, 1994) os quais formam um gel hidrofílico sobre a superfície do microrganismo protegendo-o contra a resposta natural do sistema imune, ou seja, evitando a opsonização mediada por complemento e/ou a interação do complemento com receptores dos macrófagos (Watson e cols., 1995). Portanto a cápsula impede ou retarda a fagocitose de células encapsuladas por macrófagos (Cundell e cols., 1995). Diferentes tipos de cápsulas diferem na virulência. Um exemplo típico é a diferença entre o sorotipo 3, um dos mais virulentos, e sorotipo 37, o qual é

avirulento (Salyers & Whitt, 1994). Em virtude disto o sorotipo 3 é um dos mais associados com infecções invasivas.

Existem hipóteses de que os mecanismos moleculares de patogenicidade do *S. pneumoniae* ocorrem por transformação capsular, ou seja, por transferência horizontal de genes; o que promove a geração de novas cepas e expressão de diferentes combinações de fatores de virulência (Dillard e cols., 1995). O modelo mais provável para explicar os fenômenos de transferência de genes tipo-específicos em pneumococos são os arranjos dos genes em *cassettes* (Hall & Collis, 1995), elementos móveis que podem ser transferidos de uma bactéria para outra em eventos de transformação genética, levando a formação de um novo tipo sorológico com perda da habilidade de expressar o polissacarídeo original (Dillard e cols., 1995).

Este modelo poderia explicar a diversidade genética dos pneumococos e conseqüentemente a existência dos atuais 90 sorotipos capsulares classificados com base nas diferenças de estrutura e antigenicidade de seus polissacarídeos em sorotipos. Alguns sorotipos formam sorogrupos, e os tipos recebem o mesmo número mas letras maiúsculas diferentes - **Anexo 6** (Henrichsen, 1995).

Alguns sorotipos são particularmente associados com infecções invasivas; como por exemplo os sorotipos: 14, 6A, 6B, 3, 23B, 23F e 19F. Estes tipos são os mais freqüentemente isolados de crianças com infecções graves (Hall & Collis, 1995).

Os sorotipos 14, 6A, 6B, 18C, 19F, 23F, 9V, 3, 4, 7F, 8, 19A e 1, estão freqüentemente envolvidos na maioria das infecções pneumocócicas, variando apenas a ordem de freqüência de um país para outro (Watson e cols., 1995). Na Espanha, um estudo que realizou a sorotipagem de 679 amostras clínicas de

pneumococos demonstrou que 66,5% destas amostras pertenciam aos sorogrupos 3, 9, 1, 5, 6, 23, 4, 8 e 19 (Linares e cols., 1992). Nos Estados Unidos da América, 78% das amostras clínicas estavam representadas por sete sorotipos: 14, 6B, 19F, 18C, 23F, 4 e 9V (Butler e cols., 1996). No Brasil, os resultados de tipagem de cepas de pneumococos provenientes de inquéritos nacionais principalmente com amostras dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo demonstraram que os sorotipos de maior frequência foram: 14 (10,4%), 6B (9,8%), 23F (8,0%), 5 (7,3%), 19F (6,9%), 6A (6,0%), 1 (4,6%), e 4 (4,6%) (Sessegolo e cols., 1994; Brandileone e cols., 1995). Estas diferenças de prevalência revelam a importância dos inquéritos epidemiológicos para se determinar a frequência dos sorotipos de pneumococos nas infecções em cada região do país, possibilitando assim a adoção de medidas preventivas adequadas a cada localidade.

1.3.2 Outros Fatores de Virulência

Além da cápsula, existem outros fatores de virulência dos pneumococos como a protease de imunoglobulina da subclasse A1 (IgA1) que promove a aderência e invasão dos pneumococos na mucosa do trato respiratório, em decorrência da lesão das células epiteliais ciliadas e conseqüente perda da atividade ciliar (Cundell e cols., 1995); a pneumolisina e a neuraminidase (Lock e cols., 1988), ainda não têm papel definido na patogênese das infecções causadas por esses microrganismos.

A pneumolisina, e provavelmente a neuraminidase, estão localizadas no citoplasma das células de pneumococos, sendo liberadas quando a mesma sofre lise (Willett, 1992). A susceptibilidade das células à pneumolisina é relacionada à ligação entre o colesterol presente em suas membranas e esta toxina (Willett, 1992). Essa enzima, além de interferir com os mecanismos inespecíficos de defesa,

inibindo o movimento ciliar do epitélio do trato respiratório, é responsável pela ativação da via clássica do complemento interagindo com o sistema imune humoral e celular (Lock e cols., 1988). Parecendo ser esta interação importante na patogênese da doença pneumocócica.

O mecanismo de ação da neuraminidase é baseado na capacidade desta enzima em causar danos à célula hospedeira, pela clivagem de resíduos de ácido siálico de glicoproteínas, glicolípídeos e oligossacarídeos presentes nas membranas das mesmas (Salyers & Whitt, 1994).

1.4 HISTÓRIA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Com a introdução da penicilina na terapêutica em, 1940, as taxas de letalidade das infecções pneumocócicas foram reduzidas significativamente, de mais que 50% na época pré-antibiótica para menos de 10% (Austrian, 1994). Embora a resistência à penicilina *in vitro* com cepas de laboratório tenha sido descrita em 1943 por Schmidt & Sesler (*apud* Austrian, 1994), durante um longo período, os pneumococos na comunidade foram considerados como naturalmente sensíveis à penicilina. Entretanto, em 1967 na Austrália, Hansman & Bullen descreveram o isolamento clínico da primeira cepa de pneumococos com reduzida sensibilidade à penicilina. Em 1977, amostras de pneumococos efetivamente resistentes à penicilina foram isolados de pacientes em Durban na África do Sul (*apud* Appelbaum, 1992). Desde então, os relatos de casos clínicos de pneumococos resistentes à penicilina têm ocorrido em todos os continentes (Austrian, 1994). Inicialmente, estes relatos se referiam a casos não-sensíveis à penicilina ou seja apresentavam uma concentração inibitória mínima (CIM) de 0,1 – 1,0 µg/ml. Porém, nos últimos 30 anos, esta CIM tem aumentado significativamente chegando a níveis de 8 µg/ml (Appelbaum, 1992).

Por causa deste aumento de resistência à penicilina por pneumococos, tornou-se necessário estabelecer limites para definir cepas sensíveis e resistentes. As cepas que são inibidas por concentrações de penicilina inferior a 0,12 µg/ml em condições de cultivo padronizadas são classificadas como sensíveis, aquelas inibidas por concentrações entre 0,12 - 1,0 µg/ml são classificadas como não-sensíveis ou relativamente resistentes, aquelas inibidas por concentração igual ou maior que 2,0 µg/ml são resistentes ou plenamente resistentes à penicilina (NCCLS, 1994).

A resistência à penicilina por pneumococos é investigada através de testes de triagem utilizando o método de difusão com discos de oxacilina (1 µg) conforme as normas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, dos Estados Unidos da América (NCCLS, 1994). Entretanto, estudos indicam que a triagem com oxacilina é altamente sensível mas não 100% específica para determinar resistência à penicilina (Swenson e cols., 1986). Este método não distingue entre resistência à penicilina (CIM > 2 µg/ml) e não-susceptível à penicilina (CIM 0,12 - 1,0 µg/ml), distinção esta que é relevante nos casos de meningite pneumocócica. Pois, a terapêutica empírica não tem por base o grau de sensibilidade/resistência dos pneumococos isolados, até porque outras infecções pneumocócicas quando não-susceptíveis à penicilina podem ser tratadas com altas doses, em contraste com a meningite pneumocócica que tem relatos de falhas na terapia com penicilina quando as cepas são não-susceptíveis à este antimicrobiano (Friedland & Klugman, 1992). Portanto, é determinante que todas as amostras clínicas de líquido e sangue que são resistentes, pela triagem com oxacilina sejam submetidas à um método de quantificação de susceptibilidade.

O método de microdiluição em caldo, com ajustes de cátions e suplementado

com sangue de cavalo, é a referência para determinar a susceptibilidade antimicrobiana (NCCLS, 1994). Entretanto as dificuldades encontradas para seguir este protocolo, levou alguns laboratórios a desenvolver métodos comerciais para quantificar resistência antimicrobiana. Alguns testes como Pasco (DIFCO, Wheatridge, Colorado, USA); "MicroScan rapid panels" (Dade International, West Sacramento, Califórnia, USA); E -teste (AB Biodisk, Piscataway, N. J., USA) foram avaliados em vários estudos (Tenover e cols., 1996; Krisher & Linscott, 1994; Kiska e cols., 1995).

Dos métodos analisados, o E-teste foi o que apresentou melhor concordância com o teste de microdiluição em caldo, além de ser o de mais fácil execução. No entanto, problemas referentes ao não crescimento de algumas amostras de pneumococos na ausência de CO₂, indicam a necessidade de padronizar este método de acordo com o protocolo utilizado para o método do disco (Jorgensen e cols., 1994).

1.5 EMERGÊNCIA GLOBAL DE RESISTÊNCIA À PENICILINA ENTRE OS *S. pneumoniae*.

Os *S. pneumoniae* resistentes à penicilina estão disseminados pelos cinco continentes, atingindo taxas extremamente altas em algumas países ou regiões: 56% em Papua Nova Guiné (Cohen, 1992), 40% na África do Sul (Friedland & Klugman, 1992), 46% na Espanha (Fenoll e cols., 1991), 70% na Hungria (Marton e cols., 1991) e 17,3% Estados Unidos (Butler e cols., 1996). A rapidez com que ocorreu esta disseminação de resistência entre pneumococos pode ser observada na Espanha, onde a freqüência de resistência era de 6% em 1979, e passou para 44% em 1989 (Appelbaum, 1992). Na França a freqüência de pneumococos

resistentes era de 6,6% em 1989 passando a 25% em 1993 (Ferroni e cols., 1996). Muitas destas cepas demonstraram altos níveis de resistência à penicilina (CIM > 2,0 µg/ml) e resistência a múltiplos antibióticos, que é definida como resistência a três ou mais classes de antibióticos, limitando as opções de tratamento (Caputo e cols., 1993).

1.6 EMERGÊNCIA DE *S. pneumoniae* RESISTENTES À PENICILINA NO BRASIL

A emergência de resistência à penicilina entre os pneumococos também atinge o Brasil. Até 1988 não havia relatos de resistência à penicilina no Brasil. Um estudo realizado com 108 amostras de pneumococos isolados de casos de meningite no Rio de Janeiro revelou que todas as amostras foram sensíveis à penicilina (Teixeira e cols., 1988). Naquele mesmo ano houve a descrição do primeiro caso de uma criança com meningite pneumocócica com amostra apresentando moderada resistência à penicilina, uma concentração inibitória mínima de 0,2 µg/ml, no Hospital das Clínicas em São Paulo (Marques e cols., 1988).

Um inquérito realizado por Sessegolo e colaboradores (1994) com 345 amostras de *S. pneumoniae* isolados de pacientes de São Paulo, Ribeirão Preto e Rio de Janeiro entre 1988 e 1992 demonstrou que 17,9% das amostras foram não-susceptíveis à penicilina (CIM 0,1 - 1,0 µg/ml) e duas amostras foram resistentes (CIM 2,0 µg/ml), sendo uma sorotipo 19A, isolada de um paciente de Ribeirão Preto e a outra sorotipo 19F isolada no Rio de Janeiro. Neste mesmo estudo há relato de resistência a outros agentes terapêuticos como a tetraciclina (35,9%), trimetoprim-sulfametoxazole (29,2%) e rifampicina (1,5%). Este inquérito também determinou a prevalência de sorotipos, sendo mais freqüentes os sorotipos: 14 (10,4%); 6B (9,8%); 23F (8,0%); 5(7,3%), 19F(6,9%) e 6A (6,0%).

Em 1993, *S. pneumoniae* foi a segunda mais comum causa de meningite em São Paulo, com 1,5 casos notificados por 100.000 habitantes, e uma taxa de letalidade de 34% (Brandileone e cols., 1995). Relatos sobre pneumococos isolados nesta cidade, indicaram que 24% das amostras clínicas estudadas foram não-sensíveis à penicilina e os sorotipos mais freqüentemente associados a esta resistência foram: 14, 23F, 3, 6B e 19A (Levin e cols., 1996).

Na Bahia, segundo os dados da divisão de vigilância sanitária do Estado, os pneumococos foram a terceira causa de meningite em 1994 e 1996. Em 1994 foram notificados 0,8 casos por 100.000 habitantes com uma letalidade de 37,6%; em 1996 foram notificados 0,9 casos por 100.000 habitantes com uma taxa de letalidade de 52% (Bahia, 1996), taxas maiores do que as de outras formas de meningite como por *Haemophilus influenzae* que foi de 23,13% e por *Neisseria meningitidis* de 23,72%. (Bahia, 1996)

1.7 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À PENICILINA

O mecanismo de resistência à penicilina em pneumococos, não é associado à produção de β -lactamases ou mediada por plasmídios. Mas sim, a uma característica adquirida, associada a alterações cromossomiais nos genes que codificam as proteínas ligadoras de penicilina *penicillin-binding proteins*, PBPs (Zigheiboim & Tomasz, 1980), resultando numa baixa afinidade com o antibiótico. Embora não estejam definidas as funções destas PBPs, elas são provavelmente enzimas essenciais ao último estágio de biosíntese de mureína, um constituinte da parede celular bacteriana (Hakenbeck e cols., 1995). As PBPs interagem com os antibióticos β -lactâmicos formando um composto covalente peptídeo-penicilloil (cephalosporoil) o qual é enzimaticamente inativo. Os antibióticos β -lactâmicos são reconhecidos por PBPs por causa de sua similaridade estrutural com o substrato

muropeptídeo.

O *S. pneumoniae* contém seis diferentes PBPs: **PBPs 1a, 1b, 2x, 2a, 2b e PBP 3**. Estas seis proteínas são distintas e os genes que as codificam estão localizados em diferentes posições do cromossomo dos pneumococos (Hakenbeck e cols., 1995).

A forma como ocorrem estas alterações das PBP e conseqüente redução da afinidade por antibióticos β -lactâmicos não estão bem esclarecidas, mas estudos revelam o provável envolvimento de quatro processos: a) aquisição de PBPs resistentes à penicilina através de eventos de recombinação ilegítima com DNA de outras espécies bacterianas (Coffey e cols., 1991; Dowson e cols., 1989; Laible e cols., 1991); b) transferência horizontal de genes PBP entre pneumococos resistentes e sensíveis à penicilina em eventos de transformação gênica (Laible e cols., 1995; Barnes e cols., 1995); c) aquisição geográfica de *clones* resistentes através da multiplicação e disseminação de um ou mais clones resistentes (Munõz e cols., 1991) e d) provável existência de seqüências de mutações de ponto nos genes PBP que promovem o desenvolvimento de resistência à penicilina em pneumococos (Hakenbeck e cols., 1986).

A contribuição destes mecanismos propostos para resistência à penicilina por *S. pneumoniae* em doenças infecciosas e a transmissão na comunidade precisam ser exploradas. A disseminação geográfica de pneumococos resistentes à penicilina foi descrita em vários estudos. Em Ohio - USA foi identificado um clone resistente à penicilina do sorotipo **23F** o qual foi prevalente na Espanha por mais de uma década (Muñoz e cols., 1991). Um outro trabalho realizado na Islândia com 57 amostras clínicas identificou a presença de um clone do sorotipo **6B** multiresistente originário da Espanha (Soares e cols., 1993).

Estudos realizados com amostras clínicas da África do Sul, Espanha e Alemanha (Hakenbeck e cols., 1991) e amostras clínicas do Nairobi, Kenya (Kell e cols., 1993), demonstraram alta diversidade entre as cepas resistentes à penicilina, sugerindo que mutações de ponto nos genes PBP e provavelmente transformação capsular são eventos importantes na seleção destas cepas. O papel da pressão antibiótica e seleção de cepas resistentes em infecções pneumocócicas permanece desconhecido, mas é uma séria preocupação, porque estes eventos têm sido responsáveis pelo surgimento de resistência em outras espécies bacterianas como: enterococos resistentes à vancomicina (Johnson e cols., 1990) e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (Maple e cols., 1989). A consequência destes eventos para a Saúde Pública é preocupante, porque os antibióticos são de fácil acesso nas farmácias de muitos países, como o Brasil, e são freqüentemente ingeridos sem prescrição médica e com dosagem e duração do tratamento inadequados (Campos e cols., 1985; Bricks & Leone, 1996).

1.8 APLICAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *S. pneumoniae* RESISTENTES À PENICILINA.

Diversos métodos de tipagem genética têm sido aplicados quando ocorrem surtos de infecções, para discriminar as infecções relacionadas a surtos dos casos esporádicos. Estes métodos têm ajudado em estudos epidemiológicos, como por exemplo: nos estudos com *E. coli* 0157:H7, responsável por casos de diarreia e síndrome de uremia-hemolítica (Bender e cols., 1997); infecções por *Mycobacterium tuberculosis*, principalmente, em casos devidos a aglomerações (Niemann e cols., 1997). Estes métodos também são ferramentas úteis na identificação de surtos e aglomeração de casos envolvendo salmonelose (Puohiniemi e cols., 1997), listeriose (Ericsson e cols., 1997) ou infecções estafilocócicas por ingestão de alimentos

contaminados (Kluytmans e cols., 1995).

Em decorrência dos eventos relacionados com a emergência de resistência à penicilina por pneumococos, vários métodos de tipagem genética de cepas têm sido desenvolvidos e padronizados, de forma que tenham poderes discriminatórios em estudos epidemiológicos destas infecções. Vários autores utilizaram uma associação de métodos de tipagem para identificar cepas e determinar ligações epidemiológicas (Munõz e cols., 1993, Soares e cols., 1993; Barnes e cols., 1995).

Serotipagem e polimorfismo eletroforetico de isoenzimas “Multilocus Enzyme Electrophoresis” são métodos fenotípicos utilizados (Sibold e cols., 1992), embora não forneçam informações sobre variações genéticas das cepas e não ajudem na identificação de surtos de infecções.

A variação genética dos pneumococos têm sido documentada por diferentes metodologias como a análise de polimorfismo de grandes fragmentos de DNA, obtidos após digestão com enzimas de restrição e eletroforese de campo pulsado - *Pulse-Field Gel Electrophoresis* (Lefevre e cols., 1993; Tenover e cols., 1995); análise do polimorfismo dos pequenos fragmentos de DNA obtidos após digestão com enzimas de restrição – RFLP e reação de polimerase em cadeia (PCR *fingerprinting*) usando um *primer* correspondente a seqüências intergências repetitivas presentes em enterobactérias (Versalovic e cols., 1991); e técnicas de DNA *fingerprinting* usando RNA 16s ou elementos repetitivos denominados BOX como sondas de DNA (McDougal e cols., 1992; Martin e cols., 1992). Todos estes testes têm poderes discriminatórios distintos com respeito à determinação de similaridade genética, mas não foram validados em estudos populacionais e exigem equipamentos sofisticados e complexos para sua aplicação. No momento, ainda é necessário um método simples que seja capaz de determinar surtos e que seja

validado em estudos epidemiológicos.

O PCR *fingerprinting* faz uso de *primers* complementares para seqüências de DNA repetitivas, altamente conservadas e que ocorrem naturalmente, em genomas de bactérias Gram negativas e algumas Gram positivas (Versalovic e cols., 1991). Três famílias de seqüências repetitivas foram identificadas; a seqüência REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) com 35 a 40 pares de bases; seqüência ERIC (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*) com 124 a 127 pares de bases; os elementos BOX com 154 pares de bases (Martin e cols., 1992). Estas seqüências parecem ser localizadas em posições intergênicas distintas no genoma e podem estar presentes em ambas as direções (Versalovic e cols., 1994).

Os elementos BOX são modulares, constituídos de subunidades diferencialmente conservadas e representam a primeira classe de elementos repetitivos de organismos Gram positivos, principalmente *S. pneumoniae* (Martin e cols., 1992). Três diferentes subunidades foram originalmente definidas como elementos BOX, chamado BOX **A** (57 pb), BOX **B** (43 pb) e BOX **C** (50 pb) (Martin e cols., 1992). Sondas de oligonucleotídeos complementares a estas seqüências revelaram que somente a subunidade **A** aparece altamente conservada nas diversas bactérias (Martin e cols., 1992).

O método *fingerprinting* com sondas baseadas em seqüências repetitivas intergênicas distingue organismos não relacionados, porque cepas bacterianas individuais variam com respeito à distância entre as seqüências repetitivas (RademarKer & Bruijn, 1997; Versalovic e cols., 1991), sendo capaz de amplificar fragmentos de DNA com tamanhos diferentes (Versalovic e cols., 1991), consistindo nas seqüências localizadas entre os elementos. Múltiplos fragmentos de diferentes tamanhos podem ser separados por eletroforese, tornando possível estabelecer o

padrão *fingerprinting* específico de bactérias individuais e clones.

A reação de polimerase em cadeia BOX- PCR é rápida e altamente reproduzível, quantifica variações genotípicas em amostras de pneumococos (Belkun e cols., 1996; Rodriguez-Barradas e cols., 1997), e ajuda a identificar surto de infecções, como o que ocorreu com conjuntivite pneumocócica em Houston, EUA (Ertugrul e cols., 1997). Neste trabalho, pela primeira vez, esta técnica foi utilizada em um estudo populacional na tipagem de cepas de pneumococos caracterizadas epidemiologicamente.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de resistência à penicilina entre os *S. pneumoniae* isolados de casos de meningite através de um estudo transversal realizado no Hospital Couto Maia e com, o uso de técnicas moleculares e epidemiológicas caracterizar estas cepas.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Selecionar pacientes com meningite pneumocócica em um estudo transversal e mensurar a prevalência da resistência à penicilina e a outros agentes antimicrobianos nas amostras de *S. pneumoniae* isoladas.
2. Utilizar um método de determinação de concentração inibitória mínima de penicilina, que seja simples e acessível à nossa comunidade.
3. Sorotipar cepas de pneumococos penicilina resistentes e susceptíveis.
4. Desenvolver, e aplicar métodos baseados em Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e eletroforese de campo pulsado para tipagem molecular de cepas em estudos epidemiológicos.

3. JUSTIFICATIVAS E RELEVÂNCIA

A resistência à penicilina entre os *S. pneumoniae* é um problema de Saúde Pública, que pode trazer sérias conseqüências econômicas caso seja disseminado na comunidade, pois não se dispõe até o momento de prevenção eficiente e a terapia alternativa para estes casos é cerca de 20 vezes mais onerosa do que o tratamento rotineiro com penicilina.

O Hospital Couto Maia é o centro de referência estadual para todas as formas de meningite, recebendo 90% dos casos suspeitos de postos de saúde e outros hospitais de Salvador e interior do estado. (Cunha, 1996). Em 1992, 440 casos suspeitos de meningite bacteriana foram admitidos neste Hospital e destes 307 (70%) tiveram culturas positivas, sendo que 74 (24%) dos casos com cultura confirmadas eram de meningite pneumocócica (Mascarenhas e cols., 1994).

Em Salvador - Bahia não existe um sistema de vigilância para detectar resistência à penicilina por pneumococos. A implantação de uma rotina laboratorial para identificar cepas resistentes, através de testes de sensibilidade a antimicrobianos, foi o primeiro passo a ser adotado no sentido de monitorar e controlar a meningite pneumocócica. Esta vigilância focalizou várias questões não respondidas de importância científica com respeito ao impacto clínico, prevalência de sorotipos e fatores de risco envolvidos na emergência de *S. pneumoniae* resistente à penicilina em Salvador - Bahia. A experiência geral, no que se refere à meningite pneumocócica causada por amostras resistentes à penicilina, tem sido sob forma de relatos de casos e pequenas séries, o que tem limitado a avaliação do impacto da resistência à penicilina nesta doença. Em nosso estudo pretendemos evitar estes problemas associando métodos de tipagem com estudos populacionais para que os objetivos propostos sejam melhor alcançados.

As amostras de *S. pneumoniae* isoladas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Couto Maia foram estudadas no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM - FIOCRUZ). Este laboratório trabalha com aplicação de métodos de biologia molecular para estudar as doenças infecciosas e parasitárias, tendo iniciado recentemente um programa de pesquisa em epidemiologia molecular na área de meningite bacteriana.

Vários métodos de tipagem molecular de cepas foram desenvolvidos para aplicação nos estudos de transmissão de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina (Hermans e cols., 1995), entretanto, estes métodos variam consideravelmente quanto à facilidade do desempenho técnico e à rapidez de execução. Embora tenham sido validados em microepidemias, sua utilidade em predizer aglomeração de casos em estudos populacionais permanece ainda obscura.

A análise de DNA baseada na seqüência dos elementos BOX pelo PCR *fingerprinting* tem melhor potencial discriminatório, e sua padronização para tipagem molecular de cepas usando uma população epidemiologicamente definida permitirá a identificação de surtos de infecções pneumocócicas resistentes à penicilina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO

4.1.1 Local

A parte clínica deste estudo e o isolamento de *S. pneumoniae* foram realizados no Hospital Couto Maia (HCMaia), que é um hospital com 120 leitos para doenças infecciosas em Salvador, Bahia. O HcMaia representa o centro de referência estadual para todas as formas de meningites, recebendo casos suspeitos de postos de saúde e outros hospitais de Salvador e interior do Estado, sendo que de 50% dos casos suspeitos de meningite bacteriana são procedentes de Salvador (Mascarenhas e cols., 1994) correspondendo a mais de 70% dos casos notificados descritos nesta cidade (Cunha, 1994).

A parte experimental ou seja os testes de susceptibilidade antimicrobiana e genotipagem foram realizadas no laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM - FIOCRUZ).

4.1.2 População estudada

4.1.2.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo de corte transversal no período de 01/12/95 à 30/10/97 todos os pacientes que preencheram o critérios de inclusão, que são cultura positiva de líquido para *S. pneumoniae* e consentimento pós-informado do paciente ou familiar

4.1.2.2 Seleção dos Pacientes

De acordo com o protocolo de rotina do Hospital Couto Maia, todos os pacientes com suspeita de meningoencefalite são submetidos à punção lombar para coleta do líquido, antes que seja iniciada a terapia antimicrobiana. O líquido é processado para análise das características citológicas com contagem de células, dosagens bioquímicas de glicose e proteínas e estudo microbiológico através de métodos de coloração e cultivo em meios apropriados para isolamento de organismos como *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, organismos entéricos, outras bactérias piogênicas, *Mycobacterium tuberculosis* e fungos (Forbes & Granato, 1995).

Conforme os dados clínicos, características do líquido e o resultado do Gram inicia-se o tratamento empírico com antibióticos enquanto se aguarda o resultado das culturas. A realização de hemoculturas destes pacientes faz parte da rotina do hospital, e são realizadas quando solicitadas pelo médico. Os pacientes foram selecionados para o estudo sempre que a cultura do líquido foi positiva para *S. pneumoniae* até 72 horas, considerando que na maioria dos casos o crescimento de *S. pneumoniae* ocorre entre 24 e 48 horas e após assinatura do termo de consentimento.

4.1.3 Coleta de dados epidemiológicos

A equipe de pesquisadores após obter o consentimento do paciente ou responsável (**Anexo 01**), coletou dados clínicos e epidemiológicos através de entrevista do paciente ou familiares aplicando um questionário que abordava dados demográficos, antecedentes médicos, evolução clínica e colonização

nasofaringeana de familiares e/ou contactantes (**Anexo 02**). Os pacientes foram acompanhados até a saída hospitalar (alta ou óbito), para análise da evolução clínica da meningite pneumocócica.

4.1.4 Isolamento de *S. pneumoniae* do líquido e sangue dos pacientes

As culturas primárias para isolamento de pneumococos a partir do líquido foram executadas no HC Maia através de métodos padronizados (Forbes & Granato, 1995) usando placas de ágar sangue, preparado com a base *Trypticase Soy Ágar* (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, e incubação a 36°C em lata com vela para obter uma atmosfera de CO₂, por um período de 24 a 72 horas. Após o isolamento de pneumococos, a placa de cultura foi enviada ao CPqGM-FIOCRUZ, para continuidade do estudo experimental. As culturas primárias de sangue foram realizadas em meio líquido de TSB - *Trypticase Soy Broth* (DIFCO), na proporção de 1/10 e incubação a 36°C por um período de 24 horas a sete dias, com subcultivos diários em placas de ágar sangue.

4.1.5 Isolamento de *S. pneumoniae* dos contactantes

Contactantes foram definidos como pessoas que residem na mesma casa do paciente no período inicial da doença. A pesquisa de *S. pneumoniae* na nasofaringe dos familiares e contactantes dos pacientes foi realizada utilizando um swab estéril de haste flexível (tipo 1), o qual foi inserido através do nariz e faringe posterior, sendo em seguida inoculado em meio de ágar sangue contendo 5 µg/ml de gentamicina (Montgomery e cois., 1990; Reicher e cois., 1992).

4.1.6 Identificação das Amostras

A identificação e confirmação de *S. pneumoniae* baseou-se na coloração pelo método de Gram (Chapin, 1995), susceptibilidade à optoquina e teste de solubilidade em bile, empregando solução de desoxicolato de sódio a 2% (Ruoff, 1995).

Para a execução do teste de susceptibilidade à optoquina cada amostra foi semeada em placas contendo ágar sangue de forma a obter um crescimento confluyente, sendo a seguir, depositado um disco de 6 mm de diâmetro contendo 5 µg de cloridrato de etilhidrocupreína (BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Maryland, USA). Foram consideradas amostras sensíveis ou seja, optoquina positiva, aquelas que apresentaram uma zona de inibição do crescimento ao redor do disco \geq 14 mm de diâmetro, após 24 horas de incubação a 35°C em atmosfera enriquecida com 5% de CO₂.

Para realizar os testes de solubilidade em bile foram preparadas suspensões bacterianas em solução de cloreto de sódio 0,9% a partir do crescimento obtido em meio de ágar sangue, após 24 horas de incubação a 35°C em atmosfera enriquecida com 5% de CO₂. A turvação da suspensão foi ajustada para o padrão 0,5 da escala de McFarland (10^8 unidades formadoras de colônia por ml; UFC/ml). Alíquotas de 0,5 ml da suspensão foram distribuídas em cada um de dois tubos (13 x 100 mm). Ao tubo teste foi adicionado 0,5 ml de uma solução de desoxicolato de sódio a 2% (BBL), ao tubo controle foi adicionado 0,5 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%. Os tubos foram incubados a 35°C, e observados periodicamente por um período de até 2 horas quanto ao desaparecimento ou não da turvação no tubo teste. O desaparecimento da turvação indicava teste positivo ou lise das células bacterianas.

4.1.7. Estoque das Amostras

Confirmadas serem amostras de *S. pneumoniae*, subculturas foram imediatamente cultivadas para estocagem a - 70°C sob a forma de suspensão em solução contendo 40% de soro de cavalo (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y.,USA), 10% de glicerol (DIFCO) e 50% de caldo TSB - *Trypticase Soy Broth* (DIFCO).

4.2 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Após identificação, as amostras de *S. pneumoniae* foram imediatamente submetidas a testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, teste de difusão em ágar (Doern,1995; NCCLS, 1994), e quando o diâmetro do halo de inibição do disco de oxacilina 1 µg foi menor que 20 mm, aplicava-se o método do E-teste (Jorgensen e cois., 1994), posteriormente, essas amostras foram submetidas ao método de microdiluição em caldo (Doern, 1995; NCCLS, 1994).

A cepa padrão de *S. pneumoniae*, *American Type Culture Colection* (ATCC) 49619, foi incluída para efeitos de controle de qualidade dos testes conforme recomendações do comitê nacional de padronização de laboratórios clínicos dos Estados Unidos (NCCLS,1994),(Anexo 8).

4.2.1 Testes de difusão em ágar

A susceptibilidade a antimicrobianos foi inicialmente avaliada através de testes de difusão em ágar, conforme recomendações do comitê nacional de padronização de laboratórios clínicos dos Estados Unidos (NCCLS,1994). Este comitê elaborou um protocolo de normas a serem adotadas nos testes de

susceptibilidade antimicrobiana, para que os resultados fossem uniformes, independente do local ou técnico a realizá-lo.

A partir de um crescimento bacteriano de 18 à 24 horas foi feita uma suspensão bacteriana em cloreto de sódio 0,9% com turvação padronizada com a escala 0,5 de McFarland. Esta suspensão foi disseminada com um swab na superfície de placas de ágar de Mueller-Hinton (DIFCO), enriquecido com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Após a disseminação da suspensão foram adicionados os discos contendo antibióticos. Foram testados rotineiramente os seguintes antimicrobianos: clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), oxacilina (1 µg), rifampicina (5 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim/sulfametoxazole (1,25/23,75 µg) e (vancomicina (30 µg), (BBL). Estas placas foram incubadas a 35°C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. A leitura foi realizada através de medidas dos diâmetros dos halos de inibição e interpretadas segundo as recomendações atuais do comitê nacional de padronização de laboratórios clínicos dos Estados Unidos (NCCLS,1994). Os resultados foram imediatamente comunicados à equipe médica do HCMaia através de FAX, conforme formulário (**Anexo 4**) e os dados armazenados em uma ficha padrão (**Anexo 3**).

4.2.2 E - Teste

As amostras que apresentaram diâmetro da zona de inibição menor que 20 mm em volta do disco de oxacilina foram submetidas ao método do E-teste para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de penicilina e cefotaxima. O método do E-teste é um método comercial (AB Biodisk, Piscataway, USA), baseado na difusão do antimicrobiano a partir de uma fita plástica (50 x 3mm)

contendo diferentes concentrações (um gradiente) do mesmo, o que possibilita determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do agente testado (Jorgensen e cols., 1994; Krisher & Linscott, 1994; Tenover e cols., 1996).

Para sua execução foram utilizadas placas de ágar de Mueller-Hinton enriquecido com 5% de sangue desfibrinado de carneiro onde foram semeadas as amostras bacterianas a partir de suspensões feitas em solução de cloreto de sódio 0,9% com culturas de 18 à 24 horas. Estas suspensões tinham as turvações padronizadas de forma a equivalerem a escala 0,5 de McFarland. As amostras foram semeadas, com auxílio de swabs estéreis, e sobre a superfície de cada placa foram depositadas as fitas de penicilina e cefotaxima contendo diferentes concentrações dos antibióticos (0,002 - 32 µg/ml), e incubadas a 35°C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. A leitura foi realizada através da observação do ponto de interseção do crescimento bacteriano com a fita, o qual identifica a menor concentração do antibiótico capaz de inibir o crescimento da bactéria. Os valores da concentração inibitória mínima de penicilina e cefotaxima foram imediatamente comunicados à equipe médica de plantão de acordo com formulário **(Anexo 5)**.

4.2.3 Testes de microdiluição em caldo

O método de microdiluição em caldo, padronizado pelo comitê nacional de padronização de laboratórios clínicos dos Estados Unidos (NCCLS, 1995) foi também aplicado para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs), dos antibióticos não β-lactâmicos, e para fazer a correlação com as CIMs de penicilina e cefotaxima obtidas pelo método do E-teste com a finalidade de tornar mais precisa a

classificação das cepas.

Foram empregados dez (10) agentes antimicrobianos (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) relacionados a seguir: cefotaxima, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, ofloxacina, penicilina, rifampicina, tetraciclina, vancomicina, (32 a 0,016 µg/ml) e sulfametoxazol-trimetoprim (16/304 a 0,062/1,187).

As soluções estoques dos agentes antimicrobianos, a partir das quais foram feitas as diluições, foram preparadas usando-se os solventes e diluentes apropriados (NCCLS, 1995), na concentração de 1280 µg/ml do agente ativo. Essas soluções foram imediatamente usadas ou mantidas em freezer a -70°C até sua utilização.

As diluições seriadas foram feitas em caldo de Mueller-Hinton (DIFCO) com ajuste de cátions e suplementado com sangue lisado de cavalo na concentração final de 2% (NCCLS, 1995). Foram feitas doze diluições de cada agente e estas foram distribuídas em volumes de 50 µl em placas estéreis de 96 poços. Estas placas foram acondicionadas em sacos plásticos e estocadas em freezer a -70°C até serem utilizadas. Para o uso, as placas foram deixadas à temperatura ambiente por 30 minutos antes de serem inoculadas.

As amostras a serem testadas foram cultivadas em ágar sangue por 48h a 36°C em atmosfera de CO₂ em dois repiques sucessivos de 24h. A partir deste crescimento foram preparadas suspensões em solução salina numa turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 10⁸ UFC/ml). Cada suspensão foi então diluída a 1:100 em solução de cloreto de sódio obtendo uma concentração bacteriana de 10⁶ UFC/ml, com o auxílio de um multi-inoculador do tipo eppendorf. Alíquotas de 50 µl destas diluições foram adicionadas a cada poço da placa contendo 50 µl da solução antibiótica, resultando a concentração final

de bactérias de 5×10^5 UFC/ml. A leitura foi feita após incubação das placas à 35°C por 20 a 24 horas. A concentração inibitória mínima foi lida visualmente a partir da detecção de turvação do meio de cultivo no poço (que caracteriza o crescimento bacteriano) sendo considerado aceitável um “botão” de 2mm, ou turbidez definida em comparação com o controle, sem antibiótico.

Para controle do teste foi utilizada a cepa padrão de *S. pneumoniae* ATCC 49619 e o controle da concentração bacteriana foi feito a partir de uma diluição de 1:1000 dos inóculos no momento do uso. Após agitação, volumes de 0,1 ml destas diluições foram dispensados em placas de ágar sangue e estas incubadas a 36°C , em atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas. A presença de 50 colônias indicava um inóculo de 5×10^5 UFC/ml.

4.2.4 Definição de caso

A classificação de amostras de *S. pneumoniae* como resistente à penicilina ou à cefotaxima, foi definida usando as normas adotadas pelo (NCCLS,1994) (**Anexo 07**). Sendo definida como *S. pneumoniae* susceptível à penicilina as amostras que apresentarem zona de inibição em volta do disco de $1\mu\text{g}$ de oxacilina iguais ou maiores que 20 mm no método de difusão radial ou apresentaram CIMs menores que $0,12\mu\text{g/ml}$ no E-teste e nos testes de Microdiluição em caldo. *S. pneumoniae* não susceptível à penicilina foi considerada quando as amostras tiveram CIMs de $0,12 - 1,0 \mu\text{g/ml}$ e resistentes quando as CIMs foram $\geq 2,0 \mu\text{g/ml}$ pelos métodos de E-teste e microdiluição em caldo.

Para classificar *S. pneumoniae* resistente à cefotaxima foi usada a seguinte definição: susceptível quando a CIM foi $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$; nível intermediário de

resistência com CIM de 0,5-1,0 µg/ml; e resistência \geq 2,0 µg/ml. A multi-resistência foi definida como resistência pelo método de difusão radial para dois ou mais dos seguintes grupos de antimicrobianos: trimetoprim/sulfametoxazole, tetraciclina, macrolídeos e cloranfenicol, e não-sensível ou resistente à penicilina pelos métodos de E-teste e microdiluição em caldo (Hofman e cols., 1995).

4.3 SOROTIPAGEM

As amostras de pneumococos foram classificadas em sorogrupos na Cornell University Medical College, New York, New York, USA, através de reações de Quellung (teste de entumescimento capsular) utilizando anti-soros específicos (Danish typing sera; Statens Seruminstitut Copenhagen, Dinamarca), seguindo o sistema de nomenclatura dinamarquês (**Anexo 06**).

As amostras que apresentaram tipos sorológicos complexos compostos por múltiplos determinantes antigênicos, foram enviadas ao Centers for Disease Control and Prevention – CDC, Atlanta, Georgia, USA) para completar a caracterização com testes empregando anti-soros específicos para os diferentes fatores.

4.4 ESTUDOS MOLECULARES

Foram realizadas as técnicas de reação de polimerase em cadeia (PCR) para quantificar as variações genotípicas das amostras de *S. pneumoniae*, e a técnica de eletroforese de campo pulsado para padronizar o método de PCR pelo BOX A .

A técnica de eletroforese de campo pulsado foi realizada no Laboratório de Apoio Biotecnológico do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da professora Lúcia Martins Teixeira.

4.4.1 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

4.4.1.1 Primer

O primer utilizado foi desenhado com base na estrutura primária de sequências repetitivas chamadas elementos BOX A (Versalovic e cols., 1991), tendo a seguinte posição e sequência de DNA :

BOX A (Belkum, 1996):

5'-ATA·CTC·TTC·GAA·AAT·CTC·TTC·AAA·C-3'

Sequência completa do BOX A:

5'-TA ATA·CTC·TTC·GAA·AAT·CTC·TT·CAA·ACC ACG·TCA·GCG·TCG·CCT·TGC·CGT·AGA·TAT·GT·TA-3'

4.4.1.2 Cepas

Para este estudo foram utilizadas as amostras de pneumococos isoladas de pacientes com meningite pneumocócica, mantidas em freezer à -70 °C no LPBM do CPqGM - FIOCRUZ.

Para determinar a identidade dos padrões genéticos e padronizar o método de PCR BOX-A foram tipadas também amostras múltiplas de pacientes que tiveram hemoculturas positivas.

Amostras de pneumococos isoladas da nasofaringe de familiares e/ou contactantes dos pacientes; amostras isoladas de outras cidades brasileiras (Rio de Janeiro e São Paulo) e americanas (Atlanta e New York) e a amostra padrão ATCC 49619, foram utilizadas para estabelecer controle da reação e definir melhor as relações epidemiológicas, espaciais e temporais.

Amostras de outras espécies bacterianas como *Escherichia coli* ATCC 35218; *Streptococcus mitis* (Lab. de Apoio Biotecnológico – UFRJ), *Streptococcus mutans*

(Lab. de Microbiologia – Faculdade de Farmácia/UFBA) e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foram utilizadas para estabelecer a especificidade do método.

Todas as amostras passaram por dois cultivos consecutivos em ágar sangue a 35°C por 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂, para estimular o metabolismo bacteriano.

4.4.1.3 Extração de DNA

O método de extração de DNA foi adaptado do protocolo de Rademaker & Bruijn (1997). A partir do crescimento bacteriano de 24 horas, foi preparada uma suspensão bacteriana em salina tamponada (PBS) pH 7,4, com turvação equivalente a escala 1,0 de McFarland. Esta suspensão foi centrifugada por 2 minutos x 14.000 rpm. A massa bacteriana foi ressuspensa em tampão de lise (KCl 50 mM; Tris 10 mM pH 8,3; MgCl₂ 1,5 mM; Gelatina 0,01%; Tween 20 0,5%; Proteinase K 0,5 mg/ml), incubada a 55°C por 20 minutos e depois em banho fervente por 15 minutos. Após centrifugação por 2 minutos x 14.000 rpm, o sobrenadante foi diluído na proporção de 1:10 com água estéril e utilizado imediatamente, ou conservado a -20°C para análises futuras.

4.4.1.4 Preparo do tampão

A mistura reagente foi preparada em tubos eppendorf de 1,5 ml, contendo para cada reação: 5 µl de Tampão 10 x (KCl 500 mM, MgCl₂ 20mM, Tris- HCl 100 nM), 2U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada nucleotídeo, 1,0µM de primer BOX A, 1µM de Mg Cl₂ , 5 µl de dimetil-sulfóxido (DMSO 100%) e água ultra-pura para completar o volume de 45 µl.

Para cada 5 μ L de amostra, foram utilizados 45 μ l da mistura reagente e a amplificação foi feita na máquina Perkin Elmer 9600 com o seguinte programa: pré-desnaturação a 95°C por 7 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização do *primer* a 53°C por 1 minuto, extensão a 65°C por 8 minutos e finalização da reação com uma extensão a 65°C durante 16 minutos.

4.4.1.5 Eletroforese

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de ágarose a 1,5%, empregando TAE 1x (Tris-acetato 0,04M, EDTA 0,01M, pH 8,0) em uma corrente constante de 100 volts por 2 horas. Em cada gel foi utilizado um marcador interno de peso molecular DNA VI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA).

4.4.1.6 Análise dos produtos amplificados e determinação dos padrões genéticos

Fotografias dos geis de eletroforese corados com brometo de etídio (10mg/ml) foram feitas com filme polaroid 667 (Kodak iso3000), para posterior análise visual por comparação do padrão de bandas com respeito ao geneticamente idêntico e similar, definindo os padrões genéticos. Foi considerada a distância de migração das bandas com referência ao marcador de peso molecular e as bandas foram identificadas como presentes (1) ou ausentes (0) visualmente. Foram consideradas como amostras idênticas as que apresentaram o mesmo número e posição de bandas e amostras relacionadas aquelas com três bandas ou menos de diferença.

4.4.2 Eletroforese de Campo pulsado (PFGE)

4.4.2.1 Preparo dos blocos

As amostras de *S. pneumoniae* foram cultivadas em placas de ágar sangue a 35°C por 24 horas em atmosfera de CO₂. A partir deste cultivo foi feita uma suspensão bacteriana em 0,4 ml de solução PIV (NaCl 1,0 M, Tris-HCl 10mM, pH7,6), com turvação equivalente a escala 7,0 de McFarland . A esta suspensão de células bacterianas foi adicionado 0,4 ml de ágarose a 2% (NuSieve GTG ágarose, FMC Bioproducts, Rockland, USA), preparada em solução de PIV e mantida a 65°C. Após cuidadosa agitação, a suspensão foi dispensada nos moldes de blocos, e colocado a 4°C, por 30 minutos para solidificar. Os blocos obtidos foram transferidos para tubos contendo solução de lise (TrisHCl 6mM, pH7,6, NaCl 1,0M, EDTA 100mM, Brij-58 0,5%, desoxicolato de sódio 0,2%, lauroilsarcosina de sódio 0,5% (Sigma), contendo 1mg/ml de lisozima (Sigma) e 5U/ml de mutanolisina (Sigma), e incubados por 18 horas a 37°C sob leve agitação.

4.4.2.2. Lavagem dos blocos

A solução de lise foi gentilmente removida, e aos blocos foram adicionados 4 ml de solução ESP(lauroilsarcosina de sódio 1,0%, 100,0 ml de EDTA 0,5M, pH8,0, proteinase K 0,1 mg/ml), e posterior incubação por 18 horas a 50°C.

Após a incubação a solução de ESP foi suavemente removida, e os blocos foram lavados, sucessivamente por cinco vezes, com intervalos de uma hora, sendo que a última lavagem foi de 18 horas, utilizando tampão TBE (Tris-borato 0,089M, pH8,3; EDTA 0,025M), todas as etapas de lavagem foram conduzidas a temperatura de 37°C e sob leve agitação. Concluída a lavagem, os blocos foram estocados a 4°C

para posterior tratamento com enzima de restrição.

4.4.2.3. Tratamento enzimático

Um bloco foi separado em um tubo e tratado com 250 μ l de tampão de enzima específico (Boehringer Mannheim) por uma hora, sendo então substituído por outro tampão de enzima contendo 20 unidades da enzima específica *Sma*I (Boehringer Mannheim), e mantidos por 18 horas a 25°C.

4.4.2.4 Condições de eletroforese

Após remoção do tampão contendo a enzima de restrição os blocos foram colocados a 72°C para dissolução e aplicação diretamente em orifícios do gel de ágarose a 1,2%(Seaken GTG ágarose: FMC Bioproducts). Os fragmentos de DNA foram separados utilizando o sistema CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories Inc., Richmond, Califórnia, USA). A eletroforese foi processada em tampão TBE 0,5x a 12°C, com pulsos iniciais de 1s e finais de 30 s, por um período de 23 horas, voltagem de 6v/cm e ângulo de 120°. Foi utilizado um marcador interno de peso molecular de 50 – 1000 Kb (Sigma).

O gel foi corado com solução de brometo de etídio a 0,01g/ml durante 30 minutos e fotografado com auxílio de iluminação ultravioleta, utilizando filme polaroid 667 (Kodak iso3000).

4.4.2.5 Análise e interpretação

O padrão de restrição dos fragmentos foram analisados e comparados visualmente utilizando o marcador de peso molecular como referência para as

medidas de migração. Os critérios adotados para determinar identidade genética foram os descritos na literatura (Tenover e cols., 1995) como se segue:

- Indistinguível: As amostras foram classificadas como geneticamente indistinguíveis se os seus padrões de restrição têm o mesmo número de bandas e aparentemente o mesmo tamanho;
- Relacionada : As amostras foram classificadas como restritamente relacionadas a um surto se o padrão de bandas tiver diferenças ocorridas por alterações consistentes com um simples evento genético, como por exemplo: mutação de ponto ou por inserção ou deleção de DNA. Cada alteração desta tipicamente resulta em duas ou três bandas de diferença;
- Possivelmente relacionada : Uma amostra é considerada como possivelmente relacionada a um surto se o padrão de bandas tiver diferenças consistentes com alterações devidas a dois eventos genéticos independentes, ou seja, quatro a seis bandas de diferença;
- Não relacionada : Uma amostra é considerada como não relacionada a um surto se o padrão de bandas tiver alterações consistentes com três ou mais eventos genéticos independentes, geralmente sete ou mais bandas de diferença.

4.5 ANÁLISE DE DADOS

Os dados epidemiológicos e laboratoriais foram processados através do programa Epi-Info 6 (CDC, Moutari, New, EUA). A associação entre fatores epidemiológicos, fenótipos ou genótipos e resistência à penicilina foi calculada pelo risco relativo (Rosner, 1995). Testes paramétricos, Qui-quadrado (Cochran-Mantel-Haentzel) e não-paramétricos, (teste exato de Fischer), foram utilizados para avaliar

a significância estatística entre as associações estudadas. Pacientes com meningite pneumocócica foram estratificados em grupos sensível à penicilina e não-sensível à penicilina. Todos os testes foram bi-caudais e um valor de p menor que 0,05 foi considerado como indicativo de significância estatística. O grupo não-sensível à penicilina incluiu casos com isolados que demonstraram resistência de níveis alto ou intermediário nos testes de susceptibilidade *in vitro* pelos métodos de E-teste e microdiluição em caldo. Sempre que aplicável, os pacientes foram estratificados de acordo com o fenótipo e padrões de seus isolados de pneumococos e inseridos em covariáveis categóricas dicotômicas ou não ordenadas na análise acima.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com meningite pneumocócica

Durante o período do estudo, dezembro de 1995 a outubro de 1997, foram admitidos no Hospital Couto Maia na cidade de Salvador - BA, 166 pacientes com suspeita de meningite pneumocócica, os quais 150 tiveram diagnóstico definitivo de meningite pneumocócica, uma incidência anual de 1,6 casos para 100.000 habitantes em Salvador utilizando dados do censo de 1996 (IBGE, 1996). Foram excluídos do estudo 16 casos que tiveram o teste do látex ou coloração de Gram positiva com cultura negativa para *S. pneumoniae*. Em todos os meses do ano houve ocorrência de casos de meningite pneumocócica, embora tenha sido observado um acúmulo durante os meses de maio à agosto, tanto para os casos susceptíveis quanto para os não-susceptíveis à penicilina (Fig. 1).

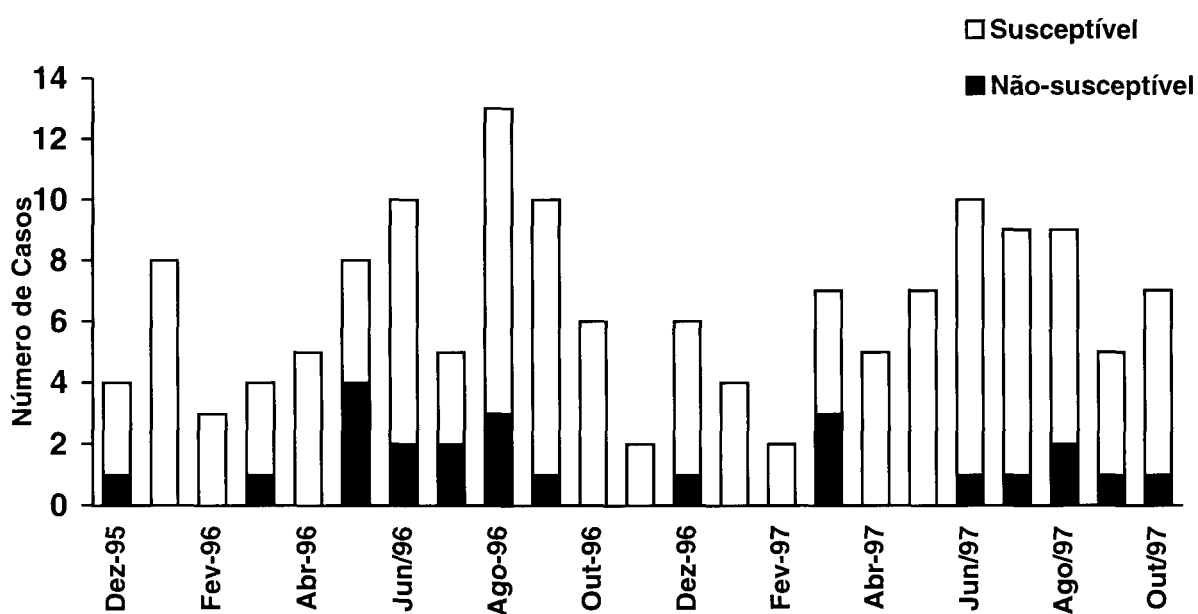


Figura 1. Frequência dos 150 casos de meningite pneumocócica no Hospital Couto Maia-Salvador/BA entre dezembro de 1995 e outubro de 1997.

Os casos de meningite pneumocócica foram procedentes de Salvador (46,2%) e de cidades vizinhas (53, 8%) (**Fig. 2**), tendo em vista que o Hospital Couto Maia é um hospital estadual de referência para doenças infecciosas.

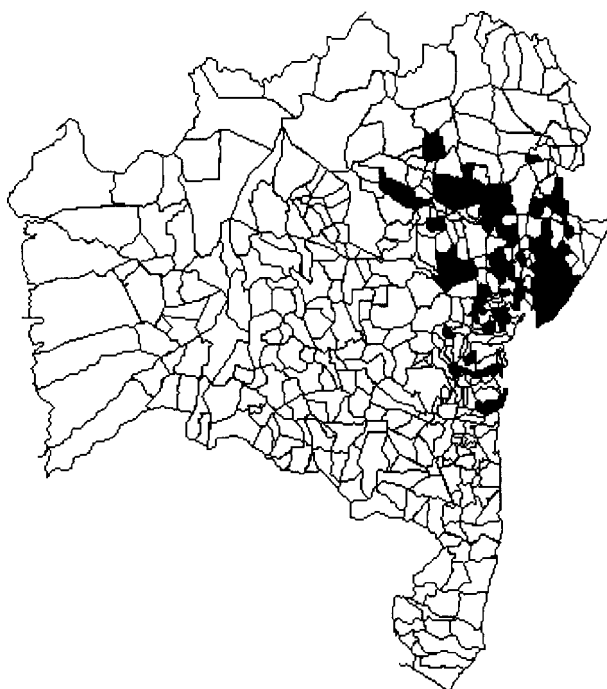


Figura 2. Distribuição, por municípios, dos pacientes com meningite pneumocócica atendidos no Hospital Couto Maia entre dezembro de 1995 e outubro de 1997.

A meningite pneumocócica ocorreu em todas as faixas etárias, (**Fig. 3**), com ocorrência de 42% dos casos em crianças menores de dois anos de idade, (**Fig. 4**).faixa etária na qual foram identificados 78,3% dos casos não-susceptíveis à penicilina. O sexo masculino foi mais atingido que o feminino, compreendendo 66,9% dos casos (**Tab. 1**).

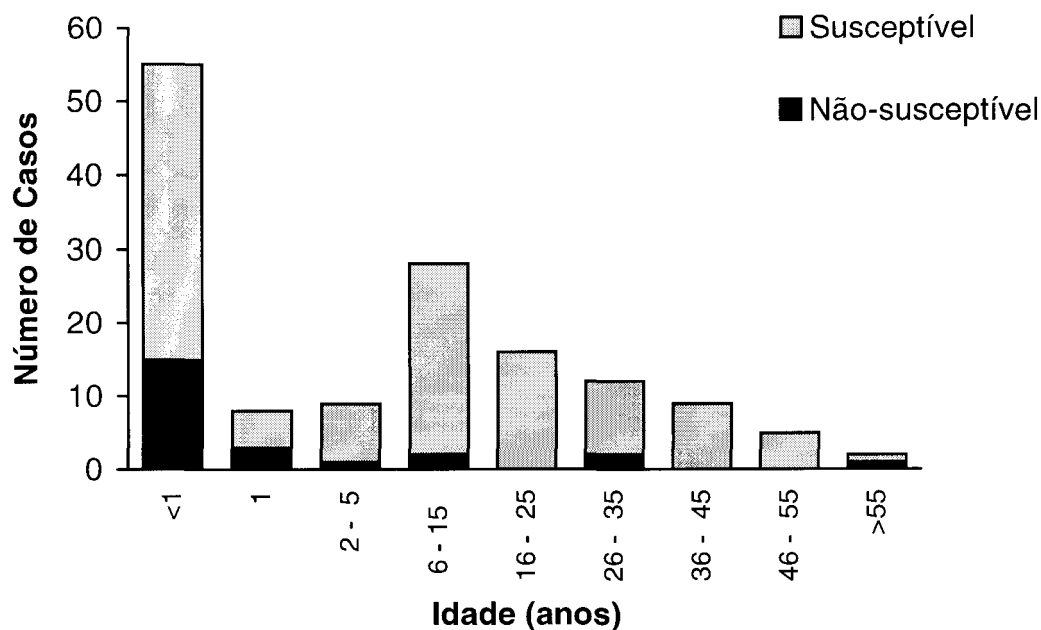


Figura 3. Distribuição, por faixa etária, dos 150 pacientes com meningite pneumocócica atendidos no período de dezembro de 1995 à outubro de 1997 no Hospital Couto Mala - Salvador/BA.

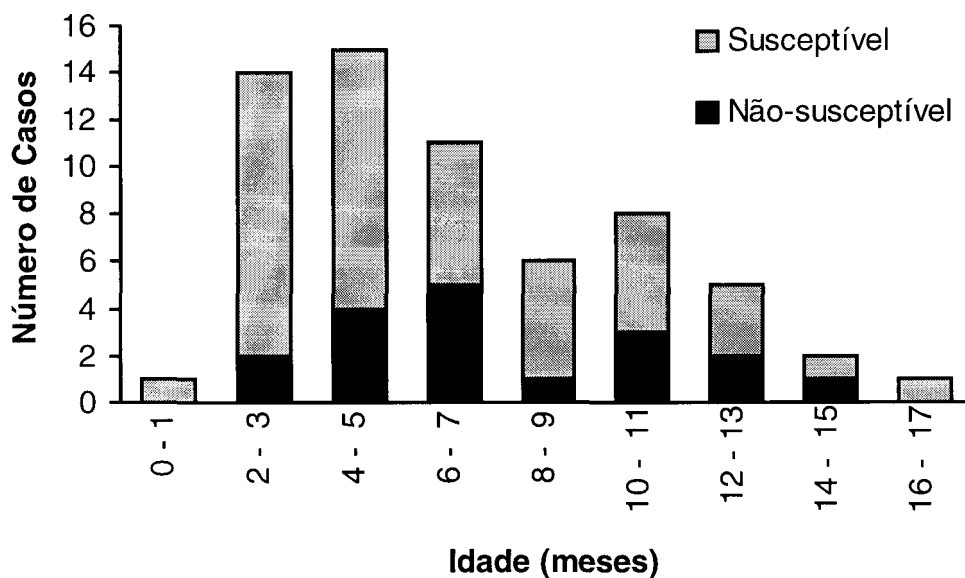


Figura 4. Distribuição dos 63 casos de meningite pneumocócica em crianças menores que 2 anos de idade no período entre dezembro/1995 à outubro/1997 - Hospital Couto Maia - Salvador/BA.

As principais características epidemiológicas e clínicas dos pacientes estão listadas nas Tabelas 1 e 2. A otite média foi a fonte de infecção mais comum entre os pacientes (36%), seguida de pneumonia (14%), traumatismo cefálico (10%) e fratura craniana (5%). Dentre os sintomas relatados os mais freqüentes foram a febre (98%), náuseas e vômitos (90%), rigidez de nuca (72%), convulsão (55%), e dores de cabeça (48%).

Os dados liquóricos (**Tab. 2**) tiveram uma ampla faixa de variação. A contagem global de leucócitos variou de 4 a 9700 células/mm³, sendo que em 96% dos casos os polimorfonucleares foram responsáveis por mais de 50% destas células. A taxa de glicose variou de 20 a 99 mg/dl, embora 66% dos casos tenham tido uma taxa de 20 mg/dl. A dosagem de proteína revelou uma variação de 35 a 600 mg/dl, sendo que 63% dos pacientes tiveram dosagens na faixa de 300 a 500 mg/dl.

Os pacientes ficaram internados no Hospital durante 12 dias em média, sendo que 55% destes evoluíram para a cura, 42,9% foram a óbito e 2,1% foi transferido para outro hospital.

Tabela 1. Características epidemiológicas dos pacientes com meningite pneumocócica e fatores associados com resistência à penicilina - Hospital Couto Maia - Salvador/BA. Dezembro/95 a Outubro/97.

CARACTERÍSTICAS	Nº	Res. (%)	Sen. (%)	OR (95% IC)	Valor de p
Idade					
≤ 2 anos	63	18 (78,3)	45 (37,5)	6,0	p < 0,001
> 2 anos	80	5 (21,7)	75 (62,5)	(1,90 - 20,18)	
Sexo					
Masculino	96	18 (78,2)	78 (64,4)	1,98	p = 0,29
Feminino	48	5 (21,8)	43 (35,6)	(0,63 - 6,67)	
Procedência					
Salvador	66	12 (54,5)	54 (45)	1,47	p = 0,27
Interior	76	10 (45,5)	66 (55)	(0,53 - 4,05)	
Uso de antibióticos < 1m					
sim	35	12 (70,6)	23 (37,7)	3,97	p = 0,01
não	43	5 (29,4)	38 (62,3)	(1,09 - 15,20)	

Tabela 2. Características clínicas dos pacientes com meningite pneumocócica - Hospital Couto Maia - Salvador/BA. Dezembro/95 a Outubro/97.

CARACTERÍSTICAS	Mínimo	Máxlmo	%	MEDIANA	TOTAL
Clínicas					
Febre			98,5		138
Náusea/Vômitos			90,0		128
Dor de Cabeça			47,8		140
Rigidez da Nuca			72,0		90
Convulsão			55,5		99
Dados laboratoriais					
Contagem de leucócitos por mm ³	4000	10000		2.400	106
Glicose (mg/dl)	20	99		20	143
Proteínas (mg/dl)	35	600		400	140
Antecedentes Médicos					
Otite Média			35,6		101
Pneumonia			14,4		97
Traumatismo Cefálico			10,7		93
Fratura Craniana			5,3		93
Sinusite			3,4		89
Doença Crônica					
Otite Media			8,3		84
Sinusite			6,0		83
Deficiência Nutricional			4,7		84
Alcoolismo			2,5		118
Diabetes			1,0		95
Anemia Falciforme			1,0		87
Hepatopatia			2,3		85
Uso De Antibióticos					78
< 1 mês			44,8		
<6 meses			58,9		
Evolução Clínica					142
Cura			55,0		
Óbito			42,9		
Transferido			2,1		
Dias de Internamento	0	78		12	144

5.2. Perfil de sensibilidade das amostras aos antimicrobianos

5.2.1 Testes de difusão em agar

Das 150 culturas positivas para *S. pneumoniae*, foram analisadas quanto a

susceptibilidade 149 amostras, porque uma cultura foi perdida durante o processamento. (Tab. 3).

Os testes de triagem usando discos de oxacilina detectaram resistência, ou halo de inibição < 20 mm de diâmetro, em 34 (23%) amostras. O trimetoprim/sulfametoxazol foi o antibiótico para o qual se encontrou uma maior frequência de resistência, com 47(31,5%) amostras resistentes e 14(9,4%) com níveis intermediários de resistência. As amostras foram resistentes à tetraciclina em 25% dos casos enquanto que 5% apresentou nível intermediário de resistência. Para o cloranfenicol e a eritromicina, foram observadas taxas elevadas de susceptibilidade 99% e 98%, respectivamente, e nenhuma amostra demonstrou resistência à vancomicina e clindamicina.

Tabela 3. Padrão de susceptibilidade pelo método de difusão em agar, de 149 amostras de *Streptococcus pneumoniae*, isolados de pacientes com meningite no Hospital Couto Maia em Salvador - BA, no período de dezembro de 1995 a outubro de 1997.

ANTIBIÓTICOS (μg / disco)	Susceptível		Não-Susceptível		Resistente	
	mm**	Nº(%)	mm**	Nº(%)	mm**	Nº(%)
Clindamicina 2 μg	≥ 19	149 (100)	16-18	0(0)	≤ 15	0(0)
Cloranfenicol 30 μg	≥ 21	148 (99)	ND	ND	≤ 20	1(1)
Eritromicina 15 μg	≥ 21	147 (98)	16-20	0(0)	≤ 15	2(2)
Oxacilina* 1 μg	≥ 20	115 (77)	ND	ND	≤ 20	34(23)
Rifampicina 5 μg	≥ 19	149 (100)	17-18	0(0)	≤ 16	0(0)
Tetraciclina 30 μg	≥ 22	103 (70)	18-21	8(5)	≤ 17	38(25)
Trimetoprim/ Sulfametoxazol 1,25/23,75 ^b μg	≥ 19	88 (59)	16-18	14(10)	≤ 15	47(31)
Vancomicina ^a 30 μg	≥ 17	149(100)	ND	ND	ND	0(0)

* Foi empregado disco de oxacilina de 1 μg

** Diâmetro do halo de inibição

ND - Não definido

a) O NCCLS não define resistência ou não susceptibilidade para vancomicina

b) Concentração de trimetoprim (1,25 μg), concentração de sulfametoxazol (23,75 μg)

5.2.2 E - teste

O método do E-teste foi aplicado para determinar CIM de penicilina e cefotaxima em 34 amostras que apresentaram halo de inibição menor que 20 mm de diâmetro pelo teste de triagem com oxacilina 1µg. Das 34 amostras, 24 (70,6%) foram não-susceptíveis à penicilina (CIM > 0,1 µg/ml), apresentando uma discrepância de resultados para dez amostras (10/34; 29,4%) que foram classificadas como resistentes a oxacilina pelo método de triagem e sensíveis à penicilina pelo E-teste, com CIM menor que 0,1µg/ml. A faixa de variação da concentração inibitória mínima de penicilina para as 34 amostras testadas pelo E-teste foi de 0, 047 a 0, 38 µg/ml. Para a cefotaxima a faixa de variação da CIM foi de 0, 047 a 0, 38µg/ml, sendo todas sensíveis (CIM < 0,5 µg/ml). (Tab. 4).

Tabela 4. Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de penicilina e cefotaxima, pelo método do E -teste para as 34 amostras que foram não-susceptíveis pelo método de difusão em agar. Hospital Couto Maia - Salvador/BA entre dezembro de 1995 e outubro de 1997.

ANTIBIÓTICOS	Método do E-teste	
	CIM (µg/ml)	N.º (%) N=34
PENICILINA		
Susceptível	0,047 - 0,094	10 (29,4)
Não-susceptível	0,125 - 0,38	24 (70,6)
Resistente	-	-
CEFOTAXIMA		
Susceptível	0,047 - 0, 38	34(100)
Não-susceptível	-	-
Resistente	-	-

5.2.3 Microdiluição em caldo

O teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado para as primeiras 104 amostras do estudo, utilizando dez antimicrobianos (**Tab. 5**); Dezoito (17,3%) amostras foram não-susceptíveis à penicilina com CIM variando de 0,125 a 1,0 µg/ml. A resistência à penicilina (CIM > 1,0 µg/ml) não foi observada entre estas amostras. A distribuição das CIMs de penicilina para as 104 amostras testadas não teve tendências a aumento durante o período, com 86/104 (82,7%) das amostras sendo inibidas por níveis de concentração dentro da faixa de sensibilidade, ou seja CIM < 0,06 µg/ml (**Fig. 5**).

Tabela 5. Padrão de susceptibilidade pelo método de microdiluição em caldo, de 104 amostras de *Streptococcus pneumoniae* isolados de pacientes com meningite no Hospital Couto Maia-Salvador/BA no período de dezembro de 1995 à outubro de 1997.

ANTIBIÓTICO	Susceptível		Não-Susceptível		Resistente	
	CIM ^a (µg/ml)	Nº (%)	CIM ^a (µg/ml)	Nº (%)	CIM ^a (µg/ml)	Nº (%)
Cefotaxima	≤ 0,5	104 (100)	1	0 (0)	≥ 2	0 (0)
Clindamicina	≤ 0,25	104 (100)	0,5	0 (0)	≥ 1	0 (0)
Cloranfenicol	≤ 4	103 (99)	ND	0 (0)	≥ 8	1 (1)
Eritromicina	≤ 0,5	102 (98)	1 - 2	2 (2)	≥ 4	0 (0)
Ofloxacina	≤ 2	104 (100)	4	0 (0)	≥ 8	0 (0)
Penicilina	≤ 0,06	86 (83)	0,1 - 1,0	18 (17)	≥ 2	0 (0)
Rifampicina	≤ 1	104 (100)	2	0 (0)	≥ 4	0 (0)
Tetraciclina	≤ 2	74 (71)	4	6 (6)	≥ 8	20 (19)
Trimetoprim Sulfametoxazol	≤ 0,5/9,5	62 (59)	1/19 - 2/38	24 (23)	≥ 4/76	18 (17)
Vancomicina	≤ 1	104 (100)	ND	0 (0)	ND	0 (0)

a) CIM - Concentração inibitória mínima (NCCLS, 1995)

ND - não definido

Os percentuais de resistência mais elevados foram aqueles observados para o trimetoprim/sulfametoxazol com 17% (18/104) de amostras resistentes e 23% (24/104) com níveis intermediários de resistência, em seguida a tetraciclina, com 19% (20/104) de resistência e 6% (6/104) de amostras com níveis intermediários. Para eritromicina e cloranfenicol foram encontrados 2% (2/104) e 1% (1/104) de amostras com resistência, respectivamente. Todas as amostras foram susceptíveis para cinco dos antibióticos testados: cefotaxima, clindamicina, ofloxacina, rifampicina, e vancomicina.

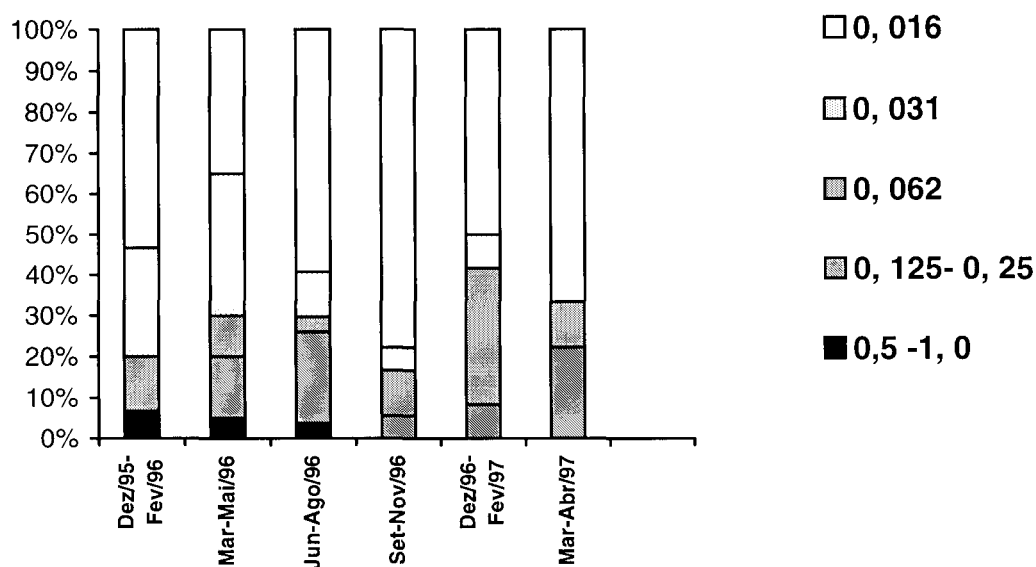


Figura 5. Distribuição das Concentrações inibitórias mínimas de penicilina entre 104 amostras isoladas de pacientes com meningite pneumocócica no período entre dezembro de 1995 e abril de 1997, Hospital Couto Maia - Salvador/BA.

As concentrações de antibióticos capazes de inibir o crescimento de 50% (CIM₅₀) e 90% (CIM₉₀) das amostras testadas estão relacionadas na **Tabela 6**. As concentrações mínimas de cada antimicrobiano necessária para inibir 90% do total de amostras testadas, foram: 0,125 µg/ml de cefotaxima, 0,125 µg/ml de

clindamicina, 4µg/ml de cloranfenicol, 0,062 µg/ml de eritromicina, 0,25 µg/ml de penicilina, 2,0 µg/ml de ofloxacina, 4,0 µg/ml de TMP/SMX, 16 µg/ml de tetraciclina, e 0,125µg/ml de vancomicina.

Os valores de CIM₅₀ foram, em geral, próximos aos da CIM₉₀, com exceção de tetraciclina e TMP/SMX que apresentaram resultados com uma ampla faixa de variação das concentrações inibitórias mínimas (**Tab. 6**).

Tabela 6. Padrão de susceptibilidade a antimicrobianos pelo método de microdiluição em caldo, das 104 amostras de *Streptococcus pneumoniae* isolados de casos de meningite no Hospital Couto Maia-Salvador/BA no período de dezembro de 1995 a outubro de 1997.

ANTIBIÓTICO	CIM ^a (µg/ml)		
	Faixa de variação	^b CIM ₅₀	^c CIM ₉₀
Cefotaxima	0,016-0,5	0,016	0,125
Clindamicina	0,016-0,250	0,062	0,125
Cloranfenicol	0,500-8,0	2,0	4,0
Eritromicina	0,016-1,0	0,031	0,062
Ofloxacina	0,125-2,0	1,0	2,0
Penicilina	0,016-1,0	0,016	0,250
Rifampicina	0,016-0,125	0,031	0,062
Tetraciclina	0,031->32	0,250	32,0
Trimetoprim Sulfametoxazol	0,062-8,0	0,5	4,0
Vancomicina	0,016-1,0	0,5	0,5

a) CIM - concentração inibitória mínima

b) CIM₅₀ - Menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento de 50 % do total de amostras testadas

c) CIM₉₀ - Menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento de 90 % do total de amostras testadas

O uso combinado dos testes, E-teste e triagem com oxacilina na vigilância de resistência à penicilina por pneumococos demonstrou sensibilidade de 94,4% e especificidade de 98,8% (**Tab. 7**). A discordância de resultados entre esta combinação de métodos e o método padrão-ouro, microdiluição em caldo, foi

observada em apenas duas amostras. Uma amostra que foi resistente a oxacilina com diâmetro do halo de inibição de 14 mm teve CIM de 0,064 µg/ml pelo E-teste, e de 0,25 µg/ml pela microdiluição em caldo. A outra amostra foi resistente a oxacilina, com diâmetro do halo de inibição de 16mm e teve CIM de 0,125 µg/ml pelo E-teste, e de 0,062 µg/ml pela microdiluição em caldo.

Tabela 7. Comparação entre os testes de microdiluição em caldo com a associação teste de disco/E-teste na vigilância de resistência à penicilina em amostras isoladas de pacientes com meningite pneumocócica no Hospital Couto Maia-Salvador - BA.

Difusão de disco */ E-teste	Microdiluição em Caldo			
	Não-susceptível		Susceptível	
	N.º	(%)	N.º	(%)
Não-susceptível	17	(94)	1	(1)
Susceptível	1	(6)	85	(99)
Total	18	(100)	86	(100)

* oxacilina 1 µg

A não susceptibilidade para múltiplos antibióticos (≥ 3) foi observada em 3,8% (4/104) amostras. Duas foram não-susceptíveis à penicilina, tetraciclina e TMP/SMX. Uma foi não-susceptível a cloranfenicol, tetraciclina e eritromicina. A outra amostra foi não-susceptível a tetraciclina, eritromicina e TMP/SMX, sendo que na triagem com disco de oxacilina esta amostra também se mostrou resistente a penicilina, e a determinação das CIMs pelo E-teste e microdiluição em caldo, tenha fornecido próximos a faixa de não-susceptibilidade, 0,094 µg/ml e 0,062 µg/ml, respectivamente.

5.3 Tipagem Sorológica

A tipagem sorológica foi realizada para todas as amostras do estudo através da técnica de entumescimento capsular. Foram identificados 37 diferentes sorotipos (**Fig. 6**) sendo os mais freqüentes os sorotipos (n): 3 (21 amostras); 14 (20 amostras); 6B (17 amostras); 19F(9amostras); 23F (8amostras), 6A e 8 (7 amostras cada); 10A, 18C, 4 (5 amostras cada).

As amostras não-susceptíveis à penicilina foram associadas aos sorotipos 14 (14 amostras); 6B (6 amostras); 19A; 19F; 23B e 23F com uma amostras cada. Todas as amostras do sorotipo 14 que foram não-susceptíveis à penicilina foram também não-susceptíveis ao TMP/SMX. Metade, 7/14(50%) dos casos de sorotipo 14 não-susceptível à penicilina foram isolados na mesma época, nos meses de maio à agosto de 1996 (**Fig.7**).

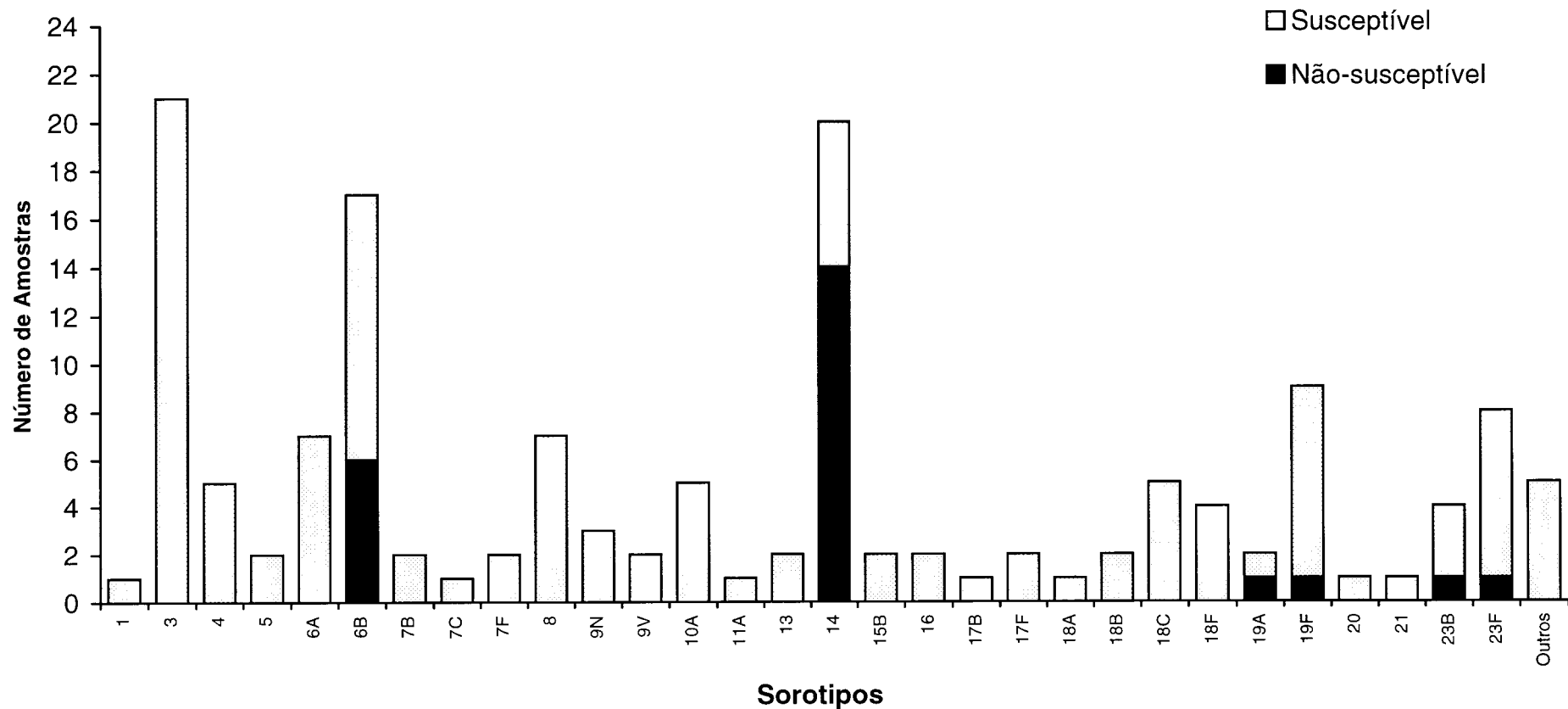


Figura 6. Distribuição dos sorotipos de 149 amostras de pneumococos isolados de pacientes com meningite no Hospital Couto Maia entre dezembro de 1995 e outubro de 1997 - Salvador/BA.

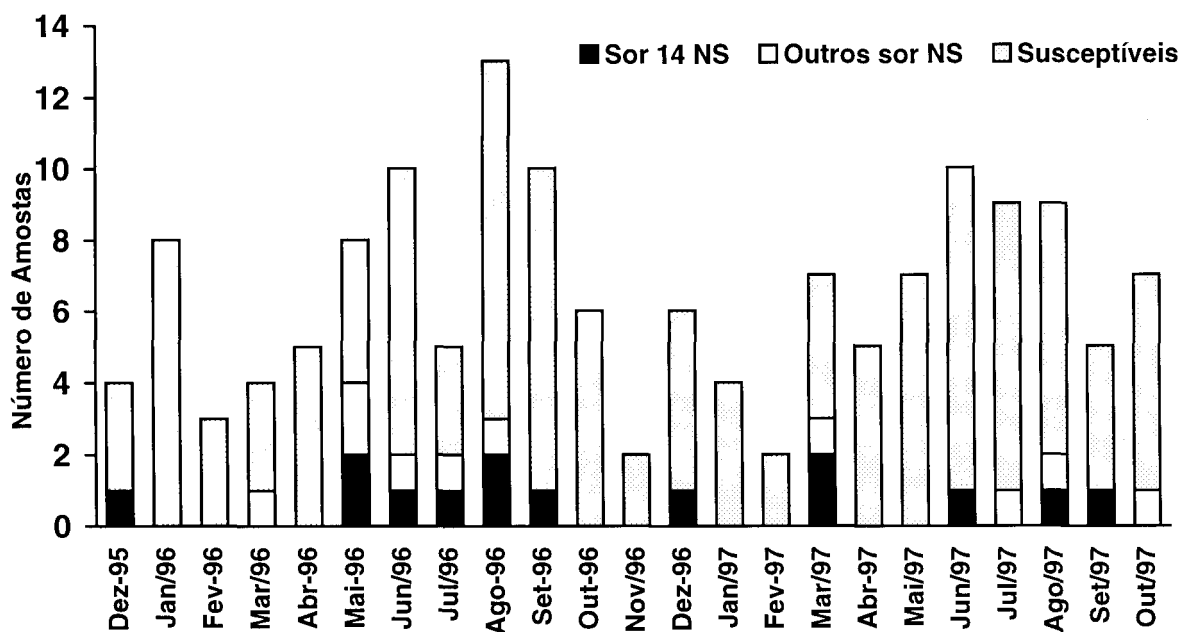


Figura 7. Distribuição de 149 amostras de *Streptococcus pneumoniae* isoladas de pacientes com meningite, atendidos no Hospital Couto Maia - Salvador/BA, sugerindo a ocorrência de surto pelo sorotipo 14 não-susceptível à penicilina nos meses de maio à agosto de 1996.

5.4 Tipagem Molecular

5.4.1 PCR BOX A fingerprinting

5.4.1.1 Amostras isoladas de pacientes com meningite pneumocócica

O método de PCR *fingerprinting* foi avaliado através da análise do teste de variabilidade aplicado a amostra ATCC 49619, a qual foi testada em mais de vinte experimentos e demonstrou o mesmo número e variabilidade de bandas (resultados não demonstrados). Como testes para controles negativos foram feitas reações sem adição de extrato de DNA das amostras em cada experimento. Quando o teste foi realizado com outras bactérias, não houve amplificação dos elemento BOX A para

Staphylococcus aureus, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*. Para o *Streptococcus mitis* houve amplificação mas o padrão foi diferente daquele observado entre as amostras de pneumococos isoladas em Salvador, ou em outras cidades e outros países, assim como para a amostras ATCC 49619 (**Fig. 8**).

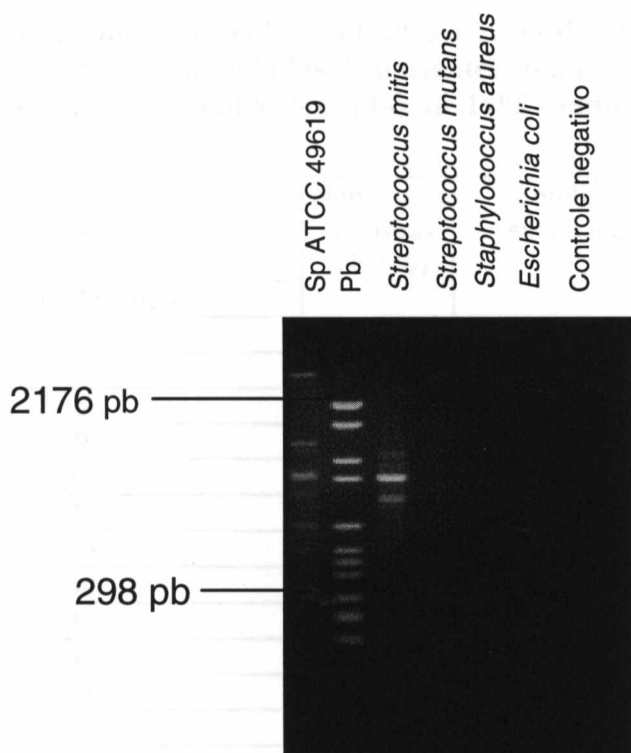


Figura 8: Padrões obtidos com a reação da PCR BOX A para outras bactérias, que não *S. pneumoniae*.

Pb = N^o de pares de base - DNA VI (154 - 2176 pb)

Amostras isoladas de hemoculturas foram obtidas de oito pacientes, e a tipagem empregando o método de PCR BOX A demonstrou padrões semelhantes as das amostras de líquido. Os resultados das amostras de seis destes pacientes estão demonstrados nas **Figuras 9 e 12**.

O método da PCR -BOX A permitiu a identificação de 95 padrões dentre as

149 amostras analisadas. Foram identificados 14 padrões idênticos, mesmo número e posição de bandas para 68/149 (45,6%) amostras, enquanto que 81/149 (54,4%) amostras apresentaram padrões singulares (**Tab. 8**). Os padrões idênticos foram formados pelos sorotipos 3, 14, 6B, 8, 6A, 23F, 9V, 9N, 10A 17F e 15B (**Tab. 9**).

Tabela 8. Frequência dos padrões obtidos através de PCR BOX A, entre as amostras de *S. pneumoniae* isoladas de pacientes com meningite no Hospital Couto Maia – Salvador/BA, entre dezembro de 1995 e outubro de 1997.

Padrões de Genotipagem	Número de Amostras (N=149)	Sorotipo envolvido (%)	PNS* (%)	TPM/SMX** NS (%)
Padrões Idênticos				
1	9	14 (100)	9 (100)	9 (100)
3	5	14 (100)	5 (100)	5 (100)
5	2	14 (100)	0 (0)	1 (50)
9	7	6B (100)	5 (71)	6 (85,7)
12	5	6B (40), 6A (60)	0 (0)	2 (40)
22	2	23F (100)	1(50)	2 (100)
25	2	23F (100)	0 (0)	2 (100)
40	2	9V (100)	0 (0)	1 (50)
41	2	9N (100)	0 (0)	1 (50)
44	17	3 (100)	0 (0)	0 (0)
48	8	8 (89), 20 (11)	0 (0)	0 (0)
79	3	10A (100)	0 (0)	0 (0)
80	2	17F (100)	0 (0)	0 (0)
84	2	15B (100)	0 (0)	2 (100)
Padrões não idênticos	71	-	4 (5,6)	30 (20)

* PNS = não-susceptível à penicilina

**TMP/SMX NS = não-susceptível à trimetoprim/sulfametoxazol

Tabela 9. Características das amostras de *S. pneumoniae* apresentando padrões idênticos isoladas de pacientes com meningite no Hospital Couto Maia – Salvador/BA, no período de 12/95 a 10/97

Amostra	Padrão PCR	Padrão PFGE	Sorotipo	Origem	Penicilina		TMP/SMX**
					CIM*	Sens	Sens
JJA	1	A2	14	Tanquinho	0,19	NS	R
11A	1	A1	14	Santa Cruz	0,125	NS	R
19A	1	A3	14	Salvador - NI	0,125	NS	NS
44A	1	A1	14	Feria de Santana	0,19	NS	NS
69A	1	A4	14	Alto de Terezinha	0,125	NS	R
82A1	1	A1	14	Pero Vaz	0,125	NS	R
103A	1	A1	14	Faz Coutos	0,125	NS	R
122A	1	A3	14	Conceição de Feira	0,19	NS	R
124A	1	A5	14	NI	0,125	NS	R
22A	3	A1	14	Catú	0,19	NS	R
32A	3	A1	14	Nova Sussuarana	0,19	NS	R
42A	3	A1	14	Federação	0,19	NS	R
55A	3	A1	14	Faz. Grande II	0,25	NS	R
80A1	3	A1	14	Itinga	0,125	NS	R
58A	5	D	14	Vencesiau Guimarães	ND	S	R
81A	5	F1	14	Paripe	ND	S	S
5A	9	ND	6B	Sussuarana	0,5	NS	NS
12A	9	R	6B	Cosme de Farias	0,094	S	R
13A	9	S1	6B	Jacobina	0,25	NS	R
23A	9	S2	6B	Faz. Grande	0,25	NS	R
60A	9	ND	6B	Itapuã	0,047	S	R
79A	9	ND	6B	Mata de São João	0,25	NS	R
118A	9	ND	6B	Inhambupe	0,19	NS	S
68A	12	ND	6B	Acajutiba	ND	S	S
74A	12	ND	6B	Mata Escura	0,064	S	S
LJL	12	ND	6A	Lauro de Freitas	ND	S	S
111A	12	ND	6A	Candeias	ND	S	R
127A	12	ND	6A	Marechal Rondon	ND	S	R
ANS	22	G	23F	Camaçari	ND	S*	R
40A	22	ND	23F	Itapuã	1	NS	R
47A	25	I	23F	Faz. Coutos	ND	S	NS
88A	25	ND	23F	Amélia Rodrigues	ND	S	R
35A	40	ND	9V	Rio Sena	ND	S	S
41A	40	ND	9V	Simões Filho	ND	S	R
25A	41	ND	9N	Queimadas	ND	S	NS
128A	41	ND	9N	Pero Vaz	ND	S	S

Tabela 9. Características das amostras de *S. pneumoniae* apresentando padrões idênticos isoladas de pacientes com meningite no Hospital Couto Maia – Salvador/BA, no período de 12/95 a 10/97 (continuação)

Amostra	Padrão PCR	Padrão PFGE	Sorotipo	Origem	Penicilina		TMP/SMX**
					CIM	Sens	Sens
CHBP	44	ND	3	Itapuã	ND	S	S
#4A	44	ND	3	Nova Esperança	ND	S	S
7A	44	ND	3	Saboeiro	ND	S	S
15A	44	ND	3	Amélia Rodrigues	ND	S	S
48A	44	ND	3	Salvador-NI	ND	S	S
70A	44	ND	3	Santo Estevão	ND	S	S
37A	44	ND	3	Ipirá	ND	S	S
72A	44	ND	3	Federação	ND	S	S
76A1	44	ND	3	Cabula	ND	S	S
85A	44	ND	3	Pernambués	ND	S	S
91A	44	ND	3	Brejões	ND	S	S
92A	44	ND	3	Paripe	ND	S	S
98A	44	ND	3	Araci	ND	S	S
101A	44	ND	3	Alagoinhas	ND	S	S
108A	44	ND	3	Santa Luz	ND	S	S
109A	44	ND	3	Faz. Grande II	ND	S	S
120A	44	ND	3	Conceição de Coité	ND	S	S
AMO	48	ND	8	Ipirá	ND	S	S
*RNTPN	48	ND	8	NI	ND	S	S
46A	48	ND	8	Nova Soure	ND	S	S
61A	48	ND	8	Dias D'Avila	ND	S	S
67A	48	ND	8	Lauro de Freitas	ND	S	S
110A	48	ND	8	Caixa D'agua	ND	S	S
113A	48	ND	8	Liberdade	ND	S	S
84A	48	ND	20	NI	ND	S	S
116A	79	ND	10A	Castro Alves	ND	S	S
126A	79	ND	10A	Nova Brasília	ND	S	S
131A	79	ND	10A	Acajutlba	ND	S	S
49A	80	ND	17F	Feira de Santana	ND	S	S
78A	80	ND	17F	Alagoinhas	ND	S	S
BBL	84	ND	15B	Maragojipe	ND	S	R
63A	84	ND	15B	Feira de Santana	ND	S	R

*CIM = concentração inibitória mínima determinada pelo método de E-teste

** TMP/SMX = trimetoprim/sulfametoxazol – susceptibilidade determinada pelo método de difusão de disco

ND = não determinado

Entre as 20 amostras do sorotipo 14 foram determinados oito padrões, sendo que as amostras não-susceptíveis à penicilina (14/20) apresentaram dois padrões, um compreendendo nove amostras e o outro compreendendo cinco amostras. A

diferença observada entre estes dois padrões foi \leq três bandas, enquanto que as amostras susceptíveis (6/20) apresentaram padrões singulares (**Fig. 9**).

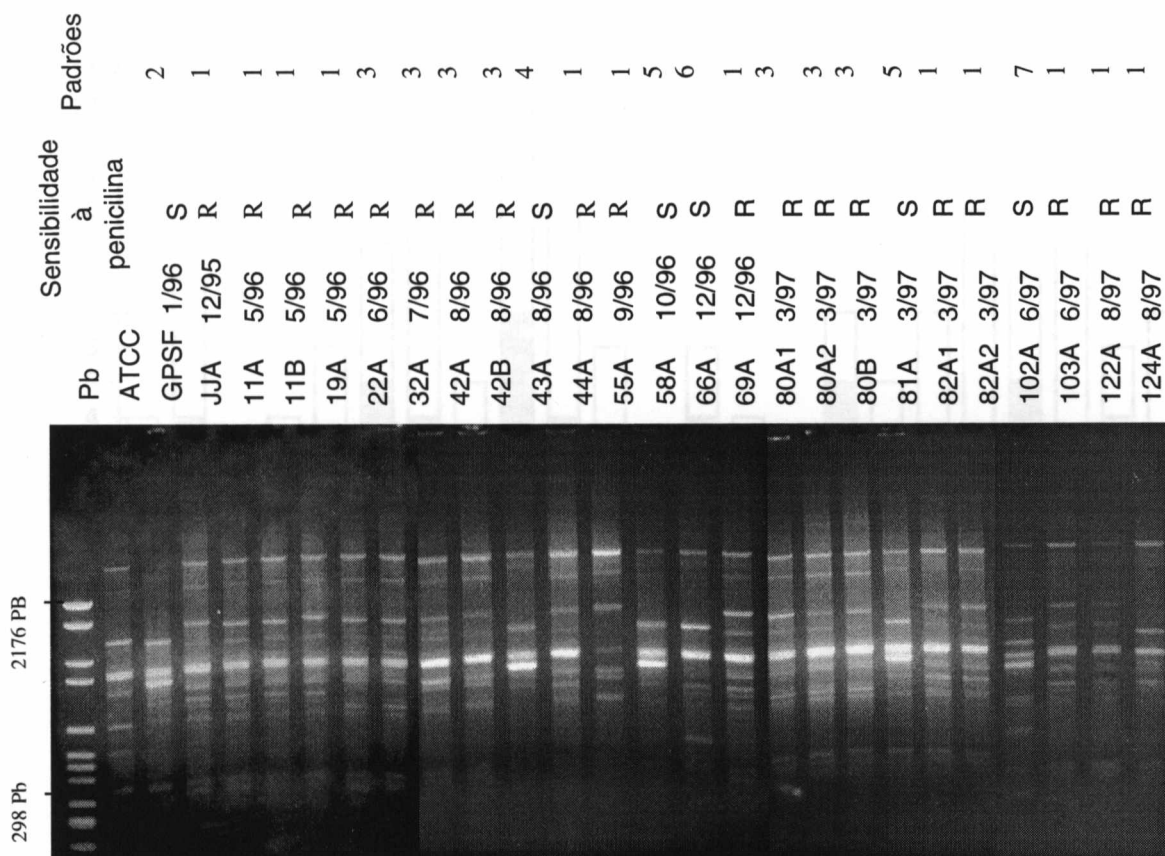


Figura 9: Padrões da PCR BOX A entre as amostras de sorotipo 14 isoladas de pacientes com meningite pneumocócica no Hospital Couto Maia no período de Dezembro/95 à Outubro/97 - Salvador/BA.

A= Amostras isoladas de líquido
 B= Amostras isoladas de sangue
 ATCC= Amostra padrão nº 49619
 R= Não-susceptível, S= susceptível
 Pb = Nº de pares de base DNA VI (154 - 2176 pb)

Foi observada uma aglomeração temporal dos padrões de PCR BOX A para as amostras de sorotipo 14 não-susceptíveis à penicilina entre os meses de maio à agosto de 1996 (**Fig. 10**).

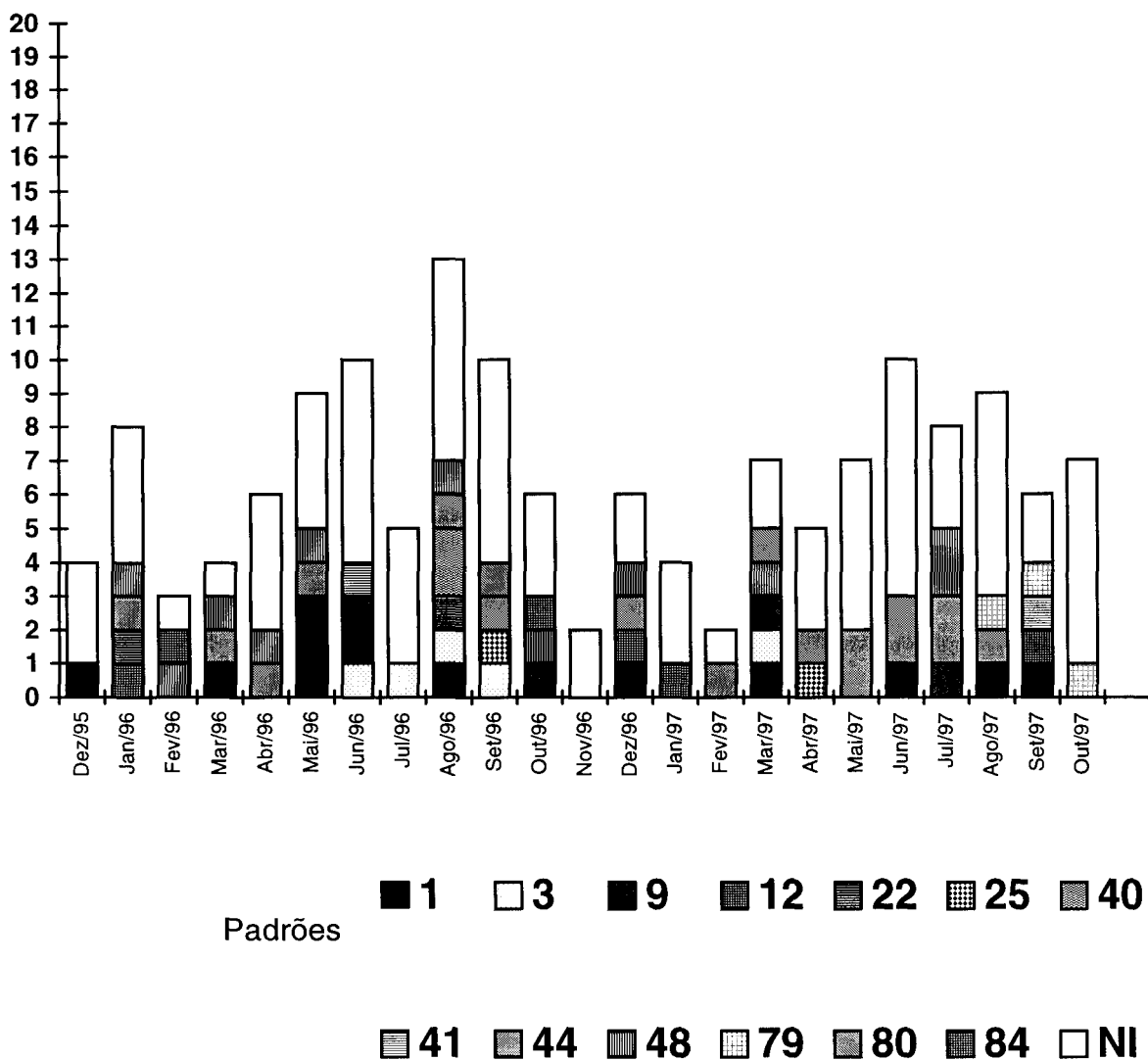


Figura 10. Distribuição temporal dos padrões de PCR BOX A de *S. pneumoniae* isolados de pacientes com meningite pneumocócica no Hospital Couto Maia - Salvador/BA. Dezembro/1995 a outubro de 1997

Entre as 21 amostras do sorotipo 3 foram determinados 4 padrões, um padrão correspondente a 17 amostras, e três outros correspondentes a uma amostra cada (**Fig. 11**). As 17 amostras do sorotipo 6B foram distribuídas em quatro padrões de PCR BOX A, sendo um com sete amostras, dois com duas amostras, e seis com padrões singulares (**Fig. 12**). Todas as amostras do sorotipo 8 (7) apresentaram padrões idênticos (não mostrado); os sorotipos 6A, 23F, 9V, 9N, 10A 17F e 15B

também apresentaram um único padrão para duas ou mais amostras (não mostrado).

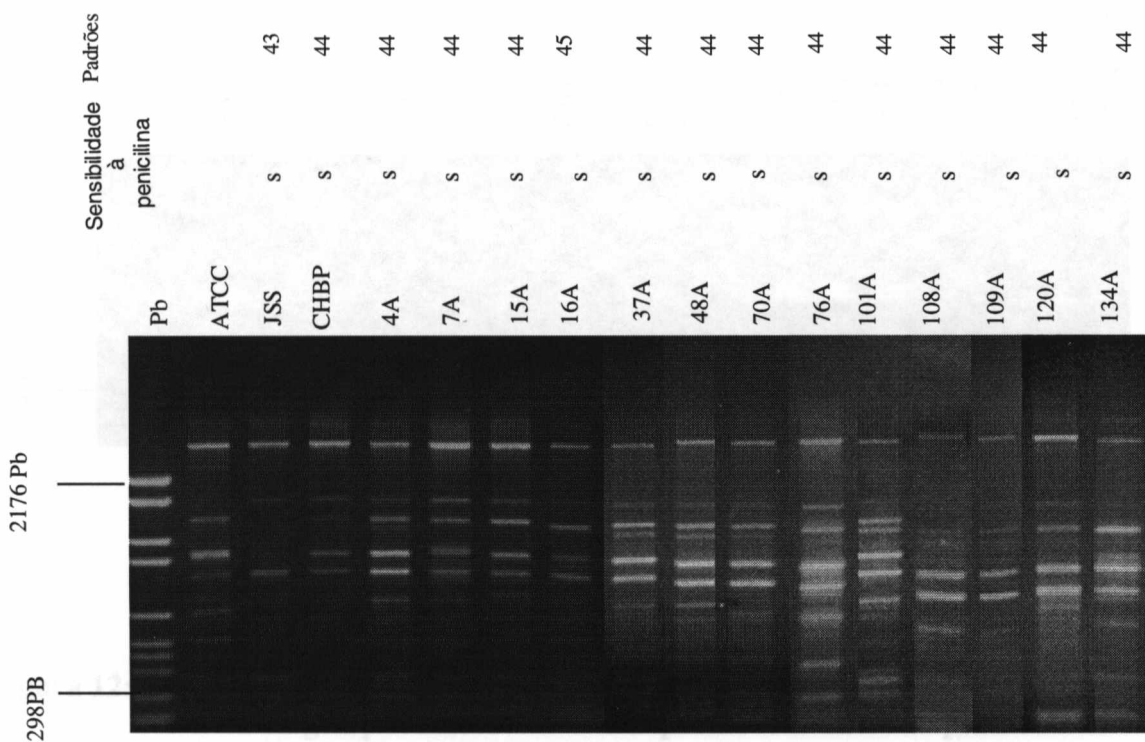


Figura 11: Padrões de PCR BOX A das amostras do sorotipo 3 isolados de pacientes com meningite pneumocócica no Hospital Couto Maia entre dezembro/95 à outubro/97.

Pb = Nº de pares de base DNA VI (154 - 2176 pb) / S = sensível

ATCC = cepa padrão nº 49619/ JSS e CHBP são iniciais dos pacientes que não receberam número.

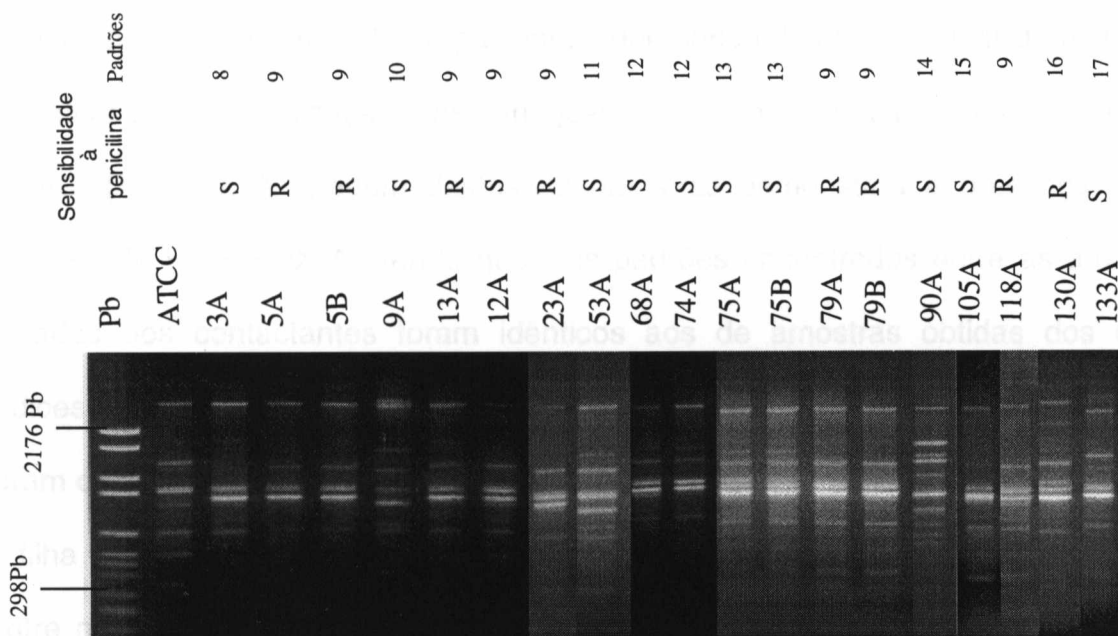


Figura 12: Padrões de PCR BOX A entre amostras do sorotipo 6B isoladas de pacientes com meningite pneumocócica no Hospital Couto Maia no período de Dezembro/95 à Outubro/97 - Salvador/BA.

PB = N^o de pares de base DNA VI (154 - 2176 pb) / S = sensível / R= resistente
 ATCC = cepa padrão n^o 49619/ A= amostras de líquido/ B= amostras de sangue

Foram observados padrões idênticos para amostras com diferentes sorotipos.

Três amostras do sorotipo 6A apresentaram padrões de PCR idênticos aos observados para duas amostras do sorotipo 6B e uma amostra do sorotipo 20 teve o mesmo padrão genético observado para as amostras do sorotipo 8 (não demonstrado).

5.4.1.2 Amostras isoladas dos contactantes domiciliares de pacientes com meningite pneumocócica

Durante o estudo foi realizada coleta de swab de nasofaringe de 40

contactantes domiciliares de 16 pacientes, que concordaram participar do estudo. A prevalência de colonização nasofaringeana entre os contactantes foi de 67,5% (27/40) (**Tab. 8**). A tipagem destas 27 amostras demonstrou a presença de 22 padrões de PCR BOX A, sendo que seis padrões encontrados entre as amostras isoladas dos contactantes foram idênticos aos de amostras obtidas dos casos índices - pacientes (**Fig. 13, Tab. 10**). Esses resultados indicam que as mães foram os contactantes para os pacientes 35A, 51A, 62A, e 68A, enquanto que a tia e a filha foram os contactantes para os pacientes 110A e 136A, respectivamente. Entre nove contactantes de quatro pacientes foi observado a presença de quatro padrões de PCR BOX A idênticos enquanto que padrões singulares foram observados para 12 contactantes (**Tab. 10**).

Tabela 10. Características de amostras de *S. pneumoniae* isoladas de contactantes domiciliares de pacientes com meningite pneumocócica no Hospital Couto Maia-Salvador/BA entre dezembro de 1995 e outubro de 1997

Caso Índice				Contactantes					
N.º de Estudo (N=16)	Sen. à Penicilina	Sorotipo da Amostra	Total de Contactantes	Total de Contactantes testados (N=40)	Isolamento de Pneumococos (%) (N=27)	PNR Nº (%)	Res. à TMP/SMX. Nº(%)	Padrões idênticos c/ Caso Índice	Padrões Idêntico c/ outros contactante
30A	S	3	22	10	4 (40)	2 (50)	2 (50)	-	3
35A	S	9V	5	1	1 (100)	0(0)	1 (100)	1	-
47A	S	23F	4	4	3 (75)	0(0)	0(0)	-	2
51A	S	17B	5	4	4 (100)	0(0)	1 (25)	1	2
54A	S	4	3	3	3 (100)	0(0)	1 (33)	-	2
59A	S	19F	3	3	2 (66)	0(0)	0(0)	-	-
62A	S	18C	3	1	1 (100)	0(0)	0(0)	1	-
68A	S	6B	13	1	1 (100)	0(0)	0(0)	1	-
69A	R	14	5	1	1 (100)	1 (100)	0(0)	-	-
110A	S	8	3	3	1 (66)	0(0)	0(0)	1	-
114A	S	23F	1	1	1 (100)	0(0)	0(0)	-	-
119A	S	6A	5	1	1 (100)	0(0)	0(0)	-	-
128A	S	9N	3	3	1 (33)	0(0)	1 (100)	-	-
133A	S	6B	4	2	1 (50)	0(0)	0(0)	-	-
134A	S	3	12	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	-	-
136A	S	23B	2	1	1 (100)	0(0)	0(0)	1	-

Obs. Foram coletados swabs nasofaríngeanos dos contactantes de 29 pacientes. As culturas de 13 foram negativas. Total de swabs = 69 / Padrões determinados pela técnica de PCR

PNR = não-sensível à penicilina/TMP/SMX= trimetoprim/sulfametoxazol

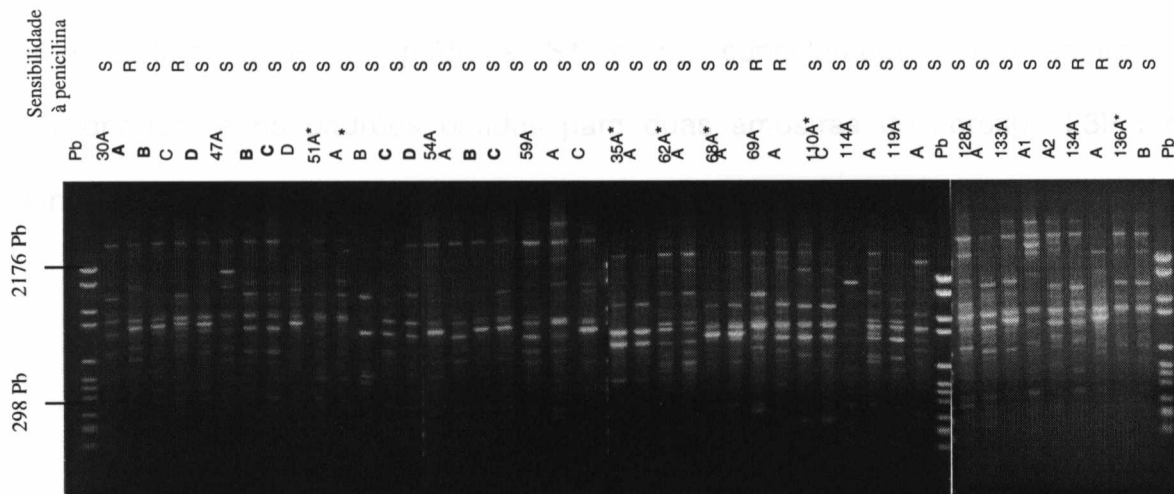


Figura 13. Padrões de PCR BOX A de amostras de *S. pneumoniae* isoladas dos contactantes domiciliares de pacientes com meningite pneumocócica no Hospital Couto Maia no período de dezembro/95 a outubro/97 - Salvador/BA.

Pb = N^o de pares de base DNA VI (154 - 2176 pb) / S = sensível / R= resistente

Os pacientes estão representados por números e os contactantes estão representados por letras

* Padrões idênticos entre paciente e contactante/** padrões idênticos entre contactantes em negrito

5.4.2 Eletroforese de campo pulsado

A técnica de eletroforese de campo pulsado foi aplicada para as 20 amostras de sorotipo 14 (**Fig. 14A**) e para alguns dos sorotipos 6B (4), 19A (1), 19F (2), 23B (2) e 23F(4) (**Fig. 14B**). As amostras do sorotipo 14 apresentaram - se distribuídas em seis diferentes padrões de PFGE, sendo um padrão encontrado entre as amostras não-susceptíveis e cinco entre as amostras susceptíveis à penicilina. (**Tab. 9**). Das amostras do sorotipo 14 não-susceptíveis à penicilina, nove foram classificadas como idênticas (perfil A1) e cinco como relacionadas (perfis A2, A3, A4 e A5). As seis amostras susceptíveis apresentaram perfis diversificados (perfis B, C, D, E, F1 e F2), entre as quais apenas dois F1 e F2 foram consideradas como relacionadas.

As 13 amostras de outros sorotipos tipadas por este método demonstraram 11 diferentes perfis. Sendo que os perfis obtidos para duas amostras do sorotipo 6B

foram determinados os padrões S1 e S2 considerados como estritamente relacionados, e os padrões obtidos para duas amostras do sorotipo 23F foram idênticos (Fig. 14B).

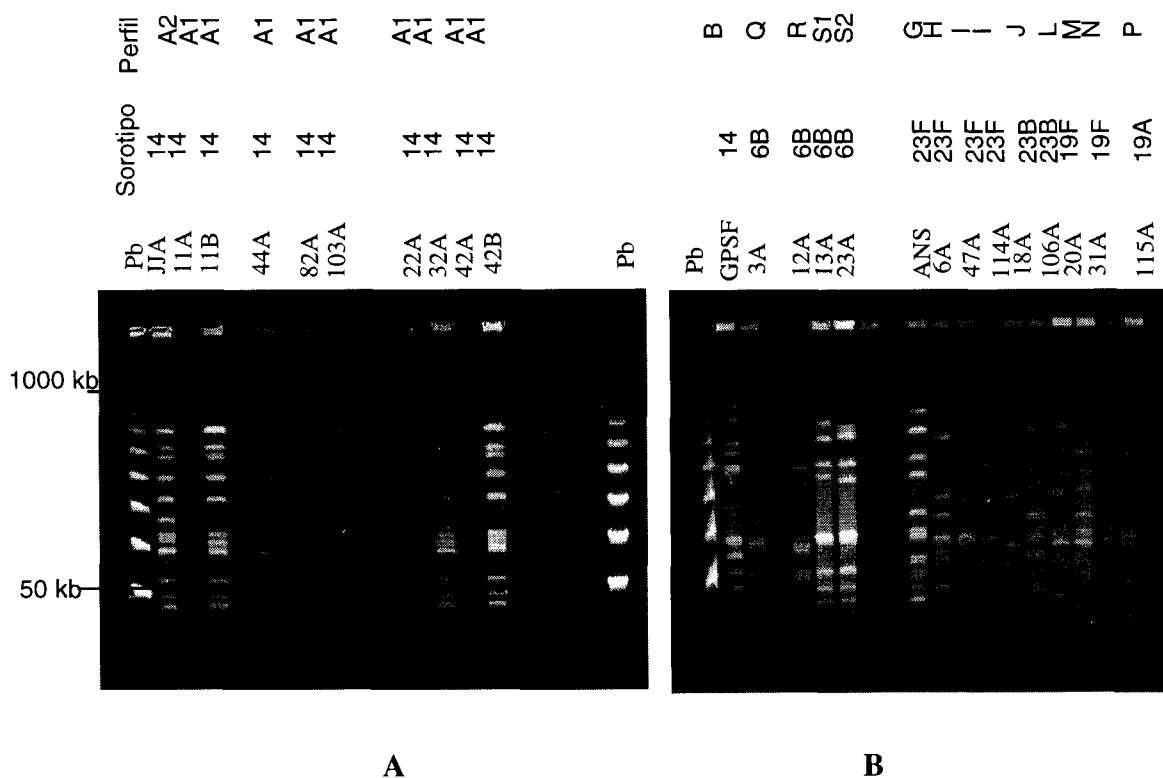


Figura 14. Perfis de PFGE entre as amostras de *S pneumoniae* do sorotipo 14 (A) e outros sorotipos (B) isoladas de pacientes com meningite pneumocócica no Hospital Couto Maia de Dez/95 a Out/97 - Salvador/BA

Pb= N° de pares de base (Sigma) 50 - 1000 Kb

6 DISCUSSÃO

No período entre dezembro de 1995 à outubro de 1997 foram identificados 149 casos de meningite pneumocócica, destes 24 (16,1%) casos foram isolados amostras de pneumococos não susceptíveis à penicilina (CIM 0,1 - 1,0 µg/ml) pelo método do E-teste. Nenhum paciente teve meningite pneumocócica resistente à penicilina (CIM > 1,0 µg/ml). Estes achados são similares aos encontrados por Sessegolo e cols., (1994) em estudo de 288 amostras clínicas, isoladas no período de 1988 à 1992, nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, com prevalência de 17,9% de amostras não-susceptíveis à penicilina. Em outro trabalho realizado por Levin e cols., (1996), com análise de 50 amostras obtidas de pacientes do Hospital das Clínicas em São Paulo no período de julho à dezembro de 1991 foi observado uma prevalência de 24% de amostras não-susceptíveis à penicilina.

Considerando que a história de resistência à penicilina por pneumococos no Brasil teve início em 1988 com a descrição do primeiro caso clínico (Marques e cols., 1988) a prevalência de casos clínicos com amostras de pneumococos não-susceptíveis à penicilina deve ser considerada alta quando comparada com outros países, como Espanha (46%) (Fenoll e cols., 1991) e África do Sul (40%) (Friedland & McCracken, 1994), cujos primeiros relatos de resistência datam de 30 anos atrás (Austrian, 1994).

Os dados acima chama atenção para a importância de se avaliar o papel da penicilina no tratamento das meningites pneumocócicas. As pneumonias e bacteremias causadas por pneumococos, com baixos níveis de resistência à penicilina podem, em geral, serem tratadas com altas doses de penicilina (150.000 - 200.000U/kg) (Pallares e cols., 1995), ao contrário do que ocorre nestas infecções,

altas doses de penicilina podem não ser adequadas ao tratamento das meningites pneumocócicas.

Estudos relativos ao esquema de tratamento experimental de meningite pneumocócica com penicilina demonstraram resultados insatisfatórios (McCracken e cols., 1984), embora Viladrich e cols.,(1988) tenha demonstrado que três pacientes com meningite pneumocócica com CIM de 0,25 à 0,5 $\mu\text{g/ml}$ responderam a terapia com altas doses de penicilina. Este mesmo autor, descreve que a terapia alternativa com cefalosporinas de terceira geração, como a cefotaxima ou ceftriaxona, confere melhores resultados e deve ser preferível para o tratamento de meningite pneumocócica com amostras apresentando moderada resistência à penicilina (CIM 0,12 - 1,0 $\mu\text{g/ml}$).

A resistência à cefotaxima não foi encontrada no presente estudo, mas foi descrita na Espanha (Paliare e cols.,1995) e na África do Sul (Klugman, 1995). No Brasil foram detectadas duas amostras com reduzida sensibilidade à cefalosporinas por Sessegolo (1994), sendo uma isolada em Ribeirão Preto/SP e a outra no Rio de Janeiro/RJ, o que chama a atenção para a possibilidade deste tipo de resistência também ocorrer em Salvador, considerando que o mecanismo de resistência às cefalosporinas de terceira geração envolve os mesmos mecanismos de resistência à penicilina, mais especificamente alterações das PBPs **2X** e **1A** (Muñoz e cols., 1993).

Portanto, a terapia alternativa para meningite pneumocócica com cefalosporinas deve ser mantida sob vigilância devido a demonstração de falhas observadas no tratamento dos casos com resistência a este antimicrobiano (Friedland e cols., 1993). Embora os pneumococos não-susceptíveis à penicilina sejam sensíveis à vancomicina, seu uso no tratamento de meningite pneumocócica

é abordado com precauções devido a menor penetração deste antibiótico na barreira hemato-encefálica (Viladrich e cols, 1991).

Durante o período deste estudo não foi observada tendência para aumento das CIMs para penicilina. Este fato, pode ser atribuído ao curto período do estudo não permitindo identificar um possível aumento. Uma outra explicação é que os casos de meningite pneumocócica não-susceptíveis à penicilina que ocorreram em Salvador são devidos à presença de clones resistentes circulantes na comunidade.

A importância de se utilizar um método que determine a concentração inibitória mínima de penicilina para amostras de *Streptococcus pneumoniae* se deve ao fato de que o teste em que se emprega o disco de oxacilina, para detecção de amostras resistentes à penicilina, não ajuda a discriminar entre amostras não-susceptíveis (CIM 0,12 - 1,0 µg/ml) e resistentes (CIM > 2,0 µg/ml) à penicilina (Swenson e cols., 1986). Embora seja 100% sensível, discrepâncias entre este método e o de microdiluição em caldo foram encontradas neste e em outros estudos (Klugman, 1994; Swenson, 1986).

Neste estudo, o índice de amostras falso-positivas, ou seja, cujos halos ao redor do disco foram < 20 mm, indicando resistência à penicilina, posteriormente não confirmada pela determinação da concentração inibitória mínima foi de 23,5% (8/34). No entanto, cabe salientar, que os valores de CIM iguais a 0,062 µg/ml foram encontrados para todas as oito amostras, e como esse valor representa o último nível considerado como indicativo de sensibilidade à penicilina. Isto poderia indicar a existência de amostras dentro de um nível de transição, de sensíveis para relativamente resistentes à penicilina, que não podem ser detectadas, com segurança, pelo teste do disco de oxacilina.

Neste trabalho, também foi utilizada uma nova metodologia de determinação

da concentração inibitória mínima de antimicrobianos, o E - teste, que vem sendo avaliado para *S. pneumoniae* (Jorgensen e cols., 1994). A experiência adquirida com este método e os resultados obtidos concordam com a opinião de Jorgensen e cols., (1994) e Skulnick e cols. (1995), ao indicá-lo como o teste de mais simples execução disponível atualmente para a determinação da concentração inibitória mínima, além de ser altamente reprodutível e de fácil interpretação.

Embora este teste possa ser aplicado para vários antimicrobianos, no presente trabalho limitou-se ao uso do mesmo para determinação de concentração inibitória mínima de penicilina e cefotaxima. O uso combinado do E - teste com a triagem com disco de oxacilina resultou numa sensibilidade de 94,4% e uma especificidade de 98,8%, índices similares ao da literatura.

Embora diferenças tenham sido observadas, o uso combinado do E - teste com o teste de oxacilina representa uma alternativa adequada aos sistemas de vigilância de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina. O método de E-teste é simples, de fácil execução e baixo custo, em comparação com a metodologia de microdiluição em caldo.

A resistência a outros antimicrobianos também foi encontrada em nosso estudo. A resistência a eritromicina e cloranfenicol somente foi observada entre amostras sensíveis à penicilina e em poucas amostras, concordando com o fato de que a resistência a esses antimicrobianos ainda permanece em baixos níveis em todo o mundo (Klugman, 1990 ; Fenoll e cols., 1991).

Os índices de resistência detectados para o TMP/SMX (41%) e a tetraciclina (30%), foram os mais altos entre as amostras deste estudo, incluindo-se nessas percentagens, amostras com níveis intermediários de resistência. Índices elevados de resistência à tetraciclina também foram observados em outros estudos

(Sessegolo e cols., 1994; Klugman, 1990), e parecem ser correlacionados com o fácil acesso da população a estes antimicrobianos.

A associação de resistência entre penicilina e TMP/SMX foi encontrada em 19,5% (29/149) das amostras analisadas pelo método do disco, concordando com estudos realizados na Espanha e na África do Sul (Klugman, 1990). No Brasil, estudos anteriores descreveram aumento da taxa de resistência ao TMP/SMX de 1% em 1988 para 30% em 1994, mas não relataram a associação de resistência com penicilina (Teixeira e cols., 1988; Sessegolo e cols., 1994).

Entre as amostras isoladas em Salvador a associação de resistência a penicilina e ao TMP/SMX parece estar relacionada a alguns clones estando presente em amostras pertencentes a três padrões genéticos, sendo dois padrões do sorotipo 14 nos quais todas as amostras (14) são não-susceptíveis à penicilina e TMP/SMX e a um padrão do sorotipo 6B, compreendendo seis amostras com associação de resistência. Os achados deste estudo demonstraram que esta associação representa um sério problema para o sistema público de saúde, porque o TMP/SMX está entre as drogas de escolha para o tratamento da otite média aguda, uma das infecções pneumocócicas mais comuns e prevalentes em crianças menores de dois anos de idade (Poole, 1995).

Este achado indica que a pressão antibiótica pode ter contribuído para a seleção de cepas resistentes na comunidade, evidenciado pelo encontro de dois marcadores fenotípicos associados ao mesmo. Estudos adicionais em relação ao comportamento de *S. pneumoniae* frente ao TMP/SMX devem ser realizados, pois a difusão da resistência a esse antimicrobiano, já detectada em outras partes do mundo (Klugman, 1990), também ocorre em nosso meio.

A prevalência dos sorotipos nos casos de meningite pneumocócica não teve

diferenças significativas dos encontrados em outros estudos brasileiros (Sessegolo e cols., 1994; Brandileone e cols., 1995), sendo encontrados em comum os sorotipos 14, 6B, 19F, 23F e 6A. Algumas diferenças são observadas com relação apenas ao percentual encontrado de cada sorotipo, por exemplo o sorotipo 5, um dos mais comumente encontrados em casos de meningite pneumocócica (Sessegolo e cols., 1994) não teve uma importância significativa em nossas amostras, representando apenas 1,3% dos casos. Um outro sorotipo importante, mas com pouca frequência nos estudos brasileiros foi o sorotipo 3 que representou apenas 5,1% dos casos de meningite em São Paulo (Brandileone e cols., 1995), entretanto, no presente estudo foi o mais freqüentemente encontrado (14%). Com relação aos outros sorotipos a frequência de isolados não teve variações significativas.

A resistência à penicilina tem sido associada a mais de 20 sorotipos diferentes (Klugman, 1990), sendo que CIM maior que 1,0 µg/ml tem sido associada particularmente aos sorotipos 6, 14, 15 19 e 23 (Fenoll e cols., 1991). No Brasil os sorotipos 6B, 35A, 23F, 19A, 19F e 9N foram os mais freqüentemente associados com não susceptibilidade à penicilina, seguidos pelos sorotipos 14, 18C, 4, 11A, 3, 1 e 6A. No presente estudo somente os sorotipos 14 (14), 6B (6), 19A (1), 19F (1), 23B (1) e 23F (1) foram associados à não susceptibilidade à penicilina. Esta diferença de padrão com relação aos outros estudos se deve provavelmente ao tipo de infecção pneumocócica analisada, que neste estudo foi apenas a meningite, enquanto os outros estudos (Fenoll e cols., 1991; Sessegolo e cols., 1995; Brandileone e cols., 1995), analisaram amostras clínicas de diferentes focos de infecção.

Esforços consideráveis foram direcionados nos últimos anos para a produção de uma vacina eficiente contra as doenças pneumocócicas. A antigenicidade do

polissacarídeo capsular dos pneumococos tem relevantes implicações no desenvolvimento de vacinas. A vacina atualmente licenciada, Pneumovax 23 ou *23 valent*, formulada com base nos estudos de sorogrupos predominantes em pacientes da Europa e América do Norte consiste de 23 tipos de polissacarídeos pneumocócicos (Hirshmann & Lipsky, 1994). Esta vacina está sendo avaliada desde os anos 80 e tem provocado controvérsias concernentes a sua eficácia. Deste modo a vacina não é recomendada para crianças < 2 anos ou adultos > 65 anos de idade, devido a sua relativa ineficiência em estimular memória imunológica; não oferece cobertura nas infecções causadas por outros sorotipos capsulares; promove competição antigênica na mesma preparação e não impede o estado de portador (Hirshmann & Lipsky, 1994).

Dos 37 sorotipos encontrados neste estudo, 19 estão presentes na vacina *23-valent*, correspondendo a 79% (118/149) do total das amostras. No entanto, esta vacina potencialmente não resolve o problema de meningite pneumocócica em Salvador, porque 44% dos casos estudados foram em crianças menores de 2 anos de idade, faixa etária na qual ela é ineficiente, pois não estimula memória imunológica (Hirshmann & Lipsky, 1994). Outras alternativas tem sido adotadas para o desenvolvimento de vacinas pneumocócicas mais imunogênicas e capazes de induzir resposta nos indivíduos em extremos de idade. Dentre as propostas mais promissoras estão as vacinas protéicas conjugadas a toxina diftérica, mutante não-tóxica - (CRM 197), a qual está em teste na Finlândia e EUA (Ahman e cols., 1996) e a conjugada ao toxóide tetânico (Laferrière e cols., 1997). Uma outra proposta é a vacinação pré-natal em teste em Bangladesh, onde espera-se que o anticorpo materno responda pela imunidade na infância (A pneumococcal, 1996). A proposta é que se desenvolva uma vacina universal, contendo antígenos de sete a doze

sorotipos mais freqüentes em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Ahman e cols., 1996).

Dos casos de meningite pneumocócica devidos ao sorotipo 14, a maioria, (90%) ocorreu em crianças menores de 2 anos de idade, e associação de resistência à penicilina e TMP/SMX estava presente em todas as amostras relacionadas a esses casos. Uma outra característica importante com relação as amostras deste sorotipo foi a aglomeração dos casos nos meses de maio a agosto de 1996, sugerindo que este sorotipo é um dos fatores responsáveis pela emergência de meningite pneumocócica não-susceptível à penicilina na Bahia.

A tipagem através de PCR BOX A identificou dois padrões genéticos entre as amostras do sorotipo 14 não-susceptíveis à penicilina, o padrão 1 com nove amostras indistinguíveis, e o padrão 3 com 5 amostras também indistinguíveis. A diferença entre estes padrões foi \leq que 3 bandas. Isto sugere uma disseminação clonal do sorotipo 14 não-susceptível à penicilina na Bahia. Estes resultados foram concordantes com aqueles obtidos pelo método de eletroforese de campo pulsado que permitiu a identificação de apenas um clone entre as amostras do sorotipo 14, não-susceptível à penicilina conforme classificação de acordo com os critérios estabelecidos por Tenover e cols., (1995). Os perfis de PFGE dessas amostras foram idênticos em 64% (9/14) ou relacionadas 36% (5/14); ou seja os perfis de bandas tinham diferenças ocorridas por alterações consistentes com um simples evento genético, como por exemplo: mutação de ponto ou por inserção ou deleção de DNA. Cada alteração desta, tipicamente resulta na presença de duas ou três bandas diferentes, confirmando a hipótese de disseminação clonal do sorotipo 14 não-susceptível à penicilina na Bahia.

O método da PCR BOX A permitiu a identificação de quatro padrões

genéticos entre as amostras responsáveis por 80% (20/25) dos casos de meningite pneumocócica não-susceptível à penicilina. Dois padrões genéticos do sorotipo 14 descritos acima, um perfil do sorotipo 6B com cinco amostras e um perfil do sorotipo 23F com duas amostras. O padrão 9 representado por amostras do sorotipo 6B teve cinco amostras não sensíveis à penicilina e duas amostras com CIM de 0,062 µg/ml último limite da faixa de sensibilidade à penicilina. Um outro perfil importante foi o 44 formado por 81%(17/21) das amostras do sorotipo 3.

Fatores relacionados à virulência poderiam explicar este fenômeno de elevada clonalidade entre as amostras do sorotipo 3, que para manter sua virulência mantêm uma estabilidade genética, conforme evidenciado pelo padrão singular do *fingerprinting* dos elementos do BOX A.

A alta prevalência de colonização nasofaríngea 67,5%(27/40) por pneumococos em contactantes domiciliares dos pacientes com meningite pneumocócica, associada à presença de padrões genéticos idênticos entre pacientes e contactantes (6/27) e entre os próprios contactantes (4/27), indica que fatores epidemiológicos estão implicados na transmissão, bem como a manutenção de determinados clones dentro da comunidade.

O método da PCR BOX A , já utilizado em outros estudos (Rodriguez-Barradas e cols., 1997), demonstrou ser eficaz em estudos de epidemiologia molecular definindo bem os agrupamentos de cepas não-susceptíveis à penicilina. Este método é mais rápido, fácil e econômico em comparação com a eletroforese de campo pulsado, e pode ser aplicado em nossa comunidade.

Os elementos BOX presentes no genoma de *S. pneumoniae* descritos por Martin e cols.,(1992) não tem função claramente definida. Algumas hipóteses foram levantadas de que eles representam domínios regulatórios do DNA, possivelmente

controlando competência específica dos genes relacionados a virulência dos pneumococos (Belkum e cois., 1996).

A predominância de clones (padrões genéticos idênticos) entre as amostras isoladas de casos de meningite pneumocócica em Salvador - Bahia coloca algumas questões importantes a respeito de relação epidemiológica e virulência destas amostras de pneumococos. A presença de clones em aglomerados temporais e a alta taxa de colonização nasofaringeana fornecem dados para estudos futuros sobre os mecanismos moleculares envolvidos na emergência de resistência à penicilina, os quais são indicativos da ocorrência de eventos de mutação de ponto e consequentemente seleção natural dentro da comunidade. Com base nestes dados obtidos a partir de estudo populacional também é interessante investigar diferenças de virulência entre amostras de pneumococos, principalmente do sorotipo 14.

Finalmente, os dados deste trabalho e de outros citados na literatura contribuem para a identificação de fenômenos relacionados a emergência de pneumococos resistentes à penicilina, a gravidade do problema, para definição de vacinas a serem utilizadas e podem ainda, contribuir para definição de política de Saúde Pública e avanço do conhecimento científico.

7 CONCLUSÕES

1. A freqüência de isolamento de amostras de *S. pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina a partir de pacientes com meningite pneumocócica no Hospital Couto Maia- Salvador - Bahia entre dezembro de 1995 e outubro de 1997, foi de 16,1%;
2. Todas as amostras foram sensíveis à cefotaxima, rifampicina, e vancomicina;
3. A multiresistência somente foi observada em quatro amostras, envolvendo os sorotipos 14, 6B e 19F. Os antibióticos relacionados foram penicilina, tetraciclina TMP/SMX e eritromicina;
4. Foi evidenciada a ocorrência de surto de meningite pneumocócica causada por amostras do sorotipo 14 não-susceptíveis à penicilina durante o período do estudo;
5. Os resultados da tipagem molecular, empregando os métodos de PCR e de PFGE indicaram a disseminação de um clone prevalente na comunidade;
6. Idade inferior a 2 anos e uso prévio de antibióticos foram os fatores de risco mais fortemente associados a aquisição de meningite pneumocócica causada por amostras não-susceptíveis à penicilina;
7. Dos sorotipos envolvidos nos casos de meningite pneumocócica, 80% estão representados na vacina pneumocócica *23-valent*;
8. Fatores epidemiológicos, como aglomeração temporal de clones não-susceptíveis à penicilina poderiam ser melhor entendidos através de estudos sobre o mecanismo molecular envolvidos na emergência de resistência à penicilina.
9. Estudos sobre virulência destas amostras poderiam explicar a predominância de clones na comunidade.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAN, H.; TAMMINEN, P.; VUORELA, A.; MALINOSKI, F.; ESKOLA, J. Pentavalent pneumococcal oligosaccharide conjugate vaccine PncCRM is well-tolerated and able to induce an antibody response in infants. **Pediat. Infect. Dis. J.**, **15**: 2, 134-39, 1996.
- ALLEN, K.D. Penicillin resistant pneumococci. **J. Hosp. Infect.**, **17**: 3-13, 1991.
- APPELBAUM, P.C. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. **Clin. Infect. Dis.**, **15**: 77-83, 1992.
- AUSTRIAN, R. Confronting drug-resistant pneumococci. **Ann. Intern. Med.**, **121**: 807-08, 1994.
- BAHIA. Secretaria da Saúde. Departamento de Vigilância da Saúde. *Meningites*. Salvador, 1996. p.1-4.
- BARNES, D.M.; WHITTIER, S.; GILIGAN, P. H.; SOARES, S.; TOMASZ, A.; & HENDERSON, F.W. Transmission of multidrug-resistant serotype 23F *Streptococcus pneumoniae* in group day care: evidence suggesting capsular transformation of the resistant strain in vivo. **J. Infect. Dis.**, **171**: 890-96, 1995.
- BELKUN, A. van; SLUIJTER, M.; GROOT, R.; VERBRUGH, H.; & HERMANS, W.M. Novel BOX Repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. **J. Clin. Microbiol.**, **34**: 1176-79, 1996.
- BENDER, J.B.; HEDBERG, C.W.; BESSER, J.M.; BOXRUD, D.J.; MACDONALD, K.L.; & OSTERHOLM, M.T. Surveillance for *Escherichia coli* O157:H7 infections in Minnesota by molecular subtyping. **New Engl. J. Med.**, **337**: 388-94, 1997.
- BRANDILEONE, M.C.C.; VIEIRA, V.S.D.; ZANELLA, R.C.; LANDGRAF, I.M.; MELLES, C.E.A; TAUNAY, A.E.; MORAES, J.C.; & AUSTRIAN, R. Distribution of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive infections over a 16-year period in the greater São Paulo area, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 2789-91, 1995.
- BRICKS, L. F. & LEONE C. Utilização de medicamentos por crianças atendidas em creches. **Rev. Saúde Pública**, **30**: (6), 527 - 35, 1996.
- BUTLER, J.C.; HOFMANN, J.; CETRON, M.S. ELLIOTT, J.A.; FACKLAM, R.R.; & BREIMAN, R.F. The continued emergence of drug resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States: An update from the Centers for Disease Control and Prevention's pneumococcal sentinel surveillance system. **J. Infect. Dis.**, **174**: 986-93, 1996.
- CAMPOS, J. A., OLIVEIRA, J.S., COSTA, D.M., & MACHADO, C.D. Prescrição de medicamentos por balconistas de 72 farmácias de Belo Horizonte/MG em Maio de 1983. **Jornal de Pediatria**, **59**: (3), 307-12, 1985.

- CAPUTO, G.M.; APPELBAUM, P.C.; & LIU, H.H. Infections due to penicillin-resistant pneumococci: clinical, epidemiologic and microbiologic features. **Arch. Intern. Med.**, **153**: 1301-10, 1993.
- CHAPIN, K. Clinical Microscopy. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. 6. ed. Washington: ASM Press, 1995. Sect.1, Cap.4, p. 33-51.
- CHERIAN, T.; STEINHOFF, M.C.; HARRISON, L.H.; ROHNY, D.; McDOUGAL, L.K.; & DICK, J. A cluster of invasive pneumococcal disease in young children in child care. **JAMA**, **271**: 695-97, 1994.
- COFFEY, T.J.; DOWSON, C.G.; DANIELS, M.; ZHOU, J.; MARTIN, C.; SPRATT, G. & MUSSER, J.M. Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. **Mol. Microbiol.**, **5**: 2255-60, 1991.
- COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**, **257**: 1050-55, 1992.
- CUNDEL, D.; MASURE, H.R.; & TUOMANEN, E.I. The molecular basis of pneumococcal infection: A Hypothesis. **Clin. Infect. Dis.**, **21**: S204-12, 1995. Supl.3.
- CUNHA, S.S. **Epidemia de meningite em Salvador: Detecção e Controle**. Salvador, 1996. 74p. Dissertação (Mestrado em Saúde Comunitária) - Instituto de Saúde Coletiva, UFBA, 1996.
- DILLARD, J.P.; VANDERSA, M.W.; & YOTHER, J. Characterization of the cassette containing genes for type 3 capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. **J. Exp. Med.**, **181**: 973-83, 1995.
- DOERN, G.V. Susceptibility tests of fastidious bacteria. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. *Manual of Clinical Microbiology*. 6.ed. Washington: ASM Press, 1995. Sect.10, Cap.114, p.1342-49.
- DOWSON, C.G.; HUTCHISON, A.; BRANNIGAN, J.A.; GEORGE, R.C.; HANSMAN, D.; LINARES, J.; TOMASZ, A.; SMITH, J.M.; & SPRATT, B.G. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**: 8842-46, 1989.
- ERICSSON, H.; EKLOW, A.; DANIELSSON-THAM, M.L.; LONCAREVIC, S.; MENTZING, L.O.; PERSSON, I.; UNNERSTAND, H.; & THAM, W. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 2904-07, 1997.

- ERTUGRUL, N.; RODRIGUEZ-BARRADAS, M.C.; MUSHER, D.M.; RYAN, M.A.; AGIN, C.S.; MURPHY, S.J.; SHAYEGANI, M.; & WATSON, D.A. BOX - polymerase chain reaction - based DNA analysis of nonserotypeable *Streptococcus pneumoniae* implicated in outbreaks of conjunctivitis. **J. Infect. Dis.**, **176**: 1401-5, 1997.
- FENOLL, A.; BOURGON, C.M.; MUÑOZ, R.; VICIOSO, D.; & CASAL, J. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1988. **Rev. Infect. Dis.**, **13**: 56-60, 1991.
- FERONI, A.; NGUYEN, L.; GEHANNO, P.; BOUCOT, I.; & BERCHE, P. Clonal distribution of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* 23F in France. **J. Clin. Microbiol.**, **34**: 2702-12, 1996.
- FORBES, A. B. & GRANATO, A. P. Processing specimens for bacteria. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. *Manual of Clinical Microbiology*. 6.ed. Washington: ASM Press, 1995. Sect. 5, Cap.21, p. 265-81.
- FRIEDLAND, I.R. & KLUGMAN, K.P. Failure of cloramphenicol therapy in penicillin-resistant pneumococcal meningitis. **Lancet**, **339**: 405-08, 1992.
- FRIELAND, I.R.; SHELTON, S.; PARIS, M.; RINDERKNECHT, S.; EHRETT, S.; KRISHER, K.; & McCRACKEN, G.H. Dilemmas in diagnosis and management of cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* meningitis. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **12**: 196-200, 1993.
- FRIEDLAND, I.R. & McCRACKEN, G. H. Management of infectious caused by antibiotic - resistant *Streptococcus pneumoniae*. **New. Engl. J. Med.**, **331**: 377-82, 1994.
- GRAY, B.M.; CONVERSE III, G.M. & DILLON Jr, H.C. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: Acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. **J. Infect. Dis.**, **142**: 923-33, 1980.
- GREENE, G.S. & DEMASI, R. Case report: Penicillin-resistant pneumococcal meningitis: Navigating a therapeutic minefield. **Am. J. Med. Sc.**, **311**: 180-85, 1995.
- HALL, R.M. & COLLIS, C.M. Nobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. **Mol. Microbiol.**, **15**: 593-600, 1995.
- HAKENBECK, R.; ELLERBROK, H.; BRIESE, T.; HANDWERGER, S.; & TOMASZ, A. Penicillin-binding proteins of penicillin susceptible and resistant pneumococci: Immunological relatedness of altered proteins and changes in peptides carrying the β -lactam binding site. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **30**: 553-58, 1986.

- HAKENBECK, R.; BRIESE, T.; CHALKLEY, L.; ELLERBROK, H.; LATORRE, C.; LEINONEN, M.; & MARTIN, C. Antigenic variation of penicillin-binding proteins from penicillin resistant clinical strains of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, **164**: 313-19, 1991.
- HAKENBECH, R.; GREBE, T.; KONIG, A.; KRAUB, J.; & REICHMANN, P. The role of penicillin-binding proteins in penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae*. In: FERRETTI, J.J.; GLIMORE, M.S.; KLAENHAMMER, T.R.; BROWN, F. (Eds.) *Genetics of Streptococci, Enterococci and Lactococci*. Dev. Biol. Stand. Basel: Karger, 1995. v. 85 p.115-23.
- HANSMAN, D. & BULLEN, M.M. A resistant pneumococcus[letter]. **Lancet.**, **2**: 264-65, 1967.
- HENDERSON, F.W.; GILLIGAN, P.H.; WAIT, K.; & GOFF, D.A. Nasopharyngeal carriage of antibiotic-resistant pneumococci by children in group day care. **J. Infect. Dis.**, **157**: 256-62, 1988.
- HENRICHSEN, J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 2759-62, 1995.
- HERMANS, P.W.; SLUIJTER, M.; HOOGENBOEZEM, T.; HEERSMA, H.; van BELKUN, A.; & GROOT, R. Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 1606-12, 1995.
- HERMANS, P.W.; SLUIJTER, M.; ELZENAAR, K.; VEEN, A.V.; SCHONKEREN, J.J.M.; NOOREN, F.M.; LEEUWEN, W.J.V.; NEELING, A.J.; KLINGEREN, B.V.; VERBRUGH, H.A.; & GROOT, R. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the Netherlands: Results of a 1-year molecular epidemiologic survey. **J. Infect. Dis.**, **175**: 1413-22, 1997.
- HIRSHMANN, J.V. & LIPSKY, B.A. The pneumococcal vaccine after 15 years of use. **Arch. Intern. Med.**, **154**: 373-77, 1994.
- HOFMANN, J.; CETRON, M.S.; FARLEY, M.M.; BAUGHMAN, W.S.; FACKLAM, R.R.; ELLIOTT, J.A.; DEEVER, K.A.; & BREIMAN, R.F. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. **New. Engl. J. Med.**, **333**: 481-86, 1995.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - Resultado do censo da população de Salvador - Bahia, 1996.
- JOHNSON, A.P.; UTTLEY, N.W.; GEORGE, R.C. Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, **3**: 280-91, 1990.
- JORGENSEN, J.H.; FERRARO, M.J.; McELMEEL, M.L.; SPARGO, J.; SWENSON, J.M.; & TENOVER, F.C. Detection of penicillin and extended-spectrum cephalosporins resistance among *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates by use of the E test. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 159-63, 1994.

- KAYHTY, H. & ESKOLA, J. New vaccines for the prevention of pneumococcal infections. **Emerg. Infect. Dis.**, **2**: 289-98, 1996.
- KELL, C.M.; JORDENS, J.Z.; DANIELS, M.; COFFEY, T.J.; BATES, J.; PAUL, J.; GILKS, C.; & SPRATI, B.G. Molecular epidemiology of penicillin-resistant pneumococci isolated in Nairobi, Kenya. **Infect. Immun.**, **61**: 4382-91, 1993.
- KELLY, T.; DILLARD, J.P.; & YOTHER, J. Effect of genetic switching of capsular type on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, **62**: 1813-18, 1994.
- KISKA, D.L.; KERR, A.; JONES, M.C.; CHAZOTTE, N.N.; ESKRIDGE, B.; MILLER, S.; JORDAN, M.; SHEAFFER, C.; & GILLIGAN, P. Comparison of antimicrobial susceptibility methods for detection of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 229-32, 1995.
- KLUGMAN, K.P. Pneumococcal resistance to antibiotics. **Clin. Microbiol. Rev.**, **3**: 171-96, 1990.
- KLUYTMANS, J.; van LEEUWEN, W.; GOESSENS, W.; HOLLIS, R.; MËSSER, S.; HERWALDT, L.; BRUINING, H.; HECK, M.; ROST, J.; van LEEUWEN, N.; van BELKUM, A.; & VERBRUGH, H. Food-initiated outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* analysed by pheno and genotyping. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 1121-28, 1995.
- KRISHER, K.K. & LINSOTT, A. Comparison of three commercial MIC systems, E-Test, Fastidious antimicrobial susceptibility panel, and FOX fastidious panel, for confirmation of penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 2242-45, 1994.
- KRONENBERGER, C.B.; HOFFMAN, R.E.; LEZOTTE, D.C.; & MARINE, W.M. Invasive penicillin resistant pneumococcal infections: A prevalence and historical cohort study. **Emerg. Infect. Dis.**, **2**: 121-24, 1996.
- LAFERRIÈRE, A.C.; SOOD, R.K.; MUYS, J.M.; MICHON, F. & JENNINGS J.H. The synthesis of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of chain length on immunogenicity. **Vaccine**, **15**: 179-86, 1997.
- LAIBLE, G.; SPRATT, B.G.; & HAKENBECK, R. Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2X genes in penicillin resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Mol. Microbiol.**, **5**: 1993-2002, 1991.
- LAIBLE, G. & HAKENBECK, R. Five independent combinations of mutations can result in low affinity penicillin-binding protein 2X of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, **173**: 6986-90, 1991.
- LEFEVRE, J.C. FAUCON, G.; SICARD, A.M.; & GASC, A.M. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulse-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 2724-28, 1993.

- LEVIN, A.S.S.; TEIXEIRA, L.M.; SESSEGOLO, J.F.; & BARONE, A.A. Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to antimicrobials in São Paulo, Brazil: Clinical features and serotypes. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **38**: 187-92, 1996.
- LINARES, J.; PALLARES, R.; ALONSO, T.; PEREZ, J.L.; AYATS, J. GUDIOL, F.; VILADRICH, P.F. & MARTIN, R. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge hospital, Barcelona, Spain (1979-1990). **Clin. Infect. Dis.**, **15**: 99-105, 1992.
- LOCK, R.A.; PATON, J.C.; & HANSMAN. Purification and immunological characterization of neuraminidase produced by *Streptococcus pneumoniae*. **Microbiol. Pathog.**, **4**: 33-43, 1988.
- MALLOY, P.J. & BRADNA, J.J. Interpretation of aerobic bacterial growth on primary culture media. In: ISENBERG, H.D. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington: ASM Press, 1992. v.1, Sect.1, Cap.1.6, p.1.6.1-1.6.9.
- MAPLE, P.A.C.; HAMILTON, J.M.T.; & BRUMFITT, M.W. World-wide antibiotic resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet ii**: 537-40, 1989.
- MARQUES, H.; YAMAMOTO, M.; SAKANE, P.; CAIAFFA-FILHO, H.H.; & MENDES, C.M.F. Relatively penicillin-resistant pneumococcal meningitis in a Brazilian infant. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **6**: 433-34, 1988.
- MARTIN, B. HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; & CLAVERYS, J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucl. Acids Res.**, **20**: 3479-83, 1992.
- MARTON, A., GULYAS, M., MUNÓZ, R., & TOMASZ, A. Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. **J. Infect. Dis.**, **163**: 542-48, 1991.
- MASCARENHAS, A.V., VILLELA, R., TAVARES-NETO, J. Estimativa do risco da meningoencefalite (MEB) e o local da residência. **R. Soc. Bras. Med. Trop.**, **27**: 414, 1994. Suppl.1.
- McDOUGAL, L.K., FACKLAM, R., REEVES, M., HUNTER, S., SWENSON, J.M., HILL, B.C., TENOVER, F.C. Analysis of multiply antimicrobial-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the United States. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **36**: 2176-84, 1992.
- MONTGOMERY, J.M., LEHMANN, D.; SMITH, T.; MICHAEL, A.; JOSEPH, B.; LUPIWA, T.; COAKLEY, C.; SPOONER, V.; BEST, B.; RILEY, I.D. Bacterial colonization of the upper respiratory tract and its association with acute lower respiratory tract infections in highland children in Papua New Guinea. **Rev. Infect. Dis.**, **12**: S1006-16, 1990. Suppl 8.

- MUNÓZ, R.; COFFEY, T.J.; DANIELS, M.; DOWSON, G.C.; LAIBLE, G.; CASAL, J.; HAKENBECK, R.; MICHAEL, J.; MUSSER, J.M.; SPRATT, B.G.; TOMASZ, A. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, **164**: 302-06, 1991.
- MUNÓZ, R. MUSSER, J.M.; CRAIN, M.; BRILES, D.E.; MARTON, A.; PARKINSOM, A.J.; SORENSEM, U.; TOMASZ, A. Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. **Clin. Infect. Dis.**, **15**: 112-18, 1993.
- MUSHER, D.M. Infectious caused by *Streptococcus pneumoniae*: Clinical spectrum, Pathogenesis, Immunity, and Treatment. **Clin. Infect. Dis.**, **14**: 801-07, 1992.
- NATIONAL Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, fifth edition. Approved standard. M2-A5. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993a.
- NATIONAL Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, third edition. Approved standard. M7-A3. Viilanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993b.
- NATIONAL Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests, M100-S5. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1994.
- NIEMANN, S.; RUSCH-GERDES, S.; RICHTER, E. IS6110 fingerprinting of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany durng 1995. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 3015-20, 1997.
- PALLARES, R.; LINARES, J.; VADILLO, M.; CABELLOS, C.; MANRESA, F.; VILADRICH, P.F.; MARTIN, R.; GUDIOLI, F. Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, spain. **New Engl. J. Med.**, **333**: 8474- 80, 1995.
- PFALLER, M. A. Typing methods for epidemiologic investigation. In: BALOWS, A.; HANSLER JUNIOR, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHADOMY, H.J. (Ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. 5.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. p.171-82.
- A PNEUMOCOCCAL vaccine to save children of all ages nears final testing. **CVI Forum**, (13): 3-11, 1996.
- POOLE, M.D. Otitis media complications and treatment failures: implications of pneumococcal resistance. **J. Infect. Dis.**, **14**: S23-6, 1995.
- PUOHINIEMI, R.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. Molecular epidemiology of two international sprout-borne *Salmonella* outbreaks. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 2487-91, 1997.

- RADEMAKER, J.L.W. & BRUIJN, F.J. Characterization and classification of microbes by REP - PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: G. ANOLLÉS, C. & GRESSHOFF, P.M. *DNA markers: Protocols, Applications and Overviews*. J. Wiley & Sons, Inc., 1997. In press.
- REICHLER, M.R.; ALLPHIN, A.A.; BREIMAN, R.F.; SCHREIBER, J.R.; ARNOLD, J.E.; McDOUGAL, L.K.; FACKLAM, R.R.; BOXERBAUM, B.; MAY, D.; WALTON, R.O.; HACOBS, M.R. The Spread of multiply resistant *Streptococcus pneumoniae* at a day care center in Ohio. **J. Infect. Dis.**, **166**: 1346-53, 1992.
- RODRIGUEZ - BARRADAS, M.C.; THARAPEL, R.A.; GROOVER, J.E.; GIRON, K.P.; LACKE, C.E.; HOUSTON, E.D.; HAMILL, R.J.; STEINOFF, M.C.; MUSHER, D.M. Colonization by *Streptococcus pneumoniae* among human immunodeficiency virus-infected adults: Prevalence of antibiotic resistance, impact of immunization, and characterization by polymerase chain reaction with BOX primers of isolates from persistent *S. pneumoniae* carriers. **J. Infect. Dis.**, **175**: 590-97, 1997.
- ROSNER, B.A. *Fundamentals of Biostatistics*. Belmont: Wordsworth Publishing Company, 1994.
- RUOFF, K.L. *Streptococcus*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. *Manual of Clinical Microbiology*. 6.ed. Washington: ASM Press, 1995. Sect. 5, Cap.23, p.299-307.
- SALYERS, A.A. & WHITT, D.D. *Streptococcus pneumoniae* In: *Bacterial Pathogenesis. A molecular Approach*. ASM Press, 1994. Cap.27, p.322-31. local?
- SCOTT, J.A.G.; HALL, A.J.; DAGAN, R.; DIXON, J.M.S.; EYKYN, S.J.; FENOLL, A.; HORTAL, M.; JETTÉ, L.P.; JORGENSEN, J.H.; LAMOTHE, F.; LATORRE, C.; MACFARLANE, J.T.; SHLAES, D.M.; SMART, L.E.; TAUNAY, A. Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: Associations with age, sex, and geograpy in 7,000 episodes of invasive disease. **Clin. Infect. Dis.**, **22**: 973-81, 1996.
- SELANDER, R.K.; CAUGANT, D.A.; OCHAMAN, H.; MUSSER, J.M.; GILMOUR, M.N.; WHITTAM, T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl. Environ. Microbiol.**, **51**: 873-84, 1986.
- SESSEGOLO, J.F.; LEVIN, A.S.S.; LEVY, C.E.; ASENI, M.; FACKLAM, R.R.; TEIXEIRA, L.M. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolate in Brazil from 1988 to 1992. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 906-11, 1994.
- SIBOLD, C.; WANG, J.; HENRICHSEN, J.; HACKENBAECK, R. Genetic relationships of penicillin-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated on different continents. **Infect. Immun.**, **60**: 4119-26, 1992.

- SKULNICK, M.; SMALL, G.W.; LO, P.; PATEL, M.P.; PORTER, C.R.; LOW, D.E.; MATSUMURA, S. MAZZULLI, T. Evaluation of accuracy and reproducibility of E test for susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin, cefotaxime and ceftriaxone. **J. Clin. Microbiol.**; **33**: 2334-37,1995.
- SOARES, S.; KRISTINSSON, K.G.; MUSSER, J.M.; TOMASZ, A. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. **J. Infect. Dis.**, **168**: 158-63, 1993.
- SWENSON, J.M.B.; HILL, B.C.; THORNSBERRY, C. Screening pneumococci for penicillin resistance. **J. Clin. Microbiol.**, **24**: 749-52, 1986.
- TEIXEIRA, L.M.; ANDRADE, J.R.C.; LOURENÇO, N.J. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **R. Microbiol. São Paulo**, **19**: 93-4, 1988.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELESEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 2233-39, 1995.
- TENOVER, F.C.; BAKER, C.N.; SWENSON, J.M. Evaluation of commercial methods for determining antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, **34**: 10-14, 1996.
- TOMASZ, A. The pneumococcos at the gates. **New Engl. J. Med.**, **333**: 514-15, 1995.
- TOMASZ, A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Clin. Infect. Dis.**, **24**: S85-8,1997.
- VERSALOVIC, J.T.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting bacterial genomes. **Nucl. Acids Res.**, **19**: 6823-31, 1991.
- VERSALOVIC, J.T.; KAPUR, V.; MASON, JUNIOR.; SHAH, U.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. MUSSER, J.M. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains recovered Houston: Identification and molecular characterization of multiple clones. **J. Infect. Dis.**, **167**: 850-56, 1993.
- VERSALOVIC, J.T.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F.J.; & LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods Mol. Cell. Biol.**, **5**:25-40, 1994.
- VILADRICH, P.F.; GUDIOL, F. LINÁRES, J.; RUFÍ, G.; ARIZA, J.; PALLARES, R. characteristics and antibiotic of adult meningitis due to penicillin-resistant pneumococci. **Am. J. Med.**, **84**: 839-46,1988.
- WATSON,D.A.; MUSER, D.M.; VERHOEF, J. Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **14**: 479-90, 1995.

WILLETT, H.P. *Streptococcus pneumoniae* In: JOKLLIK, W.K.; WILLETT, H.P.; AMOS, B.; WILFERT, C.M.; *Zinsser Microbiology*. 20.ed. Califórnia/Connecticut: Appleton & Lange, 1992. Sec 3, Cap.25, p.432-42.

ZIGHELBOIM, S. & TOMASZ, A. Multiple antibiotic resistance in South African strains of *Streptococcus pneumoniae*: Mechanism of resistance to β -lactam antibiotics. **Rev. Infect. Dis.**, 3: 267-76, 1981.

9 ANEXOS

ANEXO I:

Termo de Consentimento

Eu, _____, portador de Doc. de Identidade _____ em pleno goza das minhas faculdades mentais dou consentimento para minha participação, como voluntário, no estudo da Emergência da resistência à penicilina em *Streptococcus pneumoniae* e seu impacto na meningite pneumocócica em Salvador, Bahia.

Eu tive a oportunidade de perguntar questões referentes a este estudo de investigação. Todos as questões foram respondidas para minha total e completa satisfação. Caso eu tenha qualquer outra questão referente ao estudo ou aos meus direitos humanos, devo contatar o presidente da Comissão Ética Médica do Hospital Couto Maia. Entendo que a minha participação neste estudo é voluntária, se eu escolher não participar deste estudo serei acompanhado por um médico e receberei tratamento apropriado.

Salvador _____

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____

Nome do responsável: _____

Assinatura do responsável: _____

Nome da testemunha/médico: _____

Assinatura da testemunha/médico: _____

NOTA: Quando o paciente não tiver condições de responder por seus atos, o termo será apresentado para o responsável pelo mesmo.

ANEXO II:

**QUESTIONÁRIO DO ESTUDO DE MENINGITE PNEUMOCÓCICA NO
HOSPITAL COUTO MAIA**

I. Identificação do Paciente:

1. Número de identificação do estudo {ie}:
2. Número de identificação do SMB {smb}:
3. Número de identificação do hospital {idr}:
4. Data da admissão {da}:

II. Identificação Microbiológica:

7. Coloração de Gram positiva {dgc}:
8. Látex positivo {lat}:
9. Líquor positivo para *S. pneumoniae* (1=s, 0=n) {cp}:
10. Hemocultura foi positiva para *S. pneumoniae* {hp}:
11. Amostra resistente ou sensível à penicilina (0=S, 1=I, 2=R) {sen}:
12. Sorogrupo da amostra {sor}:
13. Sorotipo da amostra {sort}:

III. Entrevista

1. Entrevistado ou revisão do prontuário {en}:
(1 = entrevistado, 2 = revisão do prontuário)

IV. Dados Demográficos

- 1-a. Idade em anos (se menos que 1 ano, coloque 0) {ano}:
- b. Se menos que 2 anos, idade do paciente em meses {mês}:
- c. Se menos que 1 mês, idade do paciente em dias {dia}:
2. Sexo (1=M, 0=F, 9=ns) {sx}:
- 3a. Procedência (1=Salvador ou 0=Interior): {sal}
- Se mora em Salvador qual bairro: {bairro} _____
- Qual distrito sanitário: {dsa} _____
- Se mora no Interior qual cidade: {Interior} _____
4. Naturalidade (1=capital, 0=interior, 8=nsa) {pr}: -

5. Estado Civil {ec}:
 1=solteiro(a) 2=casado(a) 3=viuvo(a)
 4=divorciado(a) 5=separado(a)

6. Grupo Racial {rc}:
 1=branco 2=mulato 3=negro

7. Paciente esta empregado (1=s,0=n,8=nsa,9=ns) {emp}:

8. Paciente esta estudando (1=s,0=n,8=nsa,9=ns) {est}:

9. Paciente vai a creche (1=s,0=n,8=nsa,9=ns) {cre}:

V. INÍCIO DOS SINTOMAS

1. Quando começou doença {qcd}

2. Febre {feb1}

3. Dor de cabeça {dc1}

4. Confusão Mental {cm1}

5. Sonolência {son1}

6. Inconsciência {inc1}

7. Convulsões {cv1}

8. Rigidez de nuca {rn1}

9. Náusea/vômito {nv1}

Para Crianças

10. Irritabilidade {ir1}

11. Não aceitando a dieta {nad1}

VI. ANTECEDENTES MÉDICOS

1. Fontes da Infecção de Meningite: Doença - (1=s,0=n,8=nsa,9=ns)

a. Pneumonia {pn}

b. Otite Media {om}

c. Sinusite {sa}

d. Sepsis ou bacteremia {sb}

e. Endocardite {end}

f. Abscesso {ab}

g. Traumatismo cefálico {tr}

h. Fratura craniana {fr}

i. IRA {ira}

j. Outro {of}

2. Doenças Anteriores

a. O paciente apresenta alguma doença crônica (1=s,0=n) {ci}:

Doença (1=s,0=n,8=nsa,9=ns)

b. Diabetes/Hiperglicemia {db}

c. Anemia falciforme {af}

d. Hepatopatia {hc}

- e. Esplenectomia {spl}
- f. Câncer {ca}
- g. Alcoolismo {al}
- h. ICC {chf}
- i. Doença Pulmonar Crônica {copd}
- j. Doença Autoimune {dai}
- k. Infecção por HIV {hiv}
- l. Deficiência Nutricional {nu}
- m. Otite media {otm}
- n. Sinusite {sin}
- o. Pneumonia recorrente {pnr}
- p. IVAS {rpn}

VII. HISTÓRIA DE HOSPITALIZAÇÕES ANTERIORES (1=s,0=n,8=nsa,9=ns)

- 1 - a. História de hospitalização nos últimos 6 meses {phm}:
 b. último ano {pha}:
- 2 - a. Número de hospitalizações nos últimos 6 meses {nhm}:
 b. no último ano {nha}: --
3. História de infecção hospitalar no último ano {ni}:
4. Paciente foi internado no UTI durante o ano passado {uti}:
5. Paciente recebeu antibióticos no hospital durante o ano passado {aph}:

VIII. ANTIBIÓTICOS

(1=s,0=n,8=nsa,9=ns)

1. Paciente usou antibióticos durante último mês {am}:
2. Paciente usou antibióticos nos últimos 6 meses {ai}:
3. Paciente usou antibióticos no último ano {aa}:
4. Usou "benzetacil intramuscular" {bz}:
5. Quantas episódios de uso de antibióticos durante o ano passado {ae}:
6. Se usou antibióticos no ano passado, ele recebeu de (1=s,0=n,8=nsa,9=ns):
- a. hospital {ah}
- b. centro/posto de saúde {ac}
- c. clinica/cons privada {acl}
- d. farmácia {afr}
- e. família/amigos {afa}:
- f. outro local {aol}

IX. INFORMAÇÃO SOBRE OS CONTACTANTES

2. Renda familiar mensal (salários mínimos) {ms}:
3. Tipo de residência {res}:
 1 = casa de alvenaria/bloco 4 = apartamento
 2 = casa de madeira 5 = não tem
 3 = casa de taipa 6 = outro tipo
4. Quantas pessoas moram na casa {qp}:
5. Quantos cômodos tem a casa {qc}:
6. Quantos quartos tem a casa {qq}:
7. Quantas camas tem a casa {ql}:
- 8a. Quantos pessoas dormem no mesmo quarto do paciente {mq}:
- b. Paciente dorme com quantas pessoas na cama (1=s,0=n,8=nsa,9=ns) {do}:
- 9a. Quantas crianças menores que 10 anos moram na casa {cra}:
- b. Quantas crianças menores que 2 anos {crb}:
- c. Quantas crianças menores que 5 anos {crc}:
10. Quantas crianças vão a creche {crch}:
11. Quantas crianças vão a escola (99=ns) {esc}:
 (1=s, 0=n, 8=nsa, 9=ns)
12. Pcte/Moradores da casa trabalham com crianças {fc}:
13. Pcte/Moradores da casa trabalham como doméstica {fe}:
14. Pcte/Moradores da casa trabalham como babá {fb}:
15. Pcte/Moradores da casa trabalham em creche {chcw}:
16. Pcte/Moradores da casa trabalham na área de saúde {hcw}:
17. Pcte/Morador da casa tomou antibióticos nos últimos 6 meses {mta}:
18. Pcte/Morador da casa esteve hospitalizado nos últimos 6 meses {mho}:
19. Pcte/Morador da casa teve nos últimos 6 meses:
- a. otite {mot}
- b. IRA ou sinusite {msin}
- c. pneumonia {mpne}
20. Paciente/Morador esteve nas forças armadas 6 meses passados {mil}:
21. Paciente/Morador esteve na prisão nos últimos 6 meses {pri}:

22. História de viagens nos últimos 6 meses – Paciente e Moradores da casa

- a. viagem fora da cidade da residência {pvc}: {fvc}
- b. se mora no interior, viagem para Salvador {pvs}: {fvs}
- c. viagem para fora do estado {pve}: {fve}

23. Se paciente é criança menor que 5 anos de idade, quem toma conta dele durante o dia {tc}:

- 1 = mãe 5 = outro morador da casa -
 2 = pai 6 = vizinho
 3 = irmãos 7 = baba
 4 = avo 8 = não se aplica

X. APRESENTACAO CLÍNICA

1. Se paciente tem menos que 2 anos, peso dele {kg}:
2. Se paciente tem menos que 2 anos, altura dele {cms}:
3. Paciente estava consciente na admissão {pco}:
4. Sensório do paciente {msp}:
5. Se criança menor que 2 anos, sensório do paciente {msc}:

XI. INFORMACAO LABORATORIAL NA ADMISSÃO.

1. HemoGrama foi feito nas primeiras 24h (1=s,0=n,9=ns){hem} :
2. Contagem de leucócitos (em milhares) {hgneu}
3. LeucoGrama diferencial:
- a. PMNs {hgpmn}
- b. Linfócitos {hglin}
- c. Monócitos {hgmon}
- d. Bastões {hgbas}
4. Dados do Líquor:
- a. Prejudicada (1=s,0=n) {prej}
- b. Contagem de leucócitos {lleu}
- c. Hemácias (1=s,0=n) {lhem}
- d. Maior que 50% de PMN (1=s,0=n){lpmn}
- e. Glicose (mg/dl) {gli}
- f. Proteína (mg/dl) {prot}

XII. TRATAMENTO DO PACIENTE

1. Esquema inicial inclui:
- a. penicilina {ipcn}
- b. cloranfenicol {iclo}
- c. ceftriaxona (rocefina) {ictx}

- d. ceftazidina {ictz}
2. Para os casos que não começaram com o ceftriaxona (rocefina),
foi incluída depois: {dctx}
3. Resultados do teste de sensibilidade
foram recebidos antes que alta ou óbito: {rr} -
4. Depois desse resultados: {dabx} 1=mantida sem ceftriaxona
2=mantida com ceftriaxona
3=mudada sem ceftriaxona
4=mudada com ceftriaxona
8=nsa

XIII. EVOLUÇÃO CLÍNICA: ALTA FINAL

2. Data da alta: ___/___/___ {fdal}
3. Tipo de alta: {ftal}
- 1=curado 2=transferido 3=outro diagnóstico
4=obito 9=ns
4. Dias internados no HCM: {fdi}
5. Dias internados na UTI do HCM: {futi}
6. Convulsões durante internamento (1=s,0=n,8=nsa,9=ns){fcvd}

XIV. COLONIZAÇÃO NASOFARINGEANA DOS CONTACTANTES

1. Quantos contactantes tem: {tcon}
2. Quantos contactantes foram obtidos swabs: {tswb} {pswb}
3. Quantos desses foram positivos para S.p.: {tspn} {pspn}
4. Quantos dos positivos foram resistente: {três} {pres}

XV. Genotipagem

1. Perfil: {pfge}
2. Perfil: {pcr}

ANEXO III:**FICHA DE DADOS DAS AMOSTRAS DE *S. pneumoniae*****I. Identificação do Paciente**

1. No. do paciente no estudo {enm}: |_|_|_|_|_|_|
2. No. do hospital {idr}: |_|_|_|_|_|_|
3. Data de admissão {da}: |_|/|_|/|_|

II. Dados de Microbiologia

1. No. da cultura estudada {nce}: |_|_|_|_|
2. Tipo de cultura (1=liquor, 2=hemo) {tc}: |_|

III. Confirmação

1. Teste de optoquina sensível (1=sim, 0=nao) {osen}: |_|
2. Bile solubilidade (1=sim, 0=nao) {bsen}: |_|
3. Confirmação de *S. pneumoniae* (1=s, 0=n) {conf}: |_|
4. Contaminação (1=sim, 0=nao) {cont}: |_|

IV. Sensibilidade pelo Teste Kirby-Bauer

	Zona(mm)	Sensibilidade (R, I, S, U=não sabe)
1. Oxacilina {oxa}	_____	_
2. Ceftizoxima {czx}:	_____	_
3. Cloranfenicol {clo}:	_____	_
4. Tetraciclina {tet}:	_____	_
5. Eritromicina {eri}:	_____	_
6. Clindamicina {cli}:	_____	_
7. Vancomicina {van}:	_____	_
8. Rifampicina {rif}:	_____	_
9. TMP/SMX {bac}:	_____	_
10. Diâmetro da zona de oxacilina foi menos que 20mm (1=s,0=n) {zoxa}: _		

V. Ensaio do E-test

- a. Penicilina G MIC {epen}: _____
 b. Penicilina G Sensibilidade (R,I,S) {epens}: |__|
 c. Cefotaxima MIC {ecef}: _____
 d. Cefotaxima Sensibilidade (R,I,S) {ecefs}: |__|

VI. Sorotipagem

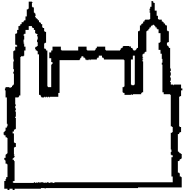
1. Sorogrupo do isolado (se não tem, coloque 99=ns) {sor}: |__|__|
 2. Sorotipo do isolado {sort}: |__|__|__|

VI. Ensaio de Microdiluição de Caldo

- a. Penicilina G MIC {mpen}: |__|__|__|__|
 b. Penicilina G Sensibilidade (R,I,S) {mpens}: |__|
 c. Cefotaxima MIC {mcef}: |__|__|__|__|
 d. Cefotaxima Sens {mcefs}: |__|
 e. Cloranfenicol MIC {mclo}: |__|__|__|__|
 f. Cloranfenicol Sens {mclos}: |__|
 g. Tetraciclina MIC {mtet}: |__|__|__|__|
 h. Tetraciclina Sens {mtets}: |__|
 i. Eritromicina MIC {meri}: |__|__|__|__|
 j. Eritromicina Sens {meris}: |__|
 k. Clindamicina MIC {mcli}: |__|__|__|__|
 l. Clindamicina Sens {mclis}: |__|
 m. Vancomicina MIC {mvan}: |__|__|__|__|
 n. Vancomicina Sens {mvans}: |__|
 o. Rifampicina MIC {mrif}: |__|__|__|__|
 p. Rifampicina Sens {mrifs}: |__|
 q. TMP/SMX MIC {mbac}: |__|__|__|__|
 r. TMP/SMX Sens {mbacs}: |__|
 s. Ofloxacina MIC {mofl}: |__|__|__|__|
 t. Ofloxacina Sens {mofls}: |__|

ANEXO IV:**LAUDO DE RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE**

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
Rua Waldemar Falcão, 121
Tel.: (0)71-356 4320 Fax: (0)71-356 4295
E-mail: fiocruz@ufba.br
40295-001 Salvador - Brasil

Para Dra. Kátia Salgado
Chefe do Laboratório de Análises Clínicas
Hospital Couto Maia/SESAB

Nome do paciente : _____
Nº do HCMaia: _____ Pavilhão _____ Data de admissão __/__/__
Nº da cultura no HCMaia _____ Data da cultura __/__/__ material _____

Resultado do Teste de Sensibilidade (Kirby-Bauer/ Difusão em placa)

Bactéria *Streptococcus pneumoniae*

Antimicrobiano	diâmetro da zona (mm)	sensibilidade (R, I, S)
oxacilina		
cefotaxima		
cloranfenicol		
tetraciclina		
eritromicina		
clindamicina		
vancomicina		
rifampicina		
TMP/SMX		

No teste de sensibilidade "in vitro" esta cepa é :

sensível à penicilina

resistente (resultado preliminar)

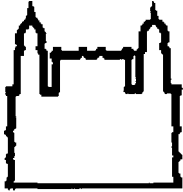
à penicilina.

Salvador, __/__/__

Joice Neves Reis
Farmacêutica-Bioquímica
CRF4 - 2374

ANEXO V:**LAUDO DE RESULTADO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA**

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Rua Waldemar Falcão, 121
Tel.: (0)71-356 4320 Fax: (0)71-356 4295
E-mail: fiocruz@ufba.br
40295-001 Salvador - Brasil

Para Dra. Kátia Salgado
Chefe do Laboratório de Análises Clínicas
Hospital Couto Maia/SESAB

Nome do paciente : _____
Nº do HC Maia: _____ Pavilhão _____ Data de admissão __/__/__
Nº da cultura no HC Maia _____ Data da cultura __/__/__ material _____

Teste de sensibilidade para *S. pneumoniae* pelo método do E-teste :

ANTIBIÓTICO	CMI	Sensibilidade
Penicilina G		
Cefotaxima		

S = sensível; I= resistente- nível intermediário; R= resistente- nível alto

No teste de sensibilidade "in vitro" esta cepa é :

sensível à penicilina

resistente (resultado final) à penicilina.

Salvador, __/__/__

Joice Neves Reis
Farmacêutica-Bioquímica
CRF4 - 2374

ANEXO VI:**Classificação dos *S. pneumoniae* de acordo com os tipos sorológicos**

<i>S. pneumoniae</i> Grupo	<i>S. pneumoniae</i> tipo
Tipo 1	1
Tipo 2	2
Tipo 3	3
Tipo 4	4
Tipo 5	5
Grupo 6	6A 6B
Grupo 7	7F 7A 7B 7C
Tipo 8	8
Grupo 9	9A 9L 9N 9V
Grupo 10	10F 10A 10B 10C
Grupo 11	11F 11A 11B 11C 11D
Grupo 12	12F 12A 12B
Tipo 13	13
Tipo 14	14
Grupo 15	15F 15A 15B 15C
Grupo 16	16F 16A
Grupo 17	17F 17A
Grupo 18	18F 18A 18B 18C
Grupo 19	19F 19A 19B 19C

<i>S. pneumoniae</i> Grupo	<i>S. pneumoniae</i> tipo
Tipo 20	20
Tipo 21	21
Grupo 22	22F 22A
Grupo 23	23F 23A 23B
Grupo 24	24F 24A 24B
Grupo 25	25F 25A
Tipo 27	27
Grupo 28	28F 28A
Tipo 29	29
Tipo 31	31
Grupo 32	32F 32A
Grupo 33	33F 33A 33B 33C 33D
Tipo 34	34
Grupo 35	35F 35A 35B 35C
Tipo 36	36
Tipo 37	37
Tipo 38	38
Tipo 39	39
Tipo 40	40
Grupo 41	41F 41A
Tipo 42	42
Tipo 43	43
Tipo 44	44
Tipo 45	45
Tipo 46	46
Grupo 47	47F 47A
Tipo 48	48

Nota: Os tipos destacados estão incluídos na vacina 23-valent.

ANEXO VII:**CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SENSIBILIDADE (TESTE DE DIFUSÃO)**PARA *S. pneumoniae*.M100-S5
M2-A5

(DISK DIFFUSION)

TABLE 2C.

**Zone Diameter Interpretive Standards and Equivalent Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Breakpoints for *Streptococcus pneumoniae***

Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter, Nearest Whole mm			Equivalent MIC Breakpoints ^c (μg/mL)	
		Resistant	Intermediate	Susceptible	Resistant	Susceptible
Azithromycin	15 μg	≤ 13	14–17	≥ 18	≥ 2	≤ 0.5
Chloramphenicol	30 μg	≤ 20	—	≥ 21	≥ 8	≤ 4
Clarithromycin	15 μg	≤ 16	17–20	≥ 21	≥ 2	≥ 0.5
Clindamycin	2 μg	≥ 18	10–10	≥ 19	≥ 1	≤ 0.25
Erythromycin	15 μg	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 4	≤ 0.5
Ofloxacin	5 μg	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 8	≤ 2
Penicillin ^a	1 μg oxacillin disk	—	—	≥ 20	—	≤ 0.06
Rifampin	5 μg	≤ 16	17–18	≥ 19	≥ 4	≤ 1
Tetracycline	30 μg	≤ 17	18–21	≥ 22	≥ 8	≤ 2
Trimethoprim/sulfamethoxazole	1.25/23.75 μg	≤ 15	16–18	≥ 19	≥ 4/76	≤ 0.5/9.5
Vancomycin ^b	30 μg	—	—	≥ 17	—	≤ 1

NOTE 1: Information in boldface type is considered tentative for 1 year.

NOTE 2: These zone diameter standards apply only to tests performed using Mueller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood; equivalent MIC breakpoints relate to tests performed by broth microdilution using CAMHB-LHB.

FOOTNOTES

- Isolates of pneumococci with oxacillin zone sizes of ≥ 20 mm are susceptible (MIC ≤ 0.06 μg/mL) to penicillin and can be considered susceptible to ampicillin, amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin/sulbactam, cefaclor, cefepime, cefetamet, cefixime, cefotaxime, cefprozil, cefibuten, ceftriaxone, cerufoxime, cefpodoxime, ceftizoxime, imipenem, and loracarbef for approved indications, and these agents need not be tested. A penicillin MIC should be determined on isolates of *S. pneumoniae* with oxacillin zone sizes of ≤ 19 mm. The disk test does not distinguish penicillin intermediate strains (i.e., MICs = 0.12 – 1.0 μg/mL) from strains that are penicillin resistant (i.e., MICs ≥ 2.0 μg/mL). Reliable disk diffusion tests for cefotaxime and ceftriaxone do not yet exist. Their *in vitro* activity is best assessed using an MIC method.
- The absence of resistant strains precludes defining any results categories other than "Susceptible." Strains yielding results suggestive of a "Nonsusceptible" category should be submitted to a reference laboratory for further testing.
- These values represent MIC breakpoints used in determining approximate zone size interpretive criteria. They relate to MICs determined by M7 methodology.

NCCLS VOL. 14 NO. 16 1994

Anexo VIII:**CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SENSIBILIDADE PARA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA *S. pneumoniae*.**M100-S5
M7-A3

(AEROBIC DILUTION)



TABLE 2C.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Interpretive Standards ($\mu\text{g/mL}$) for *Streptococcus pneumoniae*

Antimicrobial Agent	Susceptible	Intermediate	Resistant
Azithromycin	≤ 0.5	1	≥ 2
Cefotaxime ^a	≤ 0.5	1	≥ 2
Cefepime	≤ 0.5	1	≥ 2
Ceftriaxone ^a	≤ 0.5	1	≥ 2
Cefuroxime axetil (oral)	≥ 0.5	1	≥ 2
Chloramphenicol	≤ 4	—	≥ 8
Clarithromycin	≤ 0.5	1	≥ 2
Clindamycin	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Erythromycin	≤ 0.5	1-2	≥ 4
Imipenem	≤ 0.12	0.25-0.5	≥ 1
Ofloxacin	≤ 2	4	≥ 8
Penicillin ^b	≤ 0.06	0.1-1	≥ 2
Rifampin	≤ 1	2	≥ 4
Tetracycline	≤ 2	4	≥ 8
Trimethoprim/sulfamethoxazole	$\leq 0.5/9.5$	1/19-2/38	$\geq 4/76$
Vancomycin ^c	≤ 1	—	—

NOTE 1: These interpretive standards are applicable to only broth microdilution susceptibility tests with *S. pneumoniae* using cation-adjusted Mueller-Hinton broth with 2 to 5% lysed horse blood.

NOTE 2: Information in boldface type is considered tentative for 1 year.

FOOTNOTES

- a. When recovered from patients with meningitis, strains in the intermediate category may require therapy with maximum doses of the drug.
- b. A pneumococcal isolate that is susceptible to penicillin can be considered susceptible to ampicillin, amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin/sulbactam, cefaclor, cefepime, cefetamet, cefixime, cefotaxime, cefprozil, ceftributen, ceftriaxone, cefuroxime, cefpodoxime, ceftizoxime, imipenem, and loracarbef for approved indications. Testing of these agents (except cefepime, cefotaxime, ceftriaxone, or cefuroxime axetil) against penicillin-intermediate or penicillin-resistant isolates is not recommended. Currently, reliable interpretive criteria for these agents are not available. Physicians should be informed that clinical response rates with these agents may be lower in strains that are not susceptible to penicillin.
- c. The absence of resistant strains precludes defining any results categories other than "Susceptible." Strains yielding results suggestive of a "Nonsusceptible" category should be submitted to a reference laboratory for further testing.

Anexo IX:

DIÂMETROS ACEITÁVEIS NO CONTROLE DE QUALIDADE PARA TESTE DE DIFUSÃO DE DISCO PARA *S. pneumoniae*.

M100-S5
M2-A5

(DISK DIFFUSION)



Table 3C.

Acceptable Zone Diameter (mm) Quality Control Limits for *Streptococcus pneumoniae*

Antimicrobial Agent	Disk Content	<i>S. pneumoniae</i> (ATCC ^a 49619)
Azithromycin	15 µg	19–25
Cefaclor	30 µg	24–32
Cefixime	5 µg	16–23
Cefpodoxime	10 µg	28–34
Cefprozil	30 µg	25–32
Ceftizoxime	30 µg	28–34
Chloramphenicol	30 µg	23–27
Clarithromycin	15 µg	25–31
Clindamycin	2 µg	19–25
Dirithromycin	15 µg	18–25
Erythromycin	15 µg	25–30
Grepafloxacin	5 µg	21–28
Loracarbef	30 µg	22–28
Meropenem	10 µg	28–35
Ofloxacin	5 µg	16–21
Oxacillin	1 µg	8–12
Rifampin	5 µg	25–30
Tetracycline	30 µg	27–31
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	22–27
Vancomycin	30 µg	20–27

NOTE 1: These quality control ranges are applicable only to tests performed by disk diffusion using Mueller-Hinton agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood.

NOTE 2: Information in boldface type is considered tentative for 1 year.

FOOTNOTE

a ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

NCCLS VOL. 14 NO. 16 1994

Anexo X:

VALORES ACEITÁVEIS PARA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA NO TESTE DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE CIM PARA *S.*

pneumoniae.

M100-S5
M7-A3

(AEROBIC DILUTION)

TABLE 3C.



Acceptable Quality Control Ranges of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ($\mu\text{g}/\text{mL}$) for *Streptococcus pneumoniae*

Antimicrobial Agent	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC** 49619
Azithromycin	0.06–0.25
Cefaclor	1–4
Cefepime	0.06–0.25
Celetamet	0.5–2
Cefotaxime	0.06–0.25
Cefpodoxime	0.03–0.12
Cefprozil	0.25–1
Ceftizoxime	0.12–0.5
Ceftriaxone	0.03–0.12
Cefuroxime	0.25–1
Chloramphenicol	2–8
Clarithromycin	0.03–0.12
Clindamycin	0.03–0.12
Dirlithromycin	0.06–0.25
Erythromycin	0.03–0.12
Grepafloxacin	0.06–0.5
Imipenem	0.03–0.12
Loracarbef	2–8
Meropenem	0.06–0.25
Ofloxacin	1–4
Penicillin	0.25–1
Rifampin	0.015–0.06
Tetracycline	0.12–0.5
Trimethoprim/sulfamethoxazole	0.12/2.3–1/19
Trospectomycin	1–4
Vancomycin	0.12–0.5

NOTE 1: Information in boldface type is considered tentative for 1 year.

NOTE 2: These quality control ranges are applicable to tests performed by the broth microdilution method only using cation-adjusted Mueller-Hinton broth with 2 to 5% lysed horse blood.

FOOTNOTE

a. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

NCCLS VOL. 14 NO. 16 1994