

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Ana Carolina Carvalho de Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS OPTOQUINA RESISTENTE DE
Streptococcus pneumoniae.
IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.**

Rio de Janeiro

2022

Ana Carolina Carvalho de Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS OPTOQUINA RESISTENTE DE
Streptococcus pneumoniae.
IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso

Rio de Janeiro

2022

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Oliveira, Ana Carolina de

Caracterização molecular de cepas optoquina resistente de *Streptococcus pneumoniae*: implicações no diagnóstico laboratorial. / Ana Carolina de Oliveira. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022.

52 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

Orientador: Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso.

1. *Streptococcus pneumoniae*. 2. Resistência Antimicrobiana . 3. Resistência a optoquina. I. Título.

Molecular Characterization of Optochin – Resistant Strains of *Streptococcus pneumoniae*. Implications for Laboratory Diagnostic .

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ana Carolina Carvalho de Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS OPTOQUINA RESISTENTE DE
Streptococcus pneumoniae.
IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Profa. Dra. Ana Cristina Rivas
Profa. UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Suely Aparecida Pimenta Fracalanza
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

A Deus, a minha e família e amigos, que
contribuíram e deram forças para que eu
pudesse concluir esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter sido meu sustento em todas as horas e dando forças para continuar de pé até nos momentos difíceis.

A minha família, em especial minha mãe Gisele Carvalho por ser meu porto seguro, meus avós Arlete C. e Silvio C. e ao meu irmão Altair Jr., por acreditarem, apoiarem e me encorajarem a seguir em frente sempre, sem medo das etapas mais difíceis.

Ao meu namorado, Renan Macêdo por todos os momentos de companheirismo, compreensão, encorajamento, incentivo e principalmente os momentos de escuta.

Aos meus amigos, que sempre estiveram presentes mesmo que de longe, especialmente à Nicole Oliveira, que me acompanha há tantos anos e sempre acreditou e me encorajou a ir atrás dos meus sonhos e objetivos.

Ao meu orientador, Dr. Ivano de Filippis, muito obrigada por toda a paciência e disponibilidade ao ensinar, pelo aprendizado, apoio e incentivo.

Aos amigos que a pesquisa me deu, em especial Beatriz Cordeiro, Andressa Brito e Nicolle Félix, por tornarem o caminho mais leve e divertido, além do apoio em todas as horas.

Ao laboratório de microrganismos de referência - LMR, onde tive a oportunidade de desenvolver este projeto ao qual tenho um grande carinho e as pessoas do laboratório que sempre me ajudaram.

Ao Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária, INCQS, FIOCRUZ, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que de alguma forma estiveram comigo durante esta etapa.

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Streptococcus pneumoniae, ou pneumococo é uma bactéria coco Gram positiva, que pode ser encontrada na nasofaringe de seres humano, responsável por grande número de casos de pneumonia em todo o mundo, além de causar doenças como otite média e aguda, sinusite e até mesmo meningite e septicemia. Pode ser classificado em mais de 100 sorotipos, cuja distribuição varia de acordo com a região geográfica. O tratamento e profilaxia é realizada através de antibioticoterapia utilizando os antimicrobianos das classes: β -lactâmicos, quinolonas e macrolídeos. A optoquina é um antibiótico utilizado para a identificação do pneumococo em laboratório através da determinação da susceptibilidade, pois é esperado que cepas de pneumococo sejam sensíveis a esse antibiótico. A optoquina atua sobre a enzima ATPase, interferindo no metabolismo bacteriano. Estudos mostram que cepas resistentes à optoquina (Opt^R) ocorrem por efeito de mutações nas subunidades do gene *atpC* que codifica a enzima ATPase, alvo do antimicrobiano. O projeto teve como objetivo identificar cepas de pneumococo isoladas de material clínico, avaliar o uso do teste de optoquina para identificação, caracterizá-las quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, e sua possível associação a clones hipervirulentos pela análise de MLST. Foram avaliadas 211 cepas isoladas de diferentes estados durante o período pré e pós vacinal, 2006 a 2021. Os isolados previamente identificados como pneumococo foram submetidos ao teste de optoquina e PCR para confirmação da espécie. As cepas foram submetidas ao TSA por disco - difusão e CIM. Das 211 cepas testadas, 35 apresentaram resistência a pelo menos uma classe dos antibióticos testados, dessas 35 somente 1 apresentou resistência a três classes distintas, sendo classificada como MDR, no entanto essa cepa não foi resistente a optoquina. A resistência aos outros antibióticos foi confirmada através do CIM, sendo maior resistência a tetraciclina (8%) seguida por eritromicina (6,1%), penicilina (5,7%), levofloxacina (1,9%) e cloranfenicol (0,9%). Do total de amostras (211), 24 foram Opt^R. Essas cepas foram submetidas ao sequenciamento do gene da enzima ATPase, onde foram constatadas mutações no gene *atpC* que podem estar envolvidas no fenótipo Opt^R. A determinação da susceptibilidade à optoquina é um método de baixo custo, rápido e muito utilizado

para a identificação do patógeno, por isso é utilizado amplamente em laboratórios de análises clínicas públicos e privados, entretanto, o aumento do número de cepas Opt^R demonstra a baixa confiabilidade no teste e a necessidade de uma investigação criteriosa. Além do aumento de cepas Opt^R, o aumento da resistência aos demais antimicrobianos demonstra a real necessidade do desenvolvimento de medidas de controle e identificação mais criteriosas, afim de prover ao paciente um tratamento eficaz e evitar o surgimento de novas cepas multirresistentes.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*; resistência antimicrobiana; optoquina.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae, or pneumococcus, is a Gram positive coccus or spherical bacterium, which can be found in the nasopharynx of humans, responsible for a large number of cases of pneumonia worldwide, in addition to causing diseases such as otitis media and acute, sinusitis and even meningitis. and septicemia. It can be classified into more than 100 serotypes, whose distribution varies according to the geographic region. Treatment and prophylaxis is performed through antibiotic therapy using antimicrobials of the classes: β -lactams, quinolones and macrolides. Optochin (Opt) is an antibiotic used to identify pneumococcus in the laboratory by determining susceptibility, as pneumococcal strains are expected to be sensitive to this antibiotic. Opt acts on the ATPase enzyme, interfering with bacterial metabolism. Studies show that strains resistant to optoquine (Opt^R) occur as a result of mutations in the subunits of the *atpC* gene that encodes the ATPase enzyme, which is the antimicrobial target. This study aimed to identify pneumococcal strains isolated from clinical material, evaluate the use of the optochin test for identification, evaluate their antimicrobial susceptibility profile, and their possible association with hypervirulent clones by MLST analysis. A total of 211 strains isolated from different states were evaluated during the pre- and post-vaccination period, 2006 to 2021. The isolates previously identified as pneumococcus were submitted to the Opt test and PCR to confirm the species. The strains were submitted to antimicrobial susceptibility test by disk - diffusion and MIC. Of the 211 strains tested, 35 showed resistance to at least one class of the antibiotics tested, of these 35 only one showed resistance to three distinct classes, being classified as multidrug-resistant (MDR), however this strain was not resistant to Opt. Resistance to other antibiotics was confirmed by MIC, with greater resistance to tetracycline (8%) followed by erythromycin (6.1%), penicillin (5.7%), levofloxacin (1.9%) and chloramphenicol (0.9%). Of the total samples (211), 24 were Opt^R. These strains were subjected to sequencing of the ATPase enzyme gene, where mutations in the *atpC* gene were found and could be involved in the Opt^R phenotype. The determination of susceptibility to optochin is a low-cost, fast and widely used method for identifying the pathogen in public and private clinical analysis laboratories, however, the increase in the number of Opt^R strains

demonstrates the low reliability of the test and the need for a careful investigation. In addition to the increase in Opt^R strains, the increase in resistance to other antimicrobials demonstrates the real need to develop more accurate control and identification measures, in order to provide the patient with an effective treatment and prevent the emergence of new MDR strains.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; antimicrobial resistant; optochin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Morfologia das colônias de pneumococo.....	16
Figura 2	Fatores de virulência.....	20
Figura 3	Antibiograma por disco-difusão.....	31
Figura 4	Antibiograma por fitas E-test.....	32
Figura 5	Distribuição geográfica das amostras	33
Figura 6	Perfil de susceptibilidade das cepas de pneumococo.....	34
Figura 7	Gráfico 3 - Perfil de susceptibilidade das cepas OPT ^R	35
Figura 8	Comparação do perfil de susceptibilidade entre as cepas do período pré e pós vacinal.....	36
Figura 9	Análise filogenética por MST	39
Figura 10	Tabela de relações após análise por MST	40

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Brain and Heart Infusion
CBRVS	Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária
CC	Complexo Clonal
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CRIE	Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EuCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IJSEM	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LPSN	List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
MDR	Multidroga Resistente
MLST	Multilocus Sequence Typing
Mm (μm)	Micrômetro
MST	Minimum Spanning Tree
OMS	Organização Mundial da Saúde

OPT	Optoquina
OPT ^S	Optoquina sensível
OPT ^R	Optoquina resistente
PCR	Polimerase Chain Reaction
PNI	Plano Nacional de Imunização
Ply	Pneumolisina
ReLAVRA	Rede Latino Americana de Vigilância da Resistência Antimicrobiana
SBIM	Sociedade Brasileira de Imunizações
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
ST	Sequence Typing
Sp	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
VPC	Vacina Pneumocócica Conjugada
VPP	Vacina Pneumocócica Polissacarídica

Sumário

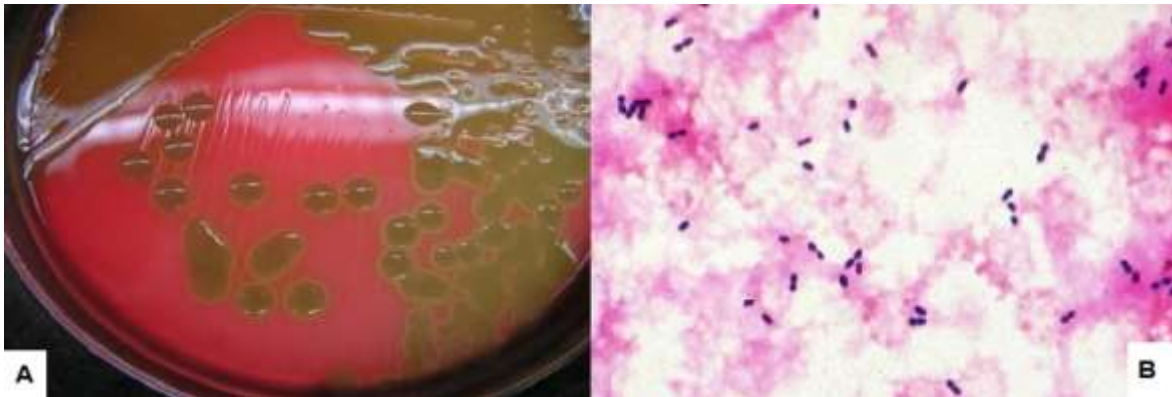
1. INTRODUÇÃO	166
1. 1 Resistência antimicrobiana.....	177
1. 1. 1. Fatores de virulência	199
1. 2. Doenças causadas pelo <i>S.pneumoniae</i>	222
1. 3. Vacinas pneumocócicas.....	233
1. 4. Epidemiologia.....	24
1. 5. Métodos laboratoriais utilizados na identificação do <i>S.pneumoniae</i>	25
1. 6. Resistência à optoquina e outros antimicrobianos.....	26
1. 7. Justificativa.....	28
2. OBJETIVOS	29
2. 1. Objetivo geral.....	29
2. 2. Objetivos específicos.....	29
3. METODOLOGIA.....	30
3. 1. Métodos fenotípicos.....	30
3. 2. Métodos moleculares	322
4. RESULTADOS	323
4. 1. Análise por MLST.....	37
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Streptococcus*, é composto por cocos Gram positivos, organizados em cadeias ou cocos isolados. Algumas espécies desse gênero, como o *Streptococcus pneumoniae*, necessitam de ambientes apropriados para crescimento, além de meios de cultura específicos enriquecidos com sangue (MURRAY, 2009).

A espécie *Streptococcus pneumoniae* (Sp), ou pneumococo, é uma bactéria Gram positiva, alfa-hemolítica, imóvel, lanceolada que mede entre 0,5 a 1,5µm de diâmetro, não produtora de esporos. Suas células se formam em cocos, na maioria das vezes formando pares ou cadeias curtas e ocasionalmente de forma individual, como mostra a figura 1, o cultivo contínuo em laboratório proporciona essa formação em cadeias (MURRAY, 2009).

Figura 1 - A) Colônias de *S.pneumoniae* em placa de ágar sangue em meio Columbia. B) Colônias coradas através da técnica de coloração de gram.



Fonte: Google Imagens

O *S. pneumoniae* foi descoberto há mais de 100 anos por Sternberg e Pasteur em meses diferentes no ano de 1880 e descrito pela primeira vez em 1884 por Klein, porém em 1901 foi reclassificado como pneumococo por Chester, classificação esta que seria publicada de forma válida na *Approved Lists of Bacterial Names* (1980) do *International Journal of Systematic Evolution Microbiology* - IJSEM – Revista Internacional de Microbiologia Sistemática e

Evolutiva (periódico de registro para publicação de novas nomenclaturas microbianas) (LPSN, 2018).

O pneumococo é um dos principais agentes etiológicos causadores de infecções adquiridas na comunidade, como otite média e aguda, pneumonia, meningite e bacteremia e tem o ser humano como seu único hospedeiro, podendo habitar a nasofaringe, muitas vezes de maneira assintomática, sendo assim considerado um microrganismo patogênico oportunista (WHITMAN *et al.*, 2009).

Em 1995, após diversos estudos relatarem casos frequentes de pneumonia, a doença foi considerada como infecciosa emergente. Já no atual cenário as doenças pneumocócicas regressam de maneira preocupante, pois deixam de ser infecções facilmente controladas com o uso dos antimicrobianos, e passam necessitar de uma terapia mais eficaz visto que, o número de cepas resistentes aos antibióticos utilizados no tratamento vêm crescendo gradativamente (WHITMAN, 2009; TORTORA, 2012).

1. 1 Resistência antimicrobiana

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerada um problema de saúde global, que têm evoluído progressivamente em decorrência de diversos fatores como o uso excessivo de antimicrobianos no ambiente hospitalar, incerteza no diagnóstico e até mesmo seguimento das medidas terapêuticas pelos pacientes, utilizando doses diferentes por períodos diferentes. Além disso, o uso indiscriminado na agropecuária que influencia diretamente na microbiota do solo, através da urina e dejetos fecais dos animais. Ademais, o descarte de efluentes hospitalares também contribui para um aumento da resistência, uma vez que possuem uma alta concentração de bactérias, resíduos de produtos hospitalares como antimicrobianos e desinfetantes, ou seja, um ambiente propício para que ocorra pressão seletiva, o que favorece a

transmissão de genes de resistência entre os microrganismos (RIZZO *et al.*,2013; GALLEGO, 2016; LOUREIRO *et al.*, 2016).

A vista disso, existe desde 1996 a ReLAVRA - Rede Latino Americana de Vigilância da Resistência Antimicrobiana - que visa instruir políticas de prevenção e controle da resistência antimicrobiana, o que se deu através da criação de laboratórios nacionais de referência que têm como objetivo relatar os dados de microrganismos resistentes. A partir dos anos 2000, tornou-se comum encontrar esse problema em patógenos nasocomias e patógenos causadores de doenças adquiridas na comunidade, como o pneumococo (OPAS, 2021).

Além disso, fatores como o aumento do uso de antimicrobianos no atual período de pandemia, são ocorrências preocupantes. Ocorre que, o número de pessoas internadas por período extenso subiu em ritmo acelerado, conseqüentemente o número de pacientes com infecções hospitalares o que leva a um uso maior de antibióticos, favorecendo mais uma vez um ambiente de pressão seletiva nas bactérias possibilitando a propagação da resistência (FIOCRUZ, 2021).

Segundo O'Neil (2016) a resistência antimicrobiana é um problema significativo que necessita de atenção devido ao seu rápido avanço, estimando que em 2050 uma a cada três pessoas venham a óbito em decorrência de doenças causadas por infecções provenientes de bactérias resistentes, gerando uma estimativa de cerca de dez milhões de mortes ao ano em todo o mundo (O'NEIL, 2016).

Estudos recentes mostram que o *Streptococcus pneumoniae* têm adquirido resistência a antibióticos e por isso foi incluso na lista que contém 12 famílias de bactérias resistentes a antimicrobianos, publicada em 2017 pela OMS, e que as classificou como “alvos prioritários da OMS para a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos”. Os patógenos foram classificados em três prioridades: Prioridade 1 – crítica: onde estão incluídas as bactérias multirresistentes causadoras de infecções graves e frequentemente mortais, como infecções na corrente sanguínea e pneumonia, prioridade 2 – alta e prioridade 3 – média, classificação onde está incluso o *S. pneumoniae* sem

sensibilidade à penicilina e de bactérias causadoras de doenças comuns com crescente resistência aos antimicrobianos (BRANDILEONE, 2006; GRIVEA, 2012; OMS, 2017).

Os mecanismos de resistência a antimicrobianos também são considerados como recursos de defesa que o microrganismo utiliza para sobreviver no hospedeiro, que podem variar de mutações associadas à resistência ou simplesmente fatores de virulência que possibilitam o escape do sistema imunológico do hospedeiro. Em relação ao pneumococo, além da resistência, a presença de cápsula na estrutura bacteriana, enzimas que degradam células do sistema imune e proteínas de adesão são alguns desses mecanismos (TORTORA, 2012).

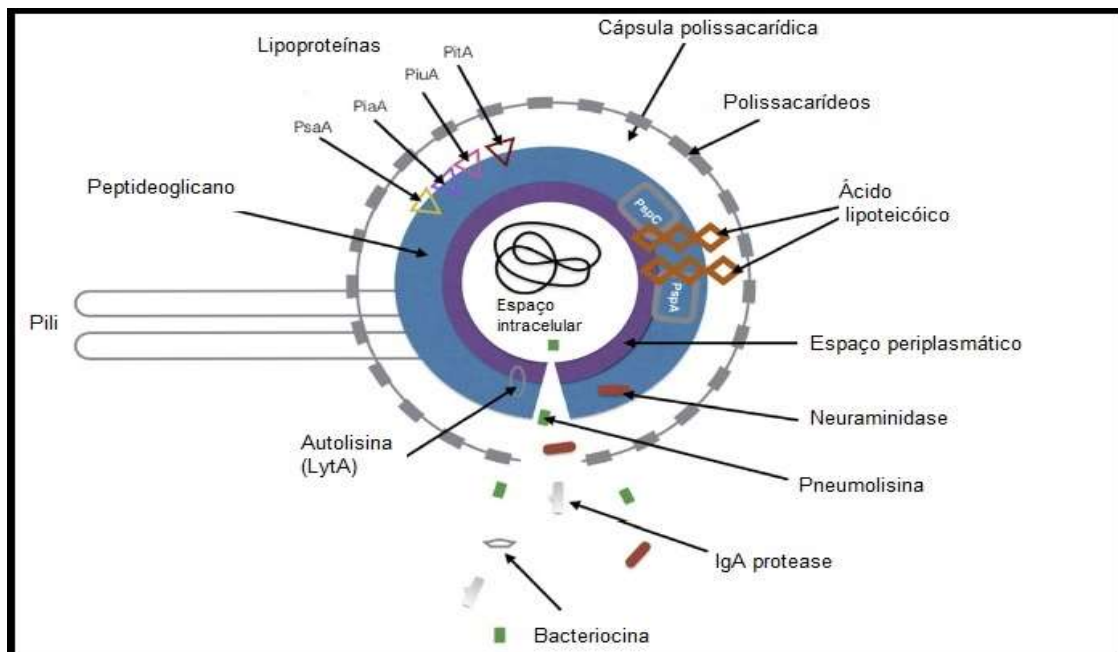
1. 1. 1. Fatores de virulência

Colonizador comum das vias aéreas superiores, em indivíduos saudáveis o pneumococo pode passar despercebido pelas células de reconhecimento do sistema imunológico, o que possibilita ao microrganismo alcançar as vias inferiores e causar a doença pneumocócica. Isto posto, os principais fatores de virulência presentes na célula bacteriana, são elementos que possibilitam que a infecção causada pelo pneumococo seja bem sucedida, são elas: a cápsula polissacarídica com seu potencial antifagocítico e de aderência, pneumolisina, produção de bacteriocinas - toxinas com potencial de inibir o crescimento de outras estirpes bacterianas - e outros fatores secundários. Algumas cepas de pneumococo também possuem transposons conjugativos, – segmentos de DNA que têm como característica a capacidade de mudar de lugar ocasionando uma mutação –, o que confere grande plasticidade genômica ao microrganismo que adquire a capacidade de desenvolver genes de resistência através de recombinação gênica (VAN DER POLL *et al.*, 2009; MOLINA *et al.*, 2009).

As características atribuídas ao *S. pneumoniae*, estão relacionadas à complexa gama de fatores de virulência, expostos na Figura 2, sendo alvo de

estudos ainda nos dias de hoje. Esses fatores agem interferindo na resposta do sistema imunológico do hospedeiro, impedindo a ação dos mecanismos de defesa seja por meio das proteínas de superfície ou contato direto com tecidos da mucosa, evitando a ativação do sistema imune do hospedeiro, impedindo a depuração bacteriana (WHATMORE *et al.*, 2000; VAN DER POLL *et al.*, 2009; BROOKS *et al.*, 2018).

Figura 2 - Esquema dos fatores de virulência de *S. pneumoniae*.



Fonte: BROOKS, 2018.

O principal mecanismo de defesa do pneumococo é a cápsula polissacarídica que é produzida em maior quantidade no momento em que o patógeno coloniza e invade o trato respiratório do hospedeiro, tornando-se transparente durante o processo de colonização e mais opacas e rígidas no processo de invasão. Dessa forma ela impede a fagocitose do microrganismo e depuração da mucosa - atividades de exclusão de substâncias indesejadas realizadas pelo próprio organismo do hospedeiro, no intuito de eliminar o invasor. Além disso, a cápsula possui outras propriedades como a inibição do sistema complemento, através do bloqueio da ligação do receptor fagocítico CR3 com as partículas opsonizadas pela proteína iC3b e entre os receptores FCγ ao Fc, da imunoglobulina G (IGg), não sendo capaz de fagocitar o pneumococo (VAN DER POLL *et al.*, 2009; BROOKS *et al.*, 2018).

Apesar da cápsula ser o principal meio de defesa do organismo, existem outros mecanismos, citados anteriormente, que atuam em conjunto da mesma e são muito utilizados pelo pneumococo, como a pneumolisina (ply), citolisina existente em todos os pneumococos, independente de sorotipo ou genótipo (YOO *et al.*, 2010).

A pneumolisina é muito estudada por sua atividade hemolítica e propriedades citotóxicas, dependente da ligação com colesterol da membrana das células eucarióticas para a formação dos poros que levam à lise de células do tecido pulmonar. Ademais, induz a produção de grande quantidade de citocinas, o que ativa o sistema complemento, liberando neutrófilos com abundância e assim super estimulando o processo inflamatório, ocasionando maior dano ao tecido. Outro papel importante que vêm sendo estudado é a participação da pneumolisina na produção de biofilme em cepas de *S. pneumoniae*, pois há indícios de sua presença tanto na superfície das células pneumocócicas quanto na matriz extracelular do biofilme (YOO *et al.*, 2010; SHAK *et al.*, 2013; YUN *et al.*, 2015).

Em conjunto com esses mecanismos, o pneumococo possui uma matriz de sistemas de sinal de quinases que reconhecem sinais do meio onde o patógeno está inserido, como por exemplo a densidade celular, disponibilidade de substrato e microrganismos competidores semelhantes. Este sistema ativa diretamente a síntese de bacteriocinas, recombinação gênica, formação do biofilme e expressão da virulência. Possuem também, os chamados “ABC transporters” ou ATP - binding cassette, estes essenciais para a capacidade do DNA de recombinação para a aquisição de nutrientes e formação de bombas de efluxo para resistir à antimicrobianos. Esses transportadores possuem a função de importar carbono ou aminoácidos e exportar enzimas de degradação e adesinas de superfície externa, essenciais ao microrganismo (VAN DER POLL *et al.*, 2009). Contudo, uma série de fatores de virulência agem em conjunto para que a invasão no tecido seja considerada bem sucedida, variando de acordo com o local do tecido colonizado e a densidade populacional de microrganismos ali presentes (GARCIA *et al.*, 2006; KADIOGLU *et al.*, 2008; VAN DER PLL *et al.*, 2009).

1. 2. Doenças causadas pelo *S.pneumoniae*

O pneumococo é um dos principais microrganismos causadores de doenças invasivas em todo o mundo, como pneumonia, sepse, meningite, e não invasivas como sinusite, bronquite e otites média e aguda, especialmente em crianças menores de 5 anos, adultos com mais de 65 anos e pessoas com doenças pré-existentes (OMS, 2014).

As doenças pneumocócicas são consideradas uma das maiores causas de morbimortalidade, principalmente em países em desenvolvimento, chegando ao 15% de todas as mortes de crianças menores de 5 anos no ano de 2017. Os sintomas mais comuns entre as doenças invasivas causadas pelo *S. pneumoniae* incluem tosse, dor no peito, fadiga, falta de ar, febre acompanhada de suor e calafrios, náusea, vômito e diarreia. O tratamento é realizado por meio de antibioticoterapia e a prevenção ocorre através da vacina atrelada a bons hábitos de higiene e alimentares (OMS, 2018).

Entre as doenças causadas pelo *S. pneumoniae*, a pneumonia e a meningite são as mais preocupantes por serem doenças mais agressivas. Ainda que a inserção da vacina tenha ocasionado uma diminuição dos casos, os números de casos ainda são considerados altos em países em desenvolvimento (KUPEK *et al.*, 2016).

A pneumonia é definida como uma infecção severa que acomete os pulmões, ela ocorre quando, o pneumococo se prolifera e ocasiona a infecção nas vias aéreas respiratórias de indivíduos que não possuem anticorpos contra a cápsula. Quando o pneumococo penetra os vasos linfáticos dos pulmões e chega à corrente sanguínea, há de 10% a 20% de chance de ocasionar bacteremia, assim aumentando a possibilidade do quadro evoluir para sepse ou meningite, a partir do momento que este fator facilita o acesso do pneumococo à locais secundários de infecção como o sistema nervoso e sistema cardíaco. Um dos fatores permissivos para que o número de casos seja consideravelmente

alto e a incidência frequente é a diversidade de sorotipos capsulares do pneumococo, uma vez que as vacinas disponíveis nos postos de saúde pública possuem cobertura vacinal contra 10 sorotipos (VPC 10) ou 13 (VPC 13) sorotipos, em vacinas ofertadas na rede privada (BROOKS *et al.*, 2012; KUPEK *et al.*, 2016).

1. 3. Vacinas pneumocócicas

As vacinas contra o *S. pneumoniae* são licenciadas em todo o mundo desde 1977 e com o passar do tempo sofreram alterações como a troca da vacina polissacarídica pela conjugada, levando a queda considerável de doenças invasivas causadas por pneumococo e diminuição da taxa de mortes (BARRETO, 2013; IMOHL, 2015). Em 2009, a vacina pneumocócica conjugada 7-valente, com cobertura vacinal contra sete sorotipos diferentes de *S.pneumoniae*, foi a primeira dose autorizada no Brasil (SVS, 2014).

Já em 2010, VPC-10 entrou para o calendário do PNI, contendo todos os sorotipos da VCP-7 e mais três sorotipos adicionais tendo cobertura contra 10 sorotipos do pneumococo. Em 2019, o ministério da saúde autorizou a incorporação da vacina 13-valente (VPC-13) nos Centros de Referência de Imunobiológicos - CRIE, disponíveis de maneira gratuita para grupos com comorbidades: pessoas com HIV/AIDS; pessoas transplantadas sejam de órgãos sólidos ou de células-tronco de medula óssea; imunodeficiência devido ao câncer ou imunodepressão terapêutica, sendo elas maiores de 5 anos (CDC, 2008; SVS, 2014). Portanto, atualmente a vacina VPC-10 continua disponível nos postos de saúde pública, protegendo contra 70% das doenças graves em crianças e a VPC-13, ofertada em clínicas particulares, protegendo contra 90% dos casos (SBIM, 2020).

Também está disponível a vacina VPC-23, em clínicas particulares, recomendada após a iniciação do esquema vacinal com a vacina VPC - 10, no caso da oferta em postos públicos ou até mesmo após a VPC -13 em clínicas

particulares. Além disso, ela é mais recomendada para determinado grupos de pessoas com comorbidades como, diabetes, doenças cardíacas e respiratórias graves, além de doenças autoimunes. A VPC-23 é ofertada também nos CRIE, para os grupos mais propensos ao desenvolvimento de doenças pneumocócicas (SBIM, 2020).

1. 4. Epidemiologia

A inserção das vacinas antipneumocócicas, desencadeou uma redução significativa dos números de doenças pneumocócicas ao redor do mundo, porém, de acordo com a OMS, as doenças pneumocócicas ainda representam 1,6 milhão de mortes em todo o mundo por ano e são responsáveis por quase meio milhão de óbitos em crianças menores de 5 anos nos países em desenvolvimento (OMS, 2019).

No Brasil estima-se que 2.000 crianças vêm a óbito diariamente por pneumonias em geral, e em relação a pneumonia pneumocócica, na América Latina e no Caribe, estima-se um número de 1,6 milhões de casos por ano, dentre eles podendo ocorrer de 12 a 28 mil mortes anualmente. Sendo assim, o pneumococo é considerado um dos patógenos humanos mais importantes, sendo classificado em mais de 100 sorotipos diferentes que variam de acordo com a região geográfica, entre estes, 23 são responsáveis pela maioria das doenças pneumocócicas em todo o mundo (DENG *et al.*, 2016; SBIM, 2020). Ainda remetendo ao Brasil, no período de 2009 a 2018 o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) confirmou a notificação de 52.926 casos de meningite, sendo 19,9% pneumocócicas prioritariamente em indivíduos menores de 10 anos de idade (SILVA *et al.*, 2021).

O pneumococo é considerado a segunda maior causa de meningite bacteriana no Brasil. No período de 2003 a 2018, 18.278 casos de meningite pneumocócica foram confirmados no país, onde 5.446 desses casos vieram a óbito, significando uma taxa de 30% de letalidade. No Brasil, a introdução da

vacina VPC-7 foi o que contribuiu para uma redução considerável nos casos, além da inclusão da VPC - 10 no calendário de imunização (SVS, 2019).

1. 5. Métodos laboratoriais utilizados na identificação do *S.pneumoniae*

A identificação e diferenciação das diferentes espécies de *Streptococcus* spp. é realizada através de três metodologias “pilares” que são: métodos sorológicos, onde a espécie é definida através da tipagem de Lancefield que classifica os *Streptococcus* em grupos (A, B, C, F e G), de acordo com os antígenos; métodos hemolíticos, cujo objetivo é analisar os padrões de hemólise do microrganismo e classificá-los em hemólise total (β -hemólise), hemólise incompleta (α -hemólise) e ausência de hemólise (γ - hemólise); e métodos bioquímicos, como o teste de bile solubilidade especificamente para identificar o *Streptococcus pneumoniae* (MURRAY, 2009 TORTORA, 2012).

A determinação das características fenotípicas é convencionalmente usada em laboratórios de diagnóstico para a identificação do pneumococo, incluindo morfologia colonial, α -hemólise em ágar sangue, teste de catalase que diferencia o *Streptococcus* sp. de outros microrganismos, como o *Staphylococcus* sp., susceptibilidade à optoquina (Opt) e solubilidade biliar que o diferenciam de estreptococos do grupo viridans e sorologia específica para detecção do antígeno polissacarídico capsular (sorotipos). Classicamente, o pneumococo em ágar sangue mostra uma zona de inibição de crescimento de pelo menos 14 mm em torno de um disco de Opt de 6 mm incubado por 18-24h a 37° C em 5% de CO₂, enquanto outros estreptococos α -hemolíticos são resistentes à Opt (MURRAY, 2009; PINTO *et al.*, 2013).

A determinação da suscetibilidade à Opt é um método rápido e de baixo custo muito utilizado em laboratórios clínicos para distinguir *S. pneumoniae* das muitas outras espécies estreptocócicas comensais que apresentam morfologia colonial semelhante em ágar sangue. O aumento do número de isolados com diminuição da susceptibilidade a esta droga tem demonstrado a pouca confiabilidade deste teste para a identificação de pneumococos em laboratórios

de análises clínicas (BOREK *et al.*, 1997; KELLOGG *et al.*, 2001; DIAS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2021).

1. 6. Resistência à optoquina e outros antimicrobianos.

Classificado como antimicrobiano, a Opt é um fármaco, introduzido no século XX como um aliado para o tratamento de pneumonia lobar. Porém, o uso contínuo evidenciou efeitos colaterais graves e falhas no tratamento, portanto o uso da Opt em pacientes foi suspenso. Entretanto, foi observado que através da sensibilidade do pneumococo à Opt, era possível diferenciá-los de outros *Streptococcus* alfa-hemolíticos. Apesar deste feito ter sido descoberto em 1915, os testes em laboratório só começaram a ser realizados a partir de meados dos anos 50. Ao longo de 30 anos, nenhum caso de resistência à Opt foi reportado, até que em 1987 surgiu o primeiro caso na Finlândia (PIKIS *et al.*, 2001, KARUNANAYAKE *et al.*, 2007).

A optoquina (*Ethylhydrocupreine hydrochloride*) é um derivado do quinino amplamente utilizado contra a malária e seu mecanismo de ação se dá através da interrupção do crescimento de pneumococos susceptíveis, interagindo com a ATPase impedindo que cepas suscetíveis gerem novas moléculas de trifosfato de adenosina, essenciais ao seu metabolismo. Em contrapartida, estudos recentes relatam cepas adquirindo resistência à Opt, que ocorre devido a mutações em subunidades do gene *atpC* que codifica a enzima ATPase, alvo do antimicrobiano (NAGATA *et al.*, 2012).

O operon da ATPase é formado pelos genes *atpA*, *atpB* e *atpC*. A resistência à Opt tem sido descrita por mutações pontuais no gene *atpC*, mais especificamente na subunidade F^oF¹ do gene (DIAS *et al.*, 2013; RADDAOUI *et al.*, 2018), no entanto cepas Opt resistentes (Opt^R) com mutações nos genes *atpA* e *atpB*, tem sido descritas por outros autores (NAGATA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2021) O aumento da resistência de pneumococos à Opt têm sido acompanhado, bem como aos outros antimicrobianos.

- a) **β -lactâmicos** - Os antibióticos β -lactâmicos agem na síntese do peptídeoglicano, que confere integridade à parede celular bacteriana, capazes de inibir parcial ou totalmente o crescimento e multiplicação dos microrganismos. Um dos motivos da resistência contra este agente antimicrobiano é a produção da enzima *β -lactamase* que age hidrolisando o anel β -lactâmico pela quebra da ligação amida, perdendo assim a capacidade de atuação contra o microrganismo. Porém esse fator não é algo comum em cepas de pneumococos, onde sua resistência está relacionada a mudança do gene alvo, a modificação estrutural das proteínas ligadoras de penicilinas - PBP, que impede a ligação do antibiótico à parede da célula bacteriana diretamente ligada ao gene *penA*, gene responsável por codificar a PBP, mais especificamente a PBP2. As PBP's são enzimas que montam o peptídeoglicano no lado externo da membrana plasmática para construir a parede celular (MOUJABER *et al.*, 2017).
- b) **Quinolonas** - As quinolonas são antimicrobianos que se ligam às enzimas *DNA girase* ou *topoisomerase II*, essenciais a bactéria, inibindo-as. Essas enzimas têm a função de tornar a molécula de DNA bacteriano compacta e biologicamente ativa, ao inibir essa enzima o DNA passa a ocupar muito espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres estabelecem a síntese descontrolada de RNA mensageiro codificando proteínas, ocasionando a morte de bactérias. A resistência ocorre quando há a alteração estrutural do gene *gyrA* que codifica a enzima DNA girase, por mutação cromossômica, fazendo com que o microrganismo não sofra ação do antimicrobiano (CORNICK *et al.*, 2012).
- c) **Macrolídeos** - Essa classe apresenta antimicrobianos que possuem atividades bacteriostáticas ou inibindo o crescimento bacteriano, principalmente quando em altas concentrações. Se ligam à subunidade ribossomal 50S do rRNA bacteriano, inibindo a síntese proteica e processos de estrutura e função essenciais

para a replicação da bactéria. Sua resistência está associada a mutação dos genes *erm* e *mef* que são responsáveis pela produção da bomba de efluxo, tornando o pneumococo resistente a esses antibióticos (SUTCLIFFE *et al.*, 1996; FARRELL *et al.*, 2004; SCHROEDER *et al.*, 2016).

Com o aumento da resistência a antibióticos, a identificação acurada do microrganismo é de grande importância para o manejo inicial do paciente e prognóstico positivo.

1. 7. Justificativa

As doenças pneumocócicas são consideradas de grande relevância para a saúde pública, visto que possui alta taxa de morbimortalidade em todo o mundo. Tendo como objetivo minimizar esse problema, o PNI em 2010 implementou a vacina contra o pneumococo ao calendário, ocasionando queda no número de casos e mortes por este patógeno. Entretanto, é um microrganismo cujo infecções causadas por ele ainda são recorrentes, principalmente por sua diversidade de sorotipos capsulares (DENG *et al.*, 2016).

Sendo assim, a correta identificação do patógeno seja como agente etiológico de doenças invasivas ou de pneumonia e outros agravos, é de extrema importância não somente para o correto manejo do paciente, mas também para a avaliação epidemiológica do caso pelos órgãos de saúde envolvidos, tendo como premissa o conceito segundo a lei 8.080, que define vigilância epidemiológica como: “conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos” (FUNASA, 2002). Isto posto, é importante que medidas profiláticas eficientes sejam tomadas rapidamente evitando a possível disseminação do patógeno na comunidade.

Diante disso, com estudos recentes relatando cepas de pneumococo apresentando resistência a Opt - utilizada na identificação -, provenientes de mutações no gene *atpC*, o intuito deste projeto foi quantificar e analisar essas cepas resistentes a Opt e a outras classes de antimicrobianos comumente utilizados no tratamento, sendo assim importante em razão de novos mecanismos de resistência que têm surgido e se espalhado por diversos países, o que causa grande preocupação principalmente neste período de pandemia. A aquisição de genes de resistência já ocorre de maneira natural, porém o uso excessivo e inapropriado de antibióticos está acelerando este processo.

2. OBJETIVOS

2. 1. Objetivo geral

Analisar cepas de *S. pneumoniae* resistentes à Opt e investigar possíveis associações da diminuição da susceptibilidade à Opt com aumento da resistência a antibióticos e presença de clones epidêmicos.

2. 2. Objetivos específicos

- Determinar o número de cepas resistentes à Opt.
- Determinar o perfil de susceptibilidade das cepas resistentes à Opt.
- Confirmar o mecanismo de resistência à Opt por sequenciamento do gene *atpC*.
- Classificar as cepas por ST (MLST)

– Avaliar possíveis associações entre cepas Opt resistentes e sorotipos, ST ou perfil de resistência.

3. METODOLOGIA

Duzentas e onze cepas isoladas de diferentes estados durante o período pré e pós vacinal, de 2006 à 2021, foram utilizadas neste estudo, considerando o período pós vacinal os anos posteriores à inclusão da vacina 10-valente que contém os sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, introduzida no calendário nacional do PNI no ano de 2010. Estas cepas fazem parte da Coleção de Pesquisa do Laboratório de Microrganismo de Referência do INCQS/FIOCRUZ. Os isolados foram identificados através de suas características morfológicas e detecção do gene *ply* pela PCR, exclusivo do pneumococo.

3. 1. Métodos fenotípicos

A sensibilidade à Opt foi determinada pelo método de Kirby - Bauer (disco - difusão) bem como dos antimicrobianos mais utilizados contra o pneumococo como: penicilina, levofloxacina, eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol. O antibiograma por disco difusão (Kirby - Bauer) é um teste in vitro utilizado para determinação da susceptibilidade do microrganismo à antimicrobianos, sendo uma metodologia utilizada até hoje na rotina dos laboratórios de análises clínicas, por ser prático e possuir baixo custo, fornece resultados qualitativos porém eficazes se seguidos os critérios necessários que estão descritos no EuCAST, manual padrão atualmente seguido internacionalmente tanto para os parâmetros da realização do procedimento quanto para a leitura dos pontos de corte.

O teste de Kirby - Bauer é realizado com discos de papel-filtro contendo diferentes antibióticos em diferentes concentrações, dispostos em placas com o meio de cultura Ágar Mueller Hinton, enriquecidas com sangue de equino para auxiliar no crescimento do pneumococo, seu princípio é a difusão do antibiótico pela placa na superfície do meio de cultura através destes discos podendo ou inibir o crescimento bacteriano. A interpretação é feita por medição do halo de inibição da bactéria, o que indica sensibilidade, quando há inibição do halo de crescimento bacteriano, ou resistência quando não há inibição do halo de crescimento. (ANVISA, 2008). A figura 3, mostra o conceito de teste de antibiograma por disco - difusão.

Figura 3 - Antibiograma por disco difusão, cujo princípio é a propagação do antimicrobiano por difusão em ágar.



Fonte: google imagens

As cepas que apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, foram submetidas ao método de antibiograma por concentração mínima - CIM, por fitas tipo E-test para determinação quantitativa da resistência aos antibióticos específicos. O método do CIM consiste em utilizar uma fita de antibiótico posicionada sobre o meio de cultura utilizado. A fita possui diferentes concentrações do antibiótico, indicando a concentração mínima necessária para inibir o crescimento do microrganismo. A leitura é feita a partir do início do ponto de intersecção da fita, com o CIM determinado por onde começa a elipse, além

dos valores de corte também serem padronizados pelo manual do EuCAST. A figura 4, traz a representação do teste de fitas de CIM.

Figura 4. Antibiograma por fitas de CIM.



Fonte: Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos5.htm> Acesso em: 21/05/2021.

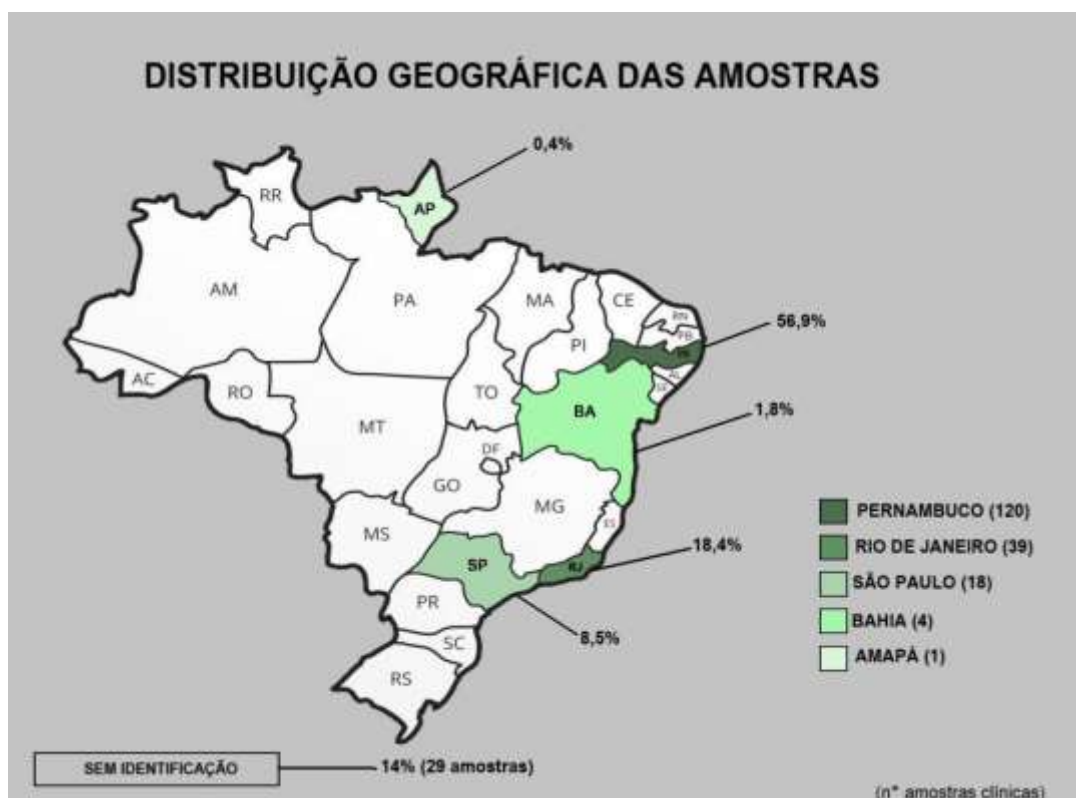
3. 2 Métodos moleculares

Além da confirmação da identificação do pneumococo através da PCR, as cepas que apresentam baixa sensibilidade a Opt foram submetidas aos métodos moleculares de PCR para amplificação do gene de resistência utilizando iniciadores (primers) específicos e posteriormente o sequenciamento para a determinação dos alelos. Além disso as amostras foram submetidas à análise por MLST para a determinação do ST de acordo com o protocolo disponível em: <https://pubmlst.org/spneumoniae/>.

4. RESULTADOS

Duzentos e onze isolados de material clínico foram identificados através dos métodos fenotípicos e moleculares descritos anteriormente, sendo cento e quarenta e seis cepas isoladas no período pré introdução da VPC-10 (pré-vacinal) e sessenta e cinco do período pós-vacinal. Após confirmação da identidade as cepas foram preservadas por dois métodos diferentes, congelamento profundo em criotubo com caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 20% de glicerol a -70°C e liofilização. As ampolas liofilizadas foram preservadas em freezer comum a -15°C. As cepas confirmadas foram catalogadas e incorporadas à Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária (CBRVS) do INCQS/FIOCRUZ. Quanto à distribuição geográfica, estas cepas foram recebidas de diferentes regiões do Brasil como mostra a figura 5.

Figura 5: Distribuição geográfica das amostras recebidas de diferentes Estados do Brasil.

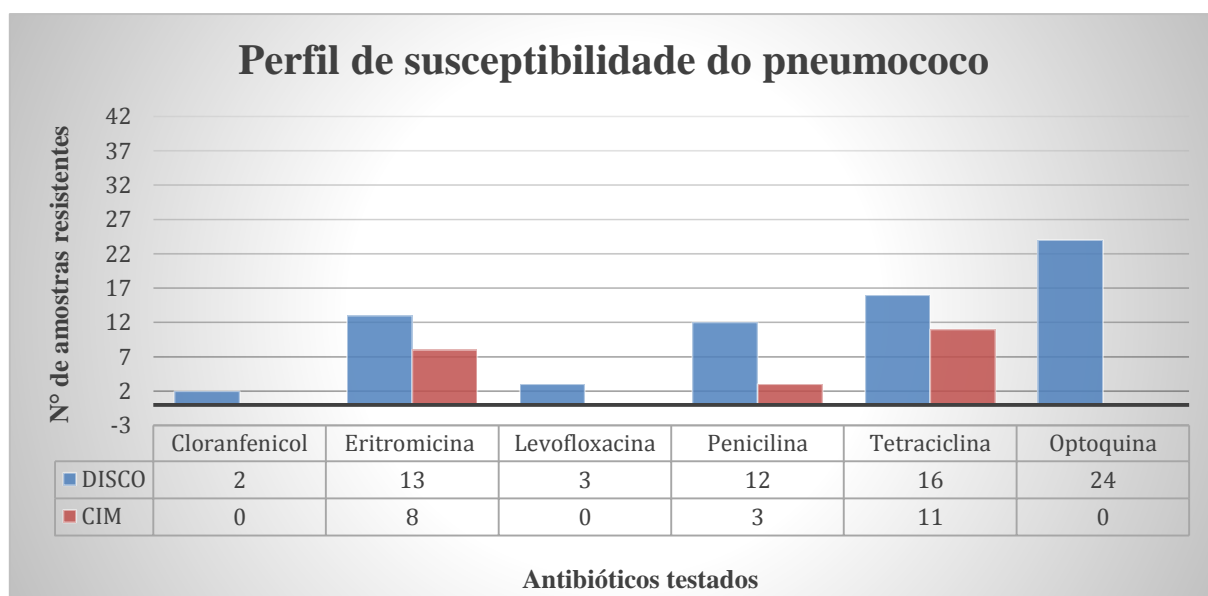


Fonte: Própria, 2022. As cores no mapa variam de acordo com intensidade, onde as regiões mais escuras são as que enviaram maior número de amostras.

Após a identificação de todas as cepas, temos os seguintes resultados: das 211 cepas testadas, 35 apresentaram resistência a pelo menos um dos

antibióticos (16,5%). Além da resistência aos antibióticos, 24 cepas (11,4%) foram resistentes à Opt. Das 35 cepas resistentes aos antibióticos, apenas uma apresentou resistência à três classes de antibióticos testados por disco difusão, sendo classificada como multidroga resistente (MDR) segundo a classificação de MAGIORAKOS *et.al.*, 2012. Essa cepa não foi resistente à Opt. A resistência aos outros antibióticos foi confirmada através do CIM, observando uma maior expressão para a tetraciclina (8%) seguida por eritromicina (6,1%), penicilina (5,7%), levofloxacina (1,9%) e cloranfenicol (0,9%). Os valores de resistência, distribuídos de acordo com cada antibiótico estão representados na figura 6, vale ressaltar que uma mesma cepa pode apresentar resistência à uma ou mais classes de antibióticos.

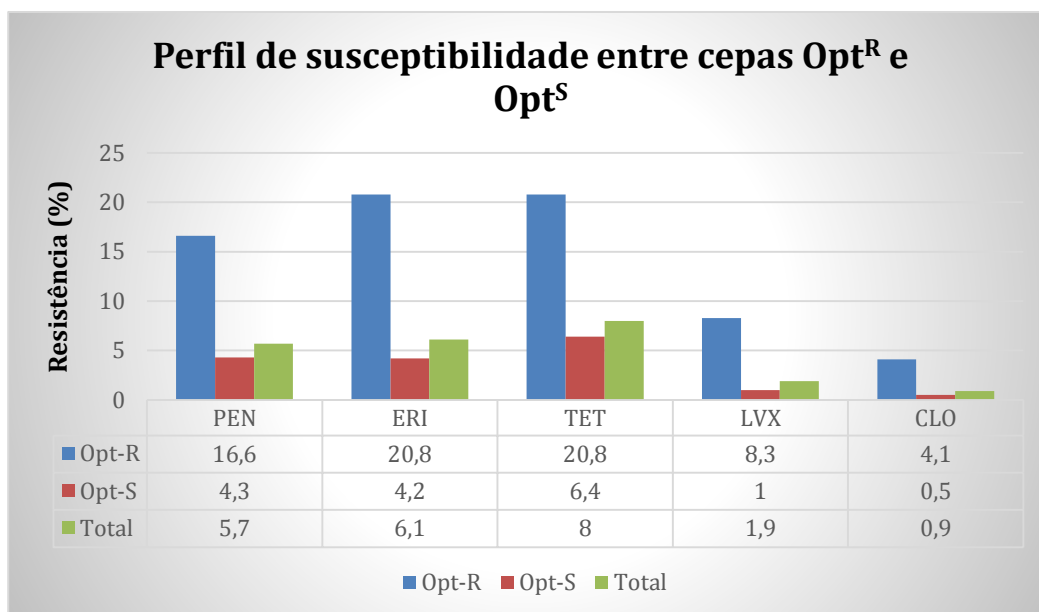
Figura 6 - Perfil de susceptibilidade de *S. pneumoniae* por disco - difusão e por CIM.



Fonte: Própria, 2022.

Das 211 cepas classificadas como pneumococos, 24 (11,4%) foram resistentes à Opt, e confirmadas como pneumococo através da PCR. Quando comparamos a resistência entre as cepas Opt^R e Opt^S aos demais antibióticos, a proporção de cepas resistentes é maior entre as classificadas como Opt^R, sugerindo uma relação entre o fenótipo Opt^R e o aumento da resistência aos antibióticos. A figura 7 mostra essa comparação.

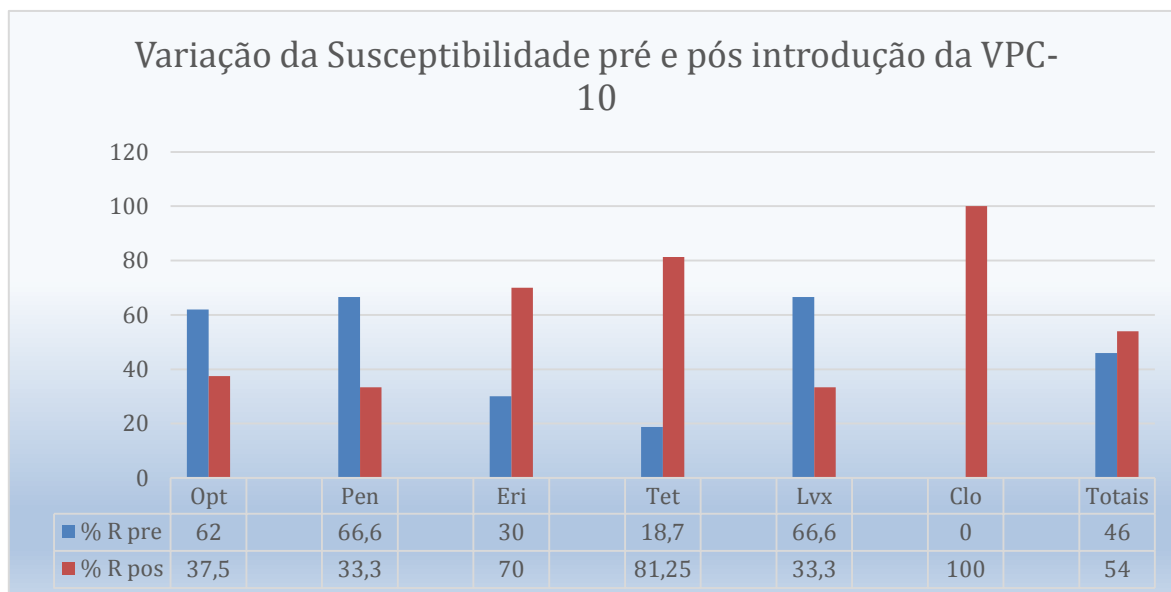
Figura 7 - Comparação da susceptibilidade aos antimicrobianos entre as cepas resistentes e sensíveis à Opt.



Fonte: Própria, 2022. PEN=penicilina, ERI=eritromicina, TET=tetraciclina, LVX=levofloxacina, CLO=cloranfenicol.

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi também avaliada comprando as cepas isoladas nos períodos pre- e pós vacinal. A Figura 8 mostra a proporção de cepas resistentes para cada antibiótico incluindo a Opt. Não foi observada uma diferença significativa em termos de resistência entre esses dois períodos. Em termos gerais, as cepas isoladas no período pós-vacinal apresentaram ligeiro aumento da resistência em comparação ao período pré-vacinal. No entanto, ao analisarmos separadamente o comportamento dessas cepas para cada antibiótico, é possível notar uma grande diferença para a penicilina e levofloxacina, com o dobro de cepas resistentes no período pré-vacinal, e valores inversos para os antibióticos eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol que apresentam uma resistência muito maior no período pós-vacinal.

Figura 8 - Comparação do perfil de susceptibilidade entre as cepas do período pré e pós vacinal.



Fonte: Própria, 2022.

As cepas Opt^R, foram submetidas ao sequenciamento de um fragmento de ~1009pb utilizando os primers descritos por DIAS *et al.*, 2007.

A região amplificada corresponde à subunidade *c* da região F₀F₁ do gene da ATPase. Não foram observadas as mutações pontuais descritas pelos autores como responsáveis pela diminuição da susceptibilidade à Opt após alinhamento comparativo pelo programa BioEdit (HALL, 1999). No entanto, após tradução das sequências de nucleotídeos em aminoácidos pelo programa Transeq do pacote Emboss (acesso em: https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/) encontramos algumas mutações nos genes *atpB* e *atpC* que poderiam ser responsáveis pelo fenótipo Opt^R.

Adicionalmente, a análise das sequências descritas por NAGATA *et al.*, 2012, DIAS *et al.*, 2013; RADDAOUI *et al.*, 2018 e SOUZA *et al.*, 2021 no banco de dados de MLST do *S. pneumoniae* (acesso em: <https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-pneumoniae/>), indicou múltiplos alelos para as sequências dos genes *atpA*, *atpB* e *atpC* de cepas OPT^R. Todas as sequências descritas por DIAS *et al.*, 2013 na região do gene *atpC*, foram classificadas como alelo 80 pelo banco de MLST. Das 24 cepas sequenciadas, foram obtidas 16 sequências com qualidade satisfatória para comparação. Foram então encontradas 12 cepas com o mesmo alelo 80 e mais duas com

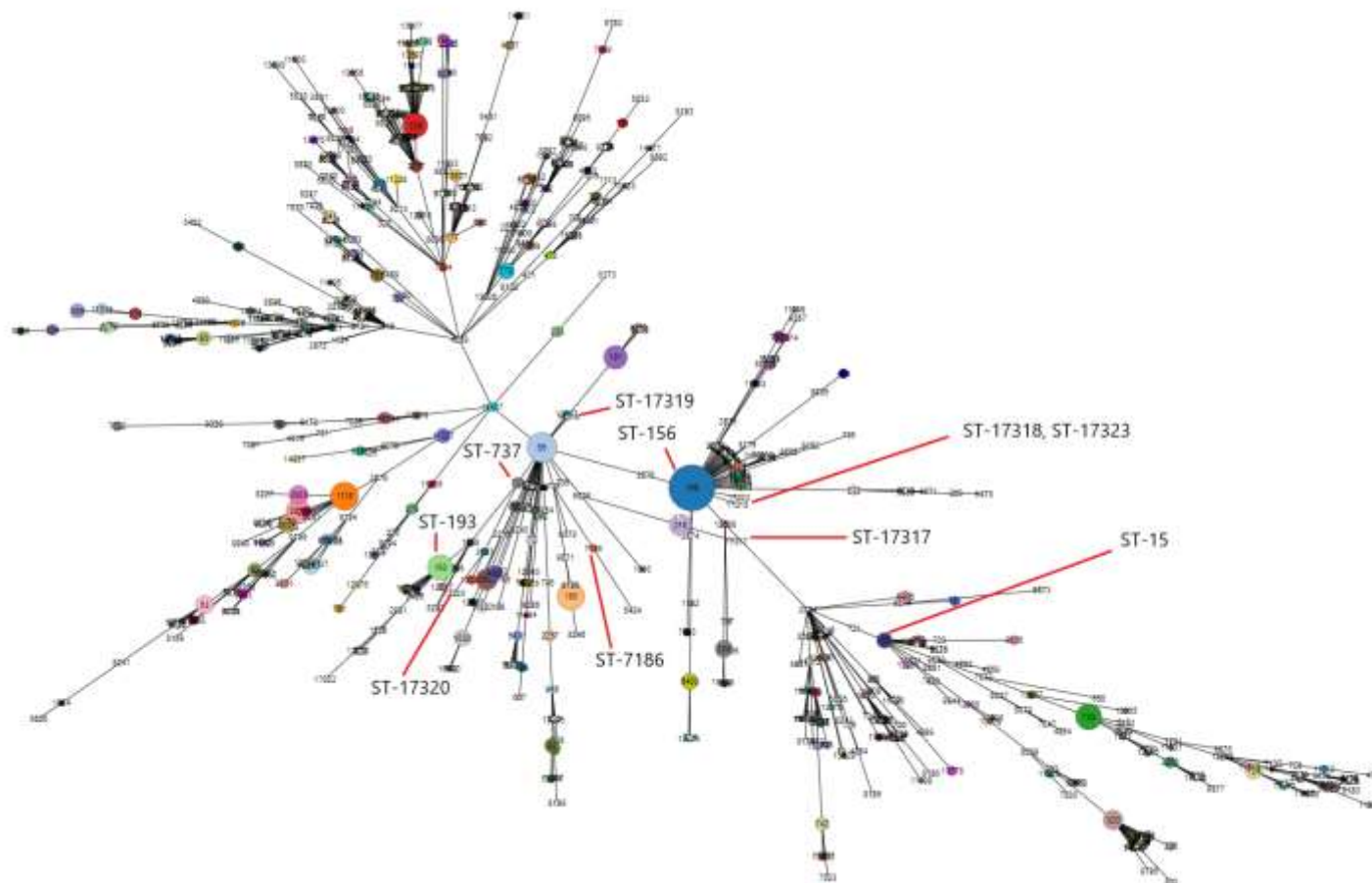
alelo 59, uma com alelo 64 e uma com alelo 51. Todas portanto com diferentes mutações nessa região do gene da ATPase, o que sugere ser o mecanismo de resistência à Opt dessas cepas.

4. 1. Análise por MLST

Dezesseis cepas Opt^R foram analisadas pelo sequenciamento de sete genes constitutivos (MLST). O perfil de alelos para a definição dos *Sequence Types* (ST) foi submetido ao banco de dados de MLST de pneumococos em <https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-pneumoniae>. A análise dos perfis alélicos dessas cepas no banco de dados resultou em sete ST com 100% de concordância com ST já depositados no banco de dados, ST-15 (duas cepas), ST-156, ST-193, ST-646, ST-737, ST-2880 e ST-7186 sendo um por cepa. As outras sete cepas não apresentaram similaridade de 100% com nenhum ST já descrito e, portanto, são considerados novos ST e foram designados conforme a seguir: ST-17317, ST-17318, ST-17319, ST-17320, ST-17321, ST-17322 e ST-17323. Uma cepa não foi classificada.

As relações filogenéticas entre as cepas Opt^R e as outras cepas do banco de dados que contém atualmente, 73.634 isolados depositados de todo o mundo sendo 1.331 isolados do Brasil, foram analisadas através do *Minimum Spanning Tree* (MST). A análise mostra uma forte relação genética da maioria das cepas Opt^R com o ST-66. De fato, é possível agrupar vários das cepas classificadas com os ST já descritos e a maioria dos novos ST em um complexo clonal (cc) a partir do ST-66 que poderia ser chamado de cc66, já que esses ST apresentam quatro ou mais alelos em comum com o ST-66. Nesse grupo foram incluídas as cepas classificadas como ST- 737, ST-7186, ST-193, ST-156 já descritos e os novos ST-17317, ST-17318, ST-17319, ST-17320 e ST-17323 (Figura 9).

Figura 9 - Análise filogenética por *Minimum Spanning Tree* (MST) dos ST descritos a partir das cepas Opt^R.



Fonte: Própria , 2022. Os ST associados ao cc66 e o ST-15 estão indicados por linhas vermelhas.

A Tabela 1 mostra a distribuição de todos os ST descritos nesse estudo e as relações dos ST, sorotipos e complexos clonais obtidas pela análise por MST.

Tabela 1 - Relações entre os ST, sorotipos e complexos clonais obtidos após análise por MST.

ST	SOROTIPO	COMPLEXO CLONAL
15	14	15
156	14	66
193	18C	66
737	7C	66
2880	19A	ND
7186	ND	66
17317	ND	66
17318	ND	66
17319	ND	66
17320	ND	66
17321	ND	ND
17322	ND	ND
17323	ND	66

Fonte: Própria, 2022. ND=não determinado.

5. DISCUSSÃO

A determinação da susceptibilidade à Opt, para a identificação do pneumococo é um método comumente utilizado em laboratórios de rotina, por ser uma técnica rápida e de baixo custo. Entretanto, os relatos de cepas resistentes ao antibiótico têm

colocado em dúvida a real eficácia e confiabilidade do teste (PIKIS *et al.*, 2001; NAGATA *et al.*, 2012). Analisar e identificar o mecanismo de resistência presente nestas cepas é crucial para o desenvolvimento de medidas de controle, além de novos métodos que identifiquem e diferenciem o pneumococo de outros estreptococos e para entender as relações das cepas Opt^R com as cepas Opt^S.

Nosso estudo mostrou um aumento de cepas com diminuição da susceptibilidade à Opt, com 11,4% das cepas apresentando o fenótipo Opt^R. Podemos considerar um número importante pois impacta diretamente na correta identificação de cepas patogênicas de pneumococos em processos infecciosos envolvendo sepse, meningites, pneumonias, otites, entre outros cuja identificação acurada é imprescindível para um bom prognóstico tanto em laboratórios públicos quanto privados.

De acordo com nossos resultados, podemos observar uma clara relação da diminuição da susceptibilidade aos antimicrobianos com o aumento da resistência à Opt, mostrando que o aumento da resistência a diversos antimicrobianos, vem evoluindo numa taxa mais rápida entre as cepas Opt^R. No entanto a única cepa resistente a três classes de antibióticos (eritromicina, penicilina e tetraciclina) classificada como MDR e encontrada nesse estudo, não apresentou resistência à Opt.

Não foi possível observar uma diferença significativa no aumento da resistência entre cepas isoladas no período pré e pós vacinal. Esse resultado é observado quando calculamos a média entre os antibióticos testados incluindo a Opt. Três antibióticos (Opt, penicilina e levofloxacina) apresentaram maior número de cepas resistentes nos isolados do período pré-vacinal, enquanto para os outros três (eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol) o aumento da resistência foi observado entre os isolados do período pós-vacinal. Seriam necessários mais estudos com outros antibióticos e um maior número de cepas para poder inferir qualquer conclusão em relação a esses resultados.

Os ST obtidos após a análise por MLST e suas relações filogenéticas por MST das 16 cepas Opt^R mostraram que quatro cepas pertencentes a ST já descritos e 5 cepas com novos ST, agruparam com 4 ou mais alelos iguais ao ST-66. No banco de dados de MLST existem 321 pertencentes ao ST-66, sem contar cepas que poderiam ser agrupadas no cc66 com quatro ou mais alelos iguais. A grande maioria (83%) dessas cepas, foi isolada de diferentes processos infecciosos sendo 79% de doenças invasivas (meningites e sepse) o que é preocupante pois isso revela o potencial

patogênico desse clone. Os sorotipos 9N e 19A são os mais associados a esse clone, sendo encontrados em 87% das cepas do ST-66. Essa característica é mais um fator de preocupação, pois esses dois sorotipos não estão incluídos na PCV-10 utilizada no Brasil. Além de cepas associadas ao ST-66, duas cepas foram classificadas como ST-15 que é um outro ST fortemente associado à agravos importantes, com 77% das cepas isoladas de doenças invasivas e infecções respiratórias. Por outro lado, 93% dessas cepas pertencem ao sorogrupo 14 que está incluído na PCV-10. Uma outra observação importante é que entre os ST já descritos, três (ST-737, ST-2880 e ST-7186) foram descritos apenas no Brasil. Dois desses ST estão associados a sorotipos que não estão nem na PCV-10 nem na PCV-13 (ST-737, sorotipo 7C; ST-7186, sorotipo 10F) e um está associado a um sorotipo presente apenas na PCV-13 (ST-2880, sorotipo 19A). Todas as cepas pertencentes a esses três ST, foram isoladas de doenças invasivas e respiratórias, apresentando um grande potencial de virulência.

A análise por MLST mostrou que há uma forte associação entre sorotipos e ST novos ou já descritos e que o sorotipo 19A está particularmente presente em diferentes ST com grande potencial de disseminação no país além de novos sorotipos que não estão presentes na PCV-13 utilizada pelo PNI no Brasil. A associação dessas cepas com cepas Opt^R e com susceptibilidade a outros antimicrobianos reduzida, é mais um fator de preocupação e sua circulação deve ser constantemente monitorada.

Ademais, os resultados obtidos em relação aos mecanismos de resistência à Opt entre as cepas avaliadas, mostram que mutações em outras regiões do gene da ATPase, podem estar relacionadas com o aumento de cepas Opt^R, diferente do que tem sido descrito até o momento (DIAS *et al.*, 2007; RADDAOUI *et al.*, 2018). As mutações encontradas em nosso estudo, estão mais relacionadas com as descritas por SOUZA *et al.*, 2021, envolvendo diferenças nos genes *atpA* e *atpB*.

6. CONCLUSÕES

Com o constante crescimento das cepas resistentes não só a optoquina, mas em conjunto com os antibióticos utilizados no seu tratamento e profilaxia, é cada vez mais necessária uma identificação mais criteriosa. No caso do pneumococo é urgente

a determinação de métodos que atuem em conjunto com o teste de susceptibilidade à optoquina, visando a diminuição de resultados falso negativos, tendo em vista que cepas resistentes à optoquina são consideradas não pneumocócicas, para assegurar um diagnóstico mais eficaz e possibilitar sucesso do tratamento ao paciente. Além disso, é de suma importância o monitoramento destes microrganismos com potencial de resistência e principalmente os provenientes de pacientes portadores de Síndrome Respiratória Aguda Grave, e da introdução de novos clones e novos sorotipos nesta observação, para prevenir possíveis epidemias causadas por microrganismos multidroga resistentes não imunopreveníveis.

Existe hoje uma discussão entre epidemiologistas sobre o aumento do número de casos de doenças invasivas e respiratórias causadas por *S. pneumoniae* 19A e que por essa razão, esse sorotipo deveria ser incluído na vacina PCV-10 atualmente oferecida no calendário nacional. Outra opção seria a substituição da PCV-10 pela PCV-13 que já inclui o sorotipo 19A além do 3 e do 6A. Essa discussão é extremamente oportuna e pelos estudos recentemente publicados além do estudo aqui apresentado, a inclusão desse sorotipo na vacina, seria uma importante ação das autoridades de Vigilância Sanitária contra a disseminação de cepas com grande potencial patogênico, para as quais a população não está protegida.

7. REFERÊNCIAS

1. ANVISA, 2008. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos5.htm. Acesso em: 20 mai. 2021.

2. Barreto, Bruno Acatauassú; *et al.* Specific anti-pneumococcal polysaccharide antibody deficiency and humoral response to pneumococcal vaccines: Update on diagnosis. **Braz j allergy immunol**, são paulo, v.1, n. 5, p. 253-260, 2013.
3. Borek ap, Dressel Dc, Hussong J, Peterson Ir. Evolving clinical problems with streptococcus pneumoniae: Increasing resistance to antimicrobial agents, and failure of traditional optochin identification in chicago, illinois, between 1993 and 1996. *Diagn microbiol infect dis.* 1997 dec;29(4):209-14. Doi: 10.1016/s0732-8893(97)00141-7. Pmid: 9458976.
4. BRANDILEONE, Maria-Cristina C. *et al.* Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **J Med Microbiol**, São Paulo, v. 55, n.5, p.567-574, mai. 2006.
3. Brooks LRK, Mias GI. *Streptococcus pneumoniae's* Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front Immunol.* 2018 Jun 22;9:1366. doi: 10.3389/fimmu.2018.01366. PMID: 29988379; PMCID: PMC6023974.
4. BROOKS, Geo F; CARROLL, Karen C; BUTEL, Janet S. *et al.* **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg (lange)**. 25° ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. 828p.
5. CDC, 2008. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5742a2.htm>. Acesso em: 25 abr. 2021.
6. Cornick JE, Bentley SD. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. *Microbes Infect.* 2012 Jul;14(7-8):573-83. doi: 10.1016/j.micinf.2012.01.012. Epub 2012 Feb 4. PMID: 22342898.

7. Deng X, Peirano G, Schillberg E, Mazzulli T, Gray-Owen SD, Wylie JL, Robinson DA, Mahmud SM, Pillai DR. Whole-Genome Sequencing Reveals the Origin and Rapid Evolution of an Emerging Outbreak Strain of *Streptococcus pneumoniae* 12F. *Clin Infect Dis*. 2016 May 1;62(9):1126-1132. doi: 10.1093/cid/ciw050. Epub 2016 Feb 7. PMID: 26908785.
8. Dias ca, Agnes G, Frazzon Ap, Kruger FD, D'azevedo PA, Carvalho MDA G, Facklam RR, Teixeira Im. Diversity of mutations in the atpc gene coding for the c subunit of f0f1 atpase in clinical isolates of optochin-resistant *streptococcus pneumoniae* from brazil. *J clin microbiol*. 2007 sep;45(9):3065-7. Doi: 10.1128/jcm.00891-07. Epub 2007 jul 11. Pmid: 17626173; pmcid: Pmc2045260.
9. Dias CA, Teixeira Im, Carvalho MDG, Beall B. Sequential multiplex pcr for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from brazilian children. *J med microbiol*. 2007 sep;56(pt 9):1185-1188. Doi: 10.1099/jmm.0.47347-0. Pmid: 17761481.
10. Eucast, 2021. European committee on antimicrobial susceptibility testing. Disponível em: Eucast: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. Acesso em: Dez.2021.
11. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Morris L, Buckridge S, Felmingham D. Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both erm(B)- and mef(A)-mediated macrolide resistance. *J Clin Microbiol*. 2004 Feb;42(2):764-8. doi: 10.1128/JCM.42.2.764-768.2004. PMID: 14766850; PMCID: PMC344484.
12. FIOCRUZ, 2021. Disponível em: [Cobertura vacinal \(who.int\)](#)

13. FUNASA, 2002. Guia de vigilância epidemiológica / Fundação Nacional de Saúde. 5. ed. Brasília : FUNASA, 2002.
14. Gallego; Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/148013>>.
15. García-Suárez Mdel M, Vázquez F, Méndez FJ. Streptococcus pneumoniae virulence factors and their clinical impact: An update. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006 Oct;24(8):512-7. doi: 10.1157/13092469. PMID: 16987470.
16. Grivea IN, Sourla A, Ntokou E, et al. Macrolide resistance determinants among Streptococcus pneumoniae isolates from carriers in Central Greece. *BMC Infectious Diseases*. 2012 Oct;12:255. DOI: 10.1186/1471-2334-12-255. PMID: 23057516; PMCID: PMC3484024
17. Hall, T.a. 1999. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
18. Imöhl M, Möller J, Reinert RR, Perniciaro S, van der Linden M, Aktas O. Pneumococcal meningitis and vaccine effects in the era of conjugate vaccination: results of 20 years of nationwide surveillance in Germany. *BMC Infect Dis*. 2015 Feb 14;15:61. doi: 10.1186/s12879-015-0787-1. PMID: 25885764; PMCID: PMC4335684.
19. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Apr;6(4):288-301. doi: 10.1038/nrmicro1871. PMID: 18340341.
20. KARUNANAYAKE, L; Bandara, D; DUNUSINGHE, P. Fatal meningitis in a child due to multidrug resistant Streptococcus pneumoniae. **Ceylon Medical Journal**, Sri Lanka, v. 52, n. 1, p. 32-33, mar. 2007.

21. Kellogg Ja, Bankert Da, Elder CJ, Gibbs JL, Smith MC. Identification of streptococcus pneumoniae revisited. *J clin microbiol.* 2001 sep;39(9):3373-5. Doi: 10.1128/jcm.39.9.3373-3375.2001. Pmid: 11526182; pmcid: Pmc88350.
22. Kupek, E., & Vieira, I. L. V. (2016). O impacto da vacina pneumocócica PCV10 na redução da mortalidade por pneumonia em crianças menores de um ano em Santa Catarina, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 32(3), e00131414. doi:10.1590/0102-311X00131414
23. LOUREIRO, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2015.11.003>. Acesso em: fev. 2022.
24. LPSN. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/species/streptococcus-pneumoniae>. Acesso em: 22 abr. 2021.
25. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-liljequist B, Paterson DL, Rice IB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin microbiol infect.* 2012 mar;18(3):268-81. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 jul 27. Pmid: 21793988.
26. Molina R., González A., Stelter M., Pérez-Dorado I., Kahn R., Morales M., Moscoso M., Campuzano S., Campillo N.E., Mobashery S., et al. Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Rep.* 2009;10:246–251. doi: 10.1038/embor.2008.245.
27. Moujaber G El, Osman M, Rafei R, Dabboussi F, Hamze M. Molecular mechanisms and epidemiology of resistance in *Streptococcus pneumoniae* in

- the Middle East region. *J Med Microbiol.* 2017 Jul;66(7):847-858. doi: 10.1099/jmm.0.000503. Epub 2017 Jun 26. PMID: 28650313.
28. MURRAY, Patrick R; ROSENTHAL, Ken S; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica.** 6° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 948p.
29. Nagata, o. Ueda, t. Shobuike, t. Muratani, y. Aoki and h. Miyamoto, "Emergence of optochin resistance among *streptococcus pneumoniae* in japan," *Open journal of medical microbiology*, vol. 2 no. 1, 2012, pp. 8-15. Doi: 10.4236/ojmm.2012.21002.
30. OMS, 2014. Disponível em: <https://www.who.int/immunization/diseases/pneumococcal/en/>. Acesso em: 23 abr. 2021.
31. OMS, 2017. Disponível em: <https://periodicos.fiocruz.br/pt-br/content/bact%C3%A9rias-resistentes-medicamentos>. Acesso em: Dez. 2020
32. OMS, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>. Acesso em: abr. 2021.
33. OMS, 2019. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/immunization/position_paper_documents/pneumococcus/who-pp-pcv-2019-summary.pdf?sfvrsn=3e4fdf81_2. Acesso em: 27 abr. 2021
34. O'Neill, J. et al (2016). Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance, chaired by Jim O'Neill. Available at: https://amrreview.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf. Acesso em: fev. 2022.

35. OPAS, 2021. Disponível em: [Rede Latino-Americana de Vigilância da Resistência Antimicrobiana - ReLAVRA - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde \(paho.org\)](#)
36. PIKIS, Andreas. *et al.* Optochin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Mechanism, Significance, and Clinical Implications. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p.582-590, set. 2001.
37. Pinto TC, Souza AR, De pina SE, Costa NS, Borges Neto AA, Neves FP, Merquior VL, Dias CA, Peralta JM, Teixeira IM. Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant streptococcus pneumoniae isolates from brazil, with description of five novel mutations in the atpc gene. J clin microbiol. 2013 oct;51(10):3242-9. Doi: 10.1128/jcm.01168-13. Epub 2013 jul 24. Pmid: 23884994; pmcid: Pmc3811620.
38. Raddaoui A, Ben Tanfous F, Achour W, Baaboura R, Ben Hassen A. Description of a novel mutation in the atpc gene in optochin-resistant streptococcus pneumoniae strains isolates from tunisia. Int j antimicrob agents. 2018 may;51(5):803-805. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.12.029. Epub 2018 jan 3. Pmid: 29305958.
39. Rizzo L, Fiorentino A, Anselmo A. Advanced treatment of urban wastewater by UV radiation: Effect on antibiotics and antibiotic-resistant E. coli strains. Chemosphere. 2013 Jun;92(2):171-6. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.03.021. Epub 2013 Apr 13. PMID: 23591136.
40. SBIM, 2020. Disponível em: <https://familia.sbim.org.br/doencas/doenca-pneumococica-dp>. Acesso em: 30 mai. 2021.
41. SBIM, 2020. Disponível em: [Vacina pneumocócica polissacarídica 23-valente – VPP23 - Família SBIm](#). Acesso em: 02 fev. 2022.

42. Schroeder MR, Stephens DS. Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016 Sep 21;6:98. doi: 10.3389/fcimb.2016.00098. PMID: 27709102; PMCID: PMC5030221.
43. Shak JR, Ludewick HP, Howery KE, Sakai F, Yi H, Harvey RM, Paton JC, Klugman KP, Vidal JE. Novel role for the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. *mBio*. 2013 Sep 10;4(5):e00655-13. doi: 10.1128/mBio.00655-13. PMID: 24023386; PMCID: PMC3774193.
44. Silva, A. F. T. da, Valente, F. de S., Sousa, L. D. de, Cardoso, P. N. M., Silva, M. A. da, & Santos, D. R. dos. (2021). Estudo epidemiológico sobre meningite bacteriana no Brasil no período entre 2009 a 2018. *Revista De Medicina*, 100(3), 220-228. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v100i3p220-228>
45. Souza, A.R.V., De Pina, S.E.C.M., Costa, N.S. *Et al.* Description of optochin-resistant *streptococcus pneumoniae* due to an uncommon mutation in the *atpa* gene and comparison with previously identified *atpc* mutants from brazil. *Sci rep* 11, 7936 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87071-8>
46. SUTCLIFFE, Joyce; TAIT-KAMRADT, Amelia; WONDRACK, Lillian. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* Resistant to Macrolides but Sensitive to Clindamycin: a Common Resistance Pattern Mediated by a Efflux System. **Antimicrob Agents Chemoter**, v. 40, n. 8, p. 1817-1824, ago. 1996.
47. SVS, 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_procedimentos_vacinacao.pdf. Acesso em: 29, abr. 2021.

48. SVS, 2019. Disponível em:
<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf>. Acesso em: 29, abr. 2021
49. TORTORA, Gerard J; FUNKE, Berdell R; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10° ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967p.
50. Van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009 Oct 31;374(9700):1543-56. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61114-4. PMID: 19880020.
51. WHATMORE, Adrian M. *et al*. Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of "Atypical" pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. **Infect Immun**, v. 68, n. 3, p. 1374-1382, mar. 2000.
52. WHITMAN, William B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 3°ed. Nova York: Springer, 2009. 1450p.
53. Yoo IH, Shin HS, Kim YJ, Kim HB, Jin S, Ha UH. Role of pneumococcal pneumolysin in the induction of an inflammatory response in human epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010 Oct;60(1):28-35. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00699.x. PMID: 20528932.
54. Yun KW, Lee H, Choi EH, Lee HJ. Diversity of Pneumolysin and Pneumococcal Histidine Triad Protein D of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Invasive Diseases in Korean Children. *PLoS One*. 2015 Aug 7;10(8):e0134055. doi: 10.1371/journal.pone.0134055. PMID: 26252211; PMCID: PMC4529296.