



**FIOCRUZ**

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

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Medicina  
Investigativa**

**TESE DE DOUTORADO**

**COLONIZAÇÃO NASOFARINGEANA POR  
*STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*: ESTUDO  
LONGITUDINAL EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO  
ANOS DE IDADE.**

**ANA PAULA DE OLIVEIRA MENEZES**

**Salvador - Bahia - Brasil**  
**2014**

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

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Medicina  
Investigativa**

**COLONIZAÇÃO NASOFARINGEANA POR  
*STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*: ESTUDO  
LONGITUDINAL EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO  
ANOS DE IDADE**

**ANA PAULA DE OLIVEIRA MENEZES**

Orientador: Dra. Joice Neves Reis Pedreira

Tese apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Biotecnologia em  
Saúde e Medicina Investigativa  
para obtenção do grau de Doutor.

**Salvador - Bahia – Brasil**  
**2014**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Menezes, Ana Paula de Oliveira

M543c Colonização Nasofaringeana por *streptococcus pneumoniae*: estudo lngitudinal em crianças menores de cinco anos de idade. / Ana Paula de Oliveira Menezes. - 2014.

89 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Joice Neves Reis Pedreira, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

Tese (doutorado) – Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

1. *Streptococcus pneumoniae*. 2. Nasofaringe. 3. Vacina conjugada. I.Título.

CDU 616.981.21

COLONIZAÇÃO NASOFARINGEANA POR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*:  
ESTUDO LONGITUDINAL EM CRIANÇAS  $\leq 5$  ANOS DE IDADE.

ANA PAULA DE OLIVEIRA MENEZES

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comissão Examinadora

---

Dra. Maria da Conceição Chagas de Almeida  
Pesquisadora do CPqGM/PGBSMI

---

Dra. Tânia Fraga Barros  
Professora Associada da UFBA/PPGFAR

---

Dr. Geraldo Marcelo da Cunha  
Escola Nacional de Saúde Pública/ENSP-FIOCRUZ

*A Deus, pela vida.*

*A meus pais, Valteir e Ondina, pelo amor e dedicação. Ao meu  
irmão, Rodrigo pelo amor e paciência.*

*Ao meu namorado, Marcos, pelo companheirismo e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

- A Deus por me conceder os melhores caminhos na minha vida profissional.
- A orientadora Dra. Joice Neves Reis Pedreira pela oportunidade de trabalhar em pesquisa e constante orientação.
- Aos coordenadores do Mestrado e Doutorado em Biotecnologia e Medicina Investigativa, pela presteza e competência com que têm conduzido este curso.
- Aos demais professores, colegas do doutorado e a ex-secretária do curso, Taíse Coutinho e a secretária lumara o. Evangelista.
- Ao Coordenador, Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, os pesquisadores, Eliana Reis, Theomira Conceição e Luciano Kalabric pelo apoio profissional.
- Aos estudantes do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular pela amizade e incentivo em todos estes anos, especialmente, Gisele Lopes, Cyntia, Wendell, Adenizar Chagas.
- Ao Dr. Edson Duarte por permitir a realização dos experimentos no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Bioestatística.
- Ao Dr. Guilherme Ribeiro e Dr. Marcelo Cunha pelo auxílio nas análises estatísticas.
- A Dra. Marilda Gonçalves e os seus orientandos pelo apoio profissional e amizade.
- A estudante de enfermagem Suelen Figueredo, doutorando Jailton Azevedo e a mestranda Mariela Leite por auxiliar na coleta dos swabs de nasofaringe das crianças e na entrevista dos responsáveis legais pelas crianças.
- A pesquisadora Leila Campos por contribuir na correção do anti-projeto, submetido a pós-graduação, e auxiliar na coleta dos swabs de nasofaringe.
- A Dra. Soraia Cordeiro e doutoranda Milena Soares pelo apoio profissional e amizade.
- A equipe de pesquisa, doutoranda Cristiane Cardoso, aos mestrandos Cláudia Alves, Lorena Freire e Luís Eduardo Viana e aos estudantes de iniciação científica.
- Aos ex-componentes da equipe de pesquisa Vivian Galvão e Diêgo Rodrigo Reis pelo auxílio no laboratório e amizade.

- A Dra. Tânia Barros e aos estudantes do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (UFBA) pelo apoio e amizade e, em especial a Mestre Carolina Arraes, pelo auxílio e orientação na rotina do laboratório.
- A coordenadora do Laboratório Pesquisa em Hematologia (UFBA) Dra. Elisângela Adorno por permitir a utilização do fotodocumentador, além da amizade ao longo desses anos.
- A Sra. Ana Maria Fiscina Sampaio, coordenadora da Biblioteca, pela normalização e revisão das referências bibliográfica.
- Ao Dr<sup>o</sup> Bernard Beall chefe do Streptococcus Laboratory, National Centers for Infectious Disease, CDC, e Dra. Maria da Glória Carvalho (CDC) pelo treinamento nas técnicas de Biologia Molecular, na sorotipagem das cepas de *Streptococcus pneumoniae* e na elaboração do primeiro artigo deste trabalho.
- A Dr<sup>a</sup> Conceição Chagas pelas importantes observações na qualificação e depois da mesma.
- As crianças e aos seus responsáveis legais pelo consentimento e aceitação desta pesquisa.
- A todos aqueles que, embora não citados, também contribuíram para o nosso êxito.

“No campo das observações o acaso favorece apenas  
as mentes preparadas.”

*Louis Pasteur*



MENEZES, Ana Paula de Oliveira. Colonização nasofaringeana por *Streptococcus pneumoniae*: Estudo longitudinal em crianças menores de cinco anos de idade. f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## RESUMO

*Streptococcus pneumoniae* é um dos agentes etiológicos mais importantes em infecções adquiridas na comunidade. Este patógeno coloniza o trato respiratório de indivíduos saudáveis, apresentando maior prevalência entre 1 e 2 anos de idade (aproximadamente 50%) e depois diminui com a idade adulta (aproximadamente 10%). A alta incidência das doenças pneumocócicas e a crescente resistência aos antimicrobianos, favoreceu a introdução das vacinas conjugadas (ano de 2000). Após a introdução das vacinas conjugadas foi observado à queda na incidência da doença pneumocócica e diminuição da prevalência de colonização por sorotipos vacinais. Em contrapartida vem sendo notado o aumento de casos de doença sorotipos não vacinais. Por isso a importância de verificar a dinâmica da colonização nasofaringeana por pneumococos em crianças < 5 anos de idade antes da introdução da vacina. Foram selecionadas randomicamente 203 crianças residentes da comunidade de Pau da Lima, Salvador, Bahia, das quais foi colhido a amostra nasofaringeana em quatro períodos durante um ano com intervalo de três a quatro meses entre cada coleta. No período de janeiro de 2008 a janeiro de 2009 foram colhidos um total de 721 swabs, sendo 398 positivos para pneumococos (56%). Os fatores de risco associados a colonização foram: aglomeração, contato com crianças menores de 2 anos de idade e presença de ITRS. Os sorotipos vacinais mais prevalentes foram o 6A/B, 19F, 14, 23F e 18. O sorotipo 19F foi o segundo mais prevalente e associado com a não susceptibilidade à penicilina. Dezesesseis isolados do sorotipo 19F foram não tipáveis (NT) pelo método de multiplex PCR; sendo identificados apenas quando submetidos a reação de Quellung. Por isso, foi desenvolvido um novo primer para identificação deste sorotipo. Entre os sorotipos não vacinais os mais prevalentes foram o 16F, 15B/C, 6C e 34. A não susceptibilidade a penicilina e TMP/SMX foi de 38,5% e 58,0%, respectivamente. Pode-se observar que 91% dessas crianças estiveram colonizadas pelo menos uma vez durante o seguimento e que sorotipos não vacinais (34 e 15B/C) persistiram colonizando a mesma criança em mais de uma coleta. Ao longo do estudo, clones internacionais foram identificados na comunidade como o “Spain<sup>9V</sup>-3” (ST 156) e “Portugal <sup>19F</sup>-21” (ST 177), relacionados com a não susceptibilidade a penicilina. O monitoramento da dinâmica da colonização pós-vacina é importante para a adequação da prevenção na era das vacinas conjugadas com limitado número de sorotipos.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*, colonização nasofaringeana, vacina conjugada.

MENEZES, Ana Paula de Oliveira. Colonization nasopharyngeal by *Streptococcus pneumoniae*: longitudinal study in children under Five years old. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

*Streptococcus pneumoniae* is one of the most important etiologic agents in community-acquired infections. This pathogen colonizes the respiratory tract of healthy individuals shortly after birth, with higher prevalence of between 1 and 2 years of age (approximately 50%) and then decreases with age reaching adult rates below 10%. The high incidence and increasing antimicrobial resistance, favored the introduction of conjugate vaccines in 2000. After the introduction of conjugate vaccines a decreasing incidence of pneumococcal disease and carriage rates by vaccine serotypes was observed. In contrast we observe an increase in number of cases of disease and carriage by non-vaccine serotypes. Thus, this study aims to determine the dynamics of nasopharyngeal colonization by pneumococci in children <5 years of age after introduced the conjugate vaccine. A total of 203 children were random selected at the community of Pau da Lima in Salvador, Bahia, of whom the nasopharyngeal swab was collected in four periods with interval of 3 to 4 months between each collection. A total of 721 swabs were collected from January 2008 to January 2009, with 398 positive for pneumococci (56%). Risk factors associated with colonization were: crowding, contact with children lower than 2 years old and the presence of URTI. and The most prevalent vaccine serotype were 6A / B, 19F, 14; 23F and 18. The serotype 19F was the second most prevalent and associated with non-susceptibility to penicillin. Sixteen isolates of serotype 19F were nontypeable (NT) by the method of multiplex PCR; being identified only when submitted to Quellung reaction. Therefore, we developed a new primer to identify this serotype. The most prevalent non-vaccine serotypes were 16F, 15B / C, 6C and 34. The non-susceptibility to penicillin and TMP / SMX was 38.5% and 58.0%, respectively. It can be seen that 91% of the children were colonized at least once during follow-up and non-vaccine serotypes (34 and 15B / C) persisted colonizing the same child on more the one collection. Throughout the study, international clones were identified circulating at this community as the Spain9V-3 (ST 156) and Portugal 19F-21 (ST 177), all related with non-susceptibility to penicillin. The monitoring of the dynamics of post-vaccine colonization is important for the adequacy of prevention in the era of conjugated vaccines with limited repertoire of serotypes.

Keyword: *Streptococcus pneumoniae*, nasopharyngeal carriage, conjugate vaccine.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Typing Culture Collection</i>
CDC	<i>Center for Disease and Control</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
DLV	<i>Dublo locus variant</i>
<i>et al.</i>	Colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Osvaldo Cruz
LEMB	Laboratório de Epidemiologia Molecular e Bioestatística
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
LPMC	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica
MLST	<i>Multi Locus Sequence Type</i>
NT	Não tipável
ND	Não determinado
PFGE	<i>Pulse Field Electrophoretic</i>
PNSP	<i>Streptococcus pneumoniae</i> não susceptível a penicilina
PVC-7	Vacina Conjugada Heptavalente
PVC-10	Vacina Conjugada Decavalente
PVC-13	Vacina Conjugada 13-valente
PPV-23	Vacina Polissacarídica Pneumocócica 23- valente
TPM/SMX	Sulfametoxazol/trimetoprima
ST	Sequence Type
ST 156	Sequence Type 156 – clone de disseminação internacional

ST 177

Sequence Type 177 – clone de disseminação internacional

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1A	Coloração de Gram de secreção respiratória, mostrando diplococos Gram positivos característicos de pneumococos e células polimorfonucleares(PMN). Fonte:WWW..bact.wisc.edu/./S.pneumoniae1.jpg	16
Figura 1B	Morfologia do <i>Streptococcus pneumoniae</i> em meio de Agar sangue, exibindo–hemólise(Arquivo pessoal).	16
Figura 2.	Microscopia Eletrônica de <i>Streptococcus pneumoniae</i> evidenciando a cápsula polissacarídica. Fonte: Adaptado de PLETZ MW <i>et al.</i> ,2008	17
Figura 3A	Representação hipotética da superfície do pneumococo demonstrando alguns fatores de virulência. Fonte: Adaptação de BRILES, D. E. <i>et al</i> , Clinical Microbiology Reviews, 1998	18
Figura 3B	Microscopia eletrônica de pneumococo apresentando <i>pili</i> . Fonte: BAROCCHI <i>et al.</i> , PNAS, 2006	19
Figura 4	Mapa do bairro de Pau da Lima com a localização (círculo vermelho) das áreas que foram selecionados as crianças para participarem do estudo. Fonte: REIS, <i>et al.</i> , Plos Infected Tropical Diseases, 2008	30 e 31
Figura 5	Recovery of 36 serotypes 19F isolated that were non-typeable from carriage and invasive sources. Fonte: MENEZES, et al., J. Clin. Microb., 2013	35
Figura 6	Flow of Participants through the study	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Risk factors for pneumococcal carriage among children < 5 years old at community-level	52
Tabela 2	Risk factors for pneumococcal carriage among children < 5 years old, stratified by invasiveness property of serotype	53
Tabela 3	Serogroup/type distribution of all pneumococcal carriage isolates (N=398) recovered from children in Salvador, Bahia	54
Tabela 4	Frequência dos perfis genotípicos e fenotípicos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolados de nasofaringe de crianças na cidade de Salvador, Bahia	58 e 59

# SUMÁRIO

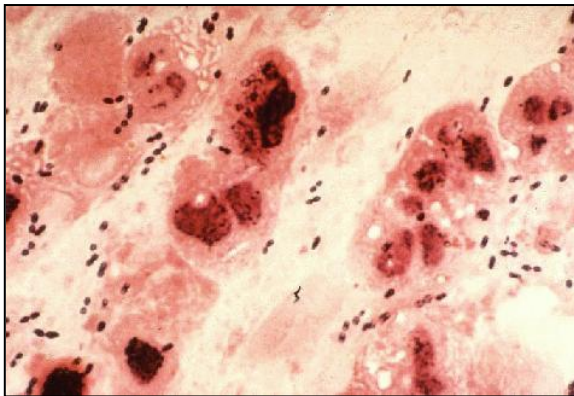
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	<i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> (PNEUMOCOCOS).....	16
1.2	COLONIZAÇÃO POR <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> .....	19
1.3	EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES PNEUMOCÓCICAS.....	20
1.4	FATORES BIOLÓGICOS QUE INFLUENCIAM A COLONIZAÇÃO, TRANSMISSÃO E PATOGENIA DO <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> .....	21
1.5	VACINAS PNEUMOCÓCICAS.....	23
1.6	A BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA OS ESTUDOS EPIDEMIOLOGICOS DE COLONIZAÇÃO NASOFARINGENA.....	25
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
3.1	GERAL.....	29
3.2	ESPECÍFICOS.....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
<b>5</b>	<b>ARTIGO 1.</b> <i>Update of pneumococcal pcr serotyping assay for detection of a commonly occurring type 19f wzy variant in Brazil</i> .....	34
<b>6</b>	<b>ARTIGO 2.</b> <i>Nasopharyngeal Carriage of <i>Streptococcus pneumoniae</i> among Children in Urban Setting in Brazil prior to PCV10 introduction</i> .....	37
<b>7</b>	<b>RESULTADOS ADICIONAIS</b> .....	55
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	60
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	66
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67
	<b>ANEXO I</b> .....	79
	<b>ANEXO II</b> .....	81
	<b>ANEXO III</b> .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

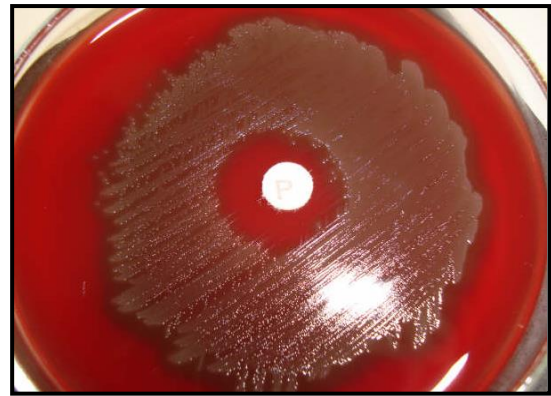
### 1.1 *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* (PNEUMOCOCOS)

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) é uma bactéria que foi descrita quase que simultaneamente, por Sternberg, em setembro de 1880, nos Estados Unidos da América e Pauster, em dezembro do mesmo ano, na França. Esta bactéria foi chamada primeiro de "*Micrococcus Pasteuri*, Sternberg" e após alguns anos, passou a ser chamada de *Streptococcus pneumoniae*, "*Streptococcus*" por apresentar pelo método de coloração de Gram a mesma estrutura dos estreptococos e "*pneumoniae*" por ser considerado agente etiológico da pneumonia (APUD AUSTRIAN, R., 1985).

Pneumococos são diplococos Gram positivos em formato de lanceta, encapsulados com diâmetro de 0,5-1,2  $\mu\text{m}$  (Figura 1A). Essa bactéria é anaeróbia facultativa e quando cultivada em meio de ágar sangue produz uma hemólise parcial denominada de  $\alpha$  hemólise, que se evidencia pela formação de uma área esverdeada em volta da colônia (Figura 1B) (BRAIDO, 2008; KELLOGG, 2001).



**Figura 1A.** Coloração de Gram de secreção respiratória, mostrando diplococos Gram positivos característicos de pneumococos e células polimorfonucleares (PMN).  
Fonte:WWW..bact.wisc.edu/.../S.pneumoniae1.jpg.

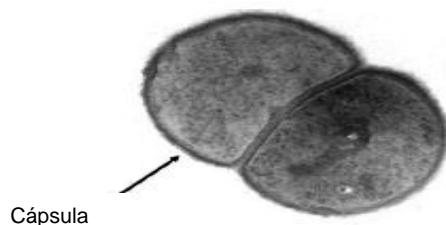


**Figura 1B.** Morfologia do *Streptococcus pneumoniae* em meio de Agar sangue, exibindo  $\alpha$ -hemólise (Arquivo pessoal).



Este patógeno quando cultivado em meios sólidos apresenta UFC (Unidades formadoras de colônia) com morfologia arredondada, translúcida ou opaca, lisa ou mucoide com um sulco central promovido pelo processo de autólise parcial (KELLOGG, 2001). Esta morfologia do pneumococo é variável de acordo com o sítio de isolamento, sendo que isolados da nasofaringe apresentam colônias transparentes e da corrente sanguínea, opacas. Essa característica se deve à presença da cápsula, fator de virulência, cuja expressão é variável entre cepas colonizadoras e invasivas (TUOMANEN, 1999; YOTHER, 1998).

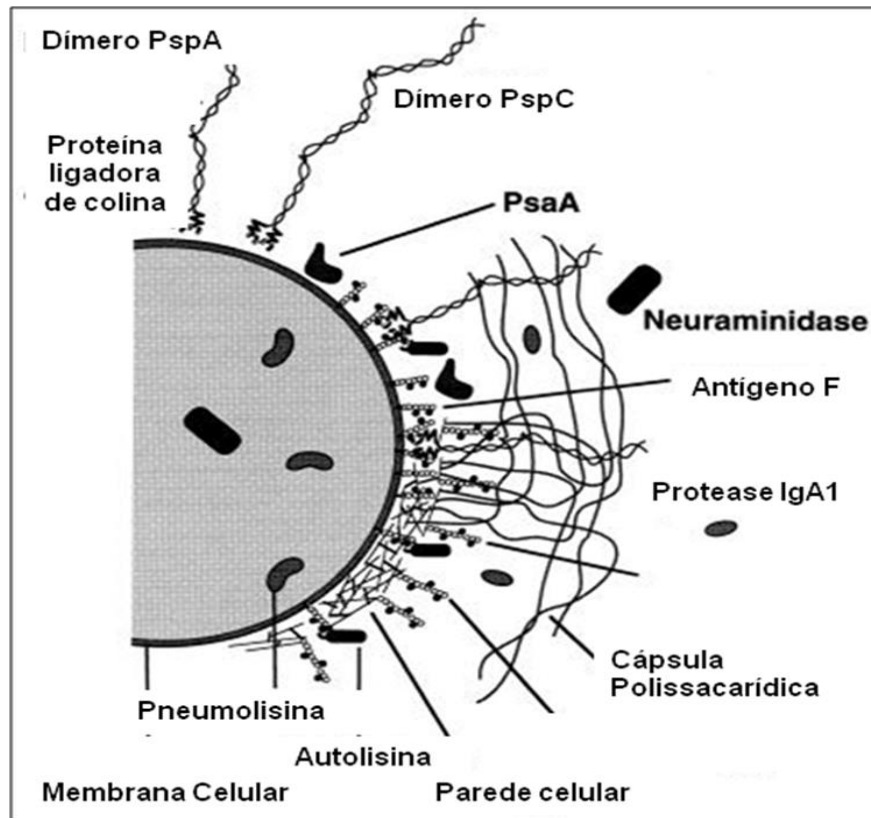
Pneumococos, na sua maioria são revestidos por uma cápsula polissacarídica, seu principal fator de virulência, que o protege da fagocitose pelas células do sistema imunológico (BRAIDO, 2008; SJOSTROM, 2006). Sendo que ela também pode restringir o processo de autólise e reduzir a exposição a antibióticos (VAN DER POLL e OPAL, 2009) (Figura 2). A cápsula varia em tamanho, composição e propriedades antifagocitárias (CATERRAL, 1999; HAUSDORFF, 2000; HAUSDORFF, 2005; WASFY, 2005). A composição química da cápsula é utilizada para agrupar pneumococos, por similaridade imunológica, em sorogrupos e sorotipos, sendo que atualmente foram identificados 46 sorogrupos e 93 sorotipos (CATTERALL, 1999; CALIX e NAHM, 2010; HAUSDORFF, 2000; HAUSDORFF, 2005; KUCH, 2010; PARK, 2007; WASFY, 2005). A distribuição dos sorotipos varia conforme a população, região geográfica, tempo, apresentação clínica e idade do paciente (MUSCHER, 1992; SCOTT *et al.*, 1996; HAUSDORFF *et al.*, 2000; BRANDILEONE *et al.*, 2003; HAUSDORFF *et al.*, 2005).



**Figura 2:** Microscopia Eletrônica de *Streptococcus pneumoniae* evidenciando a cápsula polissacarídica. Fonte: Adaptado de PLETZ *et al.*, 2008

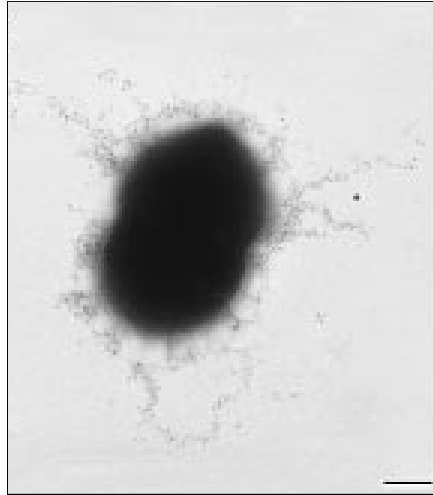
Outros fatores de virulência também contribuem para a patogenicidade dos pneumococos, como: pneumolisina (ply), autolisina A (Lyt A), neuroaminidases (NanA, NanB e NanC), protease IgA1, proteína A de superfície pneumocócica

(PspA), proteína C de superfície pneumocócica (PspC), antígeno A de superfície pneumocócica (PsaA), proteínas ligadoras de colina (Cbps) e *pili* (MITCHELL e MITCHELL, 2010; GAMEZ e HAMMERSCHMIDT, 2012) (Figura 3A e B).



**Figura 3A.** Representação hipotética da superfície do pneumococo demonstrando alguns fatores de virulência. Fonte: Adaptação de BRILES *et al.*, Clinical Microbiology Reviews, 1998.

A proteína de superfície do pneumococo, PspA é o principal fator que contribui para o evento de colonização da nasofaringe e penetração da barreira hemato-liquórica (TUOMANEN,1999). A pneumolisina é uma toxina multifuncional que age como um antígeno de proteção. Possui ação citotóxica nos quadros de meningite e ativa o sistema complemento em casos de pneumonia (WINTER *et al.*, 1997; ALEXANDER *et al.*, 1998; TUOMANEN, 1999). O *pili*, apêndice rígido e filiforme, localizado na superfície das bactérias, contribui para uma maior aderência do patógeno às células do pulmão, eventos de colonização e agem estimulando uma resposta inflamatória do hospedeiro (Figura 3B)(BAROCCHI *et al.*, 2006).



**Figura 3B:** Microscopia eletrônica de pneumococo apresentando *pili*. Fonte: BAROCCHI *et al.*, PNAS, 2006.

## 1.2 COLONIZAÇÃO POR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

*S. pneumoniae* faz parte da microbiota normal do trato respiratório superior de humanos, sendo que a prevalência na nasofaringe de indivíduos saudáveis, varia principalmente em função da idade. A colonização é mais prevalente em crianças do que adultos; tendo início logo após o nascimento e alta prevalência entre um e dois anos de idade, seguido de redução até alcançar taxas inferiores a 10% nos adultos (GRAY *et al.*, 1980; HUSSAIN *et al.*, 2005; FRANCIS *et al.*, 2009; DONKOR, 2013). Em média, um evento de colonização por pneumococos persiste por até duas semanas, embora alguns estudos tenham observado períodos de até trinta semanas (MEATS *et al.*, 2003; SLEEMAN *et al.*, 2008; HILL *et al.*, 2010; DONKOR, 2013).

Algumas características dos hospedeiros favorecem a colonização pelo pneumococo e conseqüentemente o risco de patologias. Essas características estão relacionadas ao déficit do sistema imune: congênito ou adquirido. Estes incluem anemia falciforme, HIV, neoplasia, asplenia, extremos de idade, imunodepressão ou terapias antiproliferativas. Muitas são patologias crônico-degenerativas, tais como, *diabetes mellitus*, insuficiência renal crônica, síndrome nefrótica, doença pulmonar obstrutiva crônica, e outras patologias pulmonares e cardiovasculares, hepatopatias crônicas e todas as condições que causam danos à integridade da anatomia do trato respiratório, com redução da habilidade para remover secreções e agentes inalados (GARCIA *et al.*, 2006).

Outros fatores como sazonalidade, freqüência à creche ou escola, infecção prévia do trato respiratório superior, doenças e perfil socioeconômico também influenciam a prevalência de colonização pneumocócica na população, alcançando taxas mais elevadas no inverno e em países em desenvolvimento (GRAY *et al.*, 1980; DONKOR, 2013; BOGAERT *et al.*, 2004; GONZALEZ, 2010; JOURDAIN *et al.*, 2010).

Um estudo longitudinal realizado na Inglaterra encontrou uma prevalência de colonização em 52% das crianças menores de dois anos e de 45% para a faixa etária entre 3 e 4 anos de idade (HUSSAIN *et al.*, 2005), enquanto que, em Gâmbia e Kênia a prevalência de colonização por pneumococos é de 80% e 66%, respectivamente (DARBOE *et al.*, 2010 ABDULLAHI *et al.*, 2012). No Brasil, a taxa de colonização é muito similar a dos países do continente africano. Estudos realizados nas cidades de Salvador e Goiânia encontraram uma prevalência de colonização de 66,6% e 57,6% em crianças menores de cinco anos, respectivamente (REIS *et al.*, 2008; FRANCO *et al.*, 2012).

As crianças podem ser portadoras de diferentes sorotipos de pneumococos ao longo do tempo, sendo que os sorotipos considerados menos virulentos como: 9N, 15B, 15C, 16F, 20, e 38 persistem mais tempo colonizando do que os sorotipos mais virulentos como: 1, 4, 5, 9A, 14, 9V e 18C. As crianças colonizadas por pneumococos virulentos apresentam um risco de 20 a 50 vezes maior de desenvolver infecção pneumocócica (SLEEMAN *et al.*, 2005; DONKOR, 2013).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES PNEUMOCÓCICAS

Pneumococos é um dos agentes etiológicos mais importantes em infecções adquiridas na comunidade (OBARO *et al.*, 1996; HOBAN *et al.*, 2001; PALLARES *et al.*, 2003; CASTANHEIRA *et al.*, 2004), responsável por doenças invasivas (meningite, bacteremia, sepse, peritonite, artrite/osteomielite) e não invasivas (otite média aguda, sinusite, conjutivite e pneumonia) (BRICKIS e BEREZIN, 2006). A bacteremia e septicemia podem estar presentes em 20 a 30% dos casos de pneumonia pneumocócica (MUSHER, 2004; DONKOR, 2013). Este patógeno acomete cerca de 1,2 milhões de crianças a cada ano, principalmente, em países em desenvolvimento (HAUSDORFF *et al.*, 2000; PAI *et al.*, 2006; O'BRIEN *et al.*, 2009; SARTORI *et al.*, 2012). É responsável por 14,5 milhões de episódios de

doenças graves e 826 mil mortes por ano em crianças com idade entre um e 59 meses nos países da África e Ásia (MACKENZIE *et al.*, 2010). A meningite pneumocócica é letal em aproximadamente 40% dos casos e pode causar sequelas em mais de 50% das crianças, sendo as mais comuns o retardamento mental e deficiência motora (ARDITI *et al.*, 1998; GOETGHEBUER *et al.*, 2000; KOEDEL *et al.*, 2002; DONKOR, 2013).

No Brasil, o pneumococo também é o principal agente causador da pneumonia em todas as faixas etárias e um dos principais responsáveis pela meningite na comunidade. Segundo o Ministério da Saúde, entre 2004 a 2007, 65% das hospitalizações foram devido à pneumonia pneumocócica. Os casos de doenças pneumocócicas são mais comum em crianças menores de um ano de idade e a letalidade esta mais relacionada à meningite e sepse (NOVAES *et al.*, 2011; SARTORI, *et al.*, 2012). No período de 1983 a 2003, o número de casos de meningite causada por pneumococo foi de 29.600 com 8.554 óbitos (BRICKS *et al.*, 2002; BRICKS *et al.*, 2006).

Em Salvador, um estudo de vigilância populacional, conduzido no período de 1995 a 1999, identificou uma incidência anual de meningite pneumocócica de 1,6 e 24,7 casos/100.000 pessoas-ano para todas as faixas etárias e crianças menores que 5 anos, respectivamente. A letalidade foi de 42% para todos os pacientes e 60% para os menores de cinco anos (REIS *et al.*, 2002). Outro estudo realizado na mesma cidade no período de 2000 a 2007 mostrou que houve um declínio de 26% na incidência da meningite pneumocócica em todas as faixas etárias; a incidência reduziu 26% no período de 2000 a 2007, caindo de 1,12 para 0,83 casos/100.000 habitantes. Apesar do declínio na incidência, a letalidade permaneceu elevada, sendo de 29% em todas as faixas etárias e 42% em crianças menores de cinco anos de idade (MENEZES *et al.*, 2011).

#### 1.4 FATORES BIOLÓGICOS QUE INFLUENCIAM NA COLONIZAÇÃO, TRANSMISSÃO E PATOGÊNIA DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

O pneumococo ganha acesso ao hospedeiro através da colonização da nasofaringe e o sucesso deste processo depende tanto da virulência do sorotipo que esta colonizando quanto da eficiência do sistema imune do hospedeiro (WOODS, 2008). A partir da nasofaringe, a bactéria pode se espalhar para a mucosa adjacente

e causar doença invasiva ou não, sendo que a maioria das infecções permanece assintomática (BOGAERT *et al.*, 2004).

A transmissão ocorre entre humanos através do contato direto com as secreções ou dispersão de aerossóis por pessoas portadoras ou infectadas (BOGAERT *et al.*, 2004; DONKOR, 2013). Na maioria dos casos, uma vez adquirido, o contágio leva à colonização nasofaríngea que pode durar de semanas a meses (KADIOGLU *et al.*, 2008; BRAIDO *et al.*, 2008).

Pneumococo possui uma série de fatores de virulência que contribui para os eventos de colonização, tais como: cápsula, proteína ligadora de colina, *pili*, formação de biofilme e interação com a microbiota residente do trato respiratório superior (SIMELL *et al.*, 2012). Existe evidência da formação de biofilme pelo pneumococo que colabora para a colonização e infecção do ouvido médio. O significado clínico da formação do biofilme ainda é desconhecido, mas sugere-se que ele auxilia no crescimento do patógeno durante a colonização e contribui para o desenvolvimento das doenças invasivas (SANCHEZ *et al.*, 2011; SIMELL *et al.*, 2012).

Outro fator importante para o sucesso da colonização nasofaríngea é a composição da microbiota residente no trato respiratório superior. Dependendo da interação entre o pneumococo e as outras bactérias, que pode ser por competição ou simbiose, o evento pode ser facilitado ou impedido. Um exemplo é a interação entre *Haemophilus influenzae* não tipável e *S. pneumoniae* que favorece a rinosinusite crônica (COPE *et al.*, 2011). Já a relação natural entre *S. pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* tem sido descrita como de competição (BOGAERT *et al.*, 2004; REGEV-YOCHAY *et al.*, 2004; SIMELL *et al.*, 2012).

O desequilíbrio entre os fatores do hospedeiro (barreiras imunológicas) e do micro-organismo (fatores de virulência da cepa) favorece a invasão do pneumococo para outros sítios; o que pode ocasionar doenças não invasivas com manifestações clínicas moderadas, como otite média, conjuntivite e sinusite ou ainda invadir sítios estéreis do organismo originando infecções invasivas, potencialmente fatais como a pneumonia, meningite e bacteremia (HO *et al.*, 2004; SIMELL *et al.*, 2012).

## 1.5 VACINAS PNEUMOCÓCICAS

O elevado índice de morbimortalidade por infecções pneumocócicas e a emergência de cepas resistentes aos principais antimicrobianos estimularam o desenvolvimento de vacinas (BRINKS e BEREZIN, 2006). Existem dois tipos de vacinas pneumocócicas: as polissacarídicas e as conjugadas. Ambas possuem em sua formulação polissacarídeos capsulares como antígenos que estimulam a produção de anticorpos sorotipo- específicos (PLETZ *et al.*, 2008).

A vacina polissacarídica 23-valente (PPV-23, Pneumovax23, *Merck & Company Inc.*), foi licenciada nos Estados Unidos da América desde 1983 e é composta por polissacarídeos purificados de 23 sorotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F) (PLETZ *et al.*, 2008). O uso da vacina PPV-23 é bastante limitado porque ela estimula uma resposta imunológica T independente, não sendo, portanto, indicada para crianças menores de dois anos de idade, que possui o sistema imunológico imaturo. Esta vacina é efetiva na prevenção de doenças invasivas, principalmente, em idosos maiores de 65 anos, na redução de hospitalização por infecções pneumocócicas, na prevenção de bacteremia e, sobretudo nas mortes hospitalares (VLASICH, 2001; CDC, 2008, HAUSDORFF *et al.*, 2005). Esse tipo de vacina confere uma imunidade de pouca duração, sendo recomendada a revacinação em intervalo de cinco a seis anos (PLETZ *et al.*, 2008).

A primeira vacina pneumocócica conjugada, a heptavalente (PCV-7) foi licenciada nos Estados Unidos em 2000, sendo formulados com antígenos dos sete sorotipos mais prevalentes em doença invasiva pediátrica naquele país, os sorotipos: 14, 6B, 19F, 18C, 23F, 4 e 9V. Estudos clínicos mostraram uma eficácia de 94% entre crianças vacinadas, contra doença invasiva causada pelos sorotipos representados na vacina (CDC, 2005). O governo brasileiro, através do Ministério da Saúde aprovou a introdução da vacina pneumocócica decavalente (PCV\_10) no programa nacional de imunizações, no primeiro semestre de 2010 (Ministério da Saúde, 2008).

A PCV-10 (Synflorix, GSK) possui 3 sorotipos (1, 5, 7F) a mais que a vacina PCV-7, além disto elas diferem nas proteínas utilizadas para a conjugação. A PCV-10 possui 8 dos 10 polissacarídeos conjugados a uma proteína da membrana externa (proteína D) da bactéria *Haemophilus influenzae*, e os outros dois polissacarídeos (sorotipos 18C e 19F) são conjugados a um toxóide tetânico e um

toxóide diftérico modificado, respectivamente. A PCV-7 possui todos os 7 polissacarídeos conjugados com a toxóide diftérica modificada. Estudos imunológicos mostraram uma equivalência de resposta imunológica específica aos sorotipos incluídos na vacina comparando crianças vacinadas com a PCV-10 com crianças vacinadas com a vacina heptavalente (Prevnar, Wyeth). (WHITNEY *et al.*, 2003)

Em 2009, a vacina PCV-7 foi substituída pela vacina tridecavalente – PCV-13 (Prevnar13, Pfizer), a qual possui 3 sorotipos (3, 6A e 19A) adicionais aos da vacina decavalente (OOSTERHUIS-KAFEJA *et al.*, 2007; CLARK, 2006). Esta vacina foi licenciada para uso no Chile e Agência Europeia de Medicina em 2009, e em 2010 foi licenciada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso nos Estados Unidos da América. No Brasil esta vacina está disponível apenas em clínicas particulares.

Após a introdução das vacinas conjugadas, foi observado um declínio na circulação dos sorotipos vacinais e o aumento de sorotipos não vacinais. Este fenômeno, conhecido como *serotype replacement*, ocorreu nos Estados Unidos da América, onde foi observado um aumento de casos de doença pelos sorotipos, 19A resistente à penicilina (HICKS, 2007) e 22F (PAI *et al.*, 2005; WHITNEY *et al.*, 2006). Na Europa, também, observou-se um aumento do número de casos de doenças pneumocócicas pelos sorotipos 1, 19A, 36A e 7F (ISAACMAN *et al.*, 2010).

Nos anos seguintes à introdução das vacinas conjugadas, foi observada também a circulação de clones exibindo sorotipo capsular diferente dos que circulavam no período pré-vacinal. Estudo realizado na Noruega mostrou um aumento de cepas de pneumococos sorotipo 19A, após a introdução da vacina heptavalente, não susceptíveis a penicilina e com similaridade genética a clones do complexo “Denmark<sup>14</sup>-32-ST230” e “Taiwan<sup>19F</sup>-14-ST236” ([VESTRHEIM](#) *et al.*, 2012).

## 1.6 A BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DE COLONIZAÇÃO NASOFARINGENA.

A biologia molecular é uma importante ferramenta para os estudos epidemiológicos porque permite obter informações sobre os tipos e subtipos genéticos circulantes, bem como identificar a presença de clones em uma determinada região em um período de tempo. Essas informações podem ser



originárias de isolados de colonização ou de doença invasiva. Os estudos moleculares com isolados de pneumococos oriundos da nasofaringe de indivíduos na comunidade permitem acompanhar a transmissão do patógeno entre indivíduos, a permanência do mesmo na comunidade e a substituição por outros sorotipos circulantes. Esses estudos facilitam também a comparação entre cepas circulantes na comunidade e as que estão ocasionando doenças invasivas e não invasivas.

As técnicas mais frequentes utilizadas nos estudos de caracterização molecular de pneumococos são eletroforese em campo pulsátil (PFGE) e *Multi locus sequence Typing* (MLST) (GERTZ *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2010). O uso combinado destes dois métodos tem contribuído para uma melhor compreensão da epidemiologia das infecções pneumocócicas, principalmente pelo uso do MLST, o qual permite uma comparação de isolados em nível mundial. Assim, nas últimas décadas foi descrito a disseminação internacional de clones de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina, principalmente o *Sequence type* (ST) 156. Este ST mostra uma habilidade não só de expansão mundial como também de troca capsular, sendo que, já foi descrito como sorotipos 14 e 9V (SOGSTAD *et al.*, 2006). Outro clone relacionado com a não susceptibilidade à penicilina o ST 66, tem sido descrito em vários países e, é muito frequente no Brasil, sendo encontrado em doenças invasivas e em eventos de colonização (BRANDILEONE *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009). Esse clone já foi caracterizado em isolados de pneumococos sorotipo 9N, 14, 19F e 23F (SERRANO *et al.*, 2005). Em Salvador, o ST 66, circula como sorotipo 14 não sensível à penicilina (REIS *et al.*, 2008).

Estudo realizado na África mostra claramente a contribuição das ferramentas disponíveis da biologia molecular para compreender a dinâmica da transmissão do patógeno na comunidade, este estudo descreve a persistência do sorotipo 6B entre as famílias (intra-domiciliar), revelando a importância da transmissão domiciliar para as crianças (HILL, 2010). Em Salvador, um estudo de colonização nasofaríngea demonstrou através de técnicas de biologia molecular (BOX PCR, PFGE e MLST) que os isolados de nasofaringe são muito mais diversos do que os isolados de meningite e que os principais clones causadores de doença são poucos frequentes na comunidade (REIS *et al.*, 2008).

O conhecimento sobre as características moleculares das cepas circulantes, tanto em isolados de doença invasivos como de colonização são fundamentais para

o monitoramento das doenças pneumocócicas (BRANDILEONE *et al.*,1998; SÁ-LEAO *et al.*, 2000; BRUEGGEMANN *et al.*, 2003).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Após a introdução das vacinas pneumocócicas conjugadas houve um declínio no número de casos de doenças pneumocócicas por sorotipos vacinais, e excepcionalmente em alguns locais tem-se constatado um aumento na prevalência de doença pneumocócica por sorotipos não vacinais (MILLER *et al.*, 2011). Este fato conhecido como *serotype replacement* é importante porque estas cepas com sorotipos não vacinais têm uma elevada resistência aos antimicrobianos de uso empírico (HUANG *et al.*, 2012). Além disso, tem-se documentado a circulação de clones de disseminação mundial contendo tipo capsular não vacinal (SIMÕES *et al.*, 2011). O clone que exibia o sorotipo vacinal troca a cápsula polissacarídica para não ser reconhecido pelos anticorpos produzidos após a vacinação, permanecendo com seu material genético precursor.

Vários estudos prospectivos sobre colonização nasofaríngea realizados na era pré e pós-vacinal, revelam resultados importantes sobre a dinâmica da transmissão do pneumococo, o que tem contribuído para uma melhor avaliação dos benefícios das vacinas conjugadas (GILS *et al.*, 2010; BRUGGER, 2010; HILL *et al.*, 2010; LABOUT *et al.*, 2011). No Brasil, os estudos sobre colonização nasofaríngea, na sua maioria, são de corte transversal, mostrando a prevalência de sorotipos de *S. pneumoniae* em um dado momento, mas não a sua persistência ao longo de um determinado período. Além disso, a maioria, destes estudos foi realizada com uma amostragem de conveniência, geralmente, em creches e escolas (BEREZIN *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2010). Isto dificulta o entendimento da dinâmica da transmissão do pneumococo já que escolas e creches são fatores de risco para a colonização nasofaríngea.

Em Salvador, entre os anos de 2000 e 2001 foi realizado um estudo de corte transversal sobre a transmissão de pneumococo em uma comunidade carente (Nordeste de Amaralina), onde foi verificada a propagação de cepas de pneumococos intra e inter-famílias na comunidade. No entanto, não foi observada a presença significativa de clones encontrados em casos de doença invasiva (REIS *et al.*, 2008). Este trabalho apresentou resultados importantes, contudo, devido ao desenho do estudo, não foi possível responder alguns questionamentos sobre a persistência de clones e sorotipos ao longo do tempo.

Estudos prospectivos, associados ao uso de técnicas moleculares, podem auxiliar na compreensão da transmissão de cepas de *S. pneumoniae*. A partir destes

estudos pode-se observar a persistência de algumas cepas circulando na comunidade e verificar se a permanência destas cepas ocorre devido à presença do tipo de cápsula (sorotipo), mecanismos de resistência às drogas ou certos clones com distribuição mundial. Essa permanência da cepa na nasofaringe dos hospedeiros aumenta o risco do mesmo causar doenças. Os estudos prospectivos também podem auxiliar na identificação de cepas de pneumococos que colonizam o indivíduo, por um período prolongado, influenciando a aquisição de mecanismos de resistência; devido ao maior tempo de exposição aos antimicrobianos (GHAFAR *et al.*, 2004).

Na era das vacinas conjugadas protéicas, um contínuo monitoramento sobre a distribuição de sorotipos na população é necessário para a avaliação do impacto e adequação das vacinas multivalentes. Além disto, é de suma importância conhecer os clones circulantes na população antes das intervenções vacinais para que se possa avaliar seu verdadeiro impacto na redução de infecções e formação de novos nichos de colonização.

### **3 OBJETIVOS**

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a dinâmica da transmissão do *Streptococcus pneumoniae* durante eventos de colonização nasofaríngea em crianças menores de cinco anos em uma comunidade de Salvador (BA).

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever a prevalência e persistência de eventos de colonização por *S. pneumoniae* em crianças menores de cinco anos;
2. Identificar os principais fatores de risco relacionados com a colonização nasofaríngea em crianças menores de cinco anos;
3. Descrever a prevalência de sorotipos de *S. pneumoniae* presentes na nasofaringe dessas crianças;
4. Descrever o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das amostras de *S. pneumoniae* isoladas;
5. Avaliar a similaridade do perfil de sorotipos de *S. pneumoniae* identificados com a possível cobertura de uma vacina pneumocócica conjugada;
6. Identificar o perfil genotípico das amostras de *S. pneumoniae* isoladas;
7. Correlacionar os sorotipos e genótipos de *S. pneumoniae* isolados da nasofaringe com aqueles obtidos de infecções invasivas na cidade de Salvador.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 DESENHO E LOCAL DO ESTUDO

O estudo de coorte prospectivo foi realizado na comunidade de Pau da Lima (Salvador, Bahia), no período entre janeiro de 2008 a janeiro de 2009. O isolamento e identificação dos pneumococos foram realizados no Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística (LEMB/CPqGM) e Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC/UFBA).

A identificação dos sorotipos e caracterização molecular foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC/UFBA) e Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM/CPqGM).

#### 4.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES / CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Foram selecionadas 203 crianças menores de cinco anos de idade de forma randômica entre os residentes de algumas áreas do Bairro de Pau da Lima (Figura 4), Salvador (BA) para participarem do estudo. Um total de 4 coletas de amostras de nasofaringe foram realizadas com intervalos de 3 a 4 meses entre cada uma. Para cada criança selecionada foi obtido o consentimento do responsável legal através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



Figura 4. Mapa do bairro de Pau da Lima com a localização (círculo vermelho) das áreas que foram selecionados as crianças para participarem do estudo. Fonte: REIS, et al., Plos Infected Tropical Diseases, 2008.

### 4.3 COLETA DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os dados epidemiológicos foram coletados no momento da coleta da amostra nasofaringeana através de entrevista com os responsáveis legais, utilizando um questionário para obtenção dos dados demográficos e informações sobre fatores de risco para colonização, doenças crônicas, doenças infecciosas prévias, uso de antimicrobiano, hospitalização recente e calendário vacinal.

### 4.4 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

O isolamento dos *S. pneumoniae* foi realizado através de métodos de referência (WHO, 2007).

**Sorotipagem do *Streptococcus pneumoniae*:** A sorotipagem capsular de *S. pneumoniae* foi realizada através de multiplex-PCR de acordo com as recomendações do Center for Disease Control and Prevention (CDC), EUA (PAI, 2006; CDC, 2011). Isolados negativo no PCR foram submetidos ao monoplex-PCR utilizando o primer 19F variante (MENEZES, 2013) e foi a reação de Quellung.

**Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos:** As amostras de *S. pneumoniae* foram submetidas aos testes de susceptibilidade pelo método de microdiluição de acordo com as recomendações do CLSI (Clinical Laboratory Standard Infections), empregando-se 7 antimicrobianos diferentes: penicilina, cefotaxima, tetraciclina, eritromicina, sulfametoxazol/trimetoprim, ofloxacina e levofloxacina. Isolados que apresentaram CIM > 0,12 µg/mL foram considerados como não susceptíveis à penicilina.

**Caracterização genotípica das amostras de *S. pneumoniae*:** Foi realizada através dos métodos de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) (Lefevre, 1993) *Multilocus sequence typing* (MLST) (Enright, 1998). A análise das imagens obtidas pelo PFGE foram realizadas através do *Gel Compar software* versão 4 (Applied maths, Kortrijk, Belgium), utilizando os critérios de TENOVER (1995). Uma amostragem de cada clone identificado pelo PFGE foi submetida à técnica de tipagem por MLST. As seqüências obtidas pelo MLST foram determinadas com base na seqüência dos sete genes *house-keeping* (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* e *ddl*) do DNA cromossômico obtido dos isolados. As seqüências foram submetidas *on line* para o banco de dados utilizando os softwares disponíveis no *site da web* para pneumococos (<http://www.mlst.net>).

#### 4.5 CRITÉRIOS DE DEFINIÇÃO PARA COLONIZAÇÃO NASOFARINGEANA

\*Persistência: presença do mesmo sorotipo em mais de uma coleta confirmado pelo PFGE.

\*Intradomiciliar: presença do mesmo sorotipo por mais de uma criança no mesmo domicílio confirmado pelo PFGE.

\*Interdomiciliar: presença do mesmo sorotipo por crianças de domicílios diferentes pelo PFGE.

#### 4.6 ANÁLISE DE DADOS

O programa Epi-Windows versão 3.5.4 (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA) foi utilizado para a criação dos bancos de dados epidemiológico e microbiológico. Os dados genotípicos também foram armazenados no mesmo programa. O perfil genotípico dos isolados de nasofaringe foi comparado com o perfil genotípico de isolados de doença invasiva. Análises univariada e multivariada foram utilizadas para definir os fatores de risco em estar ou não colonizado por pneumococos, considerando o intervalo de confiança de 95%. Foram caracterizados os fatores de risco para colonização nasofaringeana por pneumococo das 203 crianças acompanhadas ao longo do estudo, considerando o período de contribuição de cada uma no estudo.

O teste exato de Fisher e o qui-quadrado foram utilizados para avaliar a significância estatística dentre as associações.

Os isolados de doença invasiva que foram utilizados para comparação faz parte do projeto de pesquisa de vigilância ativa para meningites bacterianas desenvolvido no hospital Couto Maia (Referência para doença infecciosa) e de isolados de hemoculturas de outros hospitais de Salvador, Bahia.

Para o cálculo amostral assumimos a prevalência de 50% de colonização nasofaringeana por pneumococos nesta faixa etária entre os expostos, com intervalo de confiança de 95% e poder de 80%.

#### 4.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS



Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, sob o número 108/2006.

#### 5. ARTIGO 1:

Update of pneumococcal PCR Serotyping Assay for detection of a commonly occurring type 19F wzy variant in Brazil.

Este artigo contempla um dos objetivos da tese que foi determinar a prevalência dos sorotipos de isolados de *S. pneumoniae* da nasofaringe. Neste trabalho mostramos a existência de um variante do sorotipo 19F no Brasil que não foi identificado no multiplex PCR, técnica utilizada para a determinação dos sorotipos em diversos laboratórios do mundo, incluindo o Brasil, por ser mais barata e rápida. A identificação desta variação do sorotipo 19F no Brasil foi importante porque este sorotipo faz parte da vacina conjugada decavalente, vacina pneumocócica implementada no Brasil em 2010, e poderia estar sendo subidentificado na avaliação da efetividade da vacina no país.

Publicado na revista *Journal Clinical of Microbiology* em 2013.

MENEZES, A.P.O; NEVES, J.N.; TERNES, Y. M.; ANDRADE, A. L.; PIMENTA, F. P.; CARVALHO, M. DA G.; BEALL, B. Update of pneumococcal PCR Serotyping Assay for detection of a commonly occurring type 19F wzy variant in Brazil. **J. Clin. Microbial.**, v. 51, n. 7, p. 2470-2471. 2013.

## Update of Pneumococcal PCR Serotyping Assay for Detection of a Commonly Occurring Type 19F *wzy* Variant in Brazil

Ana Paula de O. Menezes,<sup>a</sup> Joice Neves Reis,<sup>a,b</sup> Yves Mauro Ternes,<sup>c</sup> Ana Lúcia Andrade,<sup>c</sup> Fabiana C. Pimenta,<sup>d</sup> Maria da Gloria Carvalho,<sup>d</sup> Bernard Beall<sup>d</sup>

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil<sup>a</sup>; Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brazil<sup>b</sup>; Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil<sup>c</sup>; Division of Bacterial Disease, Respiratory Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA<sup>d</sup>

In this era of effective pneumococcal conjugate vaccines, simple and inexpensive methods are desirable for determining capsular serotype (st) distributions. Although a multiplexed conventional PCR (cmPCR) approach is generally reliable (1–4) (updates at [www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm)), the key serotypes 19A and 19F have presented problems (5, 6). The *wzy*<sup>19A</sup>- and *wzy*<sup>19F</sup>-encoded oligosaccharide repeat unit polymerases putatively provide the basis of the structural difference between the st19A and st19F capsules (7). Recently, we reported an st19F isolate recovered in Canada (strain 2584-0819F) that yielded a false-positive cmPCR type 19A (cmPCR-19A) result and a false-negative cmPCR-19F result (5). We redesigned our st19A primers in order to avoid further false-positive PCR-19As. Due to the similarity of the strain 2584-0819F *wzy* to the common st19A *wzy*, we were unable to design a new assay that would encompass strain 2584-0819F and the most commonly globally encountered 19F *wzy* gene represented by GenBank accession number CR931678 (unpublished data). More recently, a re-

lated circumstance described two cmPCR-19F isolates that expressed an st19A capsule (6).

Here we describe a third variant *wzy* gene that was common within a collection of 1,064 pneumococcal isolates recovered in Brazil between 2010 and 2011 (cities of Goiânia and Salvador) (Fig. 1). Using our standard assay (4), the 1,012 carriage isolates included 54 cmPCR-19F isolates and 105 cmPCR-nontypeable isolates. All 54 cmPCR-19F isolates were st19F employing the Quellung reaction (Quellung-st19F). Of the 105 cmPCR-nontypeable carriage isolates, 31 were Quellung-st19F. The 52 invasive isolates included none that were cmPCR-19F; however,

Published ahead of print 8 May 2013

Address correspondence to Bernard Beall, [bbeall@cdc.gov](mailto:bbeall@cdc.gov).

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00743-13

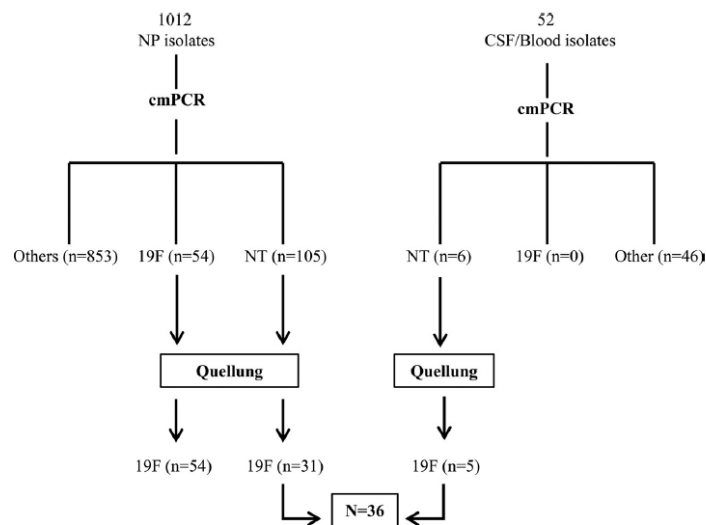


FIG 1 Recovery of 36 serotype 19F isolates that were cmPCR nontypeable from carriage and invasive sources. Six hundred twenty pneumococcal carriage isolates were obtained from a survey conducted in Goiânia city from December 2010 through February 2011 (each isolate from a separate child). Of these isolates, 13 were cmPCR nontypeable (cmPCR-NT) and serotype 19F. Three hundred ninety-two isolates from 200 children that were less than 5 years of age were collected in Salvador city during 2008 (multiple swabs from some children at 3-month intervals), 20 of which were cmPCR-NT and serotype 19F (18 of which were from a separate child). All 52 isolates recovered from CSF or blood represented independent infections occurring in Salvador city between 2008 and 2010. All 36 cmPCR-NT, serotype 19F isolates, and, in addition, the previously described 19F sequence variant 2584-08 (5), were PCR typeable using a new primer set derived from their *wzy* sequences (GenBank accession numbers KC690152 and FJ829071). NP, nasopharyngeal; CSF, cerebrospinal fluid.

5 of the 6 cmPCR-nontypeable isolates were Quellung-st19F. In total, 36 of the 90 Quellung-19F isolates were cmPCR nontypeable.

Sequencing the 1,335-bp *wzy* genes from 4 of the 35 cmPCR-nontypeable Quellung-st19F isolates (two invasive, two carriage) revealed them to be identical and to share 98.8% identity with the *wzy* structural gene from 2584-0819F (6). Thus, within Brazil, there appears to be a second major *wzy* allele (GenBank accession number [KC690152](#)) represented by 40% (36/90) of st19F isolates (Fig. 1). We designed new cmPCR primers to target this new *wzy* variant (primers 19FvarF [GACAATTCTG GTTGACTTGTGATTTTG] and 19FvarR [CTACCAAATACC TCACCAGCTTCC]). All 36 serotype 19F isolates previously found to be cmPCR nontypeable, as well as the previously described 2584-0819F (6), were positive for a 585-bp amplicon following amplification with these primers. These primers do not target known 19A *wzy* genes.

In the recent study (6), 168 of 170 cmPCR-19F isolates found through using the standard CDC 19F PCR assay were st19F using the Quellung reaction, while the remaining two isolates were st19A. It is logical to assume that there will be a low error rate when employing cmPCR for deducing st19A, st19F, and possibly other serotypes. Until sequence signatures that dictate differences between the 19F and 19A capsular structures are deduced, better resolution of these two serotypes is problematic. Nonetheless, available data indicate that primer 19FvarF and 19FvarR-directed PCR may be useful for detecting a major st19F *wzy* variant within Brazil and elsewhere. There is a continued need for monitoring cmPCR-based serotype distribution data through using antibody-based serotyping as a quality control measure.

**Nucleotide sequence accession number.** The newly determined *wzy* sequence has been deposited in GenBank under accession number [KC690152](#).

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by the Research Support Foundation for the State of Bahia (FAPESB; 1431040054051), the National Institutes of Health (D43 TW TW00919 and TW 007303), and a Fogarty International Center Global Infectious Diseases Research Training Program grant, National Institutes of Health, to the University of Pittsburgh.

We thank the laboratory staff at the CDC, especially Zhongya Li, for technical support.

#### REFERENCES

- de O Menezes AP, Campos LC, dos Santos MS, Azevedo J, dos Santos RC, Carvalho MDG, Beall B, Martin SW, Salgado K, Reis MG, Ko AI, Reis JN. 2011. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007. *Vaccine* 29:1139-1144.
- Dias CA, Teixeira LM, Carvalho MDG, Beall B. 2007. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J. Med. Microbiol.* 56:1185-1188.
- Morais L, Carvalho MDG, Roca A, Flannery B, Mandomando I, Soriano-Gabarro M, Sigauque B, Alonso P, Beall B. 2007. Sequential multiplex PCR for identifying pneumococcal capsular serotypes from South-Saharan African clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* 56:1181-1184.
- Carvalho MDG, Pimenta FC, Jackson D, Roundtree A, Ahmad Y, Millar EV, O'Brien KL, Whitney CG, Cohen AL, Beall BW. 2010. Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotype. 2010. *J. Clin. Microbiol.* 48:1611-1618.
- Pimenta FC, Gertz RE, Jr, Roundtree A, Yu J, Nahm MH, McDonald RR, Carvalho MDG, Beall BW. 2009. Rarely occurring 19A-like *cps* locus from a serotype 19F pneumococcal isolate indicates continued need of serology-based quality control for PCR-based serotype determinations. *J. Clin. Microbiol.* 47:2353-2354.
- Siira L, Kaijalainen T, Lambertsen L, Nahm MH, Toropainen M, Viro-lainen A. 2012. From Quellung to multiplex PCR, and back when needed, in pneumococcal serotyping. *J. Clin. Microbiol.* 50:2727-2731.
- Aanensen DM, Mavroidi A, Bentley SD, Reeves PR, Spratt BG. 2007. Predicted functions and linkage specificities of the products of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *J. Bacteriol.* 189:7856-7876.

Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* among Children in Urban Setting in Brazil prior to PCV10 introduction.

Este artigo contempla os objetivos 1, 2, 3, 4 e 5 da tese. Neste trabalho acompanhamos crianças menores de cinco anos de idade durante um ano, em uma comunidade carente da cidade de Salvador, antes da introdução da vacina conjugada decavalente no Brasil. Neste trabalho foi descrito a prevalência e persistência dos sorotipos dos pneumococos ao longo do estudo. Além do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos mais utilizados na terapia das patologias causadas pelos pneumococos. Este trabalho nos possibilitou também descrever os fatores que estão associados a colonização nasofaringeana pelo pneumococo. Foi visto a presença de sorotipos pneumococos que não estão presentes na vacina decavalente persistente no processo de colonização. Estes devem ser monitorados porque podem ser futuros candidatos à incorporação na vacina conjugada.

**Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* among Children in an Urban Setting in Brazil prior to PCV10 Introduction**

**Run title: Pneumococcal carriage at community-level**

Ana Paula de O. Menezes<sup>1</sup>, Jailton Azevedo<sup>1</sup>, Mariela C. Leite<sup>2</sup>, Leila C. Campos<sup>1</sup>, Marcelo Cunha<sup>3</sup>, Maria da Gloria S. Carvalho<sup>4</sup>, Bernard W. Beall<sup>4</sup>, Mitermayer G. Reis<sup>1</sup>, Albert I. Ko<sup>1,5</sup>, Daniel M. Weinberger<sup>5</sup>, Guilherme Ribeiro<sup>1,6</sup>, Joice N. Reis<sup>1,2§</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA 40296-710, Brazil;

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA 40170-115, Brazil;

<sup>3</sup>Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ

<sup>4</sup>Respiratory Diseases Branch, Centers for Disease Control & Prevention, Atlanta, GA 30333, USA;

<sup>5</sup>Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, New Haven, USA;

<sup>6</sup>Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA 40170-115, Brazil;

§Corresponding author: Joice Neves Reis, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz/MS, Rua Waldemar Falcão 121, Salvador, Bahia 40296-710, Candeal, Brazil. Fax: +55 71 3176-2281; Phone: +55 71 3176-2302; E-mail: [joice@ufba.br](mailto:joice@ufba.br)

**Abstract**

Information on the pneumococcal carriage in the pre-vaccine period is essential to predict and assess its impact. Therefore, we present data on pneumococcal carriage before the introduction of the decavalent-pneumococcal conjugated vaccine (PCV10) in Brazil. We carried out a prospective on a cohort of children aged < 5 years old, randomly selected in an urban community located in the periphery of the city of Salvador, Brazil and follow-up from January 2008 to January 2009. Nasopharyngeal swabs were collected from each child at four times. 156/203 children were followed during all the four visits and were eligible for same analysis. In total 721 nasopharyngeal swabs were collected, yielding 398 pneumococcal isolates. The means of pneumococcal carriage was 56%. The variables associated with

carriage was having contact with one or more children under two years old (2.00 95% CI 1.33 - 2.88), living in a house with more than 4 persons per room (1.77, 95% CI 1.05 - 3.10), and presence of URTI (1.38 95% CI 0.73 - 2.53). Contacts with children under two years old and live in crowded house also were associated with colonization by high-invasiveness serotypes. The most prevalent vaccine serotype were 6A/B (25.4%), 19F (10.1%) and 14 (9.0%) and non vaccine were 16F (4.8%), 15B/C (4.5%) and 6C/D (3.5%). Of the 156/203 children follow-up, 91% were colonized at least once and 15.4% were persisting colonized in more than one visit. Overall, 38.4% (153/398) of the pneumococcal showed reduced susceptibility to penicillin, these 74% (113/153) was non susceptible to SXT/TMP. Monitoring pneumococcal carriage is essential in conjugate vaccine era to better understand population's dynamic of this pathogen.

**Keywords:** Children, nasopharyngeal carriage, *Streptococcus pneumoniae*, serotypes, vaccine

## Background

Asymptomatic carriage of pneumococci is common in young children and has been related to the development of disease and transmission of the pathogen [1-3]. The prevalence of pneumococcal carriage increases in the first few years of life, peaking at approximately 50% to 80% in hosts 2-3 years of age and decreasing thereafter until stabilizing at 5% to 10% in hosts over 10 years of age [4]. Effective vaccines against 10-, or 13- of the 90+ pneumococcal serotypes are now used in many countries, resulting in a substantial decline in invasive disease and carriage of vaccine serotypes [5-6]. Despite this success, serotypes not targeted by the vaccine have increased among healthy carriers and could potentially become important causes of invasive diseases. Therefore, it is essential to obtain information on the pneumococcal carriage in the pre-vaccine era to predict and assess its impact.

Many studies have been conducted in Brazil to investigate the distribution of pneumococcal serotypes from invasive disease and nasopharyngeal colonization. However, there are no reports of prospective studies conducted in communities. The previous studies were undertaken in schools and daycare which represent important risk factors for the transmission and circulation of pneumococcus [7-8]. In addition, our previous study conducted in a slum community in Salvador did not observe association between prevalence of carriage with the size of the household or numbers of contacts, which would suggest a density-dependent transmission phenomenon. It was hypothesized that study design and sample size could have affected the ability to adequately evaluate this risk factor [9].

Thus, we carried out a cohort study on pneumococcal carriage in a slum community in Salvador to describe the risk factors for carrier status of *S. pneumoniae* in children under five years old, determined the patterns of serotypes, antimicrobial susceptibility, and defined the possible coverage provided by the PCV10 or PCV13 pneumococcal conjugate vaccine.



## **Methods**

### **Study site and population**

The study was conducted in the Pau da Lima community which is situated in the periphery of Salvador, a city of 2,443,107 inhabitants in Northeast Brazil. Pau da Lima has 14,122 residents, 8% (1,131) of these were aged < 5 years [10]. A total of 130 households were randomly selected within the census tract. Eligible subjects were defined as children 1 to 59 months of age who lived continuously in selected household during the month prior to recruitment and were enrolled into the study according to informed consent procedures approved by the Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health.

### **Data collection**

The study team conducted Interviews during house visits and administered a standardized questionnaire to obtain information on demographics, underlying medical conditions, hospitalizations, occurrence of an upper respiratory tract infection (URTI) in the previous month, antibiotic therapy in the last month, childcare arrangements, school attendance and habits such as smoking. Information for children was obtained by interviewing the parent or legal guardian.

### **Isolation of pneumococci**

During the follow-up between January 2008 and January 2009, nasopharyngeal swabs were collected from each child at four times, at enrollment and then again within three months intervals. Samples were collected with calcium alginate swabs (Calgiswab type 1, Spectrum USA) and inoculated into modified Stewart transport medium and sent to the Clinical Microbiology Laboratory at the Gonçalo Moniz Research Institute. All swabs were plated within 4 hours onto agar plates with 5% sheep blood and 5.0 µg/ mL of gentamicin. Plates were incubated at 35°C in 5% CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere for up to 48 hours. Three α-hemolytic colonies exhibiting morphologic characteristics suggestive of *S. pneumoniae* were isolated. Identification of these isolates as *S. pneumoniae* was confirmed by optochin disc susceptibility (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, USA) and the bile solubility test. One *S. pneumoniae* colony per plate was then subcultured, harvested, and kept frozen at -70 °C for further testing. When *S. pneumoniae* isolates from the same primary plate exhibited a clearly different colony morphology, dissimilar colonies were frozen separately.

### **Serotyping**

The isolates were serotyped by multiplex-PCR as described elsewhere [11-12]. DNA extraction and PCR conditions were performed as described at the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [13]. Isolates with negative multiplex PCR results were subjected to single-plex-PCR utilized primer 19F variation [14] and Quellung reaction testing for capsular type definition.

### **Antimicrobial susceptibility testing**

The broth microdilution method was performed according to Clinical and laboratory Standard Institute recommendations [15] to determine susceptibility of isolates to penicillin, cefotaxime, tetracycline, erythromycin, trimethoprim/sulphamethozole and levofloxacin (Sigma–Aldrich, Germany). Quality control was performed by testing *S. pneumoniae* ATCC 49619. Isolates with a penicillin MIC value  $\geq 0.12$   $\mu\text{g/mL}$  were defined as penicillin-nonsusceptible. Intermediate and resistant isolates were considered nonsusceptible.

### **Genotyping**

PFGE analysis was performed to define the molecular profile. Chromosomal digests generated by *SmaI* were prepared and analyzed as described elsewhere [16]. A CHEF DRII apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA) was used for running the gels.

The bacterial strains were analyzed by MLST, as described elsewhere [17]. The sequence types (STs) were obtained with reference to the MLST database (<http://www.spneumoniae.mlst.net>). New alleles and STs were submitted to the curator of the database and were assigned designations.

### **Data management and statistical analysis**

Data were entered and managed by Epi Info version 3.5.1 (CDC, Atlanta, GA, USA). Bivariate associations between each potential risk factor and colonization at each sampling were determined by two tailed chi-square tests or Fisher's exact tests, where appropriate (Stata 6.0; Stata Corp., College Station, TX). Logistic regression models were constructed to identify risk factors for colonization at each sampling. The potential risk factors that were statistically significant at the 0.05 level in bivariate analysis for at least one of the time points were entered into each of the three models. Associations between potential risk factors and colonization in the multivariate models were considered to be statistically significant at  $P =$

0.05. It is likely that the observed colonization prevalence in each age group underestimated the true colonization incidence because of the dynamics of pneumococcal colonization, given that the samples were collected at 3-month intervals. Therefore we used odds ratios rather than relative risk estimates to characterize the association between potential risk factors and colonization.

## **Results**

### **Demographic Characteristics and Risk factors for Carriage**

In January 2008 a total of 203 children were enrolled into the cohort study. Ages ranged from 1 to 48 months, median age 24 (12-36), predominately black race (21%) and 48% of males. The socio-economic characteristics of the households are monthly income under U\$ 430.00 and crowded environment with a median number of inhabitants per households of five (range: 2 to 15), being that mostly of the study children live in household with two rooms (81.8%), with a ratio of 3.5 residents per bed (Table 1).

In total, 721 swabs were collected throughout the study period, yielding 398 pneumococcal isolates. The prevalence of *S. pneumoniae* nasopharyngeal carriage was 50.5%, 46.3%, 63.2% and 48.8% at each point sampling, respectively. Children who live with children under two years, live in crowded house and having URTI are at greater risk of being colonized. Seasonal variation on carriage prevalence was observed with an increased prevalence of carriage from July to January (Table 1).

Of the 203 children included in the study, 156 provided the nasopharyngeal samples at all the four visits and were eligible for analysis (Figure 1). At least one pneumococcal isolate from the nasopharyngeal sample was found in 74.4% (116 of the 156) of all children, 9% (14 of the 156) were not colonized and, 19.9% (26 of the 156) were only once colonized.

Children who live in crowded house and live with other children under two years are at greater risk of being colonized by high-invasiveness serotypes. On the other hand, have had an episode of URTI in the last month increased the prevalence of carriage low-invasive serotypes. Carriage low-invasiveness serotypes was also influenced by seasonal variation with an increased prevalence in the period from July to January (Table 2).

### Serotypes Distribution

Table 3 shows the distribution of serotypes recovered throughout the period of the study. The most prevalent serotypes were 6A/B (25.4%), 19F (10.1%) and, 14 (9.1%). The serotypes included in PCV-10 and PCV-13 accounted for 52.2% and 55.5%, respectively. The most frequent non-vaccine serotypes were 16F (4.8%), 15B/C (4.5%), 6C/D (3.5%), 34 (3%) and not typeable (7.3%); 15.3% (61/398) of the isolates of *S. pneumoniae* did not have the capsular type determined by multiplex-PCR. We did not find any fluctuation in distribution of serotypes during the study period.

PFGE analysis confirmed that 24 of the 156 (15.4%) children had persistent pneumococcal carriage by some serogroups. Being the serogroup 6A/B (n=9; 37.5%), 14 (n=5; 20.8%), 19F (n=4; 16.7%), 34 (n=2; 8.3%), 23F (n=1; 4.2%), 3 (n=1; 4.2%), 6C (n=1; 4.2%) and 15B/C (n=1; 4.2%). The vaccine serotype 14 and 19F and non-vaccines serotypes 34 and 15B/C persisted colonizing the same children up to six months. The most commonly identified STs were ST156 (14), ST 66 (14), ST177 (19F) and ST 3930 (6C).

### Antimicrobial Susceptibility

Overall, 38.4% (153/398) of the pneumococci showed reduced susceptibility to penicillin with MICs ranging from 0.12 to 8.0µg/ml. Most penicillin nonsusceptible isolates (113/153; 73%) belonged to vaccine serotypes: 6A/B (45/113; 40%), 19F (29/113; 25.9%), 14(20/113;18%) and 23F(12/112; 11%). The non-vaccine serotypes commonly associated with PNSP (41/153; 22%) were NT (6/41; 14.6%), 16F (4/41; 9.8%), 13 (3/41; 7.3%) and 34 (1/41; 2.4%). In addition, 58% were nonsusceptible to trimethoprim-sulphamethoxazole (SXT), 18.6% to tetracycline, 3% to erythromycin and 2% to cefotaxime. Seventy four percent (113/153) of penicillin nonsusceptible isolates were also resistant to SXT. The mostly frequent identified patterns of multidrug nonsusceptibility were penicillin and SXT (74% [113/153]), penicillin, SXT and tetracycline (12.4% [14/113]), penicillin, SXT and erythromycin (6.2% [7/113]) and penicillin, SXT, cefotaxime and erythromycin (2.7% [3/113]). Isolates with high level of penicillin resistance (MIC > 2.00 µg/mL) were identified in 15 (7.4%) children.

### Discussion

This study provide baseline information on the dynamics of pneumococcal carriage that may be particularly relevant in the monitoring and evaluation of the PCV-10 vaccine in Brazil and, more generally, in understanding the transmission of the infection in infancy at slum settlement.

We found the carriage frequency of around 55%, with seasonal fluctuations, with high prevalence of carriage occurring during the period from July to January. Seasonal variation has not been observed in previous study conducted at England in a period of ten months [18]. As has been reported [18-19], higher carriage rates are observed in children less than 5 years of age. The younger the patient the greater the chance of pneumococcal colonization [20]. Although, variability in carriage rates were not observed in different age groups from this study population. In generally the observed carriage rate is in agreement with previous studies conducted in others Brazilian cities [7, 21-22].

In Brazil, as in many developing countries, a significant proportion of the population lives in slum communities. These urban informal settlement characterized by crowded households and lower incomes, have been identified as factors associated with increased pneumococcal carriage in children [23]. Although, living in crowded environment could not be identified as a risk factor for pneumococcal carriage in a previous study conducted in a slum community from Brazil [9]. The density-dependent transmission phenomenon of pneumococcal disease and carriage has been discussed in previous studies [20, 23-24] . In this cohort study, conducted at an urban community, the prevalence of pneumococcal carriage increased with increasing household density. Furthermore, we have identified that in this community, living in a crowded home is a risk factor for being colonized by serotypes considered highly invasive. We would like to emphasize that the measurement of household density in this study was defined as the number of persons per bed and that houses in Brazilian' slums are very small and can be overcrowded with as many as 5 persons per room.

The study confirms that, having URTI in the last month increase the odds of being colonized, in agreement with previous studies [24]. In addition, URTI also increases the chance of carriage pneumococcal serotypes with lower invasive potential. Another study showed that influenza was associated with the greatest increases in the incidence of disease caused by serotypes with lower invasive potential [25].

The serotype distribution among nasopharyngeal isolates in the present study (6A/B, 19F, 14, 23F and 18) was similar to that found in previous studies in Brazil [7-9, 21] and others countries of Latin America and Europe [26-27]. Overall, the serotypes isolates from the nasopharyngeal included the most common serotypes causing invasive disease [28], and represented in the PCV-10 vaccine (~ 52%). No additional protection against carriage was provided by the PCV-13 formulation of the vaccine, as the three additional serotypes (3, 6A and 19A) represented only 3% of carriage isolates. In Brazil, this vaccine is currently available only in private clinics although this vaccine will not be available to all segments of society due to the high cost (about US\$ 100). The most common non-vaccine serotypes were (16F, 15B/C, 6C and 34). These serotypes are rarely associated with invasive disease in Salvador [28] However, some of these non-vaccine serotypes (34 and 15B / C) are successful in carriage, their persisted colonizing the same child for up to six months. Other studies of colonization identified a high prevalence of those serotypes [20, 29], and this findings would alert the community about the possibility of serotype replacement, as observed in others place in the post-PCV-7 vaccine [30-32].

The rates of antimicrobial resistance observed in this study population were higher for both penicillin-nonsusceptible [38.5% (considered MIC  $\geq$  0,125  $\mu$ g/mL)] and SXT (58%) than the previous carriage study conducted in Salvador [9]. Likewise, increasing resistance has already been documented in invasive disease, with rates growing from 15% (1999) to 22.2% (2007) [28, 33]. In spite of the association of PNSP with PCV-10 serotypes (14, 6A/B, 19F and 23F), PNSP was also found among non-vaccine serotypes (16F, 13, 34 and NT). Geographical variations in the frequency of antibiotic resistance have been observed in different regions of Brazil and others countries [7, 21, 34-35] and these differences may reflect, in part, true geographical differences in antibiotic resistance rate, but most likely reflect differences due to investigation methodology and populations sampled.

We also identified carriage of internationally spread clones of pneumococci with penicillin non-susceptibility as the ST66, 156, 177. All of these clones have been associated with carriage and invasive disease in Salvador and others place [7, 34]. In this community, these clones also account for persistent carriage, been identified in the same child at intervals up to six months. Swabbing every 3 months is unlikely to detect the same *S. pneumoniae* carriage episode, a recent Kenyan study describe the mean duration of carriage to be 30-days [36]. A

study conducted in Gambia showed that serotype 14 had longer duration of carriage [37]. In this study community, the serotypes 6A/B, 14 and 19F were persistent in several carriage episodes.

### **Acknowledgments**

We would like to thank all the community members in Salvador who participated in the study. We also thank Milena Soares and Soraia Machado Cordeiro for advice during laboratory analysis.

This work was supported by grants from the Brazilian National Research Council (482755/2010-5), the Research Foundation for the State of Bahia (FAPESB: 1431040054051) and the National Institutes of Health (TW007303). DMW is supported by the Global Health Equity Scholars training program (TW009338)

### **Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: JNR, AK, MGC, BB. Performed the experiments: APOM, MGC. Collect the samples: APOM, JA, LCC, MCL, JNR. Analyzed the data: APOM, MC, DW, GR. Contributed reagents/materials/analysis tools: JNR, MR, MGC, BB. Wrote the paper: JNR, APOM, GR, DW. Reviewed and revised the final version of the manuscript: All authors.

### **References:**

1. Zhang, Q; Arnaoutakis, K; Murdoch, C., *et al.*, *Mucosal immune responses to capsular pneumococcal polysaccharides in immunized preschool children and controls with similar nasal pneumococcal colonization rates*, in *Pediatr Infect Dis J.* 2004. p. 307-13.

2. Turner, P; Melchiorre, S; Moschioni, M., *et al.*, *Assessment of Streptococcus pneumoniae pilus islet-1 prevalence in carried and transmitted isolates from mother-infant pairs on the Thailand-Burma border*, in *Clin Microbiol Infect.* 2012. p. 970-5.
3. Valente, C; De Lencastre, H; Sa-Leao, R. *Selection of Distinctive Colony Morphologies for Detection of Multiple Carriage of Streptococcus pneumoniae*, in *Pediatr Infect Dis J.* 2013. p. 703-4.
4. Shak, J.R; Vidal, J. E; Klugman, K. P. *Influence of bacterial interactions on pneumococcal colonization of the nasopharynx*, in *Trends Microbiol.* 2013. p. 129-35.
5. Pilishvili, T; Lexau, C; Farley, M. M., *et al.*, *Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine.*, in *Journal Infection Disease.* 2010. p. 32-41.
6. Miller, E; Andrews, N.J; Waight, P.A., *et al.*, *Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study.*, in *Lancet Infect Dis.* 2011. p. 760-768.
7. Pimenta, F.C; Carvalho, M. da G; Gertz, R. E. Jr., *et al.* *Serotype and genotype distributions of pneumococcal carriage isolates recovered from Brazilian children attending day-care centres*, in *J Med Microbiol.* 2011. p. 1455-9.
8. Berezin, E.N;Cardernuto, M. D; Ferreira, L. L., *et al.* *Distribution of Streptococcus pneumoniae serotypes in nasopharyngeal carriage and in invasive pneumococcal disease in Sao Paulo, Brazil.* *Pediatr Infect Dis J*, 2007. **26**(7): p. 643-5.
9. Reis, J.N; Palma, T; Ribeiro, G. S., *et al.* *Transmission of Streptococcus pneumoniae in an urban slum community.* *J Infect*, 2008. **57**(3): p. 204-13.
10. Reis, R.B; Ribeiro, G.S; Felzembergh, R. D; *et al.* *Impacto of Environment and Social Gradient on Leptospira Infection in Urban Slums in Plos Infected Tropical Diseases.* 2008. p. 1-10.
11. Pai, R; Gertz, R. E; Beall, B. *Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of Streptococcus pneumoniae isolates*, in *J Clin Microbiol.* 2006. p. 124-31.
12. Dias, C.A;Teixeira, L. M; Carvalho, M. da G; Beall, B. *Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children.* *J Med Microbiol*, 2007. **56**(Pt 9): p. 1185-8.
13. Center Diseases Control -CDC. *PCR deduction of pneumococcal serotypes.* (cited 2014).
14. Menezes, A.P.O; Reis, J. N; Ternes, Y. M., *et al.* *Update of pneumococcal PCR serotyping assay for detection of a commonly occurring type 19F wzy variant in Brazil*, in *J Clin Microbiol.* 2013. p. 2470-1.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.*, in *Seventeenth Informational Supplement.* 2011.
16. Lefevre, J.C, Faucon, G; Sicard, A; Gasc, A.M. *DNA fingerprinting of Streptococcus pneumoniae strains by pulsed-field gel electrophoresis.*, in *J Clin Microbiol.* 1993. p. 2724-2728.
17. Enright, M.C; Spratt, B. G. *A multilocus sequence typing scheme for Streptococcus pneumoniae identification of clones associated with serious invasive disease.*, in *Microbiology.* 1998. p. 3049-3060.
18. Hussain, M; Melegaro, A; Pebody, R. G; *et al.* *A longitudinal household study of Streptococcus pneumoniae nasopharyngeal carriage in a UK setting*, in *Epidemiol Infect.* 2005. p. 891-8.



19. Hare, K.M; Singleton, R. J; Grimwood, K., *et al.* Longitudinal nasopharyngeal carriage and antibiotic resistance of respiratory bacteria in indigenous Australian and alaska native children with bronchiectasis. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e70478.
20. Hsu, K.K; Rifas-Shiman, S. L; Shea, K. M; *et al.* Do community-level predictors of pneumococcal carriage continue to play a role in the conjugate vaccine era? *Epidemiol Infect*, 2014. **142**(2).
21. Neves, F. P; Pinto, T. C; Correa, M. A., *et al.* Nasopharyngeal carriage serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children from Brazil before introduction of the 10-valent conjugate vaccine. *BMC Infectious Disease*, 2013. **13**(318): p. 1-7.
22. Rey, L.C; Wolf, B; Moreira, J. L., *et al.* Nasopharyngeal isolates of *S. pneumoniae* from healthy carriers and children with pneumonia: colonization rates and antimicrobial susceptibility. *J Pediatr (Rio J)*, 2002. **78**(2): p. 105-12.
23. Huang, S.S; Finkelstein, J. A; Rifas-Shiman, S. L., *et al.*, Community-level predictors of pneumococcal carriage and resistance in young. *American Journal Epidemiology*, 2004. **159**(7): p. 645-654.
24. Bogaert, D; De Groot, R; Hermans, P. W. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal diseases. *Lancet Infect Dis.*, 2004. **4**(3): p. 144-154.
25. Weinberger, D. M; Harboe, Z. B; Viboud, C., *et al.* Serotype-specific effect of influenza on adult invasive pneumococcal pneumonia., in *J Infect Dis* 2013. p. 1274-80.
26. Rodrigues, F; Foster, D; Caramelo, F., *et al.* Progressive changes in pneumococcal carriage in children attending daycare in Portugal after 6 years of gradual conjugate vaccine introduction show falls in most residual vaccine serotypes but no net replacement or trends in diversity. *Vaccine*, 2012. **30**(26): p. 3951-6.
27. Rivera-Olivero, I.A; Del Nogal, B; Sisco, M. C., *et al.* Carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Caracas, Venezuela: the relative invasiveness of serotypes and vaccine coverage. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011. **30**(12): p. 1489-95.
28. Menezes, A.P.O; Campos, L. C; Santos, M. S., *et al.* Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007. *Vaccine*, 2011. **29**(6): p. 1139-44.
29. Ercibengoa, M; Arostegi, N; Marimon, J. M., *et al.* Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal carriage in healthy children attending a day care center in northern Spain. Influence of detection techniques on the results. *BMC Infect Dis*, 2012. **12**: p. 69.
30. Darboe, M.K; Fulford, A. J; Secka, O; Prentice, A. M. The dynamics of nasopharyngeal streptococcus pneumoniae carriage among rural Gambian mother-infant pairs. *BMC Infect Dis*, 2010. **10**: p. 195.
31. Isaacman, D.J; McIntosh, E. D; Reinert, R.R. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *International Journal of Infectious Diseases.*, 2010. **14**(3): p. 197-209.
32. Hicks, L.A; Harrison, L.H; Flannery, B., *et al.* Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *Journal Infection Disease*, 2007. **196**(9): p. 1346-1354.

33. Reis, J.N; Cordeiro, S.M; Coppola, S. J., *et al.* Population-based Survey of Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from Meningitis patients in Salvador, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002. **40**(1): p. 275.
34. Volonakis, K; Souli, M; Kapaskelis, A. *et al.* Evolution of resistance patterns and identification of risk factors for *Streptococcus pneumoniae* colonisation in daycare centre attendees in Athens, Greece. *Int J Antimicrob Agents*, 2006. **28**(4): p. 297-301.
35. Andrade, A.L; Franco, C. M; Lamaro-Cardoso, J., *et al.* Non-typeable *Streptococcus pneumoniae* carriage isolates genetically similar to invasive and carriage isolates expressing capsular type 14 in Brazilian infants. *J Infect*, 2010. **61**(4): p. 314-22.
36. Abdullahi, O; Karani, A; Tigo C.C., *et al.* The prevalence and risk factors for pneumococcal serotypes in the nasopharynges of children in Kilifi District, Kenya. *Plos One*, 2012. **7**(2): p. 1020-1029.
37. Hill, P.C; Cheung, Y. B; Akisanya, A; *et al.* Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian infants: a longitudinal study. *Clin Infect Dis*, 2008. **46**(6): p. 807-14.

Figure 1. Flow of participants through the study.

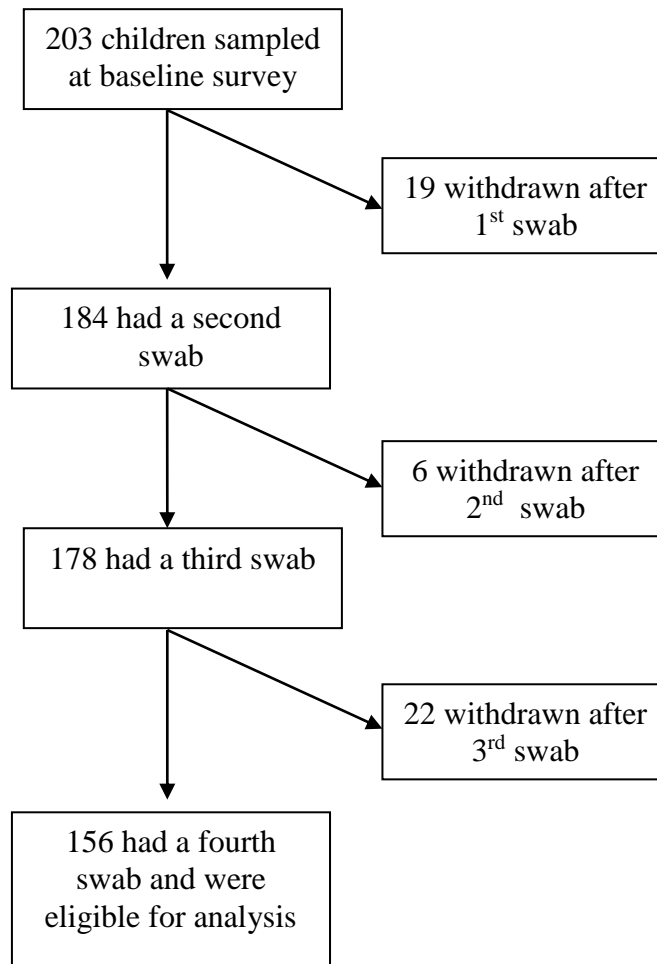


Table 1. Risk Factors for pneumococcal carriage among children &lt; 5 years old at community-level.

Demographic Characteristics	N(%) <sup>a</sup>	Pneumococcal Carriage - OR (IC95%)	
		Univariate Analysis	Multivariate Analysis
<b>Age (months)</b>			
<6	50 (7%)	REF <sup>b</sup>	
6-11	93 (13%)	0.62 (0.27 - 1.41)	
12-23	145 (20%)	1.35 (0.64 – 2.91)	
24-35	132(18%)	0.82 (0.38 - 1.70)	
36-47	173(24%)	0.71 (0.35 - 1.42)	
48-59	128 (18%)	0.70 (0.32 - 1.49)	
<b>Gender Male</b>	347 (48%)	1.03 (0.73 - 1.44)	
<b>Race<sup>a</sup></b>			
Mixed	505 (70%)	REF <sup>b</sup>	REF <sup>b</sup>
White	59 (8%)	0.52 (0.30 - 0.90)	0.52 (0.29 - 0.93)
Black	153 (21%)	0.77 (0.50 - 1.20)	
<b>Day care Attendance</b>			
<b>No</b>	685 (96%)		
<b>Yes</b>	28 (4%)	1.40 (0.67-3.50)	
<b>UTRI in the last month</b>			
<b>No</b>	287 (40.5%)	REF <sup>b</sup>	REF <sup>b</sup>
<b>Yes</b>	421 (59.5%)	1.42 (1.06-1.94)	1.38 (1.00 - 1.89)
<b>Exposure to cigarette smoking</b>			
<b>No</b>	490(68%)	REF <sup>b</sup>	
<b>Yes</b>	231 (32%)	1.11 (0.75 -1.67)	
<b>Antibiotic use in the last month</b>			
<b>No</b>	653 (92%)	REF <sup>b</sup>	
<b>Yes</b>	58 (8%)	0.90 (0.51 – 1.60)	
<b>Number of household contacts with children aging ≤ 2 years</b>			
None	288 (40%)	REF <sup>b</sup>	REF <sup>b</sup>
One contact	358 (50%)	1.60 (1.10 - 2.31)	1.44 (0.99 - 2.20)
Two contacts	67 (9%)	1.90 (1.10 - 3.50)	1.38 (0.73 - 2.53)
Three contacts	4 (1%)	<b>3.20 (2.4 – 4.31)</b>	<b>2.00 (1.33 - 2.89)</b>
<b>No. of residents/No. of rooms</b>	3.3 (±1.7)	1.90 (1.19-3.13)	1.77 (1.05 - 3.10)
<b>No. of residents/No. of bed<sup>c</sup></b>	3.5 ((±1.8)	1.53 (1.10-2.23)	
<b>Season (Feb/June vs July/January)</b>	-	0.60 (0.42-0.82)	1.87 (1.29 - 2.77)

a- Number of swabs for each variable.

b-REF – reference for analysis

Table 2. Risk factors for pneumococcal carriage among children &lt; 5years old, stratified by invasiveness property of serotypes

Characteristics	N (%)	Pneumococcal Invasive property	
		OR (IC95%)	
		Low Invasive <sup>a</sup>	High Invasive <sup>b</sup>
<b>Age (months)</b>			
< 12	119 (18%)	0.74 (0.26 - 1.99)	0.18 (0.00 - 0.90)
13-23	133 (21%)	1.54 (0.67 - 3.80)	0.57 (0.16 - 2.01)
25-35	126 (20%)	1.09 (0.47 - 2.50)	0.48 (0.15 - 1.81)
36-47	155 (24%)	0.76 (0.34 - 1.69)	0.61 (0.20 - 1.95)
48-59	113 (18%)	0.82 (0.35 - 2.06)	0.40 (0.10 - 1.42)
<b>Gender Male</b>	312 (48%)	1.07 (0.73 - 1.55)	1.18 (0.62 - 2.25)
<b>Race</b>			
Mixed	452 (70%)	REF <sup>c</sup>	REF <sup>c</sup>
White	52 (8%)	0.48 (0.25 - 0.89)	0.45 (0.00 - 1.28)
Black	138 (22%)	0.70 (0.42 - 1.15)	1.31 (0.58 - 2.62)
<b>Day-care Attendance</b>			
<b>No</b>	613 (96%)	REF <sup>c</sup>	REF <sup>c</sup>
<b>Yes</b>	25 (4%)	1.05 (0.37 - 2.80)	2.11 (0.00 - 6.34)
<b>UTRI in the last month</b>			
<b>No</b>	259 (41%)	REF <sup>c</sup>	REF <sup>c</sup>
<b>Yes</b>	375 (59%)	1.53 (1.04 - 2.24)	1.01 (0.61 - 1.70)
<b>Exposure to cigarette smoking</b>			
<b>No</b>	441 (68%)	REF <sup>c</sup>	REF <sup>c</sup>
<b>Yes</b>	205 (32%)	0.97 (0.63 - 1.53)	1.21 (0.54 - 2.27)
<b>Antibiotic use in the last month</b>			
<b>No</b>	586 (92%)	REF <sup>c</sup>	REF <sup>c</sup>
<b>Yes</b>	51 (8%)	0.62 (0.28 - 1.23)	1.16 (0.41 - 2.61)
<b>Number of household contact with children aging <math>\leq 2</math> years</b>			
<b>None</b>	264 (41%)	REF <sup>c</sup>	REF <sup>c</sup>
One contact	315 (49%)	1.38 (0.94 - 2.12)	1.95 (1.02 - 3.99)
Two contacts	62 (9.7%)	1.92 (1.05 - 3.60)	1.60 (0.47 - 3.75)
Three contacts	1 (0.2%)	0.00 (0.00 - 0.00)	0.00 (0.00 - 0.00)
<b>No. of residents/No. of room</b>	3.3 ( $\pm 1.7$ )	1.65 (1.00 - 2.82)	2.49 (1.15 - 5.38)
<b>No. of residents/No. of bed</b>	3.5 ( $\pm 1.8$ )	1.38 (0.98 - 2.07)	2.25 (1.28 - 3.89)
<b>Season (Feb/June vs July/January)</b>		0.57 (0.39 - 0.84)	0.68 (0.30 - 1.28)

a-High invasive serotype: 4, 7F, 8, 9V, 14, 18C and 19A;

b-Low invasive serotype: 3, 6A/B/C, 11A, 13, 15A, 15B/C, 16F, 17F, 19F, 20, 21, 22F, 23B, 23F, 35F and NT.

c- REF – reference for analysis.

Table 3. Serogroup/type distribution of all pneumococcal carriage isolates (N=398) recovered from children in Salvador, Brazil.

Serotype	No. of isolates	(%)
<b>PCV10</b>	209	52.2
4	5	1.3
6A/B	101	25.4
7F/A	1	0.3
9V/A	2	0.5
14	36	9.0
18	10	2.5
19F	40	10.1
23F	14	3.5
<b>PCV13</b>	221	55.5
3	7	1.8
19A	5	1.3
<b>Non-vaccine</b>	177	44.5
6C	14	3.5
8	1	0.3
11A	4	1.0
13	5	1.0
15A	2	0.6
15B/C	18	4.5
16F	19	4.8
17F	2	0.6
20	2	0.6
21	3	0.8
22F/A	2	0.6
23B	1	0.3
34	12	3.0
35B	1	0.3
35F	1	0.3
ND <sup>a</sup>	61	15.3
NT <sup>b</sup>	29	7.3

a - ND= Not Determined by Multiplex PCR.

b - NT=Not typeable by both methods (Multiplex PCR and Quellung Reaction)

## 7 RESULTADOS ADICIONAIS:

Perfil genotípico dos isolados de pneumococos de colonização da nasofaringe e comparação com perfil genotípico dos isolados de pneumococos das doenças invasivas.

Estes resultados serão utilizados para a confecção do terceiro artigo da tese que contempla os objetivos 6 e 7 da mesma.

Perfil genotípico dos isolados de pneumococos de colonização e a comparação dos mesmos com o perfil genotípico dos isolados de doença invasiva.

*Streptococcus pneumoniae* foi isolado em 55% (398/721) dos swabs coletados no período do estudo. Destes, 98/398 (24.6%) foram submetidos à análise do perfil genético por PFGE, sendo identificados 18 grupos clonais (Tabela 8). Um total de 15 isolados foi classificado com perfil eletroforético único, sendo não clonais. A distribuição dos grupos clonais foi representada, na maioria das vezes, por um único sorotipo, exceto o grupo clonal ER representado pelos sorotipos 14 e 6C e AO pelos sorotipos 19F e 6A/B. Os sorotipos 19F e 14 apresentaram mesmo perfil genético de clones de disseminação mundial como o ST177 e ST156, respectivamente.

Um total de 16 isolados do sorotipo 19F apresentou três perfis clonais AO (10), CD(3) e CE(3), todos identificados previamente em casos de doença invasiva na cidade de Salvador. O clone AO de ST 177 e DLV1543, foi 100% não susceptível ao TMP/SMX e 70% não susceptível à penicilina. Este grupo clonal foi persistente no período do estudo, sendo identificado em mais de uma coleta. Também foram identificados como clone AO, quatro isolados do sorogrupo 6 A/B (Tabela 8).

O sorotipo 14 foi representado pelos clones A (ST 66), GK (ST 156) e ER. Estes grupos clonais também relacionados com casos de doença invasiva foram persistentes em mais de uma coleta durante o período do estudo. O clone A se caracteriza pela resistência à penicilina e ao TMP/SMX, 75% e 100%, respectivamente. Os sorotipos 6A, 15B/C, 19Fv e 23F foram caracterizados por clones até então não identificados em casos de doença invasiva. Os sorotipos 6A e 23F foram representados apenas por um único grupo clonal I e VA, respectivamente.

O sorotipo 15B/C foi representado por dois clones AYB e AYA, onde o clone AYB teve 33% (1/3) dos isolados não susceptíveis à penicilina e 100% (3/3) não susceptíveis ao TMP/SMX, enquanto que, o clone AYA apresentou todos os seis isolados susceptíveis à penicilina e 46% (6/13) não susceptíveis ao TMP/SMX; este clone também foi persistente durante o estudo, sendo identificado em mais de uma coleta.

O sorotipo 19Fv foi representado por dois clones, sendo um disseminado na comunidade (NA) e o outro dentro de uma mesma residência (AP). Este último clone foi 100% (5/5) não susceptível à penicilina e 80% (4/5) ao TMP/SMX. O clone de



disseminação na comunidade (NA) também apresentou uma alta resistência à penicilina (66,6%) e ao TPM/SMX (100%).

Tabela 8. Frequência dos perfis genotípicos e fenotípicos de *Streptococcus pneumoniae* isolados de nasofaringe de crianças na cidade de Salvador, Bahia

Sorotipo	Nº	Perfil genotípico		Perfil fenotípico		Origem dos Isolados	
		PFGE	MLST	PNSp <sup>b</sup> Nº (%)	STXNSp <sup>c</sup> Nº (%)	Doença Invasiva	Colonização
6A	5	I	–	0 (0.0)	3 (60.0)		X
6A/B	4	AO	ST177	1 (25.0)	4 (100.0)	X	
6C	2	ER	ST3929	0 (0.0)	2 (100.0)	X	X
14	4	ER	–	0 (0.0)	4 (100.0)	X	X
	6	GK	ST156	6 (100.0)	6 (100.0)	X	X
	8	A	ST66	6 (75.0)	7 (87.5)	X	X
15B/C	3	AYB	–	1 (33.3)	3 (100.0)		
	13	AYA	–	0 (0.0)	6 (46.2)		X
16F	1	WYW	–	1 (100.0)	0 (0.0)		
	1	WWY	–	0 (0.0)	0 (0.0)		
	2	AV	–	0 (0.0)	0 (0.0)	X	X
19F	3	CD	SLV7030	2 (66.6)	2 (66.6)	X	
	3	CE	ST177	0 (0.0)	2 (100.0)		
	10	AO	ST177/DLV1543	7 (70.0)	10 (100.0)	X	X
19Fv <sup>a</sup>	5	AP	–	5 (100.0)	4 (80.0)		X
	6	NA	–	4 (66.6)	6 (100.0)		

23F	2	VA	–	2 (100.0)	2 (100.0)		X
34	1	LA	–	0 (0.0)	1 (100.0)		
	2	LAB	–	0 (0.0)	0 (0.0)		X
	2	H	ST771	0 (0.0)	1 (50.0)	X	X

a- 19Fv – Sorotipo 19F variante (Menezes, 2013).

b- PNSp – Não susceptibilidade a penicilina.

c- STXNSp – Não susceptibilidade ao Sulfametoxazol/Trimetoprim.

## 8 DISCUSSÃO

Este estudo de desenho longitudinal para abordagem da colonização nasofaringeana por pneumococos foi o primeiro conduzido no Brasil, além de ter sido também, o primeiro a ser realizado em uma comunidade. As informações deste estudo poderão contribuir para a compreensão da dinâmica da colonização nasofaringeana no período anterior à introdução da vacina PCV-10. A contribuição do estudo não se restringe apenas a cidade de Salvador, mas pode extrapolar para outras capitais do país, visto que, esse estudo foi realizado em uma comunidade de periferia (favela), tipo de comunidade comum em outras regiões do país, que possuem características comuns como superpopulação e renda per capita inferior a três salários mínimos.

No Brasil, vários estudos de colonização por pneumococos, foram conduzidos em escolas e creches, as quais constituem em fatores de risco para a colonização (LAVAL *et al.*, 2006; PIMENTA *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2013). Este tipo de amostragem por conveniência é mais fácil e barata de ser conduzida, além de ser menos perigosa para os indivíduos que realizam a coleta, visto que, nestas comunidades carentes a violência é maior. Neste estudo de coorte, enfrentamos a perda de seguimento de 23%, devido à mudança domiciliar das famílias. Estas crianças que não foram acompanhadas durante o estudo, não prejudicaram as análises. Elas apresentavam características similares às outras crianças seguidas e as análises foram realizadas considerando o tempo de permanência de cada uma no estudo.

Resultados similares ao total de crianças colonizadas (55%) neste estudo foram relatados em estudos realizados em outros países e outros estados brasileiros. Na Austrália, Alaska e Inglaterra a prevalência de colonização nasofaringeana foi de cerca de 60% (HUSSAIN *et al.*, 2005; HARE *et al.*, 2013). No Brasil, resultados similares foram descritos em Fortaleza (55%), Brasília (49%), Rio de Janeiro (49%) e no estudo realizado anteriormente em Salvador (66%) (REY *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2008; PIMENTA *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2013).

Entretanto, existem resultados discordantes também em outros países, como na Itália (8,2%) e Gâmbia (80%), e outras cidades brasileiras, como São Paulo (42%) e Goiânia (36%) (MARCHISIO *et al.*, 2002; HILL *et al.*, 2008; LAVAL *et al.*,

2006; BEREZIN *et al.*, 2007). Acredita-se que estas diferenças estão relacionadas principalmente às condições sócio-econômicas e metodologias analíticas. Locais com melhores condições sócio-econômicas apresentam baixas taxas de colonização nasofaringeana por pneumococos (HUSSAIN *et al.*, 2005; MACKENZIE *et al.*, 2010; ABDULLAHI *et al.*, 2012).

Os fatores de risco envolvidos com a colonização nasofaringeana por pneumococos foram o contato com crianças menores de dois anos de idade, Infecção do trato respiratório superior (UTRS), número de residentes por cômodo e por cama. A colonização por sorotipos com alto poder invasivo estava associada ao contato com crianças menores de dois anos de idade e a aglomeração; a associação de colonização por sorotipos com baixo poder invasivo foi observado em crianças com ITRS. Estudo mostra que indivíduos infectados com o vírus da Influenza tem mais chance de ser colonizado por sorotipos de baixo poder invasivo (WEINBERGER *et al.*, 2013)

A aglomeração de indivíduos, ou seja, a quantidade de indivíduos por domicílio revela a situação sócio-econômica dos residentes. Estudos realizados por outros autores relatam a associação das condições sócio-econômicas com a colonização nasofaringeana (BOGAERT *et al.*, 2004; HILL *et al.*, 2008; HSU *et al.*, 2014).

Os fatores de risco associados com colonização nasofaringeana por pneumococos encontrado neste trabalho são similares aos achados em outros estudos, exceto pelo fato de não ter sido encontrado associação com frequentar escola e creche (LEINO *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2008; PEBODY *et al.*, 2008; UENO *et al.*, 2013). A maioria das crianças que residem em comunidades carentes frequenta a escola depois de cinco anos de idade, além da carência de creche pública. As crianças ficam no domicílio e são cuidados por irmãos mais velhos, avôs ou vizinhos.

Os fatores de proteção relacionados com a colonização foram à raça branca e a sazonalidade. Crianças tem menos chance de estar colonizado no período de fevereiro a junho. Período onde a temperatura é mais elevada e que as crianças não ficam aglomeradas.

A colonização nasofaringeana por pneumococos permanece constante independente do sexo ou da utilização de antimicrobiano pela criança no último mês. Estes achados são apoiados por estudo realizado na zona urbana de Boston (EUA)

após a introdução da vacina heptavalente, no entanto, difere em relação ao uso de antimicrobianos quando comparados com crianças residentes em comunidades fora do centro urbano (HSU *et al.*, 2014).

A prevalência de sorotipos vacinais encontrado neste trabalho corrobora com outros estudos realizados em cidades brasileiras como, Salvador, Brasília e São Paulo (REIS *et al.*, 2008; BEREZIN *et al.*, 2007; PIMENTA *et al.*, 2011). Estudo publicado recentemente no Rio de Janeiro, antes da introdução da vacina PCV-10, mostra resultado similar em relação à prevalência de sorotipos vacinais (NEVES *et al.*, 2013). Outros países da América Latina e Europa também apresentam resultados similares (RIVERA-OLIVERA *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Entre os sorotipos vacinais, o sorotipo 19F foi um dos mais prevalentes neste estudo e relacionados com a não susceptibilidade a penicilina. Alguns destes pneumococos sorotipo 19F apresentaram um gene similar à cepa 19A (2584-0819F *wzy*) isolada no Canadá (PIMENTA *et al.*, 2009) e por isso não foram identificados no multiplex PCR, sendo necessário desenhar uma um novo *primer* para ser utilizado nas reações de PCR multiplex para determinação do tipo capsular de isolados provenientes da América Latina. Pneumococos com esta característica também foram isolados de amostras de doenças invasivas em Salvador e em isolados de nasofaringe da cidade de Goiânia.

O monitoramento por PCR multiplex para identificação de sorotipos de pneumococos se faz necessário, visto que, é a técnica mais utilizada na atualidade. O PCR multiplex é um método rápido e barato e de fácil acesso quando comparado ao teste de Quellung. Na era da vacina conjugada, o monitoramento da prevalência de sorotipos de nasofaringe e doenças invasivas é importante para verificar a efetividade da vacina pneumocócica.

Ao longo de período do estudo, também foram isolados sorotipos não vacinais em 44,5% dos isolados. Os sorotipos não vacinais mais prevalentes foram: 16F e 15B/C. Estudo de colonização nasofaringeana realizado na Espanha mostra também uma alta prevalência dos sorotipos 15B e 16F (ERCIBENGOA *et al.*, 2012). Um trabalho realizado no Brasil antes da introdução da vacina decavalente mostra que o sorotipo 15C foi um dos mais prevalentes em crianças que frequentam creche (NEVES *et al.*, 2013).

Foi observado nos EUA e alguns países Europeus, após a introdução da vacina conjugada, uma redução na circulação de sorotipos vacinais e um aumento

da prevalência de sorotipos não vacinais; um dos sorotipos que aumentou após a introdução da vacina foi o 19A (WHITNEY *et al.*, 2006; PAI *et al.*, 2005; ISAACMAN *et al.*, 2010).

Os sorotipos não vacinais, de maior prevalência em eventos de colonização, podem tornar-se futuros sucessores nos casos de doença após a introdução da vacina conjugada.

Para alguns isolados não foi possível determinar o tipo capsular pelo método de multiplex PCR (15,4%) e outros permaneceram como não tipáveis (NT) mesmo após a reação de Quellung (7,3%). Esses dados corroboram com outros estudos desenvolvidos em Salvador, que encontrou 8% de isolados NT, e na Espanha, que detectou 6% de isolados NT; e em Portugal 4,5% (REIS *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2012; ERCIBENGOA *et al.*, 2012).

O estudo mostra uma média de não susceptibilidade a penicilina de 38,5%, considerando o ponto de corte de CIM > 0,125 µg/mL. Este resultado revela um aumento de duas vezes na não susceptibilidade a penicilina em comparação com estudo realizado anteriormente, o aumento foi de 15% (2000-2001) (REIS *et al.*, 2008) para 38,5% (2008-2009). A redução da sensibilidade à penicilina também foi observado em isolados de doenças invasivas, sendo que numa proporção menor. O não susceptibilidade à penicilina foi de 15% (1995-1999) (REIS *et al.*, 2002) para 22% (2000-2007) (MENEZES *et al.*, 2011). Ambos os estudos conduzidos na cidade de Salvador. Estudo realizado no Rio de Janeiro com colonização nasofaríngea, considerando o mesmo ponto de corte para a CIM, apresentou uma taxa de não susceptibilidade de 27% (NEVES *et al.*, 2013).

Isolados de pneumococos circulante nas comunidades de Salvador tem mostrado um aumento de resistência ao TMP/SMX. A não susceptibilidade dos isolados de pneumococos de colonização ao TMP/SMX foi de 48,5% em 2000 (REIS *et al.*, 2008) e aumentou para 58% (2008); Não houve diferença nas taxas de resistência para eritromicina. No total, 1% dos isolados foram não sensíveis à cefotaxima. Taxa similar foi descrita em casos de doença invasiva na cidade de Salvador (MENEZES *et al.*, 2011).

Os sorotipos mais prevalentes entre os isolados não susceptíveis a penicilina foram 6A/B, 19F, 14, 23F, NT e 16F, sendo o sorotipo 14 o mais frequente e com maiores valores de CIM (acima de 2 µg/mL). Este resultado corrobora com outro estudo realizado no Rio de Janeiro (NEVES *et al.*, 2013). Em relação a doenças

invasivas os sorotipos 14 e 23F são os mais resistentes à penicilina, sendo o sorotipo 14 associado com CIMs acima de 2 µg/mL (MENEZES *et al.*, 2011).

Neste estudo foi observada a presença de clones de disseminação internacional entre os isolados de nasofaringe. O sorotipo 14 foi caracterizado pelos clones A e GK, que são representados pelos STs 66 e 156 respectivamente. O ST 156 é um clone que foi observado primeiro na França e depois na Espanha, conhecido como “Spain<sup>9V</sup>-3”, relacionado com alto nível de resistência a penicilina e multiresistência. Este ST já foi descrito com sorotipo 9V e 14 (SOGSTAD *et al.*, 2006). Em Salvador tanto em doença invasiva quanto em colonização este ST está associado ao sorotipo 14. O ST 66 está associado aos sorotipos 9N, 14, 19F e 23F. Este ST está associado ao sorotipo 14 e a não susceptibilidade à penicilina tanto em isolados de nasofaringe quanto de doença invasiva (SERRANO *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2008; KO *et al.*, 2000; SANTOS, 2009). Estudos realizados em Goiânia e Brasília relatam a presença deste clone (ST 156) em isolados de nasofaringe e doença invasiva (ANDRADE *et al.*, 2010; PIMENTA *et al.*, 2011). Andrade e colaboradores (2010) identificaram isolados não tipáveis (NT) caracterizados como ST 156. O ST 156 esteve associado com persistência à colonização neste estudo, porque foi isolado em coletas sucessivas na mesma criança.

Outro clone de disseminação mundial encontrado foi o ST 177, denominado clone “Portugal <sup>19F</sup>-21” ([www.mlst.s.pneumoniae.com](http://www.mlst.s.pneumoniae.com); SENER *et al.*, 2006), representado pelos sorotipos 19F e 6A. Os isolados foram não susceptíveis à penicilina e ao TMP/SMX. Este grupo clonal foi isolado da nasofaringe de indivíduos saudáveis e em casos de doenças invasivas, estando relacionado à transmissão intra-domiciliar e persistência de colonização.

Os clones relacionados ao sorotipo 19Fv não foram encontrados em isolados de doença invasiva, mas estão relacionados a não susceptibilidade à penicilina e ao TMP/SMX e a transmissão intra e inter-domiciliar. Devendo ser monitorado no período pós-vacinal, assim como os grupos clonais de sorotipos não vacinais (15B/C, 16F e 34) disseminados na comunidade através da transmissão intra e inter-domiciliar.

Alguns problemas foram enfrentados na condução deste estudo de coorte, entre eles, ressalta-se a violência, que por muitas vezes impediu o acesso da equipe às residências do estudo, causando uma diferença nos intervalos de coleta dos swabs que variou de 60 a 120 dias. A perda de seguimento, que é um dos principais



problemas em estudos de coorte, não afetou as análises, uma vez que o risco do evento de colonização nas crianças que saíram do seguimento é estimado por ser igual ao das crianças que permaneceram.

## **9 CONCLUSÕES**

1. A taxa de colonização por *Streptococcus pneumoniae* em crianças menores de cinco anos na comunidade de Pau da Lima foi de 56% no ano de 2008;

2. A colonização nasofaringeana em comunidades carentes está associada à aglomeração, contato com crianças < 2 anos de idade) e presença de ITRS. Entre os fatores de proteção para colonização nasofaringeana estão a etnia (branca) e a sazonalidade (período de fevereiro a junho).
3. A transmissão intra e inter domiciliar foi identificada em casos de isolados de sorotipos vacinais como 6A/B, 14, 19F e não vacinais como 15B/C, 16F e 34; esses sorotipos foram persistentes nos eventos de colonização em 15,4% das crianças (24/156);
4. A taxa de colonização por sorotipos vacinais (6A/B, 14 e 19F) foi de 56% e de sorotipos não vacinais de 44% (6C, 16F, 15B/C e 34);
5. A não susceptibilidade a penicilina entre os isolados de *S. pneumoniae* de nasofaringe aumentou de 15% para 38% em comparação com estudos anteriores e foi identificados isolados com CIM > 2,00 µg/mL;
6. Foi identificados clones de disseminação internacional como o Spain<sup>9V</sup>-3 (ST156) e Portugal <sup>19F</sup>-21(ST 177) entre os isolados de *S. pneumoniae* de nasofaringe; esses clones são reconhecidos por serem não susceptíveis à penicilina;
7. Foram determinados vários clones de pneumococos previamente identificados entre isolados causadores de doença invasiva na cidade de Salvador, principalmente relacionados aos sorotipos vacinais 14 e 19F;
8. O monitoramento do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, distribuição de sorotipos e clones deve ser realizado no período após a introdução da vacina PCV-10 porque alguns sorotipos não vacinais podem emergir com poder invasivo e tornar predominantes em casos de doença pneumocócica;

## REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, O.; KARANI, A., *et al.* Rates of Acquisition and Clearance of Pneumococcal Serotypes in the nasopharynxes of Children in Kilifi District, Kenya. **J. Infect. Dis**, v. 206, p. 1020–1029, oct. 2012.
- ALEXANDER, J. E.; BERRY, A. M., *et al.* Amino acid changes affecting the activity of pneumolysin alter the behaviour of pneumococci in pneumonia. **Microbiol. Pathog.**, v.24, n.3, p.167-174, mar. 1998.
- ANDRADE, A. L.; FRANCO, C. M., *et al.* Non-typeable *Streptococcus pneumoniae* carriage isolates genetically similar to invasive and carriage isolates expressing capsular type 14 in Brazilian infants. **J. Infect.**, v. 61, n. 4, p. 314-322, oct. 2010.
- ARDITI, M.; MASON E. O., *et al.* Three-year multicenter surveillance of pneumococcal meningitis in children: clinical characteristics, and outcome related to penicillin susceptibility and dexamethasone use. **Pediatr.**, v. 102, p. 1087-1097, nov.1998.
- AUSTRIAN, R. **Life With the Pneumococcus**. Philadelphia: University of Pennsylvania Press, 1985.
- BAROCCHI, M. A.; RIES, J., *et al.* A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 8, p. 2857-2862, feb. 2006.
- BEREZIN, E. N., CARDENUTO M. D., *et al.* Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in nasopharyngeal carriage and in invasive pneumococcal disease in São Paulo, Brazil. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 26, n. 7, p. 643-645, jul. 2007.
- BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P.W. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect. Dis.**, v. 4, p.144-154, mar. 2004.
- BRAIDO F.; BELLOTTI M., *et al.* The role of Pneumococcal vaccine. *Pulm Pharmacol. Colonization: the key to pneumococcal disease.* **Lancet Infect. Dis.**, v.4, p.144-154, 1998.
- BRANDILEONE, M. C.; Di Fabio, J.L, *et al.* Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. **Microb. Drug. Resist.**, v4, p. 209-217, 1998.

BRICKS L. F.; BEREZIN E. N.; SILVEIRA L. Uso de antibióticos em IRA e resistência bacteriana. *In*: BRICKS LF, CERVI MC, organizadoras. Atualidades em doenças infecciosas: manejo e prevenção. São Paulo: **Atheneu**, p. 197-214, 2002.

BRICKS, L. F.; BEREZIN, E. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases. **J Pediatr.**, v.82, n.3, p.67-74, 2006.

BRILES, D. E.; TART, R. C., *et al.* Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, n. 4, p. 645-657, oct. 1998.

BRUEGGEMANN A. B.; GRIFFITHS D. T., *et al.* Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype and clone-specific differences in invasive disease potential. **J. Infect. Dis.**, v.187, p.1424-1432, 2003.

BRUGGER S.; FREY P., *et al.* Multiple colonization with *S. pneumoniae* before and after introduction of the seven-valent conjugated pneumococcal polysaccharide vaccine. **Plos One**, v. 5, n. 7, p. 1-8, jul. 2010.

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

CASTANHEIRA, M., GALES, A. C., *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America: results from five years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.10, n.7, p.645-651, Jul. 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing in Seventeenth Informational Supplement, 2011.

CATTERALL, J. R. *Streptococcus pneumoniae*. **Thorax**, v.54, n.10, p.929-937, 1999.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION-CDC. Invasive pneumococcal disease in children 5 years after conjugate vaccine introduction--eight states, 1998-2005. **MMWR**, v. 57, p.144-148, 2008.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION-CDC. Prevention of Pneumococcal Disease Among Infants and Children - Use of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide

- Vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR**, v. 59, 2010.
- CLARKE, S. C. Control of Pneumococcal Disease – the impact of conjugate vaccines. **Paediat. Healthcare Vac.**, p. 27-29 .2006.
- CASTANEDA, E.; AGUDELO, C.I., *et al.* Laboratory-based surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin American countries: a SIREVA II project, 2000-2005. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 28, n. 9, p. 265-270, 2009.
- COPE, E. K.; Goldstein-Daruech, N., *et al.* Regulation of virulence gene expression resulting from *Streptococcus pneumoniae* and nontypeable Haemophilus influenzae interactions in chronic disease. **Plos One**, v.6, n. 12, p. 1-9, dec. 2011.
- DARBOE M. K.; FULFORD, A. J., *et al.* The dynamics of nasopharyngeal *streptococcus pneumoniae* carriage among rural Gambian mother-infant pairs. **BMC Infect. Diseases.**, v. 10, n. 195, p. 1-11, jul. 2010.
- DIAS, C. A; TEIXEIRA L. M., *et al.* Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. **J. Med. Microbiol.**, v. 6, p. 1185-1188, sep. 2007.
- DONKOR, E. S. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v3, p. 1-5, mar. 2013.
- ENRIGHT M.C.; SPRATT B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. **Microbiol.**, v.144, p. 3049-3060, 1998.
- ERCIBENGOA, M.; AROSTEGI, N., *et al.* Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal carriage in healthy children attending a day care center in northern Spain. Influence of detection techniques on the results. **BMC Infect. Dis.**, v. 12, n. 69, p. 1-8, mar. 2012.
- FADEN, H.; DUFF, L., *et al.* Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. **Pediat. J. Infect. Dis.**, v.175, p.1440-1445,1997.
- FRANCIS, J. P.; RICHIMOND, P. C., *et al.* Maternal antibodies to pneumolysin but not to pneumococcal surface protein a delay early pneumococcal carriage in high-risk papua new guinean infants. **Clin. Vaccine. Immunol.**, v.16, p. 1633–1638, 2009

- FRANCO C. M.; ANDRADE, A. L., *et al.* Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 29, n.1, p.77-79, jan. 2010.
- GAMEZ, G.; HAMMERSCHMIDT, S. Combat pneumococcal infections: adhesins as candidates for protein- based vaccine development. **Curr. Drug Targets**, v. 13, n. 3, p. 323-337, 2012.
- GARCIA S.; LEVINE O. S., *et al.* Pneumococcal disease and vaccination in the Americas: an agenda for accelerated vaccine introduction. **Pan. Am. J. Public Health**, v. 19, n. 5, p. 340-348, 2006.
- GERTZ, R. E JR.; MCELLISTREM, M. C., *et al.* Clonal distribution of invasive pneumococcal isolates from children and selected adults in the United States prior to 7-valent conjugate vaccine introduction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 9, p. 479-483, sep. 2003.
- GHAFFAR, F.; BARTON, T. *et al.* Effect of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in the first 2 years of life. **Clin. Infect. Dis.**, v.39, p.930-938, 2004.
- GONZALEZ, T. B.; RIVERA-OLIVERO, I. A., *et al.* Estado de portador nasofaríngeo de *Streptococcus pneumoniae* en madres e hijos de la población indígena Panare Del estado Bolivar, Venezuela. **Rev. Arg. Microbiol.**, v.42, p.30-34, feb. 2010
- GOLDBLATT, D.; HUSSAIN, M., *et al.* Antibody responses to nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in adults: a longitudinal household study. **J. Infect. Dis**, v.192, p.387–393, 2005.
- GOETGHEBUER, T.; T. E. WEST, *et al.* Outcome of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b in children in The Gambia. **Trop. Med. Int .Health**, v.5<sub>1</sub> n.3, p.207-213, mar. 2000.
- GRAY, B. M.; CONVERSE, G. M., *et al.* Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. **J. Infect. Dis.**, v. 142, p. 923-933, 1980.
- HARE, K.M.; SINGLETON, R.J., *et al.*, Longitudinal nasopharyngeal carriage and antibiotic resistance of respiratory bacteria in indigenous Australian and alaska native children with bronchiectasis. **PLoS One**, v.8, n.8, p. 1-9, aug. 2013

HAUSDORFF, W. P.; FEIKIN, D. R., *et al.* Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. **Lancet Infect. Dis.**, v.5, n.2, p.83-93, 2005.

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

HILL, P. C.; CHEUNG, Y.B., *et al.* Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian infants: a longitudinal study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 6, p. 807-814, mar. 2008.

HILL, P. C.; TOWNEND, J., *et al.* Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in Rural Gambian Villages: A longitudinal study. **Clin. Infect. Dis.**, v.50, n. 11, p. 1468-1476, jun. 2010.

HICKS, L. A.; HARRISON, L. H., *et al.* Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. **J. Infect. Dis.**, v. 196, p.1346-1354, 2007.

HO, P. L.; LAM, K.F., *et al.* Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of nasopharyngeal and invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Hong Kong children. **Vaccine.**, v. 22, n. 25-26, p. 3334-3339, sep. 2004.

HOBAN, D. J.; DOERN, G. V., *et al.* Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clin. Infect. Dis.**, v.32, Suppl 2, n.15, p.81-93, 2001.

HSU, K K.; RIFAS-SHIMAN, S.L., *et al.* Do community-level predictors of pneumococcal carriage continue to play a role in the conjugate vaccine era? **Epidemiol. Infect.**, v. 142, n. 2, p. 379-387, feb. 2014.

HUANG, L. M.; LIN, T.Y.; JUERGENS, C. Immunogenicity and safety of a 13 valent pneumococcal conjugate vaccine given with routine pediatric vaccines in Taiwan. **Vaccine.**, v. 30, n. 12, p. 2054-2059, mar. 2012.

- HUSSAIN, M.; MELEGARO, A., *et al.* A longitudinal household study of *S. pneumoniae* nasopharyngeal carriage in a UK setting. **Epidemiol. Infect.**, v. 133, n. 5 p.891-898, oct. 2005.
- KELLOGG, J. A.; BANKERT, D.A., *et al.* Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 9, p. 3373-3375, sep. 2001.
- ISAACMAN, D. J.; MCINTOSH, E. D.; REINERT, R. R. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 14, n. 3, p 197-209, 2010.
- JOURDAIN, S.; SMEESTERS, P. R., *et al.* Differences in nasopharyngeal bacterial carriage in preschool children from different socio-economic origins. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.17, n. 6, p. 907-914, jun. 2010.
- KADIOGLU, A.; WEISER, J., *et al.* The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, n. 4, p. 288-301, apr. 2008.
- KO A.I.; REIS, J. N., *et al.* Clonally Related Penicillin-Nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* Serotype 14 from cases of Meningitis in Salvador, Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p.8-86. 2000.
- KOEDEL, U.; W. M. SCHELD, *et al.* Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. **Lancet Infect. Dis.**, v.2, n.12, p.721-736, 2002.
- UCH, A; SADOWY, E; SKOCZYŃSKA, A.; HRYNIEWICZ, W. First report of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D isolates from invasive infections. **Vac.**, v. 28, n. 39, p.6406-64077, 2010
- LABOUT, J. A. M; DUIJTS, L., *et al.* Risk factors for otitis media in children with special emphasis on the role of colonization with bacterial airway pathogens: the generation R study. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 26, p.61–66, 2011.
- LAVAL, C. B.; DE ANDRADE A.L., *et al.* Serotype of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. **Clin. Infect. Dis.**, v.12 , n.1, p. 50-55, jan. 2006.



- LEINO, T. AURANEN, K., *et al.*, Pneumococcal carriage in children during their first two years: important role of family exposure. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.20, n.11, p. 343-345, nov. 2001.
- LEFEVRE, J. C.; FAUCON, G., SICARD, A. M., GASC, A.M. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 2724-2728, 1993.
- MACKENZIE, G. A.; LEACH, A. J., *et al.* Epidemiology of nasopharyngeal carriage of respiratory bacterial pathogens in children and adults: cross-sectional surveys in a population with high rates of pneumococcal disease. **BMC Infect. Dis.**, v. 10, p. 1-10, 2010.
- MARCHISIO, P., *et al.* Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children: implications for the use heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n.5, p. 479-484, 2002.
- MEATS, E.; BRUEGGEMANN, A. B., *et al.* Stability of serotypes during nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p.386-392, 2003.
- MENEZES, A. P. O.; CAMPOS, L. C., *et al.* Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007. **Vaccine.**, v. 29, n. 6, p. 1139-1144, 2011.
- MENEZES, A. P. O., REIS, J. N., *et al.* Update of pneumococcal PCR serotyping assay for detection of a commonly occurring type 19F wzy variant in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, n. 7, p. 2470-2471, jan. 2013.
- Ministério da Saúde, Secretaria Executiva, Brasil. Mais saúde: direito de todos: 2008-2011, 2.ed. **Editora do Ministério da Saúde**, Brasília, 2008.
- MILLER, E.; ANDREWS, N.J., *et al.* Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. **Lancet Infect. Dis.**, v.11, n.10, p.760-768, 2011.
- MITCHELL, A. M.; MITCHELL, T. J. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 16, n. 5, p. 411-418, 2010.

- MUSHER, D.M. "A pathogenic categorization of clinical syndromes caused by *Streptococcus pneumoniae*," in *The Pneumococcus*. **Tuomanen**, p.211–220, 2004
- MUSHER, D. M. Pneumococcal vaccine--direct and indirect ("herd") effects. **N. Engl. J. Med.**, v.354, n.14, p.1522-1524, 2006.
- NEVES, F .P. G., *et al.* Nasopharyngeal carriage serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children from Brazil before introduction of the 10-valvnt conjugate vaccine. **BMC Infect. Dis.**, v.13, n.318, p. 1-7, 2013.
- NOVAES H. M.D., *et al.* Hospitalization rates for pneumococcal disease in Brazil, 2004-2006. **Rev. Saúde Pública**, v.45, p. 539-547, 2011.
- OBARO, S. K., *et al.* The pneumococcal problem. **BMJ**, v.312, n.7045, p.1521-1525, 1996.
- OOSTERHUIS-KAFEJA, F., *et al.* Immunogenicity, efficacy, safety and effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines. **J Infect. Dis.**, v.25, n.12, p. 2194-2212, 2007
- PAI, R.; GERTZ, R. E., *et al.* Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, n.1, p.124-131, 2006.
- PALLARES, R.; FENOLL, A., *et al.* The epidemiology of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and the clinical relevance of resistance to cephalosporins, macrolides and quinolones. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.22, Suppl 1, p.15-24, 2003.
- PARK, I.H.; PRITCHARD, D.G., *et al.* Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 33, p.1225-1233, 2007.
- PEBODY, R. G.; MORGAN, O., *et al.* Use of antibiotics and risk factors for carriage of *Streptococcus pneumoniae*: a longitudinal household study in the United Kingdom. **Epidemiol. Infect.**, v.137, p.555–561, apr. 2009.
- PIMENTA F.C.; GERTZ, R. E. Jr., *et al.* Rarely occurring 19A-like cps locus from a serotype 19F pneumococcal solate indicates continued need of serology-based quality control for PCR-based serotype determinations. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 7, p.2353-2354, jul. 2009.

- PIMENTA, F. C.; CARVALHO, M. Da G., *et al.*, Serotype and genotype distribution of pneumococcal carriage isolated recovered from Brazilian children attending Day-care centers. **J. Med. Microbiol.**, v.60, p. 1455-1459, jun. 2011.
- PLETZ, M. W.; MAUS, U., *et al.* Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 32, n. 3, p. 199-206, apr. 2008.
- Centers of Diseases Control and Prevention - CDC. *PCR deduction of pneumococcal serotypes*. cited 2014.
- REIS, J. N.; CORDEIRO, S. M., *et al.* Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 275-277, jan. 2002.
- REIS, J. N.; TALMA, P., *et al.* Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an Urban Slum Community. **J. Infect.**, v. 57, n. 3, p. 204–213, sep. 2008.
- REGEV-YOCHAY, G. M.; DAGAN, R., *et al.* Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family settings. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n.5, 632–639, 2004.
- REY, L. C.; WOLF, B., *et al.* Nasopharyngeal isolates of *S. pneumoniae* from healthy carries and children with pneumonia: colonization rates and antimicrobial susceptibility. **J. Pediatr.** V.78, n.2, p. 105-112, mar.-apr. 2002.
- RIVERA-OLIVERO, I. A.; del NOGAL, B., *et al.* Carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Caracas, Venezuela: the relative invasiveness of serotypes and vaccine coverage. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, v.30, n. 12, p. 1489-1495, apr. 2011.
- RODRIGUES, F.; FOSTER, D., *et al.* Progressive changes in pneumococcal carriage in children attending daycare in Portugal after 6 years of gradual conjugate vaccine introduction show falls in most residual vaccines serotypes but no net replacement or trends in diversity. **Vaccine.**, v.30, n.26, p. 3951-3956, jun. 2012.
- SÁ-LEÃO, R.; TOMASZ, A., *et al.* Genetic diversity and clonal patters among antibiotic-susceptible and resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children: day care centers as autonomous epidemiological units. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.4137-4144, 2000.
- SANCHEZ, C. j.; KUMAR, N., *et al.* *Streptococcus pneumoniae* in biofilms are unable to cause invasive disease due to altered virulence determinant production. **PLoS ONE**, v. 6, n.12, p.2873-2878, 2011.

- SANTOS, M. S. Análise da Composição Clonal dos *S. pneumoniae* não susceptíveis a penicilina em casos de meningite. **Dissertação de mestrado**. CPqGM/FIOCRUZ. Salvador, Bahia, 2010.
- SARTORI A. M.; de SOAREZ, P. C.; NOVAIS, H. M., *et al.* Cost-effectiveness of introducing the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine into the universal immunization in Brazil. **J. Epidemiol. Community Health**, v.66, p.1-8, sep. 2012
- SCOTT, J. A.; HALL, A. J., *et al.* Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: associations with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. **Clin. Infect. Dis.**, v.22, n.6, p.973-981, 1996.
- SENER, B.; McGEE L.; PINAR, A.; ESER, O. Genomic backgrounds of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Ankara, Turkey: Identification of emerging new clones. **Microb. Drug Resist.**, v.12, n.2, p. 109-114, 2006.
- SERRANO I.; MELO-CRISTIANO, J.; CARRIÇO J. A; RAMIREZ, M. Characterization of the genetic lineages responsible for pneumococcal invasive disease in Portugal. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.4, p.1706-1715, apr. 2005.
- SJOSTROM, K.; SPINDLER C., *et al.* Clonal and capsular types decide whether pneumococci will act as a primary or opportunistic pathogen. **Clin. Infect. Dis.**, v.42, n.4, p.451-459, 2006.
- SIMELL, B.; AURANEN, K., *et al.* The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. **Expert. Rev.. Vac.**, v.11, n.7, p.841–855, jul. 2012.
- SLEEMAN, K. L.; DANIEL, S. L., *et al.* Acquisition of *Streptococcus pneumoniae* and nonspecific morbidity in infants and their families: a cohort study. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 24, p. 121-127, 2005.
- SOGSTOD, M. K. ; AABERGE, I. S., *et al.* Molecular Characterization of non-penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Norway. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, n. 9, p.3225-3230, aug. 2006.
- TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D., *et al.* Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.9, p. 2233-2239, 1995.
- TUOMANEN, E. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.2, n.1, p.35-39, 1999.

VAN DER POLL, T.; OPAL, S. M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. **Lancet**, v. 374, n. 9700, p. 1543-1546, 2009.

VAN GILS E. J.; VEENHOVEN, R. H., *et al.* Pneumococcal conjugate vaccination and nasopharyngeal acquisition of pneumococcal serotype 19A strains. **JAMA**, v.304, n.10, p. 1099-1106, sep. 2010.

VESTRHEIM, D. F.; STEINBAKK, M.; AABERGE, I. S.; CAUGANT, D. A., *et al.* Postvaccination Increase in Serotype 19A Pneumococcal Disease in Norway Is Driven by Expansion of Penicillin-Susceptible Strains of the ST199 Complex. **Clin. Vaccine. Immunol.**, v. 19, n. 3, p. 443–445, 2012.

VLASICH. C. Pneumococcal Infection and vaccination in the elderly. **Vaccine**, v.19 n.17-19, p. 2223-2227, 2001.

UENO M.; ISHII, Y., *et al.* Prevalence and risk factors of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children in Japan. **J. Infect. Dis.**, v.66, n.1, p. 22-25, 2013.

WASFY, M. O.; PIMENTEL, G., *et al.* Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis in Egypt, 1998-2003. **J. Antimicrob. Chemother**, v.55, n.6, p.958-964, 2005.

WEINBERGER, D. M.; HABOE, Z. B. *et al.* Serotype-specific effect of influenza on adult invasive pneumococcal pneumoniae. **J. Infect. Dis.**, v. 208, n. 8, p. 1274-1280, oct. 2013.

WHITNEY, C. G.; FARLEY, M. M., *et al.* Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. **N. Engl. J. Med.**, v.348, n.18, p.1737-1746, 2003.

WHITNEY, C. G.; PILISHVILI, T., *et al.* Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case-control study. **Lancet**, v.368, n.9546, p.1495-1502, 2006.

WINTER, A. J.; COMIS, S. D., *et al.* A role for pneumolysin but not neuraminidase in the hearing loss and cochlear damage induced by experimental pneumococcal meningitis in guinea pigs. **Infect. Immun.**, v.65, n.11, p.4411-4418, 1997.

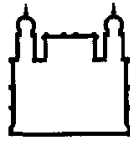
WOODS, C. R. Acute bacterial pneumonia in childhood in the current era. **Pediatr .Ann.**, v.37, p.694-702., 2008.

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

YOTHER, J.; LEOPOLD, K., *et al.* Generation and properties of a *Streptococcus pneumoniae* mutant which does not require choline or analogs for growth. **J. Bacteriol.**, v.180, n.8, p.2093-2101, 1998.

# Anexo I

Parecer do Comitê de Ética



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz**

Comitê de Ética em Pesquisas – CPqGM/FIOCRUZ

## PARECER Nº 108/2006

**Protocolo: 164**

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

**Pesquisador Responsável: Dr<sup>a</sup> Joice Neves Reis Pedreira**

**Instituição ou Departamento: LPBM / FIOCRUZ**

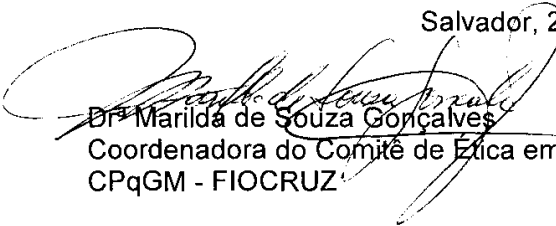
### **Considerações:**

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

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado em 25/02/2005 que está licenciado e tem validade até 25/02/2010.

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

Salvador, 25 de fevereiro de 2005.

  
Dr<sup>a</sup> Marilda de Souza Gonçalves  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
CPqGM - FIOCRUZ



## Anexo II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz-MS - Página 1 de 2

**Título do Projeto:** Transmissão de *Streptococcus pneumoniae* resistente aos antimicrobianos no Brasil

**Sub-projeto:** Estudo de Colonização Nasofaríngea por *Streptococcus pneumoniae* em Pau da Lima

**Pesquisador Responsável:** Dra. Joice Neves Reis Pedreira **Telefone:** (071) 3176-2302

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Nome do Participante:** \_\_\_\_\_

**No. da casa do participante:** \_\_\_\_\_ **No. de identificação do participante:** \_\_\_\_\_

Para ser lido a todos os participantes e responsáveis legais pelos participantes menores de idade: As informações, a seguir, descreverão o estudo de pesquisas e o seu papel /de seu filho como participante. O entrevistador responderá quaisquer perguntas que você/seu filho possa ter sobre este questionário ou sobre o estudo. Pôr favor, ouça com atenção e sinta-se à vontade para perguntar qualquer coisa sobre as informações fornecidas.

Propósito da Pesquisa: Nós estamos convidando você e/ou sua criança para participar de um estudo, que está sendo financiado e/ou realizado na Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde, sobre *Streptococcus pneumoniae*, uma bactéria que pode ser encontrada na nasofaringe de pessoas saudáveis, mas que eventualmente pode desenvolver algum tipo de infecção. O objetivo deste estudo é determinar se esta bactéria está colonizando a nasofaringe das crianças, e se ela é resistente a antibióticos.

A informação que você pode fornecer irá ajudar na identificação de fontes ambientais de transmissão, que podem ser abordadas com medidas de controle de saúde pública. Além disso, essa informação poderá no futuro ajudar na prevenção e tratamento das infecções causadas por esta bactéria. Talvez, você não seja beneficiado diretamente pela sua participação nesse estudo.

Procedimentos a serem seguidos: Se você/seu filho decidir, voluntariamente, participar desta pesquisa, após ter ouvido os termos do consentimento, o entrevistador fará perguntas a respeito do local onde você mora, sua profissão (trabalho), história médica, frequência de escolas, creches e contatos domiciliares seu e de seus filhos. Após esta entrevista o investigador irá colher o material através do nariz utilizando um swab (espécie de cotonete grande). Este material será utilizado para determinar a presença de *Streptococcus pneumoniae* e a sensibilidade dele aos antibióticos. Não há nenhum risco na participação neste estudo, o único inconveniente é que as crianças podem chorar. Durante o próximo ano, planejamos visitar você/seu filho quatro vezes, de três em três meses, no total de 4 visitas, a fim de fazer a mesma entrevista e coletar o mesmo material do nariz.

Confidencialidade: Suas respostas durante a entrevista e os resultados dos exames serão confidenciais. Apenas você/seu filho, os investigadores do grupo de estudo, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde terão acesso a estas informações. Você/seu filho não será identificado em nenhum relatório ou publicação resultante do estudo.

Participação Voluntária: Sua participação ou a de seu filho neste estudo é voluntária. Você/seu filho pode recusar-se a participar ou pode descontinuar a participação a qualquer momento durante a visita inicial ou qualquer das visitas seguintes do estudo, se você/seu filho assim decidir. Também, a equipe de estudo pode optar terminar sua participação durante ou no fim do estudo e você/seu filho será avisado no caso dessa ocorrência. Durante a entrevista, o entrevistador pode perguntar questões que você/seu filho acha que não são propícias e não quiser responder. Se quiser, você tem o direito de recusar a respondê-las. Se você/seu filho recusar-se participar de todo ou de parte deste estudo os cuidados médicos presentes ou futuros não serão afetados ou prejudicará sua relações presentes ou futuras com a Fundação Oswaldo Cruz ou outras instituições de saúde na cidade de Salvador. Você/seu filho não será responsável por nenhuma despesa, incluindo as análises laboratoriais de suas amostras, associada com este estudo. Você/seu filho não receberá compensação financeira para sua participação no estudo. Você/seu filho receberá uma cópia deste termo de consentimento.

Grupo de Contato: Se você/seu filho tiver quaisquer questões futuras sobre sua participação ou a de seu filho, neste estudo, ou sobre seus direitos ou os de seu filho como participante desta pesquisa, por favor, entre em contato com Dra. Marilda Gonçalves, Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 356-4320.

## Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz-MS - Página 2 de 2

Consentimento: Eu ouvi e entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram devidamente respondidas. Sendo assim, eu voluntariamente, concordo em participar do estudo:

Assinatura do participante do estudo

Data



Impressão Digital do Participante do Estudo

Eu ouvi e entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Eu, voluntariamente, concordo que o paciente do qual sou responsável legal, participe deste estudo:



Impressão Digital dos Pais ou Responsável

Assinatura dos Pais ou Responsável Legal

Data

Assinatura da Testemunha

Data

Assinatura do Investigador

Data

# Anexo III

## Questionários

## Questionário M01IND01

### Projeto: Colonização

**Colonização de pneumococos em Pau da Lima, Salvador – Brasil**  
**Questionário de Dados Pessoais**

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

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

Data da Entrevista:	DEIND
Iniciais do Entrevistador:	EIND

#### I. IDENTIFICAÇÃO:

1.1	Nº do domicílio:	ND
1.2	Nº do estudo:	NE
1.3	Data de identificação	DI
1.4	Termo de consentimento: Sim: <input type="checkbox"/> 1 Não: <input type="checkbox"/> 0	CONS
2.1	Nome:	NOME
2.2	Apelido:	APE
2.6	Data de Nascimento:	NASC

#### II. ENDEREÇO:

3.1	Rua / Nº:	END
3.2	Telefone (nº e nome de contato):	TEL
3.3	Ponto de Referencia:	REF
3.4	Bairro:	BAI
3.5	Cidade:	CID

## Questionário M01EPI01

### Projeto: colonização

Nº do Estudo : \_\_\_\_\_

#### Colonização de pneumococos em Pau da Lima, Salvador – Brasil

#### Questionário Epidemiológico – preenchido para todos os pctes

Etiqueta	Codificado		1ª Digitação		2ª Digitação	
	CDEPI	DCDEPI	DGEPI	DDGEPI	DG2EPI	DDG2EPI

Data do Preenchimento:	DEEPI
Iniciais do Entrevistador:	EEPI

#### I. IDENTIFICAÇÃO:

1.1	Data de Identificação:	DI
1.2	Nº do domicílio:	ND
1.3	Nº de coleta:	NC
1.4	Idade em anos (se <1ano, coloque 0): Se <2 anos, idade do paciente em meses: Se <1 mês, idade do paciente em dias:	ANO MÊS DIA
1.5	Sexo: Masculino <input type="checkbox"/> 1      Feminino <input type="checkbox"/> 0      Não sabe <input type="checkbox"/> 9	SX
1.6	Grupo Racial: Branco <input type="checkbox"/> 1      Mulato <input type="checkbox"/> 0      Negro <input type="checkbox"/> 3	RACE
1.7	Procedência: Salvador <input type="checkbox"/> 1      Interior <input type="checkbox"/> 0      Não sabe <input type="checkbox"/> 9	SAL

#### II. DADOS DOMICLIARES:

2.1	Quantas pessoas moram nesta casa?	QPMNC
2.2	Quantas pessoas menores que 10 anos?	QP10
2.3	Quantas pessoas menores que 5 anos?	QP5
2.4	Quantas pessoas menores que 2 anos?	QP2
2.5	Quantos cômodos tem na casa? Obs. Não contar cozinha e banheiro.	QCOM
2.6	Quantas camas tem na casa?	QCAMAS
2.7	Renda mensal da família (salário mínimo)? 0 - 1 <input type="checkbox"/> 1 - 2 <input type="checkbox"/> 2 - 3 <input type="checkbox"/> > 3 <input type="checkbox"/>	RENDA

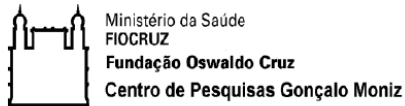
## Questionário M01EPI01

### Projeto: colonização

Nº do Estudo : \_\_\_\_\_

### III. COMORBIDADE E FATORES DE RISCO:

3.1	<p>A criança apresenta alguma das doenças citadas abaixo:          (Sim = 1, Não = 2, Não sabe = 9)</p> <p>AIDS <input type="checkbox"/></p> <p>Anemia falciforme <input type="checkbox"/></p> <p>Anemia hemolítica <input type="checkbox"/></p> <p>Doença renal <input type="checkbox"/></p> <p>Doença cardíaca <input type="checkbox"/></p> <p>Doença respiratória <input type="checkbox"/></p> <p>Diabete <input type="checkbox"/></p> <p>Quantos anos a criança tinha quando a doença foi detectada?</p>	<p>DOENCA</p> <p>AIDS          AF          AH          DR          DC          DRESP          DIABETE</p> <p>DANOS</p>
3.2	<p>A criança tem ou já teve alguma das doenças citadas abaixo:          (Sim = 1, Não = 2, Não sabe = 9)</p> <p>Bronquite <input type="checkbox"/></p> <p>Meningite <input type="checkbox"/></p> <p>Otite <input type="checkbox"/></p> <p>Pneumonia <input type="checkbox"/></p> <p>Sinusite <input type="checkbox"/></p> <p>Quantos anos a criança tinha quando a doença foi detectada?          A criança foi atendida em que serviço médico?          A criança ficou internada?</p>	<p>INFECCAO</p> <p>BRONQ          MENING          OTITE          PNEU          SINU</p> <p>IANOS          ISM          IUNID</p>
3.3	<p>Fatores de risco para a colonização nasofaríngeana.          (Sim = 1, Não = 2, Não sabe = 9)</p> <p>A criança esteve gripada nos últimos meses? <input type="checkbox"/></p> <p>Tem fumante no domicílio? <input type="checkbox"/></p> <p>A criança freqüenta creche? <input type="checkbox"/></p> <p>A criança freqüenta escola? <input type="checkbox"/></p> <p>A criança convive com algum idoso (&gt; 65 anos)? <input type="checkbox"/></p> <p>A criança viajou, por mais de 2 noites, nas últimas semanas? <input type="checkbox"/></p> <p>A criança ficou hospitalizada nos últimos 30 dias? <input type="checkbox"/></p> <p>Por que foi hospitalizada?          Onde foi hospitalizada?          A criança fez uso de antibiótico nos últimos meses? <input type="checkbox"/></p> <p>Quantos dias a criança usou o antibiótico?          Qual foi o antibiótico?</p> <p>Penicilinas <input type="checkbox"/></p> <p>SULFA <input type="checkbox"/></p> <p>Cefalosporinas <input type="checkbox"/></p> <p>Quinolonas <input type="checkbox"/></p>	<p>GRIPE          FUMO          CRECHE          ESCOLA          IDOSO          VIAJAR</p> <p>HOSP          PHOSP          OHOSP          ANT</p> <p>QTDANT          QANT</p>



## Questionário M01EPI01

### Projeto: colonização

Nº do Estudo : \_\_\_\_\_

	Macrolídeos	
	Qual?	Qual

#### IV. IMUNIZAÇÃO

4.1	<p>Vacinas: (Sim = 1, Não = 2, Não sabe = 9)</p> <p>A criança tomou a vacina anti-hib? <input type="checkbox"/></p> <p>Se sim, quantas doses?</p> <p>Data da última dose:</p> <p>A criança tomou a vacina Meningocócica? <input type="checkbox"/></p> <p>Se sim, quantas doses?</p> <p>Data da última dose:</p> <p>A criança tomou a vacina PNC7? <input type="checkbox"/></p> <p>Se sim, quantas doses?</p> <p>Data da última dose:</p> <p>A criança tomou a vacina PN23? <input type="checkbox"/></p> <p>Se sim, quantas doses?</p> <p>Data da última dose:</p>	
		<p>HIB</p> <p>DOSEH</p> <p>DATAH</p> <p>MENINGO</p> <p>DOSED</p> <p>DATAD</p> <p>PNC7</p> <p>DOSEP7</p> <p>DATAP7</p> <p>PN23</p> <p>DOSEP23</p> <p>DATAP23</p>





## Questionário M02LAB01

Projeto: colonização

Nº do Estudo : \_\_\_\_\_

### Colonização de pneumococos em Pau da Lima, Salvador – Brasil

#### Questionário laboratorial

Etiqueta	Codificado	1ª Digitação	2ª Digitação
	CDPL    DCDPL	D1PL    DD1PL	D2PL    DD2PL

Data do Preenchimento:	DPL
Iniciais do Executor:	IPL

#### I. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

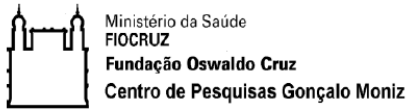
1.1	Nº. do estudo:	
1.2	Nº. do domicílio:	
1.3	Nº da coleta:	
1.4	Data de identificação:	

#### II. DADOS DE MICROBIOLOGIA:

2.2	Isolamento do <i>S. pneumoniae</i> Sim: <input type="checkbox"/> 1    Não: <input type="checkbox"/> 0	ISP
2.3	Data do isolamento:	DI
2.4	Quantos tipos de colônia isolada?	QCOL

#### III. CONFIRMAÇÃO:

3.1a)	Data teste de optoquina foi feito:	DOSEN
b)	Sensível a optoquina: Sim: <input type="checkbox"/> 1    Não: <input type="checkbox"/> 0	OSEN
3.2a)	Data da bile solubilidade:	DBSEN
3.2a)	Sensível: Sim: <input type="checkbox"/> 1    Não: <input type="checkbox"/> 0	BSEN
3.3	Confirmação de <i>S. pneumoniae</i> : Sim: <input type="checkbox"/> 1    Não: <input type="checkbox"/> 0	SPCONF



## Questionário M02LAB01

Projeto: colonização

Nº do Estudo : \_\_\_\_\_

3.4	Contaminação:  Sim: <input type="checkbox"/> 1 Não: <input type="checkbox"/> 0	CONT
-----	--	------

### IV. TESTE KIRBY-BAUER (Resultados em diâmetro de zona mm)

4.1	Data em que foi realizado o teste de sensibilidade KB:	DKB
a)	Oxalicina: Resultado: Resistente <input type="checkbox"/> R Intermediário <input type="checkbox"/> I Sensível <input type="checkbox"/> S	OXA
b)	Ceftizoxima: Resultado: Resistente <input type="checkbox"/> R Intermediário <input type="checkbox"/> I Sensível <input type="checkbox"/> S	OXAS
c)	Cloranfenicol Resultado: Resistente <input type="checkbox"/> R Intermediário <input type="checkbox"/> I Sensível <input type="checkbox"/> S	CZX
d)	Tetraciclina: Resultado: Resistente <input type="checkbox"/> R Intermediário <input type="checkbox"/> I Sensível <input type="checkbox"/> S	CZXS
e)	Eritromicina: Resultado: Resistente <input type="checkbox"/> R Intermediário <input type="checkbox"/> I Sensível <input type="checkbox"/> S	CLO
f)	Clindamicina: Resultado: Resistente <input type="checkbox"/> R Intermediário <input type="checkbox"/> I Sensível <input type="checkbox"/> S	CLOS
g)	Vancomicina: Resultado: Resistente <input type="checkbox"/> R Intermediário <input type="checkbox"/> I Sensível <input type="checkbox"/> S	TET
h)	Rifampicina: Resultado: Resistente <input type="checkbox"/> R Intermediário <input type="checkbox"/> I Sensível <input type="checkbox"/> S	TETS
i)	TMP/SMX: Resultado: Resistente <input type="checkbox"/> R Intermediário <input type="checkbox"/> I Sensível <input type="checkbox"/> S	ERI
4.3	Diâmetro da zona de oxacilina $\leq 20$ mm:  Sim: <input type="checkbox"/> 1 Não: <input type="checkbox"/> 0	ERIS
4.4	Resultados relatados para a equipe médica de prontidão  Se sim data do relato:  Sim: <input type="checkbox"/> 1 Não: <input type="checkbox"/> 0	CLI
		CLIS
		VAN
		VANS
		RIF
		RIFS
		BAC
		BACS
		ENTRES
		DENTRES

28/12/2006

2/3

QUESTIONÁRIO LABORATÓRIO

## Questionário M02LAB01

Projeto: colonização  
 Nº do Estudo : \_\_\_\_\_

### V. ENSAIO DO E-TESTE

5.1	Data em que foi realizado o E-teste:	DETEST
a)	Penicilina G Resultado: Resistente <input type="checkbox"/> R Intermediário <input type="checkbox"/> I Sensível <input type="checkbox"/> S	EPEN EPENS
b)	Cefotaxima Resultado: Resistente <input type="checkbox"/> R Intermediário <input type="checkbox"/> I Sensível <input type="checkbox"/> S	ECEF ECEFS
5.4	Resultados relatados a equipe médica de prontidão: Sim: <input type="checkbox"/> 1 Não: <input type="checkbox"/> 0 Se sim, data do relato:	ENTRES2 DENTRES2

### VI. SOROTIPAGEM:

6.1	Data da sorotipagem	DSOR
6.2	Sorotipo isolado	SORT

### VII. CONGELAMENTOS:

7.1	a. Data do congelamento #1:	DCONG1
	b. Qual freezer:	NFZ1
	c. Número da Caixa:	NCX1
	d. Local na caixa:	POSCX1
7.2	a. Data do congelamento #2:	DCONG2
	b. Qual freezer:	NFZ2
	c. Número da Caixa:	NCX2
	d. Local na caixa:	POSCX2