



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA, GENOTIPAGEM CAPSULAR E DETEÇÃO
DE GENES DE RESISTÊNCIA DE *Streptococcus pneumoniae* ISOLADOS DE
CRIANÇAS NÃO VACINADAS USUÁRIAS DE CRECHES EM FORTALEZA.**

BRUNO JAEGGER LARANJEIRA

FORTALEZA/CE

2014

BRUNO JAEGGER LARANJEIRA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA, GENOTIPAGEM CAPSULAR E DETECÇÃO
DE GENES DE RESISTÊNCIA DE *Streptococcus pneumoniae* ISOLADOS DE
CRIANÇAS NÃO VACINADAS USUÁRIAS DE CRECHES EM FORTALEZA.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia Médica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cibele Barreto Mano de Carvalho

FORTALEZA/CE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

L325r

Laranjeira, Bruno Jaegger.

Resistência antimicrobiana, genotipagem capsular e detecção de genes de resistência de *streptococcus pneumoniae* isolados de crianças não vacinadas usuárias de creches em Fortaleza / Bruno Jaegger Laranjeira. – 2014.

93 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Doutorado em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Ciências Biológicas III.

Orientação: Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho.

1. Streptococcus pneumoniae. 2. Portador Sadio. 3. Resistência Microbiana a Medicamentos. 4. Genótipo. I. Título.

CDD 616.9041


BRUNO JAEGGER LARANJEIRA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA, GENOTIPAGEM CAPSULAR E DETECÇÃO
DE GENES DE RESISTÊNCIA DE *Streptococcus pneumoniae* ISOLADOS DE
CRIANÇAS USUÁRIAS DE CRECHES EM FORTALEZA.**

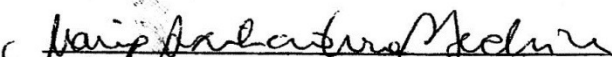
Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia Médica.

Data da Defesa: 14/03/2014

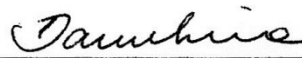
BANCA EXAMINADORA



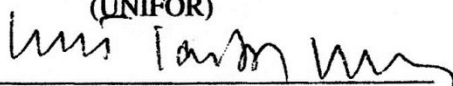
Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho
(Orientadora)



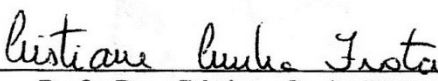
Profa. Dra. Maria Auxiliadora Bezerra Fechine
(UNILAB)



Profa. Dra. Danielle Malta Lima
(UNIFOR)



Prof. Dr. Luis Carlos Rey
(UFC)



Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota
(UFC)

*A Deus, pelo dom da vida e
por me confortar nos momentos mais
difíceis, dando-me forças para superar
todas as barreiras!*

*Aos meus pais, Abilio Pinto Laranjeira e
Rejane Jaegger Laranjeira, por todo incentivo,
compreensão e carinho durante esta trajetória,
apoiando-me de todas as maneiras possíveis;
agüentando minha ansiedade em todas as
grandes etapas que o doutorado possui.*

*Ao meu irmão, Brenno Jaegger Laranjeira,
que foi importantíssimo na minha trajetória
para que eu chegasse até aqui e por me dar a oportunidade
de ser tio mais uma vez, do Brenninho, uma criança
linda e apaixonante*

*Ao meu irmão Thiago pelo companheirismo e por
me dar a alegria de ser padrinho do Guilherme,
uma criança, que depois de tantos anos,
trouxe mais felicidade para nossa casa.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dr^a. Cibele Barreto Mano de Carvalho, minha orientadora, pela oportunidade, pela confiança depositada e por sua dedicação e colaboração dispensada ao longo desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Rey, pela oportunidade de estar em companhia de um grande profissional, por todo o apoio e incentivo para o desenvolvimento desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Raimunda Sâmia Brilhante, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, pela sua dedicação para o funcionamento desse Programa.

À Prof^a. Dr^a. Cristiane Cunha Frota, que abriu as portas do seu laboratório, sem nenhuma restrição, permitindo que o presente trabalho fosse realizado da melhor maneira possível.

À Prof^a. Dr^a. Fernanda Edna de Araújo, pela sua colaboração direta para que eu conseguisse chegar a esse título e pela excelente parceria firmada nos últimos anos.

Aos membros da banca: Prof. Dr. Luís Carlos Rey, Prof^a. Dr^a. Cristiane Cunha Frota, Prof^a. Dr^a. Daniele Malta Lima e Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Bezerra Fachine, por terem aceitado gentilmente a participar da avaliação desse trabalho.

A todos os professores do programa, com os quais tive a oportunidade e o prazer de aprender.

A todos os que fazem, ou fizeram parte, do Laboratório de Anaeróbios, por passarem novos conhecimentos que contribuíram para realização da tese.

À Adriana Pinheiro Rodrigues, por toda a sua dedicação e paciência, durante o período que estivemos juntos ao longo desses anos

Aos meus amigos que eu fiz ao longo desse caminho, em especial aos amigos Nayara Santos Oliveira, Rafael Carvalho, Milena Abraão Sena, Ana Paula Rodrigues, pelas palavras de estímulo ao longo desses anos.

Aos meus amigos de infância, Antônio Homero, Jean Fábio e Gigliano, e todos os meus primos, por compreenderem meu afastamento temporário, pelo apoio e torcida.

Ao José Olavo Moraes, técnico do Setor de Microbiologia, irmão que a vida colocou em meu caminho, pelo auxílio concedido para a realização desse trabalho, por sua grande amizade e pelo café, que sempre nos acordava para encarar os experimentos.

À Carol, secretária do curso, por estar sempre disposta a ajudar, por sua dedicação e eficiência na resolução de etapas burocráticas.

A todas as crianças e seus responsáveis que participaram desse trabalho e permitiram a coleta das amostras.

À Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP) pela bolsa concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

“Ser um empreendedor é executar os sonhos, mesmo que haja riscos.
É enfrentar os problemas, mesmo não tendo forças.
É caminhar por lugares desconhecidos, mesmo sem bússola.
É tomar atitudes que ninguém tomou.
É ter consciência de que quem vence sem obstáculos triunfa sem glória.
É não esperar uma herança, mas construir uma história...
Quantos projetos você deixou para trás?
Quantas vezes seus temores bloquearam seus sonhos?
Ser um empreendedor não é esperar a felicidade acontecer, mas conquistá-la.”

Augusto Cury

RESUMO

O *Streptococcus (S.) pneumoniae* é considerado como o principal agente causador de morbidade e mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade. As doenças pneumocócicas começam com o estabelecimento da colonização do *S. pneumoniae* na nasofaringe. O principal fator de risco para colonização é o confinamento, como em crianças que frequentam creches. Nas últimas décadas, o aumento do número de cepas de *S. pneumoniae* resistentes à antibióticos β -lactâmicos e a outras classes de antimicrobianos tem dificultado o tratamento da infecção pneumocócica. Atualmente cerca de 13 sorotipos de *S. pneumoniae* respondem por mais de 85% dos isolados invasivos. A vacina pneumocócica polissacarídica conjugada 10-valente (VPC-10) foi recentemente incluída no calendário de vacinação nacional. Os objetivos desse estudo foram determinar a prevalência, a resistência antimicrobiana, os genótipos de *S. pneumoniae* que colonizam a nasofaringe de crianças usuárias de creches em Fortaleza, Brasil, bem como para avaliar a cobertura potencial da VPC-10. Entre janeiro e dezembro de 2011, os isolados de crianças portadores foram recuperados a partir de *swabs* de nasofaringe. Foram determinadas as sensibilidades para penicilina, ceftriaxona, sulfametoxazol/trimetoprim, amoxicilina, clindamicina e eritromicina, das cepas isoladas utilizando-se o método de e-test.. A detecção dos genes de resistência à penicilina foi realizada por PCR. A genotipagem capsular dos isolados de portadores foi realizada pela técnica de multiplex PCR. Foram isolados *S. pneumoniae* em 165 (56,7%) das 291 crianças saudáveis usuárias de creches. Dos 162 isolados de portadores, submetidos à determinação da concentração inibitória mínima, foi encontrada uma taxa resistência de 27,8% para penicilina, 75,3% para sulfametoxazol/trimetoprim, 13,6% para eritromicina e 10,5% para clindamicina. Não foi detectada resistência à ceftriaxona e à amoxicilina. A porcentagem de isolados de *S. pneumoniae* com mutação em pelo menos um dos genes que determinam resistência à penicilina foi de 68,2%. Os genótipos capsulares de 115 isolados foram identificados em 129 viáveis. Os genótipos mais comuns foram 6A/6B, 14, 15B/15C, 19F e 23F, com os sorotipos 6A/6B, 14, 19F e 23F mais associados com a resistência. A cobertura estimada para VPC-10 foi de 74.4%. O presente estudo verificou que a taxa de portadores de *S. pneumoniae* é alta, assim como a resistência aos antimicrobianos penicilina e sulfametoxazol/trimetoprima, e que a cobertura potencial da VPC-10 é elevada frente aos genótipos de *S. pneumoniae* identificados, isolados de crianças usuárias de creches em Fortaleza.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*, portador sadio, resistência microbiana a medicamentos, genótipo.

ABSTRACT

Streptococcus (S.) pneumoniae is considered the principal causative agent of morbidity and mortality in children younger than five years of age. All pneumococcal diseases are initiated by establishing a *S. pneumoniae* colonization in nasopharynx. The main risk factor for colonization is crowding, as in children attending day care. During the last decades, the increasing amount of resistant *S. pneumoniae* strains to β -lactams and other classes of antimicrobials has modified the treatment of pneumococcal infection. At present, nearly 13 serotypes respond for more than 85% of invasive isolates. The 10-valent pneumococcal polysaccharide-conjugated vaccine (PCV-10) has recently been included in the national vaccination schedule. The aims of this study were to determine the prevalence, antimicrobial resistance and genotypes of *S. pneumoniae* isolated of carriage children attending day care centers in Fortaleza, Brazil, as well as to assess the potential coverage of the PCV-10. Between January and December of 2011, isolates from carrier children were recovered by nasopharyngeal swabs. Susceptibility to penicillin, amoxicillin, erythromycin, sulfamethoxazole-trimethoprim, clindamycin, were determined by e-test method. Detection of penicillin resistance genes was performed by PCR assay. Capsular genotyping of carriage isolates was performed by multiplex PCR assay. *S. pneumoniae* were isolated in 165 (87.3 %) of 291 samples of children attending day care centers. Of the 162 isolates from carriage was found a resistance rate of 27.8% for penicillin, 75.3% to trimethoprim / sulfamethoxazole, 13.6% to erythromycin and 10.5% to clindamycin. No resistance was detected to ceftriaxone and amoxicillin. The percentage of *S. pneumoniae* isolates at least one mutation in the penicillin resistance genes was 68.2%. Capsular Genotypes was indentified in 115 isolates, of 129 tested. Genotypes most common were 6A/6B, 14, 15B/15C, 19F and 23F, with serotypes 6A/6B, 14, 19F and 23F more associated with resistance. The estimated coverage for VPC-10 was 74.4%. This study showed that the rate of *S. pneumoniae* carriers is high, as well as resistance to antibiotics penicillin and sulfamethoxazole / trimethoprim, and the potential cover of VPC-10 is raised against *S. pneumoniae* genotypes identified isolated from children attending day care centers in Fortaleza.

Key-words: *Streptococcus pneumoniae*, carrier state, microbial drug resistance, genotype.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Resistência à penicilina dos pneumococos isolados de doença inva no Brasil, por ano.....	23
FIGURA 2 – Organização genética da região do <i>S. pneumoniae</i> que contém o cluster dos genes capsulares dos genótipos 4, 8,14,19F e 19A.....	27
FIGURA 3 – Sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> associados à resistência à penicilina (CLSI, 2007), período de 2000-2006, em crianças < 6 anos.....	28
FIGURA 4 – Impacto estimado da cobertura das vacinas conjugadas (%) 7, 10 e 13-valente frente aos sorotipos encontrados com mais frequência no Brasil, 2000-2006,< 6 anos.....	30
FIGURA 5 – Mapa da cidade de Fortaleza, dividida em seis regionais, com destaque para a regional V e seus bairros.....	34
FIGURA 6 – A. Coleta de material da nasofaringe B. Inoculação do <i>swab</i> em meio para transporte Stuart.....	35
FIGURA 7 – Crescimento em ágar sangue de colônias planas com alfa hemólise ao seu redor, características de <i>S. pneumoniae</i>	36
FIGURA 8 – A. <i>S. pneumoniae</i> corado pela técnica Gram: na seta é possível visualizar cocos dispostos aos pares em pequenas cadeias; B. Teste de sensibilidade à optoquina. C. teste da bile solubilidade.....	37
FIGURA 9 - Teste de Sensibilidade a antimicrobianos pelo método de <i>E-test</i> para penicilina, ceftriaxona, sulfametoxazol/trimetoprim, amoxicilina, clindamicina e eritromicina.....	39
FIGURA 10 – Percentuais de sensibilidade e resistência de 162 cepas <i>S. pneumoniae</i> frente aos antibióticos testados.....	44
FIGURA 11 – Eletroforese da 1ª reação de multiplex-PCR em gel de agarose a 2% com brometo de etídio.....	45
FIGURA 12 – Distribuição dos 129 isolados de <i>S. pneumoniae</i> de acordo com os genótipos encontrados.....	46
FIGURA 13 – Eletroforese em gel de agarose a 2% brometo de etídio para visualização do produto da <i>plp 1a</i> das cepas de <i>S. penumoniae</i> isoladas de crianças portadoras usuárias de creches.....	48

FIGURA 14 - Eletroforese em gel de agarose a 2% brometo de etídio para visualização do produto da <i>plp 2b</i> das cepas de <i>S. pneumoniae</i> isoladas de crianças portadoras usuárias de creches.....	48
FIGURA 15 – Eletroforese em gel de agarose a 2% brometo de etídio para visualização do produto da <i>plp 2x</i> das cepas de <i>S. pneumoniae</i> isoladas de crianças portadoras usuárias de creches.....	49
FIGURA 16 – Distribuição das alterações dos genes das <i>plps</i> de acordo com a CIM de penicilina.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Prevalência dos portadores do <i>S. pneumoniae</i> distribuída por sexo e idade.....	43
TABELA 2 - Número e porcentagem de isolados de pneumococos resistentes a diferentes agentes antimicrobianos, distribuídos de acordo com os genótipos..	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BHI - Brain Heart Infusion
CIM - concentração inibitória mínima
CLSI - *Clinical Laboratory Standard Institute*
DNA – ácido desoxirribonucleico
DIFR - diidrofolato redutase
DIPS - diidropteroato sintase
DPI - doença pneumocócica invasiva
E-test - epsilometer-test
EUA - Estados Unidos da América
hab.- habitantes
IgA1 - imunoglobulina da classe A1
IL - interleucina
LCR - líquido cefalorraquidiano
LytA- autolisina
MHC - complexo de histocompatibilidade
OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde
PAF - fator de agregação plaquetária
PCR - Polymerase Chain Reaction
PLPs – proteínas ligadoras de penicilina
PspA - adesina pneumocócica de superfície A
S. pneumoniae - Streptococcus pneumoniae
SIREVA - Sistema Regional de Vacinas
TNF - fator de necrose tumoral
UFC – Universidade Federal do Ceará
VPC – vacina pneumocócica conjugada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Histórico, Classificação e Características Morfológicas e Fisiológicas.....	16
1.2. Patogênese e Fatores de Virulência.....	17
1.3. Epidemiologia.....	20
1.4. Resistência a Antimicrobianos.....	21
1.4.1. Resistência aos β -lactâmicos.....	22
1.4.2. Resistência aos Macrolídeos.....	24
1.4.3. Resistência ao Sulfometoxazol-Trimetoprim.....	25
1.5. Sorotipos.....	26
1.6. Vacinas Pneumocócicas.....	28
2. PERGUNTAS DE PARTIDA.....	31
3. HIPÓTESES.....	31
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo Geral	32
4.2. Objetivos Específicos	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1. Amostras de Portadores Sadios.....	33
5.2. Aspectos Éticos.....	34
5.3. Coleta do Material de Nasofaringe.....	35
5.4. Isolamento Bacteriano.....	36
5.5. Identificação de <i>S. pneumoniae</i>	37
5.6. Estocagem das Amostras	38
5.7. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos.....	38
5.8. Extração de DNA.....	40
5.9. Iniciadores.....	40
5.10. Esquema da PCR Multiplex.....	40
5.11. Detecção dos Genes de Resistência.....	41
5.11.1. Mutações nas Proteínas Ligadoras de Penicilina - PLPs.....	41
5.12. Análise Estatística.....	42
6. RESULTADOS.....	43
6.1. Prevalência de Portadores.....	43
6.2. Sensibilidade aos Antimicrobianos.....	43

6.3. Genótipos.....	44
6.4. Detecção de Genes de Resistência.....	47
6.5. Cobertura Potencial da Vacina.....	50
7. DISCUSSÃO.....	51
8. CONCLUSÃO.....	60
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
10. APÊNDICES.....	75
11. ANEXOS.....	78

1. INTRODUÇÃO

A microbiota normal da nasofaringe dos seres humanos constitui um reservatório de potenciais patógenos do trato respiratório (FADEN et al, 1990; BOGAERT et al, 2004; MONTEROS et al, 2007) e o *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), uma bactéria da família *Streptococcaceae*, é o principal deles encontrado na nasofaringe de indivíduos saudáveis (VIEIRA et al, 2007; SIMELL et al, 2012). Embora a colonização neste local seja assintomática, se esta bactéria ganha acesso a partes das vias aéreas normalmente estéreis segue-se uma rápida resposta inflamatória que pode resultar em doença. (KADIOGLU et al, 2008; SIMELL et al, 2012).

O *S. pneumoniae* pode causar uma variedade de doenças, incluindo doenças invasivas, como meningite, bacteremia e pneumonia, bem como doenças não invasivas como, otite média e sinusite (SIMELL et al, 2012). Os fatores que permitem que o pneumococo migre da nasofaringe e cause doença invasiva variam, e dependem da virulência do microrganismo, do estado imune do hospedeiro e da existência de uma infecção viral precedente. Crianças menores de dois anos, idosos, pacientes imunocomprometidos, pacientes asplênicos, alcoolismo e pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica apresentam um maior risco de contrair doença pneumocócica. (RIVERA-OLIVERO et al, 2007, HUNG et al, 2013). Segundo Monteros e colaboradores (2007), 65% das infecções pneumocócicas ocorrem em crianças menores de dois anos e que este número aumenta para 85% em crianças menores de quatro anos de idade.

O *S. pneumoniae* é considerado como o principal agente causador de morbidade e mortalidade, com cerca de 1,2 milhões de mortes por ano. Em torno de 700 mil a um milhão destas mortes, ocorrem em crianças menores de cinco anos e mais de 90% em países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007; ANDRADE et al. 2012).

Um levantamento realizado em 2010, pelo Sistema Regional de Vacinas (SIREVA), em várias localidades brasileiras, incluindo o Ceará, sobre a ocorrência de doença pneumocócica invasiva (DPI) revelou que a maioria dos casos de DPI corresponderam a meningite (65,1%), seguida por pneumonia (20,5%) e bacteremia (11,7%) (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION: INFORME REGIONAL DE SIREVA II, 2010).

Até a década de 1960 os antibióticos β -lactâmicos foram amplamente utilizados para o tratamento de infecções pneumocócicas, pois se acreditava até então na sensibilidade universal do *S. pneumoniae* e também por causa da crença de que os estreptococos não possuíam mecanismos para o desenvolvimento de resistência clinicamente significativa. No

entanto, houve claramente uma subavaliação da capacidade evolutiva e adaptativa do *S. pneumoniae*. Desde a primeira descrição de pneumococo resistente à penicilina em Boston, em 1965, e especialmente na década de 1990, o problema da resistência pneumocócica tornou-se um motivo de grande preocupação no mundo, uma evolução geralmente atribuída a um consumo extensivo de antibióticos. A vigilância de resistência pneumocócica entre os isolados de nasofaringe de crianças saudáveis tem sido uma maneira prática e útil de estimar a prevalência de isolados resistentes em uma comunidade (BAQUERO et al, 2002; STRATCHOUNSKI et al, 2006; KATSAROLIS et al, 2009).

Mais de 90 sorotipos de pneumococos já foram identificados com base nas diferenças antigênicas das cápsulas polissacarídicas. A distribuição destes sorotipos varia de acordo com a faixa etária, sintomas clínicos e área geográfica. A prevalência regional de determinados sorotipos destaca a importância de se conhecer os sorotipos prevalentes em cada região. (ELISSON et al. 2013). Assim, a vigilância dos sorotipos envolvidos na colonização por *S. pneumoniae* em crianças não vacinadas é uma ferramenta útil para prever e avaliar o impacto da vacina pneumocócica conjugada 10-valente, recém-introduzida no Brasil (VPC-10) (FRANCO et al, 2010, NEVES et al, 2013).

1.1. Histórico, Classificação e Características Morfológicas e Fisiológicas

Em 1881 dois microbiologistas, George Miller Sternberg nos Estados Unidos da América (EUA) e Louis Pasteur na França descreveram independentemente de isolamento da saliva humana, bactérias cocóides dispostas aos pares e com forma semelhante a lancetas. Na verdade, cada pesquisador havia descrito o mesmo organismo: foi nomeado *Microbe septicemique de la salive* por Pasteur e *Micrococcus pasteurii* por Sternberg (WATSON et al, 1993).

Em 1886 esse organismo foi referido como *Pneumococcus* por Fraenkel, devido a sua propensão de causar doença pulmonar. Neufeld em 1902 descreveu a reação de NEUFELD-QUELLUNG (reação antígeno-anticorpo entre a cápsula bacteriana e antissoros homólogos), técnica utilizada até hoje na identificação dos tipos capsulares (AUSTRIAN, 1981). O microrganismo foi rebatizado de *Diplococcus pneumoniae* em 1920 – uma denominação referindo-se obviamente aos cocos arranjados aos pares que causavam pneumonia (WATSON et al, 1993). Em 1974, foi dado o nome atual ao pneumococo, *Streptococcus pneumoniae*, com base, principalmente, no seu crescimento característico de cocos dispostos em cadeias quando em meio líquido (WATSON et al, 1993).

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria Gram-positiva, capsulada em forma de cocos (lanceolados) pertencente ao gênero *Streptococcus*, família Streptococcacea e medindo 0,5 a 1,25 μm de diâmetro (DEIBEL; SEELEY, 1974). Costumam permanecer arranjados aos pares ou dispostos em pequenas cadeias. Não apresentam atividade de catalase nem de citocromo oxidase. São exigentes quanto à atmosfera de crescimento “in vitro”, pois têm o crescimento estimulado por um aumento na concentração de gás carbônico (CO_2) além de um crescimento otimizado em ambiente de microaerofilia. São também exigentes nutricionais e requerem meios de culturas ricos em vitaminas e proteínas. Em meios de cultura sólidos suplementados com sangue desfibrinado de carneiro crescem como colônias lisas, pequenas, brilhantes e circundadas com um halo esverdeado de alfa-hemólise. São sensíveis ao aquecimento a 60°C por 30 minutos, solúveis na presença de sais biliares e sensíveis à optoquina (FACKLAM; WASHINGTON, 1991; BANDETTINI; MELIOLI, 2012).

1.2. Patogênese e Fatores de Virulência

O trato respiratório superior é o nicho ecológico para muitas espécies bacterianas. Em crianças, a microbiota da nasofaringe se estabelece durante os primeiros meses de vida e uma ampla variedade de microrganismos pode colonizar a nasofaringe, como o *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *S. pneumoniae*. *Qualquer indivíduo é passível de ser colonizado por esses potenciais patógenos pelo menos uma vez na vida, mas em geral a colonização é assintomática, podendo em alguns casos evoluir para doença* (BOGAERT et al, 2004).

Todas as doenças pneumocócicas começam com o estabelecimento da colonização, isto é, com o estado de portador. A propagação do estado de portador ocorre de pessoa a pessoa, através do contato direto com a secreção nasal de indivíduos colonizados, sendo essa propagação mais comum na infância. A aglomeração é o principal fator de risco para colonização, principalmente em crianças frequentadoras de creches, pois aumenta a propagação horizontal dos pneumococos. Nenhuma das formas comuns de doença pneumocócica é transmitida, o que implica dizer que as características de virulência dos pneumococos são, provavelmente, adaptações que aumentam com a persistência do microrganismo no hospedeiro durante a colonização. A colonização pode progredir para doença invasiva se as barreiras naturais forem cruzadas (BOGAERT et al, 2004; KADIOGLU et al, 2008).

A colonização e invasão por *S. pneumoniae* depende de um conjunto de fatores de virulência que precisa ser expresso de forma coordenada. Os determinantes de virulência mais importantes incluem os fatores de adesão, as propriedades antifagocíticas e produção de enzimas como a pneumolisina (KADIOGLU et al, 2008; NELSON et al, 2007; GLOVER et al, 2008).

Na cavidade nasal, as células de *S. pneumoniae* entram em contato com o muco produzido pelas células epiteliais do hospedeiro. A cápsula é uma importante estrutura bacteriana neste momento, uma vez que a cápsula é carregada negativamente, o que pode aumentar a repulsão do microrganismo aos mucopolissacarídeos carregados positivamente. Nessa fase inicial da colonização também há uma expressão de cápsula menos espessa, chamada de variante transparente, o que resulta numa maior aproximação das proteínas de superfície com os receptores das células epiteliais do hospedeiro (KADIOGLU et al, 2008).

A colonização por *S. pneumoniae* implica na adesão do microrganismo a carboidratos de superfície celular (N-acetil-glicosamina) presentes sobre o epitélio íntegro (não inflamado).

A aderência inicial dos pneumococos é mediada por proteínas de superfície associadas à parede celular, as adesinas, principalmente a adesina pneumocócica de superfície A (PspA), que é capaz de interferir na fixação do componente C3 do sistema complemento, e assim potencialmente bloquear os eventos que levam a opsonização e fagocitose (BOGAERT et al, 2004; CHARALAMBOUS et al, 2007; KADIOGLU et al, 2008).

A neuraminidase, uma das enzimas pneumocócicas, facilita a colonização da nasofaringe, uma vez que esta enzima cliva o ácido N-acetil-murâmico da mucina, diminuindo a viscosidade do muco. Esta enzima também é capaz de clivar resíduos de ácido siálico presentes na superfície das células epiteliais da mucosa respiratória, expondo os receptores de N-acetil-glicosamina (BOGAERT et al, 2004; KADIOGLU et al, 2008).

Além da neuraminidase, o pneumococo apresenta a hialuronidase, uma enzima presente na sua superfície, que tem como função degradar o ácido hialurônico, um importante componente polissacarídico do tecido conjuntivo, com a finalidade de aumentar a permeabilidade dos tecidos facilitando assim a invasão e disseminação do pneumococo (KADIOGLU et al, 2008). Outra enzima que facilita a aderência e colonização inicial é a protease IgA1, pois a enzima hidrolisa e inativa a imunoglobulina A1 (IgA1) presente nas mucosas (WEISER et al, 2003).

Em geral, a colonização não é seguida de doença. A conversão de colonização assintomática para doença invasiva requer a produção de fatores inflamatórios locais, como a interleucina (IL) -1 e do fator de necrose tumoral (TNF), que podem ser estimulados, por exemplo, por uma infecção viral precedente ou tabagismo. A cascata inflamatória altera o número e os tipos de receptores das células epiteliais e endoteliais. As adesinas fosforilcolinas (ChoP), constituinte dos ácidos tecóicos e lipotecóicos presentes na parede celular do pneumococo, promovem a adesão do microrganismo aos receptores do fator de ativação plaquetária (rPAF) presentes na superfície das células. A ligação do pneumococo a estes receptores induz a internalização dos pneumococos e promove a migração transcelular por meio do epitélio respiratório e o endotélio vascular, o que resulta na invasão de bactérias vivas. Outra adesina, a proteína A de ligação à colina (CbpA; também chamada de PspC), tem uma afinidade elevada pelo ácido siálico imobilizado e pelo receptor N-lacto-neotetraose, presentes em células humanas ativadas por citocinas. Este receptor também tem interação diretamente com o receptor de imunoglobulina polimérica (PIgR), o que aumenta a migração através da barreira da mucosa (De VELASCO et al, 1995; OBARO; ADEGBOLA, 2002; BOGAERT et al, 2004, KADIOGLU et al, 2008).

Após o processo de adesão e migração do pneumococo, ocorre a liberação da autolisina pneumocócica (LytA). A autolisina, uma amidase, é uma enzima que hidrolisa a camada de peptidoglicano em um sítio específico, entre o ácido N-acetil murâmico e o resíduo de alanina da ligação peptídica. A ação desta enzima autolítica leva à lise da parede quando as células bacterianas estão em fase crescimento. A LytA também é responsável por liberar a pneumolisina, uma enzima produzida pelo pneumococo, que se acumula no interior da célula bacteriana (VAN DER POLL et al, 2009; KADIOGLU et al, 2008).

A pneumolisina é um membro da família das citolisinas colesterol-dependente, que tem várias funções distintas, especialmente na patogênese precoce da infecção por pneumococo. A pneumolisina interage com o colesterol nas membranas celulares de uma variedade de células hospedeiras, produzindo poros e levando à lise das células. A pneumolisina também inibe a atividade bactericida de células fagocíticas, interrompe a motilidade das células epiteliais ciliadas do trato respiratório, estimula a produção de citocinas pelos macrófagos (particularmente IL-1, IL-8 e TNF) e ativa a via clássica do sistema complemento (VAN DER POLL et al, 2009; KADIOGLU et al, 2008).

A cápsula é o mais importante fator de virulência do pneumococo, pois tem um papel importante na invasão e disseminação do trato respiratório. A cápsula é constituída por polímeros de alto peso molecular, composto por unidades de repetição de oligossacarídeos, que pode conter entre dois e oito monossacarídeos. A principal característica da cápsula é a proteção do pneumococo contra a fagocitose. Neste momento há uma expressão de cápsula mais espessa, chamada de variante opaca, que serve de escudo, impedindo que os receptores das células fagocíticas interajam com a porção constante (Fc) da imunoglobulina G (IgG), ou com componente C3 do sistema complemento, ligados às estruturas mais profundas da superfície celular do pneumococo (por exemplo, ácidos teicóico e proteínas da superfície) (De VELASCO et al, 1995; KADIOGLU et al, 2008; VAN DER POLL et al, 2009; LIÑARES et al, 2010).

Este grupo de fatores de virulência é responsável por induzir a inflamação e os sintomas que a acompanha, podendo ser diretamente responsável pela morbidade e mortalidade causada pelo pneumococo após o início da infecção (VELASCO et al, 1995).

1.3. Epidemiologia

Ao longo do tempo, vários estudos vêm demonstrando que a prevalência da colonização do pneumococo na nasofaringe pode ser influenciada por diversos fatores como idade, população estudada, área geográfica, sazonalidade e condições ambientais, como a poluição, e aglomerados (creches, quartéis e asilos) (BOGAERT et al, 2004; KATSAROLIS et al, 2009).

A prevalência do estado de portador aumenta nos primeiros anos de vida, atingindo 50-70% das crianças com 2-3 anos de idade, diminuindo gradativamente até estabilizar em 5-10% em crianças com mais de 10 anos de idade. Estudo em países em desenvolvimento relatam taxas de portadores de *S. pneumoniae* em torno de 60% (ADETIFA et al, 2012; SAKAI et al, 2013).

Na América do Sul, mais recentemente, a taxa de colonização variou de 27%, no Peru (MERCADO et al, 2012) a 58,8%, no Brasil (FRANCO et al, 2010).

Em um estudo com crianças saudáveis e usuárias de creches, realizado há 10 anos, em 11 creches do município de Fortaleza, Rey e colaboradores (2002) encontraram uma taxa de colonização por *S. pneumoniae* de 72%. Outros estudos mais recentes, com crianças usuárias de creches, realizados no Brasil relataram taxas de portadores de 58,8% e 57,8%, respectivamente (FRANCO et al, 2010; NEVES et al, 2013)

Estima-se que o pneumococo é responsável por 14,5 milhões de casos da doença em todo o mundo e mais de 800 mil mortes de crianças menores de cinco anos a cada ano (BOGAERT et al, 2004; SIMELL, et al, 2012; SAKAI et al, 2013). Em crianças menores que cinco anos de idade, a incidência anual de doença invasiva pneumocócica (DIP) varia aproximadamente de 10 a 100 casos/100.000 habitantes (hab.). Para a meningite pneumocócica, em particular, a incidência relatada na população geral é de 1-2 casos/100.000 hab. em países desenvolvidos, aumentando para 20 casos/100.000 hab. em países em desenvolvimento. A maior incidência é em crianças menores de dois anos de idade, e, especialmente, nos países em desenvolvimento em crianças menores de seis meses (HAUSDORFF et al, 2007).

Um estudo multicêntrico, realizado no Brasil, em um período de 12 anos (1993-2004) de vigilância de doença pneumocócica, executado por Brandileone e colaboradores (2006), mostrou que entre os 6470 isolados de *S. pneumoniae* invasivos identificados, 69,3% foram recuperados de líquido cefalorraquidiano (LCR), 19,1% de pneumonia invasiva e 11,6% de bacteremia ou sepse, artrite ou abscesso abdominal. Os dados sobre a idade do paciente

estavam disponíveis em 5520 isolados, dos quais 42,8% eram menores de cinco anos de idade.

1.4. Resistência a Antimicrobianos

A descoberta e a introdução da penicilina na terapêutica antimicrobiana provocaram uma mudança no prognóstico das doenças infecciosas e mais particularmente em relação às infecções pneumocócicas. Na era pré-antibiótica a letalidade causada pela pneumonia pneumocócica era de cerca de 20%, aumentando para 50% nos casos com sepse e para 80 a 100% na meningite pneumocócica. O emprego terapêutico da penicilina G (benzilpenicilina) fez esses índices caírem para 5%, 20% e 20-30%, respectivamente (TAVARES, 2000). Por mais de 25 anos a penicilina permaneceu como o principal fármaco ativo contra pneumococo, mas os primeiros relatos de resistência aconteceram na década de 60 quando foram identificadas e notificadas cepas resistentes em Boston, em 1965, e na Austrália, em 1967. Até o final dos anos 80, cepas de pneumococos resistentes à penicilina tinham se espalhado por todo o mundo (CAMARGOS et al, 2006).

Na América Latina, o primeiro relato de pneumococo resistente à penicilina foi em 1981 no México (CAMARGOS et al 2006). No Brasil o primeiro relato de uma cepa de *S. pneumoniae* com resistência intermediária à penicilina foi documentado em 1988, em São Paulo (DE SOUSA et al, 1988).

Nas últimas décadas, o aumento do número de cepas de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina, à outros antibióticos β -lactâmicos, à sulfametoxazol-trimetoprim, aos macrolídeos e a outras classes de antimicrobianos é cada vez mais relatado em todo o mundo, e tem complicado o tratamento da infecção pneumocócica (HSIEH et al, 2009; VAN DER POLL; OPAL, 2009). O frequente uso de antibióticos em crianças tem sido identificado como o maior fator de risco para a seleção de resistência em pneumococos (BRANDILEONE et al, 2006; VALENZUELA; DE QUADROS, 2009).

1.4.1. Resistência aos β -lactâmicos

As penicilinas e os outros antibióticos β -lactâmicos apresentam atividade bactericida contra o *S. pneumoniae*. O mecanismo de ação dos antibióticos β -lactâmicos consiste em bloquear o último passo da síntese da parede celular, o que é possível devido à semelhança estrutural do substrato natural das proteínas de ligação à penicilina (PLPs) e o antibiótico (inibição competitiva), inibindo, assim, as ligações cruzadas das cadeias de peptidoglicano (MORENO; CASTAÑEDA, 2003; ROGERS et al, 2007).

A resistência à ação das penicilinas nos pneumococos é mediada por genes cromossômicos, que sofrem mutações sucessivas no código genético que comandam alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas, as PLPs 1a, 1b, 2x, 2a, 2b e 3 e que passam a apresentar baixa afinidade de ligação com as penicilinas (HACKENBECK et al, 2012). Estas PLPs alteradas apresentam também baixa afinidade para outros antibióticos beta-lactâmicos, mas, nos pneumococos com resistência intermediária, as cefalosporinas da segunda e da terceira gerações e as carbapenemas ainda têm afinidade de ligação e exercem ação antimicrobiana. Contudo, nas cepas que apresentam resistência plena, que têm maior alteração nas PLPs 1a, 2b e 2x, ocorre elevada resistência também para as cefalosporina e carbapenemas. (TAVARES, 2000; MORENO; CASTAÑEDA, 2003; ZETTLER et al, 2004; CAMARGOS et al, 2006).

Estudos apontam percentuais de resistência à penicilina que superam 50% em países como Japão, Tailândia, Vietnã e Coréia (SONG, et al.1999), 60% na Espanha (BAQUERO et al, 1999), 35% nos Estados Unidos (DOERN, 2001) e 11% no Canadá (GREENBERG et al, 2002). Na América Latina, Brasil, a taxa de resistência à penicilina varia de 1,4% na região Norte (ROSSI et al, 2001) a 49% em Fortaleza, Ceará (REY et al, 2002).

Segundo Brandileone e colaboradores (2006), foi observado um aumento significativo da resistência plena (300%) e intermediária (60%) à penicilina entre as cepas de *S. pneumoniae* isoladas no Brasil, entre os anos de 1998 e 2003.

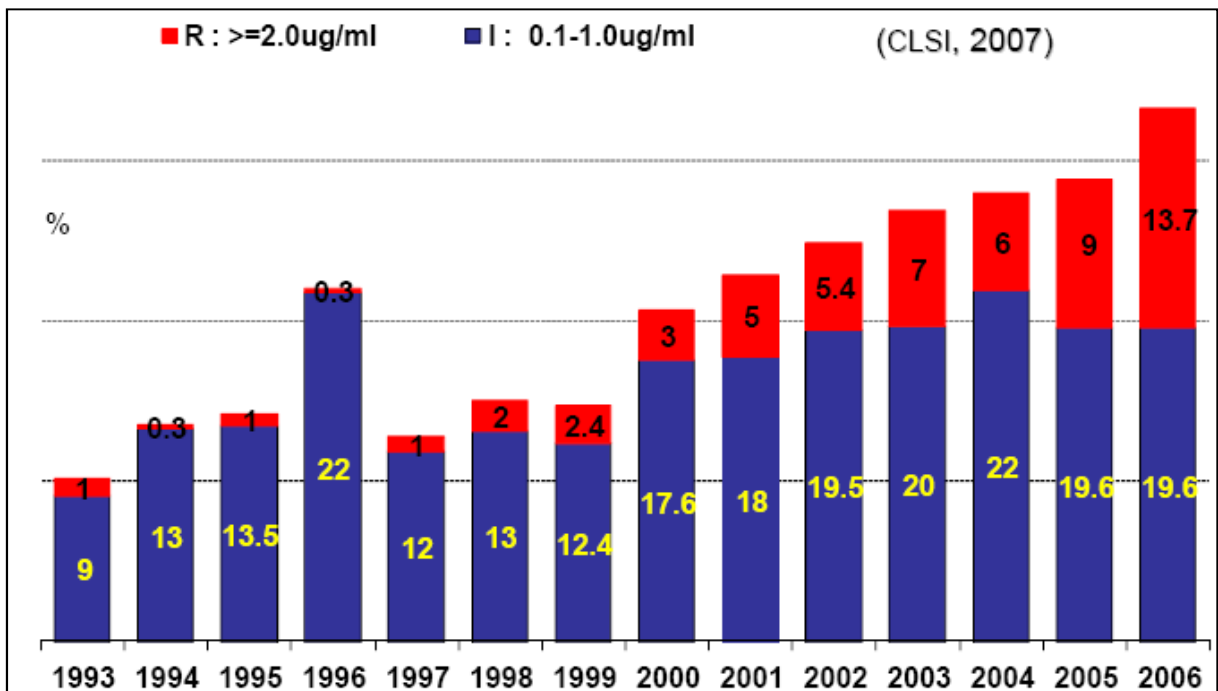
Rey e colaboradores (2002), em um estudo realizado em Fortaleza em 1998, com 441 isolados de *S. pneumoniae* de nasofaringe de crianças com pneumonia e crianças sadias usuárias de creches e postos de vacinação, encontraram uma taxa de resistência à penicilina de 49%, e de resistência à ceftriaxona de 3,2%.

Em 1993, o Sistema Regional de Vacinas (SIREVA) foi implementado no Brasil, patrocinado pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e pelo Ministério da Saúde

do Brasil. Este projeto é responsável pela vigilância laboratorial do *S. pneumoniae* na América Latina, contribuindo significativamente para a investigação dos níveis de resistência aos antimicrobianos comumente usados e dos sorotipos prevalentes em cada área (VIEIRA et al, 2007).

Segundo dados do SIREVA, houve um grande aumento da resistência à penicilina, de isolados de doença invasiva de *S. pneumoniae*, no Brasil, entre os anos de 1993 (10%) e 2006 (33,3%). A figura 1. mostra a evolução da resistência à penicilina dos pneumococos isolados de doença invasiva, por ano.

Figura. 1 – Resistência à penicilina dos pneumococos isolados de doença invasiva, no Brasil, por ano. R: resistência plena; I: resistência intermediária



Extraída de www.paho.org/spanish/ad/fch/im/17-Brandileone_SIREVA_Brasil.pdf.

1.4.2. Resistência aos Macrolídeos

Os macrolídeos são largamente utilizados no tratamento de diversas doenças infecciosas, além de ser utilizado por pacientes que são alérgicos à penicilina. Os macrolídeos são compostos por anéis de lactona com 14, 15 e 16 átomos. O mecanismo de ação dessa classe de antimicrobiano é inibir a síntese proteica. Os macrolídeos ligam-se reversivelmente à subunidade 50S do ribossomo bacteriano inibindo o processo de transpeptidação e translocação, causando liberação prematura do peptídeo que incompleto perde sua função celular, sendo assim, proteínas vitais à célula bacteriana deixam de ser sintetizadas, ocorrendo à morte celular (KANOH et al, 2010).

A aquisição do gene *ermB*, que reduz a afinidade de ligação de todos os macrolídios para o RNAr 23S (domínio V) do pneumococo, é responsável pela resistência cruzada aos macrolídios compostos por anéis de lactona com 14, 15 e 16 átomos, lincosamidas e estreptograminas B (MLS_B) (LECLERQ et al, 2002; ZETTLER et al., 2005). A resistência cruzada ocorre como resultado da metilação do resíduo de adenina (A2058), dentro dos sítios de ligação de sobreposição para as três classes de antimicrobianos quimicamente distintos (FARRELL et al, 2004). As cepas de *S. pneumoniae*, que possuam gene *ermB* e têm o fenótipo MLS_B normalmente expressam alto nível de resistência aos antibióticos MLS_B. O fenótipo MLS_B pode ser a expressão da resistência constitutiva (cMLS_B) ou induzível (iMLS_B) (LECLERQ et al, 2002; FARRELL et al, 2004). Em *S. pneumoniae*, o gene *ermB* é transportado no transposon *Tn1545* conjugativo que facilita espalhar entre diferentes cepas (FARRELL et al, 2004). O segundo mecanismo de resistência é a bomba de efluxo, que são proteínas presentes na membrana levando a um transporte ativo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular. No pneumococo, esse mecanismo de resistência é conferido pela presença do gene *mefA*, que é encontrado no transposon defeituoso *Tn1207.1*, e é responsável apenas pela resistência aos macrolídios compostos por anéis de lactona com 14 e 15 átomos (Fenótipo M) (DŽIDIĆ et al, 2008).

Pneumococos resistentes a macrolídeos foram descritos pela primeira vez em 1967, no Canadá, porém a taxa de resistência aos macrolídeos entre pneumococos permaneceu baixa em todo o mundo (<5%) durante os anos 1970. No início da década de 1980, a maior prevalência de pneumococos resistentes à eritromicina foi encontrada entre pneumococos isolados de portadores do hospital na África do Sul (63%), já entre os isolados invasivos, a prevalência de resistência foi de 8,3% em 1983. A maioria dos isolados demonstrou multirresistência (LECLERCQ et al 2002).

A prevalência da resistência aos macrolídeos em *S. pneumoniae* está aumentando em todo o mundo, mas é altamente variável entre os países. Em estudo realizado no Canadá com 3.339 isolados invasivos de *S. pneumoniae* foi observado que a resistência aos macrolídeos aumentou de 4,6% para 13,1% no período de 8 anos, de 1995 a 2002 (VANDERKOOI et al., 2005). Nos Estados Unidos, um estudo incluiu 1.531 isolados clínicos de *S. pneumoniae* que foram coletadas em 33 centros médicos em todo o país durante o inverno de 1999-2000. A taxa de resistência intermediária foi 0,9% e a de resistência plena encontrada foi de 25,7% (DAIKOS et al 2008). A ampla variação das taxas de resistência aos macrolídeos de *S. pneumoniae* isolados de amostras clínicas também tem sido relatada em vários países europeus, como Espanha e França que exibem as maiores taxas, 43,6% e 46,1%, respectivamente, enquanto que na Áustria é de apenas 10% (REINERT et al 2005).

No Brasil, em estudos realizados em Fortaleza e Paraná com crianças portadoras de *S. pneumoniae* usuárias de creches, a resistência à eritromicina e clindamicina foram, respectivamente, 23% e 18% e 8,7% e 1,1% (REY et al, 2002; VELASQUEZ et al, 2009).

1.4.3. Resistência ao Sulfametoxazol-Trimetoprim

As sulfonamidas foram os primeiros antimicrobianos desenvolvidos para introdução em larga escala na prática clínica, em 1935. A sulfonamida sulfametoxazol tem como mecanismo de ação inibir competitivamente a enzima diidropteroato sintase (DIPS). O Trimetoprim, uma diaminopirimidina introduzida em 1968, inibe seletivamente a enzima diidrofolato redutase (DIFR). O sulfametoxazol e o trimetoprim são antimicrobianos que são utilizados em combinação e inibem as enzimas DIPS e DIFR, que fazem parte da biossíntese de ácido fólico nas células bacterianas, inibindo assim o crescimento bacteriano. A resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim é conferida pela aquisição de mutações em nos genes *folA* e *folP*, que são os genes que codificam DIPS e DIFR, respectivamente (ALEKSHUN; LEVY, 2007, CORNICK et al, 2013) .

Desde a década de 1980, taxas crescentes de resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim têm sido relatadas em todo mundo. A resistência dos isolados de portadores de *S. pneumoniae* ao sulfametoxazol-trimetoprim tem ultrapassado 50% em vários lugares no Brasil e no mundo (REY et al., 2002; VELASQUEZ et al, 2009; FRANCO et al, 2010; KORONA-GLOWNIAK et al, 2011; CORNICK et al, 2013; NEVES et al, 2013).

1.5. Sorotipos

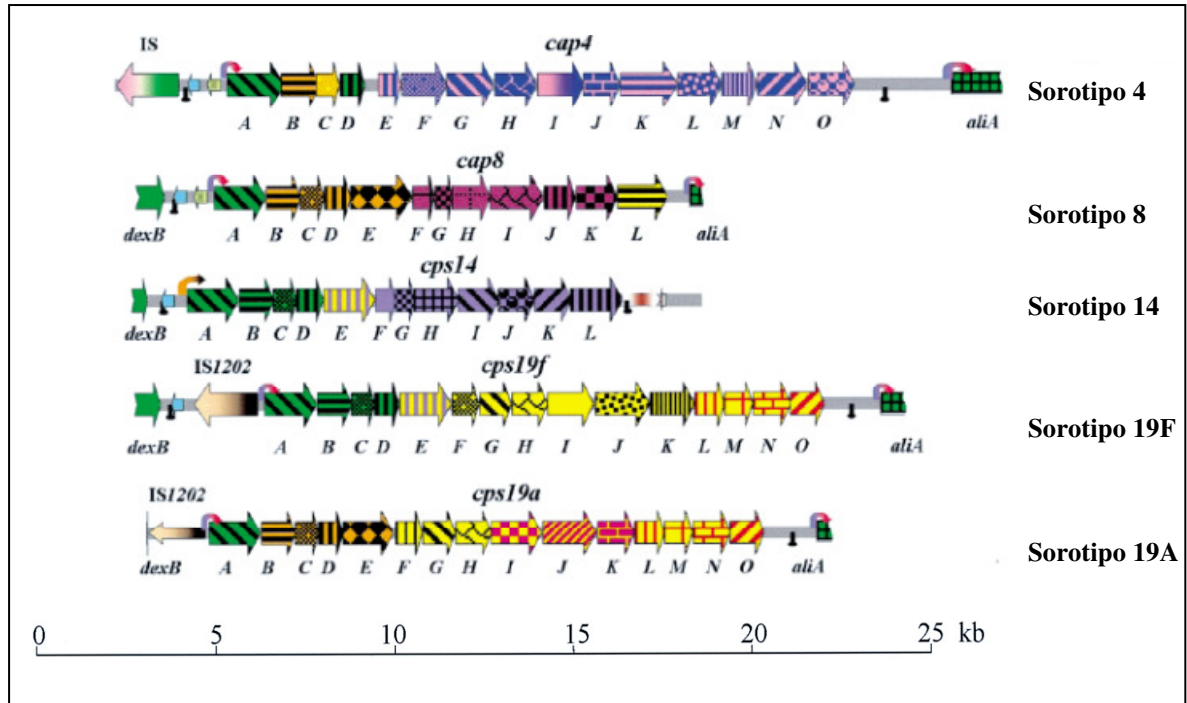
Existem mais de 90 sorotipos de *S. pneumoniae* imunologicamente distintos identificados atualmente, diferindo na composição química dos seus polissacarídeos capsulares (ELISSON et al, 2013). Porém, cerca de quinze sorotipos parecem causar a maioria das doenças invasivas. Na América Latina, 13 sorotipos correspondem a mais de 85% dos isolados invasivos (DIAS et al, 2007; NEVES et al, 2013).

Estudos da distribuição dos sorotipos dependem da sorotipagem convencional (Reação de Quellung) para determinação direta dos sorotipos de *S. pneumoniae* (DIAS et al, 2007). A reação de Quellung se baseia na capacidade de o soro hiperimune específico reagir com a cápsula da bactéria em suspensão (HENRICHSEN, 1979). Os sorotipos são classificados segundo o sistema de nomenclatura dinamarquesa, que leva em consideração as características imunológicas e antigênicas dos polissacarídeos capsulares. O grupo é denominado por números e o tipo por letras maiúsculas, e a combinação destes identifica cada sorotipo diferente (LUND, 1970, HENRICHSEN, 1979).

O alto custo do antissoro, a subjetividade na interpretação e as dificuldades intrínsecas da técnica da sorotipagem convencional limitam o seu uso a poucos laboratórios altamente especializados (PAI et al, 2006; DIAS et al, 2007). O desenvolvimento de sistemas de genotipagem baseados em reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) tem o potencial de superar algumas dificuldades associadas à sorologia convencional (PAI et al, 2006; DIAS et al, 2007).

A produção da cápsula é largamente controlada por genes responsáveis pela síntese dos polissacarídeos capsulares, localizados no locus cps. Esse locus se encontra entre os genes dexB e aliA, que não participam da biossíntese da cápsula. Os quatro primeiros genes (cpsA-D) são conservados em muitos sorotipos, porém apenas o primeiro gene capsular, cpsA, é conservado em mais de 90% dos tipos capsulares sequenciados, enquanto que a parte central do loci contém os genes que codificam os polissacarídeos específicos da cápsula (Figura 2), e que servem de base para a diferenciação dos pneumococos por PCR (GARCÍA, et al, 2000; PAI et al, 2006; DIAS et al, 2007; KADIOGLU et al, 2008).

Figura 2. Organização genética da região do *S. pneumoniae* que contém o cluster dos genes capsulares dos genótipos 4, 8, 14, 19F e 19A. As regiões que apresentam mais de 90% de nucleotídeos idênticos são representadas pelas mesmas cores e sombreamento.



Adaptada de GARCÍA, et al, 2000.

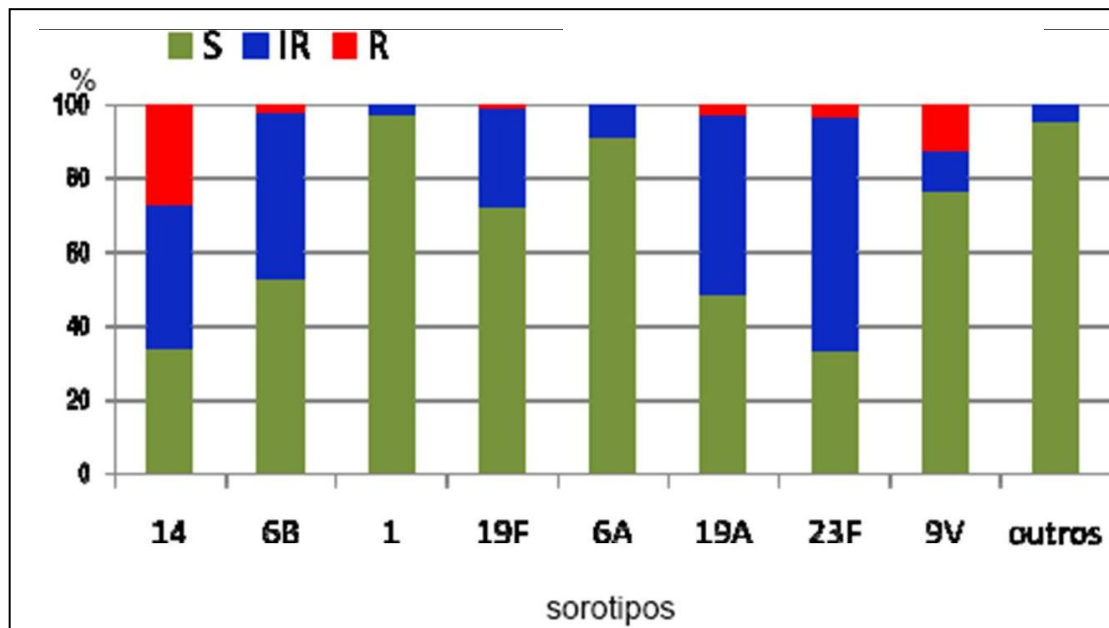
A distribuição dos sorotipos de *S. pneumoniae* isolados de nasofaringe varia um pouco de acordo com o país e faixa etária. A Europa e o EUA mostram distribuição dos sorotipos similares, com pequenas diferenças entre os sorotipos. Por exemplo, na Holanda, os sorotipos 19F, 6B, 6A, 9V e 23F são encontrados com mais frequência entre crianças menores de 3 anos de idade. Na Grécia, os sorotipos predominantes entre crianças menores de 2 anos de idade são 6B, 19F, 23F, 14 e 18C. Nos EUA os sorotipos mais comuns são o 6B, 14, 19F e 23F (BOGAERT et al, 2004).

No continente africano, no Quênia, os sorotipos mais comuns encontrados foram o 13, 15, 14, 6B e 19F. Na África do Sul, semelhante distribuição foi encontrada, com exceção do sorotipo 13, que não foi encontrado (BOGAERT et al, 2004).

Na América do Sul, os sorotipos mais prevalentes são o 14, 5, 1, 6A/B, 23F, 7F, 9V, 19F, 18C, 19A e 9N (CAMARGOS et al, 2006). No Brasil, a distribuição dos sorotipos mais prevalentes de isolados de *S. pneumoniae* de doenças invasivas, segundo um estudo realizado de 1993-1999, são o 14, 6A/6B, 1, 18C, 5, 23F, 19F e 9V (DI FABIO et al, 2001). Segundo o SIREVA, os sorotipos invasivos que mais se relacionam com resistência à penicilina, no

Brasil, estão representados na figura 3. Em Fortaleza, segundo Rey et al (2002), os sorogrupos mais comuns encontrados em crianças portadoras foram o 6 (36%), 19 (19%), 23 (13%) e 14 (10%).

Figura 3. Sorotipos de isolados invasivos de *S. pneumoniae* associados à resistência à penicilina, período de 2000-2006, em crianças < 6 anos. S: sensível; IR: resistência intermediária; R: resistente.



Adaptado de www.paho.org/spanish/ad/fch/im/17-Brandileone_SIREVA_Brasil.pdf

1.6. Vacinas Pneumocócicas

Devido à alta morbidade e mortalidade das infecções pneumocócicas a prevenção, em todas as idades, é uma abordagem mais eficaz para reduzir a carga da doença do que qualquer outro tipo de tratamento (MYERS; GERVAIX, 2007).

Atualmente, três vacinas pneumocócicas estão atualmente disponíveis: as vacinas pneumocócicas polissacarídicas conjugadas 7-valente (VPC-7), 10-valente (VPC-10) e 13-valente (VPC-13), porém a vacina conjugada 7-valente, por ser mais antiga, está sendo progressivamente retirada do mercado (ASLAN et al, 2007, VIEIRA et al, 2007, NEVES et al, 2013)

A VPC-7, licenciada desde o ano 2000 em vários países desenvolvidos, inclui os seguintes sorotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Essa vacina possui polissacarídeos capsulares conjugados a uma proteína carreadora do toxóide diftérico (CRM197) (PLETZ et al., 2008).

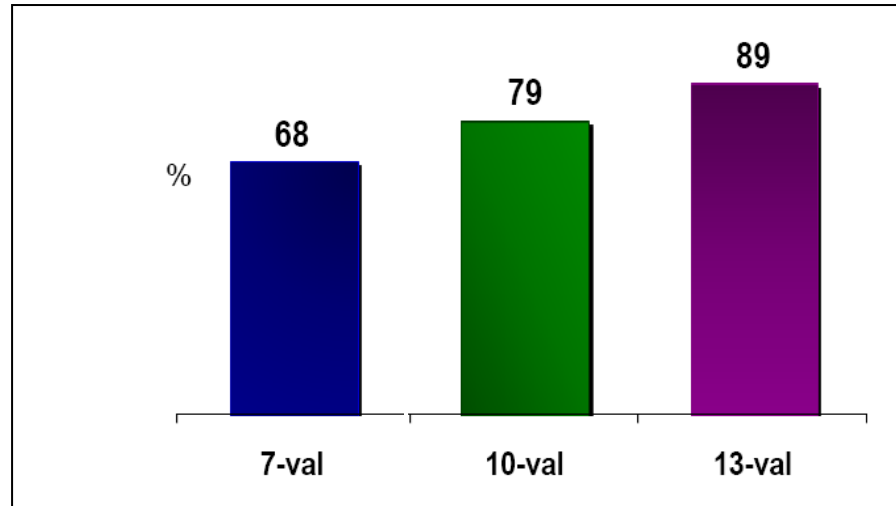
A VPC-10 foi aprovada no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e foi incluída no calendário nacional de imunização desde março de 2010, sendo introduzida, gradualmente, em diferentes áreas do país (NEVES et al, 2013). Esta vacina possui em sua formulação os mesmos sorotipos da 7-valente acrescida dos sorotipos 1, 5 e 7F. A vacina 10-valente possui polissacarídeos capsulares conjugados a três proteínas carreadoras: os sorotipos 18C e 19F são conjugados com o toxóide tetânico (TT) e com o toxóide diftérico (DT), respectivamente, e os oito sorotipos restantes são conjugados com a proteína D de *Haemophilus influenzae* não tipável (MEHR; WOOD, 2012).

A VPC-13 possui em sua formulação os mesmos sorotipos da 10-valente acrescida dos sorotipos 3, 6A e 19A. A VPC-7 está sendo substituída, nos países que adotaram essa vacina no calendário nacional de vacinação, pela VPC-13. Esta vacina também possui polissacarídeos capsulares conjugados a uma proteína carreadora do toxóide diftérico (CRM197) (MEHR; WOOD, 2012).

As vacinas pneumocócicas conjugadas são altamente imunogênicas, pois são capazes de provocar uma resposta imunológica do tipo célula T-dependente. A proteína conjugada aos polissacarídeos capsulares é processada em peptídeos pelas APCs. Os peptídeos são apresentados aos linfócitos T CD4⁺ via MHC de classe II, na presença de moléculas co-estimulantes, o que resulta na proliferação e expansão de células T efetoras (padrão de resposta Th2). Esses linfócitos T efetores ao entrar em contato com o peptídeo via MHC dos linfócitos B, também na presença de moléculas co-estimulantes, são ativados e passam a produzir citocinas (IL-4, IL5 e IL6) que são responsáveis por estimular os linfócitos B em se diferenciar em plasmócitos, produtores de imunoglobulina G, a gerar células B de memória (PLETZ et al., 2008).

A figura 4 mostra a cobertura potencial das vacinas polissacarídicas existentes, segundo dados do SIREVA, no Brasil, em sorotipos de *S. pneumoniae* invasivo.

Figura 4. Impacto estimado da cobertura das vacinas conjugadas (%) 7, 10 e 13-valente frente aos sorotipos encontrados com mais frequência no Brasil, 2000-2006, em crianças menores de 6 anos.



Adaptado de www.paho.org/spanish/ad/fch/im/17-Brandileone_SIREVA_Brasil.pdf

A incorporação da vacina pneumocócica conjugada 7-valente (PCV7) em programas de vacinação dos países industrializados reduziu o estado de portador e as doenças pneumocócicas pelos sorotipos vacinais (FRANCO et al, 2010). Portanto, os dados sobre crianças não vacinadas portadoras de pneumococos é uma ferramenta útil para monitorar o efeito da PCV-10.

1. PERGUNTAS DE PARTIDA

- Qual a prevalência de *Streptococcus pneumoniae* em amostras isoladas de crianças sadias usuárias de creches, em Fortaleza?
- Qual o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *S. pneumoniae* isolados de crianças sadias usuárias de creches?
- Quais os sorotipos de pneumococos encontrados em crianças portadoras usuárias de creches?
- Quais as proteínas de ligação à penicilina (PLPs) que apresentaram alterações nas cepas pesquisadas?
- Qual é a cobertura potencial da VPC-10, em isolados de portadores *S. pneumoniae*, incluída recentemente no calendário de imunização nacional?

2. HIPÓTESES

- A prevalência de *Streptococcus pneumoniae* em crianças portadoras usuárias de creches é alta, uma vez que as crianças que tem idade para frequentar a creche já passaram da idade de receber a vacina.
- A taxa de resistência aos antibióticos é alta para a maioria dos antimicrobianos testados.
- Os sorotipos mais comuns encontrados são semelhantes aos encontrados no restante do país.
- As cepas com resistência plena ou intermediária a penicilina apresentam uma ou mais alterações nas PLPs.
- A cobertura potencial da vacina VPC-10 é alta, uma vez que os sorotipos de *S. pneumoniae* presente na vacina correspondem aos mais comumente isolados no país.

3. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Determinar a prevalência de *S. pneumoniae* em crianças portadoras, identificar os genótipos capsulares, verificar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos, e os genes associados à resistência à penicilina em Fortaleza, Brasil.

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar a taxa de portadores de *S. pneumoniae* em crianças sadias usuárias de creche da Regional V de Fortaleza.
- Verificar a resistência de *S. pneumoniae* de isolados de crianças portadoras frente à penicilina, ceftriaxona, amoxicilina, eritromicina, clindamicina, sulfametoxazol-trimetoprim.
- Identificar alterações nas PLPs em cepas resistentes à penicilina em isolados de portadores.
- Determinar os genótipos capsulares mais comuns em isolados em amostras de portadores.
- Verificar a cobertura potencial da VPC-10 frente aos genótipos capsulares identificados.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

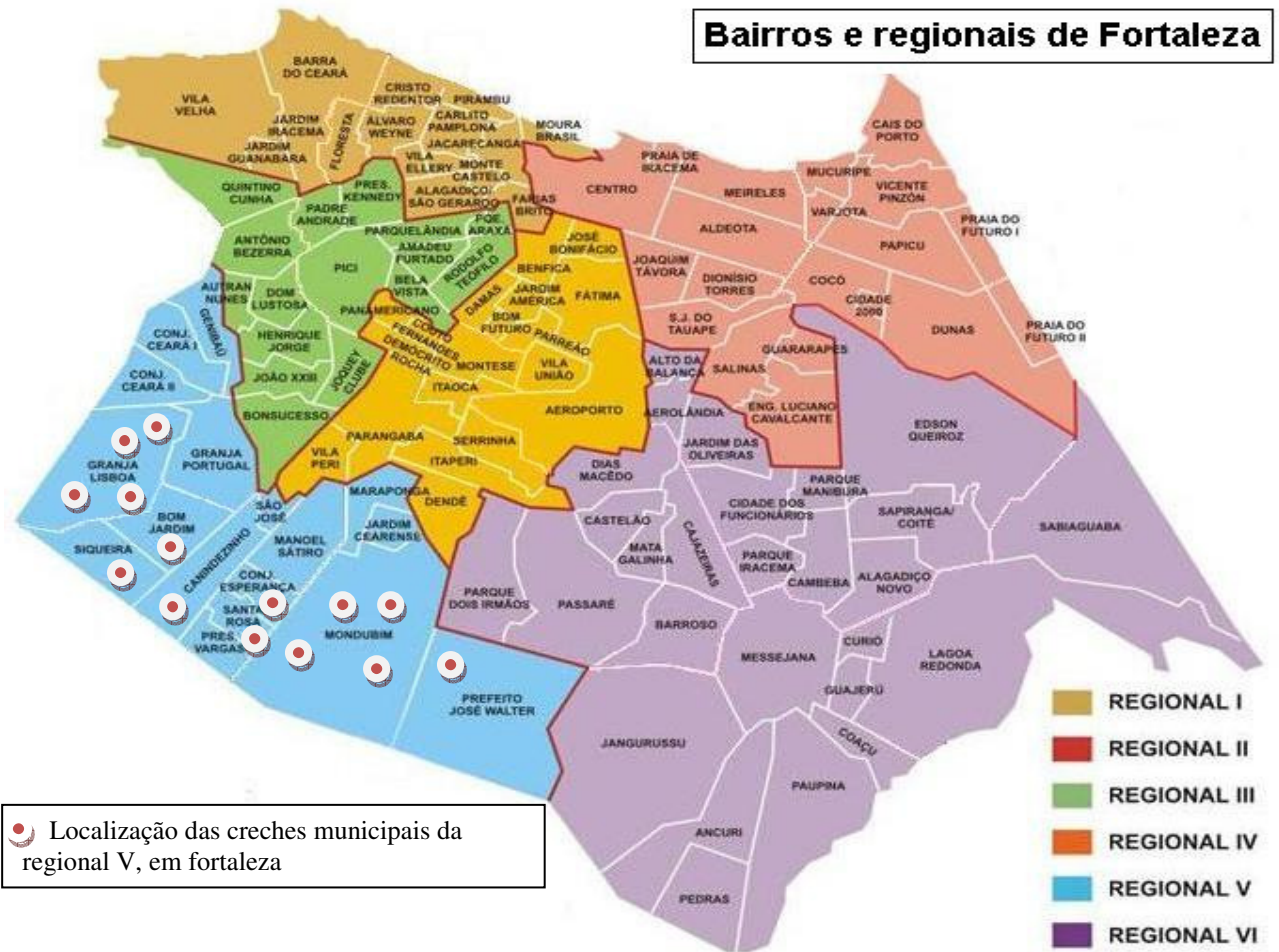
5.1. Amostras de Portadores Sadios

No período compreendido entre janeiro a dezembro de 2011, amostras da nasofaringe foram coletadas de crianças saudáveis com idade entre 20 a 65 meses. Estas crianças foram recrutadas das 14 creches municipais da Regional V de Fortaleza (figura 5.). A regional V foi escolhida por ser, segundo dados da prefeitura de Fortaleza, a Regional mais populosa, mas também a mais pobre da capital, com rendimentos médios de 3,07 salários mínimos, e ainda apresenta o menor índice de desenvolvimento humano (UECE, 2011).

Critérios de inclusão: Crianças saudáveis, com idade entre 20 a 65 meses, não vacinadas, usuárias de creche municipal de Fortaleza.

Critérios de exclusão: Foram excluídas do estudo as crianças com uso de antibiótico até 30 dias antes da coleta do material, crianças hospitalizadas por mais de 48 horas nos últimos três meses.

Figura 5. Mapa da cidade de Fortaleza, dividida em seis regionais, com destaque para a regional V e seus bairros.



Extraído de: www.solucao360.com/images/stories/fortaleza/Cidade/Bairros_e_regionais_de_Fortaleza.png

5.2. Aspectos Éticos

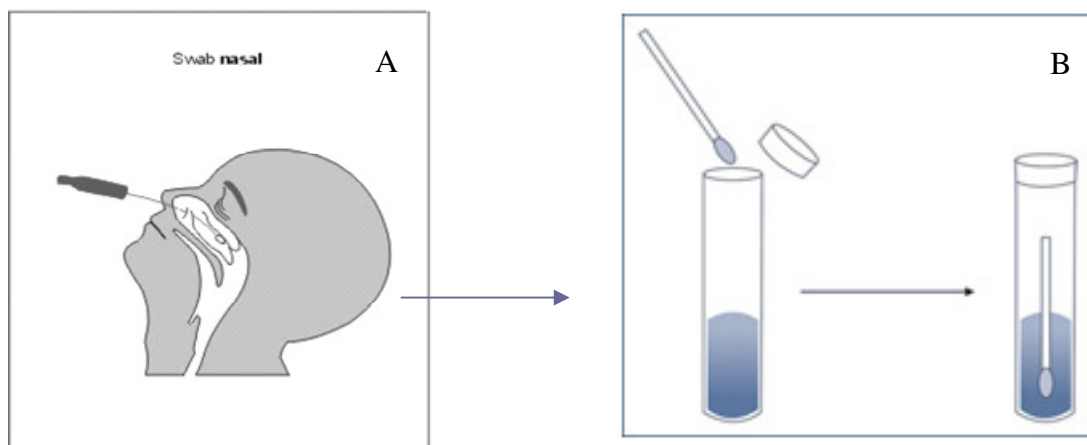
Cada unidade foi visitada pelo menos duas vezes. Na primeira visita, os responsáveis pelas crianças eram reunidos em uma sala para que pudessem ser esclarecidos sobre os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios da participação da criança na pesquisa. Após esta explanação era realizado o convite para a participação de seus filhos no estudo. Os responsáveis que permitiram a participação da criança no estudo preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice I) e responderam a um questionário (Apêndice II). Na segunda visita, as crianças que estavam dentro do critério de inclusão eram levadas para uma sala isolada para coleta do material de nasofaringe.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Infantil Albert Sabin, pelo número de protocolo 064/2010, na data de 30/09/2010 (Anexo I). O consentimento informado descreveu o objetivo do estudo, os procedimentos que seriam realizados, os riscos e os benefícios da participação. Uma cópia do documento foi entregue aos pais ou responsáveis legais da criança.

5.3. Coleta do Material de Nasofaringe

A coleta foi feita utilizando-se um *swab* pernasal de haste de aço flexível e ponta de algodão (CB Products, São Paulo, Brasil) (STRATCHOUNSKI et al, 2006). O *swab* foi introduzido no nariz da criança até a nasofaringe e foi girado levemente num ângulo de 180° (Figura 6A.), retirado cuidadosamente e mergulhado em meio para transporte Stuart (Figura 6B.) (BD, Sparks, USA). Os *swabs* foram encaminhados para processamento no laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal/ Universidade Federal do Ceará (UFC). O tempo decorrido entre coleta e processamento não excedeu a 4 horas.

Figura 6. A. Coleta de material da nasofaringe B. Inoculação do *swab* em meio para transporte Stuart.

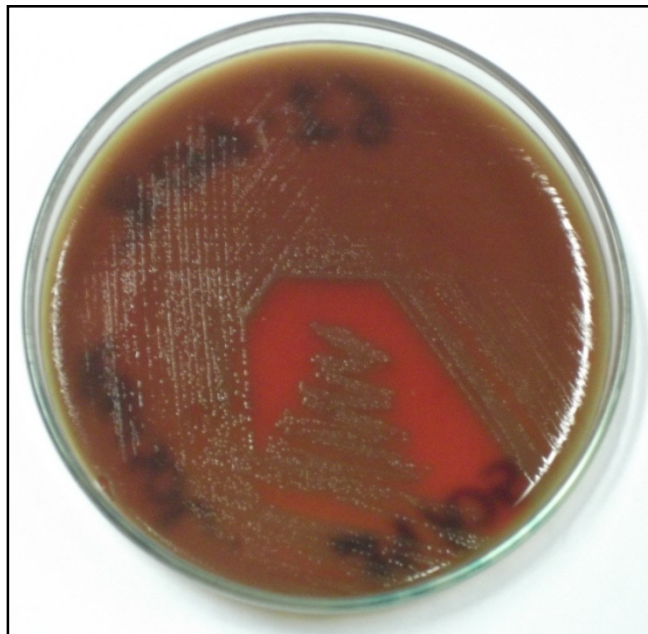


Adaptado de: www.fiocruz.br/biosseguranca/ctbio/docs/

5.4. Isolamento Bacteriano

Os *swabs* de nasofaringe foram semeados em placas de Petri contendo o meio *Brain Heart Infusion* (BHI) agar (OXOID) suplementado com sangue desfibrinado de carneiro a 5% e gentamicina 5µg/ml(SIGMA) e em seguida os meios semeados foram incubados a 36 ± 1 °C em microaerofilia (jarra com vela) por 24 horas. Após o período de incubação foram selecionadas colônias isoladas que apresentassem as seguintes características: colônias planas com uma zona cinza-esverdeada ao redor (alfa hemólise) (Figura 7). Estas colônias foram então reisoladas em outras placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura, a fim de gerar uma maior massa celular bacteriana para posterior realização da coloração de Gram, dos testes com disco de optoquina (5µg) e solubilidade em bile em solução de deoxicolato de sódio a 10% (BAYRAKTAR et al, 2005; FONSECA et al, 2005; STRATCHOUNSKI et al., 2006; LAUDERDALE et al, 2006).

Figura 7. Crescimento em ágar sangue de colônias planas com alfa hemólise ao seu redor, características de *S. pneumoniae*.



Fonte: Laboratório de Bacteriologia, UFC, 2011.

5.5. Identificação de *S. pneumoniae*

Colônias planas, que apresentaram em sua volta alfa-hemólise (hemólise parcial), que microscopicamente, coradas pela coloração de Gram, mostraram-se arranjadas como diplococos Gram-positivos em forma de lança (Figura 8A), foram selecionadas para o teste da sensibilidade à optoquina (FACKLAM; WASHINGTON, 1991).

O teste de sensibilidade à optoquina foi realizado semeando uma cultura recente (24h) de *S. pneumoniae* em ágar Mueller-Hinton (DIFCO) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e com o auxílio de um *swab*. Em seguida um disco de optoquina (5µg) foi aplicado sobre o inóculo semeado e a placa incubada em microaerofilia e a 37°C por 24h. As cepas que apresentaram sensibilidade a optoquina (halo de inibição > 14 mm) (Figura 8B) foram identificadas como *S. pneumoniae* (FACKLAM; WASHINGTON, 1991; CLSI, 2010).

O teste da sensibilidade à optoquina foi confirmado com o teste da bile solubilidade em solução deoxicolato de sódio a 10%, que foi realizado com a preparação de uma solução 0,5 na escala de turbidez de McFarland ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por minilitro (UFC/ml)), com alça de platina, do crescimento bacteriano de 24 horas. Em seguida 0,5 ml desta solução foi pipetada dentro de um tubo contendo 0,5 ml da solução de deoxicolato de sódio a 10%. Se a solução se apresentasse límpida após 5 a 15 minutos depois, o teste era considerado positivo (Figura 8C). (STRATCHOUNSKI et al., 2006; LAUDERDALE et al, 2006; LAVAL et al, 2006).

Figura 8. A. *S. pneumoniae* corado pela técnica Gram: na seta é possível visualizar cocos dispostos aos pares em pequenas cadeias; B. Teste de sensibilidade à optoquina. C. teste da bile solubilidade.



Fonte: Laboratório de Bacteriologia, UFC, 2011.

5.6. Estocagem das Amostras

Após identificação, todas as amostras de portadores foram estocadas em caldo BHI (OXOID) com 16% (vol/vol) de glicerol e congeladas a -80°C em triplicata para posterior realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, genotipagem capsular e pesquisa de genes de resistência (VIEIRA et al, 2007).

5.7. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

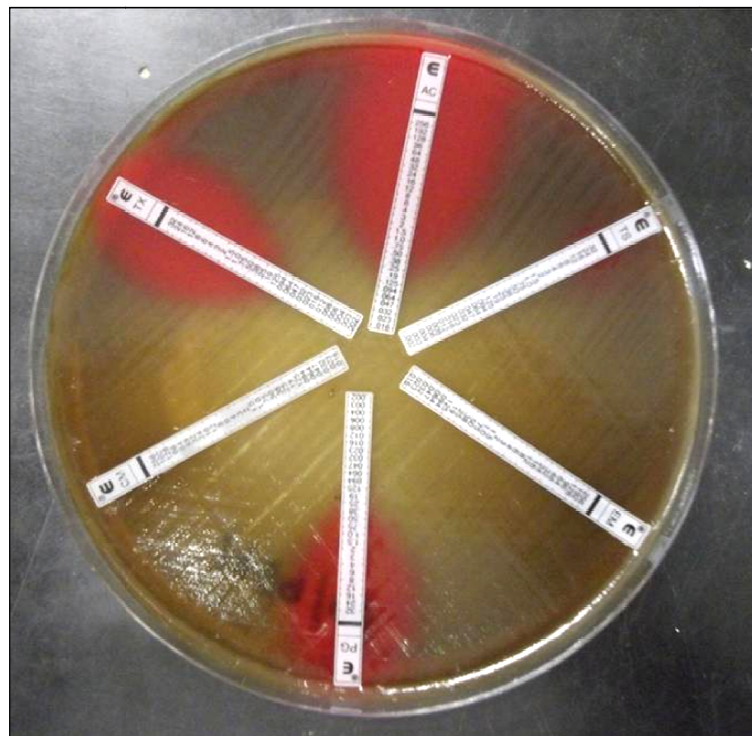
A escolha dos antimicrobianos testados foi realizada com base na utilização na rotina clínica e na sua importância como marcadores de resistência. Os antimicrobianos testados foram: penicilina, amoxicilina, ceftriaxona, clindamicina, eritromicina e sulfametoxazol/trimetoprim e o antibiograma foi realizado pelo método epsilometer-test (*E-test*, BioMérieux).

O método *E-test* é baseado numa combinação dos conceitos de testes de diluição e difusão. Como os métodos de diluição, o *E-test* quantifica diretamente a sensibilidade antimicrobiana. O *E-test* consiste numa fita plástica fina, inerte e não porosa de 5mm largura e 50mm de comprimento. Um lado da fita é marcado com uma escala de leitura de CIM em $\mu\text{g/ml}$. Uma sigla designa a identidade do antibiótico. Um gradiente exponencial pré-estabelecido do antibiótico seco e estabilizado é mobilizado no outro lado da fita. O gradiente reflete uma faixa contínua de concentração, que corresponde a várias diluições num método convencional de CIM.

Inicialmente prepara-se o inóculo em 1 ml de salina com suspensão da colônia bacteriana a fim de obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland, que corresponde $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Em seguida com *swab* a suspensão é semeada em uma placa de agar Mueller Hinton cátion ajustado com sangue de carneiro desfibrinado a 5%. Após o semeio com auxílio de uma pinça aplica-se a fita de *E-test* dos antibióticos a serem testados, onde há uma liberação imediata do antibiótico da fita para o agar. Após incubação, quando o crescimento bacteriano se torna visível, uma elipse de inibição simétrica ao redor da fita é visualizada (Figura 9).

O ponto de corte para determinação de sensibilidade, resistência intermediária e resistência plena para os antibióticos testados foram escolhidas seguindo os padrões do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2010) (Anexo II). Os pontos de corte para penicilina considerados foram correspondente à penicilina oral, uma vez que as amostras testadas foram isoladas de portadores e não de doença invasiva. Os isolados que não foram sensíveis a três ou mais antimicrobianos foram considerados multirresistentes. A cepa *S. pneumoniae* ATCC 49619 foi utilizada como referência da espécie no controle de qualidade interno (FONSECA et al., 2005; STRATCHOUNSKI et al., 2006).

Figura 9. Teste de Sensibilidade a antimicrobianos pelo método de *E-test* para penicilina, ceftriaxona, amoxicilina, clindamicina, eritromicina e sulfametoxazol/trimetoprim.



Fonte: Laboratório de Bacteriologia, UFC, 2011.

5.8. Extração de DNA

Para a realização da extração do DNA as cepas de pneumococo foram retiradas do estoque e inoculadas em caldo BHI (OXOID) e incubadas a 36 ± 1 °C durante 24 horas. No dia seguinte as cepas eram semeadas em placas contendo o meio de cultura BHI ágar (OXOID) suplementado com sangue desfibrinado de carneiro (5%) adicionado de 5 µg/ml de gentamicina e incubadas durante 24 horas a 36 ± 1 °C, em microaerofilia. As células bacterianas, crescidas na placa, foram transferidas para 2ml de BHI caldo que foram incubadas a 36 ± 1 °C durante 24 horas. A extração do DNA pneumocócico foi realizada conforme as recomendações do DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen® Group, 2011).

5.9. Iniciadores

Trinta e nove pares de iniciadores foram usados para atingir os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A/B, 7F, 7C, 8, 9N, 9V, 10A, 10F, 11A, 12F, 13, 14, 15A, 15B/C, 16F, 17F, 18, 19A, 19F, 20, 21, 22F, 23A, 23B, 23F, 24, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F, 38 e 39. Um par de iniciadores foi incluído (*cpsA-f* e *cpsA-r*) como controle interno que tem como alvo o *locus cpsA* presente em todos os pneumococos (Anexo III). (PAI et al., 2006; DIAS et al, 2007).

5.10. Esquema da PCR Multiplex

Para realização da PCR multiplex foi utilizado o protocolo descrito por Pai e colaboradores em 2006 e Dias e colaboradores em 2007 (Anexo IV). Os iniciadores foram utilizados em oito reações de multiplex, e outra reação foi utilizada para diferenciar os sorotipos 6A/B do 6C. Os iniciadores foram agrupados com base na distribuição dos sorotipos dos pneumococos invasivos encontrados no Brasil. Na primeira reação foi colocado um par de iniciadores do gene controle (*cpasA*) e mais cinco pares de iniciadores que tinham como alvo a parte variável do locus *cps*, correspondentes aos sorotipos específicos desta reação. Os isolados que os sorotipos não foram identificados nas primeiras reações foram testados nas reações seguintes até a oitava reação. Os sorotipos não identificados após as oito reações eram considerados como não-tipáveis. Como controle positivo interno foi utilizada a cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619 e como controle negativo foi utilizada água no lugar do DNA bacteriano.

Os PCRs foram realizados em solução contendo 25 µl, com cada mix da reação contendo: HotStarTaq® Master Mix Kit (Qiagen®) e os 12 *iniciadores* e o DNA dos isolados a serem identificados, na concentração de 25µg/ml (20 µg/ml de mix + 5 µg/ml de DNA). Ciclos térmicos realizados em GenePro Thermal Cycler (Bioer Technology) nas seguintes condições: um ciclo a 94°C por 15 minutos seguido de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos (desnaturação), 54°C por 90 segundos (anelamento) e 72°C por 60 segundos (extensão) e 72°C por 10 minutos (extensão final).

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2% (Fisher Bio Reagents) em 1X tampão TBE (100ml) (40 mM Tris, 20 mM de ácido acético glacial, 1 mM EDTA, pH 8.0) a 100 V por 1 hora e 30 minutos. Os géis foram revelados com brometo de etídio (0,5 µg/ml), em luz UV as imagens foram fotografadas e analisadas no ImageQuant 300 (GE Healthcare Life Sciences). Os tamanhos dos produtos de PCR foram comparados com marcador de peso molecular padrão (marcador de 50pb ou 100pb; Fisher Bio Reagents).

5.11. Detecção dos Genes de Resistência

5.11.1. Mutações nas Proteínas Ligadoras de Penicilina - PLPs

Todos os isolados genotipados foram submetidos ao teste de PCR para a detecção das mutações nas PLPs 1a, 2b e 2x. Em cada reação foi realizada com os *iniciadores* desenhados por Nagai e colaboradores (2001) (Anexo III). Os PCRs foram realizados em três soluções com volume final de 25 µl, cada mix da reação contendo: HotStarTaq® Master Mix Kit (Qiagen®) e os *iniciadores* iniciadores da PLP pesquisada. Ciclos térmicos foram realizados em GenePro Thermal Cycler (Bioer Technology) nas seguintes condições: um ciclo a 94°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de amplificação a 94°C por 5 segundos (desnaturação), 50°C por 5 segundos (anelamento) e 72°C por 5 segundos (extensão), sem extensão final. Um controle positivo foi incluído em cada reação, uma cepa de *S. pneumoniae* que não tinha alteração em nenhuma das proteínas de ligação estudadas (1a, 2b e 2x). Um controle negativo também foi incluído em cada reação, o qual continha água mili-q ao invés do DNA pneumocócico.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2% (Fisher Bio Reagents) em 1X tampão TBE (100ml) (40 mM Tris, 20 mM de ácido acético glacial, 1 mM EDTA, pH 8.0) a 100 V por 1 hora e 20 minutos. Os géis foram revelados com brometo de etídio (0,5 µg/ml), as imagens foram fotografadas e analisadas no ImageQuant 300 (GE Healthcare Life Sciences). Os tamanhos dos produtos de PCR foram comparados com marcador de peso molecular padrão (50 pb ou 100 pb ladder; Fisher Bio Reagents). As amostras que apresentaram banda visível no gel de agarose foram as que não sofreram alterações nos genes das *plps*.

5.12. Análise Estatística

O teste utilizado neste trabalho foi o Teste Exato de Fisher, na qual sua hipótese nula testa se as variáveis são independentes (não tem associação). Depois de efetuados os testes, e verificando quais tabelas 2x2 tem associação, foram realizadas as razões de chances. Os dados foram organizados e analisados no software Microsoft Office Excel 2007 em conjunto com o software R 2.14.1.

6. RESULTADOS

6.1. Prevalência de Portadores

Entre janeiro a dezembro de 2011, foram recrutadas 291 crianças saudáveis usuárias de creches municipais da regional V de Fortaleza, com idade entre 20 a 65 meses, com média de 42,5 meses. Foram coletadas uma média de 20 crianças por creche. As coletas foram realizadas em todas as 14 creches municipais da regional V de Fortaleza.

Foram isolados *S. pneumoniae* em 165 crianças, perfazendo uma taxa de portadores sadios de 56,7%. Oitenta e cinco (51,5%) desses portadores eram do sexo masculino. A distribuição dos portadores de acordo com sexo e idade é mostrada na tabela 1. Não houve relação estatística entre sexo e a idade dos portadores.

Tabela 1. Prevalência dos portadores do *S. pneumoniae* distribuída por sexo e idade.

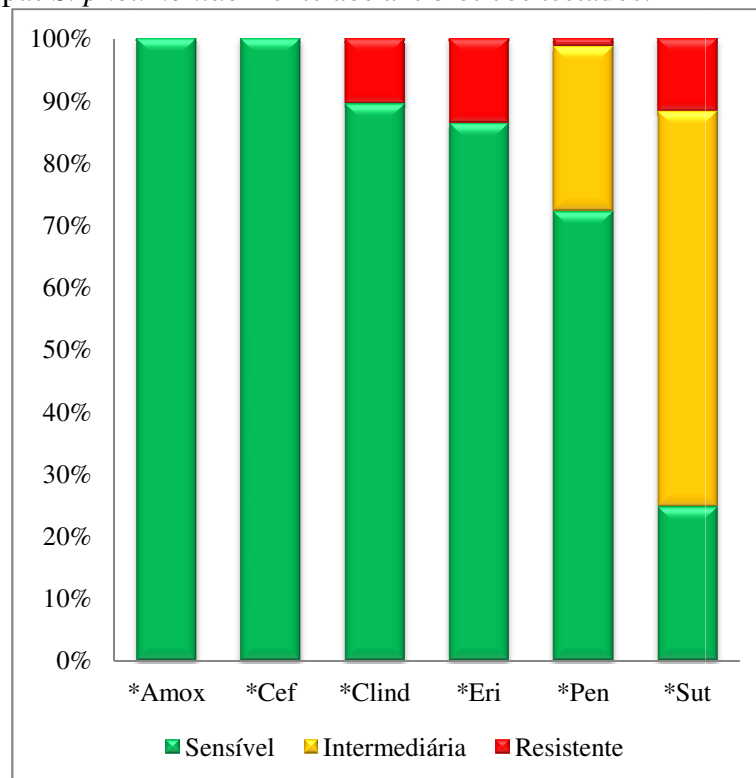
Idade	Masculino (%)	Feminino (%)	Total (%)
20-36 meses	30 (35,3)	29 (36,2)	59 (35,7)
37-48 meses	29 (34,1)	28 (35,0)	57 (34,5)
49-65 meses	26 (30,6)	23 (28,8)	49 (29,8)
Total	85 (51,5)	80 (48,5)	165 (100)

6.2. Sensibilidade aos Antimicrobianos

Das 165 cepas de *S. pneumoniae* isoladas, foi realizado o teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método do *E-test* para 162 cepas, pois três cepas foram perdidas devido à contaminação durante o processo de reativação das mesmas.

Dos 162 isolados, 45 (27,8%) foram resistentes à penicilina, sendo que 43 (95,5%) apresentaram resistência intermediária e 2 (4,5%) resistência plena. Nenhum isolado apresentou resistência à amoxicilina e a ceftriaxona. As taxas de resistência para eritromicina e clindamicina foram 22 (13,6%) e 17 (10,5%), respectivamente. Para sulfametoxazol/trimetoprim, 122 (75,3%) isolados foram resistentes, sendo que 103 (84,4%) apresentaram resistência intermediária e 19 (15,6%) resistência plena. (Figura 10).

Figura 10. Percentuais de sensibilidade e resistência de 162 cepas *S. pneumoniae* frente aos antibióticos testados.



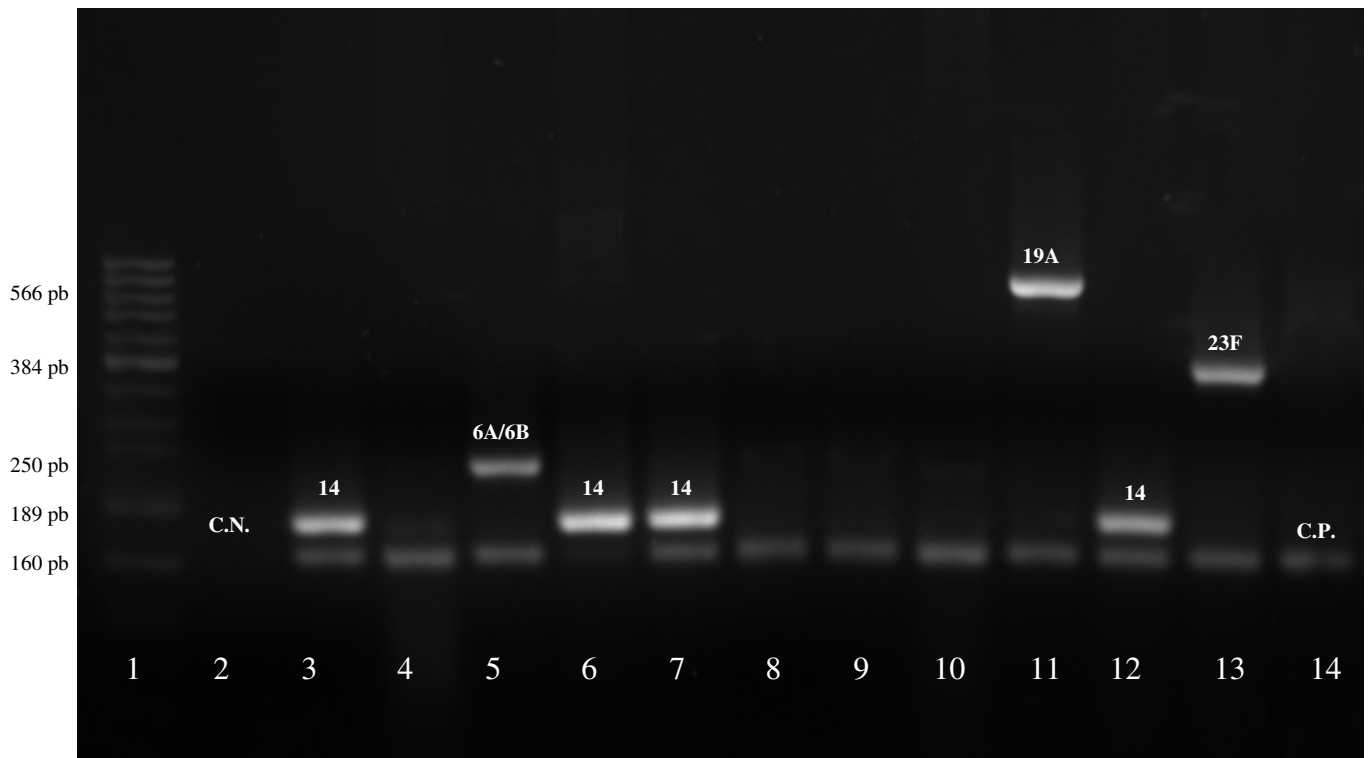
*Amox: Amoxicilina; *Cef: Ceftriaxona; *Clind: Clindamicina; *Eri: Eritromicina; *Pen: Penicilina e *Sut: sulfametoxazol/trimetoprim.

6.3. Genótipos

A genotipagem dos isolados de *S. pneumoniae* de crianças portadoras usuárias de creches foi feita através da técnica de multiplex PCR. Foram incluídos 129 isolados no estudo de genotipagem capsular, pois 36 foram perdidas por contaminação durante o processo de reativação das cepas. Todos os isolados selecionados foram positivos para o gene *cpsA*, comprovando que eram realmente *S. pneumoniae*.

Os genótipos capsulares de 115 isolados de crianças portadoras, dos 129, foram identificados pela técnica de multiplex PCR (Figura 11), enquanto 14 cepas (10,8%) não tiveram os genótipos capsulares identificados, sendo consideradas não-tipáveis.

Figura 11. Eletroforese da 1ª reação de multiplex-PCR em gel de agarose a 2% com brometo de etídio. Linha 1: marcador de peso molecular de 50 pb; linha 2: controle negativo (C.N.); Linha 3-14: controle interno gene *cpsA* (160 pb); Linha 3, 6, 7 e 12: genótipo 14 (189 pb). Linha 5: genogrupo 6 (6A/6B/6C/6D) (250 pb); Linha 11: genótipo 19A (566 pb); Linha 13: genótipo 23F (384 pb); Linhas 4,8,9 e 10: genótipos não identificados na 1ª reação: Linha 14: controle positivo (*S. pneumoniae* ATCC 49619).

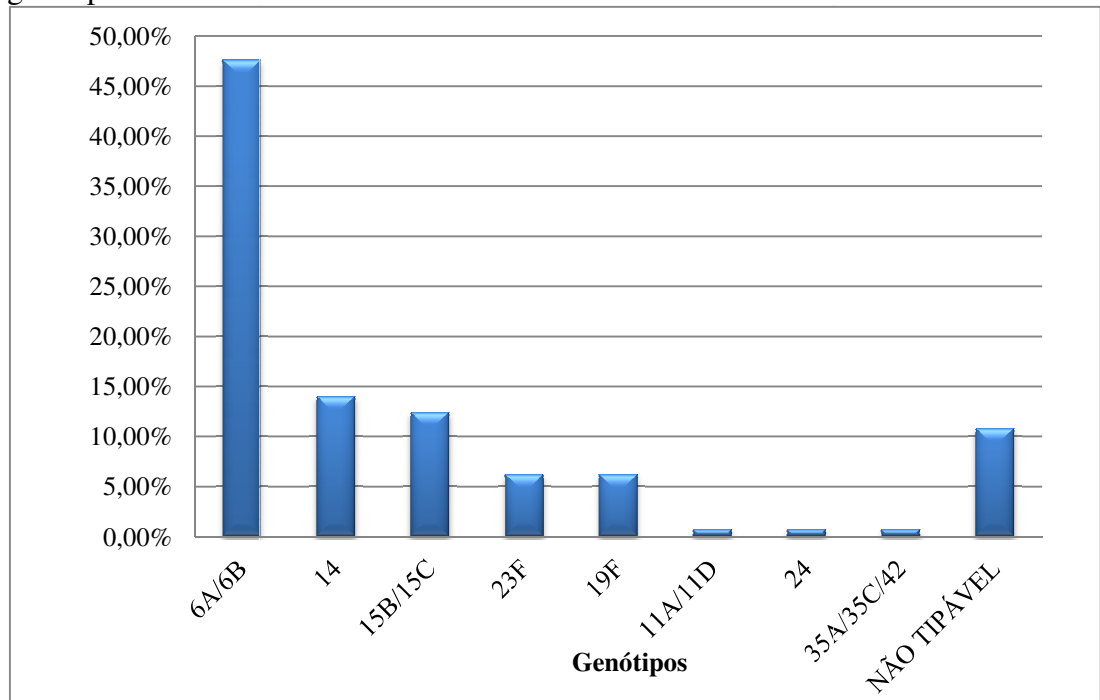


Fonte: Laboratório de Bacteriologia.

Utilizando a primeira reação de multiplex PCR para os genótipos 6A/6B/6C/6D, 9V/9A, 14, 19A e 23F, foram identificados 88 (68,2%) genótipos dos isolados testados. Usando a segunda reação para os genótipos 3, 7F / 7A, 10A, 15B/15C, 18C/18A/18B/18F e 19F, foram identificados mais 24 (18,6%) genótipos dos isolados testados, totalizando 112 (86,8%) genótipos identificados na primeira e na segunda reação.

Oito diferentes genótipos capsulares foram encontrados. Os sorotipos mais comuns encontrados foram 6A/6B (62/47,6%), 14 (18/14%), 15B/15C (16/12,4%), 19F (8/6,2%) e 23F (8/6,2%) (Figura 12).

Figura 12. Distribuição dos 129 isolados de *S. pneumoniae* de acordo com os genótipos encontrados.



Entre os genótipos encontrados, os mais associados com resistência aos antimicrobianos testados foram 6A/6B, 14, 19F e 23F (Tabela 2).

Tabela 2. Número e porcentagem de isolados de pneumococos resistentes a diferentes agentes antimicrobianos, distribuídos de acordo com os genótipos.

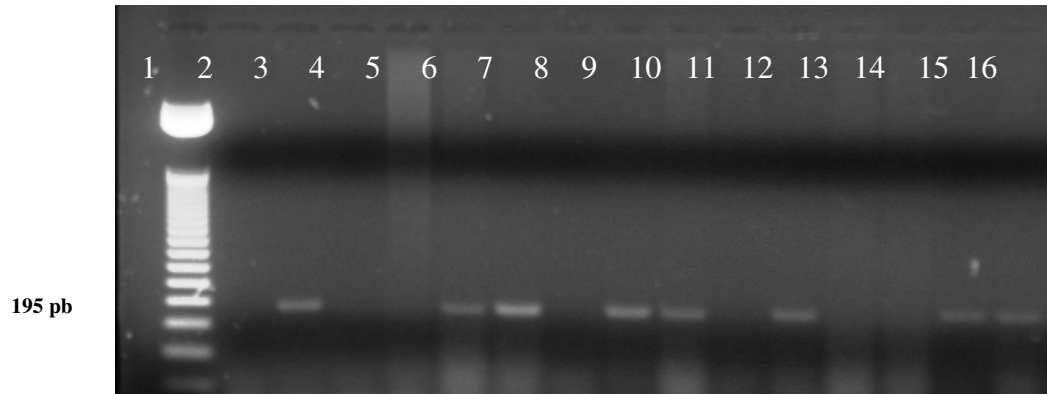
Genótipo	N (%)	PEN-I ^a	PEN-R ^b	ERI-R ^c	CLI-R ^d	STX-I ^e	STX-R ^f	MDR ^g
	129(100)	38(29.5)	2(1.5)	16(12.4)	9(7)	83 (64.3)	15 (11.6)	16 (12.4)
6A/6B	62(47,6)	13	1	6	3	40	8	5
14	18(14)	10	-	2	2	13	2	3
15B/15C	16(12,4)	2	-	-	-	8	1	-
19F	8(6,2)	4	-	5	1	6	2	5
23F	8(6,2)	5	-	1	1	4	-	1
11A/11D	1(0,7)	1	-	-	-	1	-	-
24	1(0,7)	-	-	-	-	1	-	-
35A/35C/42	1(0,7)	-	-	-	-	1	-	-
NT ^h	14(10,8)	3	1	2	2	9	2	2

^aPEN-I: Resistência intermediária à penicilina; ^bPEN-R: Resistência plena à penicilina; ^cERI-R: Resistência à eritromicina; ^dCLI-R: Resistência à clindamicina; ^eSTX-I: Resistência intermediária à sulfametoxazol-trimetoprim; ^fSTX-R: Resistência plena à sulfametoxazol-trimetoprim; ^gMTR: Multirresistente; ^hNT: não-tipável.

6.4. Detecção de Genes de Resistência

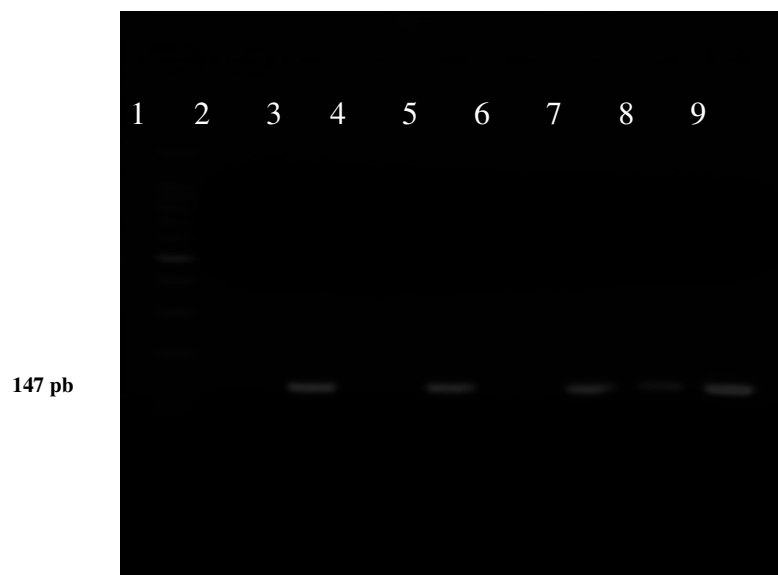
Todos os isolados genotipados de *S. pneumoniae* foram submetidos à técnica de PCR para verificação de alterações nos genes das *plps 1a* (Figura 13), *2b* (Figura 14) e *2x* (Figura 15). A porcentagem de isolados de *S. pneumoniae* com mutação em pelo menos um dos genes das *plps 1a*, *2b* e *2x* foi de 68,2% (88/129).

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 2% brometo de etídio para visualização do produto da *plp 1a* das cepas de *S. pneumoniae* isoladas de crianças portadoras usuárias de creches. Linha 1, marcador de peso molecular de 50 pb; linha 2, controle negativo; linha 3, controle positivo para *plp 1a* (195 pb); linhas 4,5,8,11,13 e 14, amostras com alteração no gene *plp 1a*.



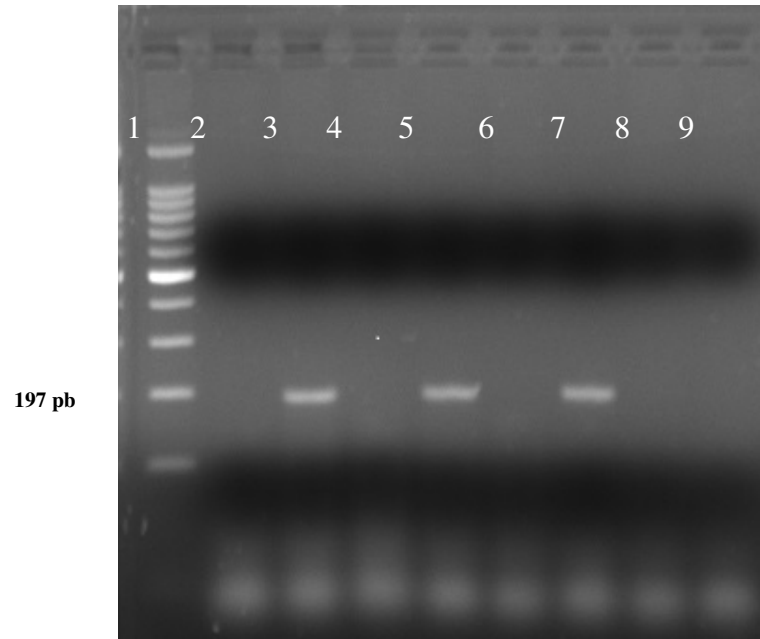
Fonte: Laboratório de Bacteriologia

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 2% brometo de etídio para visualização do produto da *plp 2b* das cepas de *S. pneumoniae* isoladas de crianças portadoras usuárias de creches. Linha 1, marcador de peso molecular de 100 pb; linha 2, controle negativo; linha 3, controle positivo para *plp 2b* (147 pb); linhas 4 e 6, amostras com alteração no gene *plp 2b*.



Fonte: Laboratório de Bacteriologia

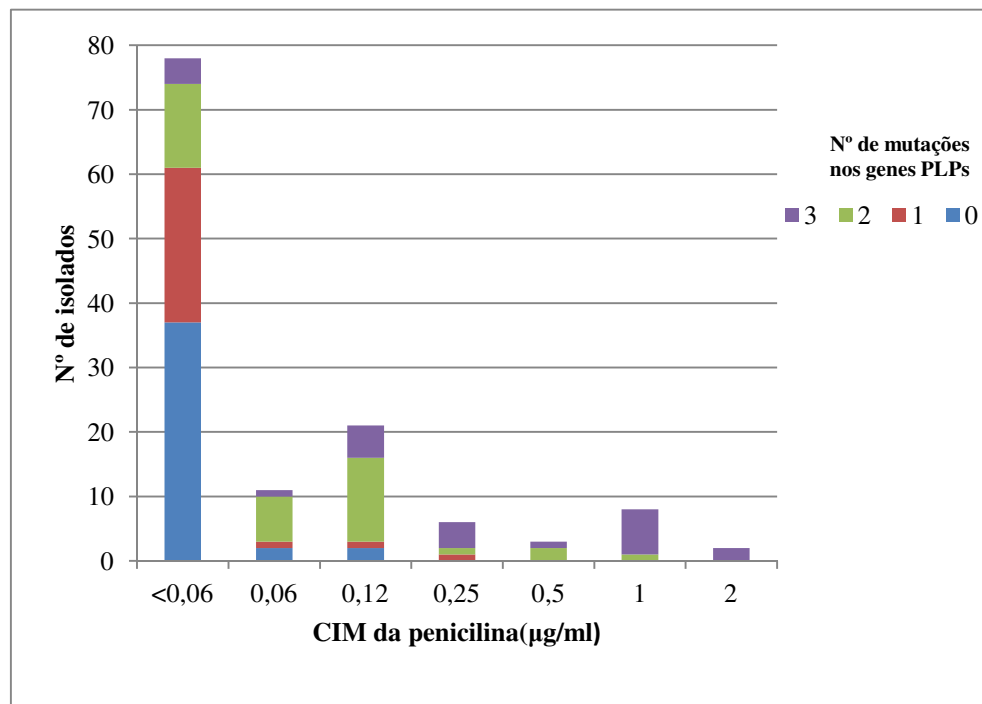
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 2% brometo de etídio para visualização do produto da *plp 2x* das cepas de *S. pneumoniae* isoladas de crianças portadoras usuárias de creches. Linha 1, marcador de peso molecular de 100 pb; linha 2, controle negativo; linha 3, controle positivo para *plp 2x* (197 pb); linhas 4,6,8 e 9 amostras com alteração no gene *plp 2x*.



Fonte: Laboratório de Bacteriologia.

A Figura 16 mostra a correlação entre os CIMs de penicilina de 129 isolados genotipados de *S. pneumoniae* e o número de mutações nos genes *plps*. O número de isolados de pneumococos sensíveis à penicilina foi significativamente maior entre os isolados com ≤ 1 mutação nas *plps* do que entre aqueles com ≥ 2 mutações nas *plps* (71,9% (64/89) e 28,1% (25/89), respectivamente ($p < 0,05$)). Enquanto que o número de isolados de pneumococos não sensíveis à penicilina foi significativamente maior entre os isolados com ≥ 2 mutações nas *plps* do que entre os isolados com ≤ 1 pbp (90% (36/40) e 7,7% (3/40), respectivamente ($p < 0,05$)).

Figura 16. Distribuição dos números de isolados que apresentaram alterações nos genes das *plps* de acordo com a CIM de penicilina



MIC ≤ 0,006 µg/ml (Sensível); 0,12-1 (Resistência intermediária); MIC = 2 (Resistência plena).

6.5. Cobertura Potencial da Vacina

A vacina conjugada 10-valente (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5 e 7F), de acordo com os genótipos encontrados nesse estudo, e considerando uma reação cruzada entre os genótipos 6A/6B no genogrupo 6, tem a cobertura potencial de 74,4% (96/129) sobre o total dos sorotipos encontrados. A cobertura potencial das vacinas conjugadas 10 e 13-valente (10-valente mais os sorotipos 3, 6A e 19A) sobre todos os sorotipos encontrados em nesse estudo é a mesma.

7. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido publicados mundialmente sobre as doenças pneumocócicas e os seus fatores de risco. Isto se deve a importância da doença pneumocócica com sua alta morbidade e mortalidade e também devido ao aumento do número de cepas de *S. pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos. (BRANDILEONE et al. 2006; JEFFERSON et al. 2006; FLAMAING et al. 2008; LAGOS et al. 2008; YANG et. 2008; CHEN et al. 2009; MANTESE et al. 2009; HUNG et al. 2013)

Os esforços mundiais para controlar as doenças pneumocócicas têm se concentrado na pesquisa de novas vacinas que contemplam os sorotipos prevalentes em determinada região. Com a introdução das vacinas pneumocócicas conjugadas 10 e 13 valentes em muitos países, estudos realizados recentemente já tratam do efeito da vacina sobre os sorotipos (ISAACMAN et al. 2010; DEL AMO et al. 2013; RICKETSON et al. 2013; ZUCCOTTI et al. 2014). Porém, dados sobre crianças portadoras saudáveis de *S. pneumoniae* e não vacinadas, como por exemplo, a taxa de portadores, os sorotipos prevalentes e a resistência a antimicrobianos, são necessários para monitorar o efeito da introdução da vacina em países como o Brasil, onde a VPC-10 foi introduzida recentemente (FRANCO et al., 2010; NEVES et al. 2013).

A taxa de portadores de *S. pneumoniae*, bem como os sorotipos, varia com a idade e região geográfica, e tem como principal fator de risco o confinamento, como ocorre em hospitais, creches e prisões, que aumenta a propagação horizontal das cepas de pneumococos (BOAGERT et al. 2004).

Na Ásia, em um estudo realizado em Taiwan (CHEN et al., 2007), com 94 crianças usuárias de creches não vacinadas, com idade entre três e quatro anos foi encontrada uma taxa de portadores de 26,6%.

Hashida e colaboradores (2011), em Fukuoka, no Japão, em uma pesquisa com 363 crianças não vacinadas usuárias de creches, com idade entre 1 e 6 anos encontraram uma taxa de colonização de 43,3%.

Na Coreia, Kim e colaboradores (2011), encontraram uma taxa de portadores, em um estudo realizado com 200 crianças usuárias de creches, não vacinadas, na faixa etária semelhante ao do presente estudo (18-59 meses), de 31,5%.

Na África, Tanzânia, Moyo e colaboradores (2012), em um estudo realizado com 300 crianças saudáveis, não vacinadas, menores de 5 anos de idade, encontraram uma taxa de portadores de pneumococo de 35%.

Dayie e colaboradores (2013), em um estudo realizado em Gana, com 848 crianças usuárias de creches e jardins de infância, menores de 6 anos, não vacinadas, relataram uma taxa de colonização de 32%.

No Marrocos (BOUSKRAOUI et al. 2011), em um estudo com 660 crianças saudáveis, frequentadoras de clínicas de vacinação, menores de 2 anos de idade, não vacinadas, foi encontrada uma taxa de colonização de 45,8%.

Na Turquia em um estudo realizado por Artan e colaboradores (2008), realizando coletas a partir de orofaringe, de 683 crianças saudáveis, frequentadoras de pré-escola, com idade entre 5 e 6 anos, encontraram uma taxa de portador de *S. pneumoniae* de 4,2%

Em um estudo realizado por Roche e colaboradores (2007), em Londres, com crianças usuárias de creches, com a faixa etária variando de seis meses a cinco anos, foi observada uma taxa de portadores de 51%, com uma frequência maior de portadores nas crianças com faixa de idade entre 1-2 anos.

Nunes e colaboradores (2005), em Portugal, obtiveram a partir de crianças usuárias de creches de Lisboa, com faixa etária entre seis meses e seis anos de idade, uma taxa de portadores de 63%.

Na Grécia (KATSAROLIS et al. 2009), em uma pesquisa com 2536 crianças usuárias de creches e de pré-escolas, não vacinadas, encontraram uma taxa de portadores de 29,41%.

Na Rússia, Stratchounski e colaboradores (2006), relataram uma taxa de colonização em crianças usuárias de creches, menores que cinco anos, de 45,8% na Rússia europeia e 53,8% na Rússia asiática.

Monteros e colaboradores (2007) realizaram um estudo no México, com 2777 crianças usuárias de creche, com idade variando entre dois meses a seis anos, e encontraram uma taxa de colonização de 29,9%.

Na América do Sul, na Venezuela, em uma pesquisa realizada por Rivera-Oliveiro e colaboradores (2011), com 1004 crianças saudáveis, com faixa etária variando de 3 a 65 meses, atendidas em um hospital infantil, foi encontrada uma taxa de portadores de 27%.

No Brasil, no Rio de Janeiro, em um trabalho realizado por Neves e colaboradores (2013), com 102 crianças saudáveis usuárias de creches, menores de 6 anos, não vacinadas, foi observada uma taxa de colonização por pneumococo de 58,8%.

Em Goiânia, uma pesquisa realizada por Franco e colaboradores (2010), com 1192 crianças saudáveis usuárias de creches com idade variando de 2 a 59 meses, não vacinadas, mostrou uma taxa de portadores de 57,6%.

Velasquez e colaboradores (2009), em uma pesquisa realizada no Paraná, com 212 crianças saudáveis usuárias de creches, com idade variando de 3 meses a 6 anos, encontraram uma taxa de portador de 43,4%.

Rey e colaboradores (2002) realizaram um trabalho em Fortaleza, em 1998, com 213 crianças usuárias de creches, na faixa etária entre 2-59 meses, e encontraram uma taxa de portadores de 72%.

Analisando os trabalhos citados, é possível observar uma grande variação na taxa de portadores saudáveis em todo o mundo. No Brasil, nos trabalhos citados acima a taxa variou de 43 a 72%. É possível afirmar, que a taxa de portadores encontrados no presente estudo, de 56,7%, realizado com crianças portadoras usuárias de creches, não vacinadas, é alta, porém é menor que a encontrada por Rey, em Fortaleza, há treze anos. Isto se deve, provavelmente, à melhoria nas creches municipais após a aprovação do Plano Municipal de Educação, sancionado em dezembro de 2008, que tem como metas principais a ampliação e adequação da rede física das creches, com redução de crianças por sala, bem como a melhoria do programa de alimentação escolar, melhorando a nutrição das crianças que frequentam creches (Política de Educação Infantil do Município de Fortaleza, 2010).

Essa alta taxa de colonização encontrada no presente estudo é corroborada por vários autores que pontuam as creches, devido ao confinamento de várias crianças em um determinado local, como o principal fator de risco para adquirir a condição de portador de *S. pneumoniae*, uma vez que facilita a disseminação horizontal (BOGAERT et al. 2004; BEREZIN et al. 2007; KATSAROLIS et al. 2009; VELASQUEZ et al. 2009; MEHR; WOOD, 2012; NEVES et al. 2013).

Nosso trabalho não encontrou nenhuma relação entre o sexo e estado de portador, visto que a diferença entre número de crianças portadoras do sexo masculino e do sexo feminino não foi significativa estatisticamente, resultado também encontrado por outros autores em trabalhos realizados com crianças portadoras saudáveis. (REY et al, 2002; BOGAERT et al, 2004; OZDEMIR et al, 2008; ARTAN et al, 2008; VELASQUEZ et al, 2009).

Com relação à faixa etária foi observado no presente estudo que, apesar de não haver diferença estatística na taxa de colonização entre as faixas etárias, houve uma tendência à diminuição da taxa de portadores com o aumento da idade, resultado concordante com estudos de autores que consideram que a taxa de portador é inversamente proporcional à faixa etária. Isso ocorre porque o sistema imune da criança não está completamente desenvolvido, favorecendo assim a colonização por sorotipos de baixa imunogenicidade. A colonização da

nasofaringe por *S. pneumoniae* é um pré-requisito para o surgimento da doença pneumocócica local e sistêmica. Estudos realizados no México (BAUTISTA-MÁRQUEZ et al, 2013), Venezuela (RIVERA-OLIVERO et al, 2011) e no Brasil (BEREZIN et al, 2007), relatam que a colonização da nasofaringe de *S. pneumoniae*, em crianças, reflete diretamente na sensibilidade aos antimicrobianos e na distribuição dos sorotipos em isolados de doenças invasivas (MONTEROS et al, 2007; MEHR et al, 2012).

A disseminação de cepas de *S. pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos tem causado crescente preocupação em todo mundo. Muitos autores relatam em seus trabalhos que isso se deve ao uso abusivo e indiscriminado de antibióticos em crianças. (REY et al. 2002; BRANDILEONE et al. 2006; KORONA-GLOWNIAK et al. 2011; ASSEFA et al. 2013) Variações fenotípicas e genotípicas têm sido observadas, sendo fundamental a vigilância epidemiológica da resistência pneumocócica, a fim de avaliar a disseminação local da resistência aos antimicrobianos e orientar de maneira específica a terapêutica antimicrobiana adequada para cada região.

A taxa de resistência à penicilina encontrada neste estudo de 27,8% (26,5% resistência intermediária e 1,3% resistência plena), determinada pelo método de e-test, pode ser considerada baixa quando comparada com os resultados encontrados por Rey e colaboradores (2002), em estudo realizado em Fortaleza, em que foi encontrada uma taxa de resistência à penicilina de 55% (49% resistência intermediária e 6% resistência plena), determinada através do método de microdiluição, em crianças saudáveis usuárias de creches.

Em um estudo realizado por Velasquez e colaboradores (2009), no Paraná, em 2008 com crianças usuárias de creches foi encontrada uma resistência à penicilina, pelo método de e-test, de 57,6%, uma resistência também superior à encontrada em nosso estudo.

Laval e colaboradores (2006), em Goiânia, encontraram, em um estudo comparativo entre isolados de crianças portadoras saudáveis e isolados de crianças com infecção sistêmica, uma taxa de resistência do *S. pneumoniae* à penicilina de, respectivamente, 19,8% e 19,2%, ou seja, resistências semelhantes.

Porém mais recentemente, no Brasil, em trabalhos realizados por Franco e colaboradores (2010) e Neves e colaboradores (2013) com crianças saudáveis usuárias de creches, encontraram, respectivamente, uma resistência de 25,9%, pelo método de e-test, e de 27,3%, pelo método de microdiluição. Esses estudos apresentam uma taxa de resistência semelhante à encontrada no presente estudo.

Em um estudo de vigilância de doença pneumocócica, realizado por Brandileone e colaboradores, em um período de 12 anos (1993-2004), realizado com 6.470 isolados

invasivos de *S. pneumoniae*, de várias regiões do Brasil, foi observado que a resistência à penicilina, durante o período estudado, aumentou de 10,2% para 27,9%. Os resultados encontrados no presente estudo, apesar de ser com portadores saudáveis de *S. pneumoniae*, mostra semelhança na taxa de resistência à penicilina relatada no estudo de vigilância de doença pneumocócica (BRANDILEONE et al, 2006).

O baixo percentual da resistência à penicilina, observada em nosso trabalho e em estudos recentes com crianças portadoras saudáveis, pode ser justificada pela diminuição do uso deste antibiótico no tratamento da PAC em crianças, uma vez que a amoxicilina é um β -lactâmico de uso oral, indicado como antimicrobiano de primeira escolha (DIRETRIZES BRASILEIRAS EM PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE EM PEDIATRIA, 2007).

O mecanismo de resistência à penicilina ocorre devido à modificação nas proteínas de ligação a penicilina (PLP). Essa modificação reduz a afinidade de ligação do antibiótico β -lactâmico ao alvo, e à medida que aumenta o número de PLPs alteradas, a concentração inibitória mínima (CIM) aumenta gradualmente, passando de sensível a intermediária até chegar à resistência plena, ou seja, quanto mais alterações nas PLPs maior a resistência do pneumococo à penicilina (HAKENBECK et al. 2012). No presente estudo observamos que a grande maioria das cepas de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina apresentaram alterações em duas ou mais PLPs. Nossos resultados são concordantes com Zettler e colaboradores (2006) e Hashida e colaboradores (2011), que também observaram um maior número de alterações nas PLPs nas cepas resistente à penicilina.

Apesar das alterações nas PLPs, não observamos no presente estudo resistência aos outros β -lactâmico, a amoxicilina e a ceftriaxona, isso pode sugerir que a resistência desses antimicrobianos estão associadas a mutações a outras PLPs, como a PLP 3 e PLP 1b, ou a outras proteínas, como proteína histidina-cinase CiaH e glicosil-transferase CpoA (HAKENBECK et al. 2012). No entanto, os isolados que apresentaram duas ou mais mutações nas PLPs com CIM \geq 0,25 mg/ml para penicilina foram menos sensíveis à amoxicilina e ceftriaxona como relatado por Noguchi et al. (2007).

No presente estudo não foi observada resistência das cepas de pneumococos à amoxicilina e ceftriaxona. Apesar da amoxicilina ser o fármaco de escolha para o tratamento ambulatorial da pneumonia adquirida na comunidade (PAC) em crianças (DIRETRIZES BRASILEIRAS EM PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE EM PEDIATRIA, 2007), nenhum trabalho na revisão da literatura feita por nós, com crianças portadoras saudáveis, testou a eficiência da amoxicilina frente ao pneumococo. Com relação à

ceftriaxona, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo também foram relatados em trabalhos realizados com crianças portadoras saudáveis, na Tanzânia (MOYO et al. 2012) e na Etiópia (ASSEFA et al. 2013). Em Fortaleza, Rey e colaboradores (2002) encontraram 99% de sensibilidade à ceftriaxona. Desse modo é possível concluir com nossos resultados comparados com os de 13 anos atrás, que a ceftriaxona é uma droga eficiente frente ao pneumococo nas cepas que circulam em Fortaleza.

O alto índice de resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim encontrado neste trabalho (75,3%) foi semelhante ao descrito por Velasquez e colaboradores (2009) em estudo realizado com crianças usuárias de creches públicas do Paraná, que encontraram uma taxa de resistência de 72,8% e ao de Rey e colaboradores (2002), em estudo realizado em crianças usuárias de creches públicas de Fortaleza, em que foi encontrada uma resistência de 79%. Em um estudo recente realizado por Neves e colaboradores (2013), com crianças usuárias de creches, foi encontrada uma resistência de 51%, que apesar de ser menor que a encontrada no presente estudo, pode ser considerada uma elevada resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim. Este alto índice de resistência pode ser justificado pelo alto consumo do sulfametoxazol-trimetoprim por ser um antimicrobiano oral de baixo custo e durante muito tempo foi de fácil acesso no comércio farmacêutico.

A resistência à eritromicina, de 13,6%, e clindamicina, de 10,5%, encontrada neste estudo, determinada pelo método de e-test, se apresenta menor que a encontrada por Rey e colaboradores (2002), determinada pelo método de microdiluição, onde a resistência encontrada para eritromicina e clindamicina, determinadas pelo método de microdiluição, foi de 23% e 18%, respectivamente.

Velasquez e colaboradores (2009), em trabalho realizado com crianças portadoras saudáveis, usuárias de creches, encontraram uma resistência, a eritromicina e a clindamicina, determinadas pelo método de disco difusão, de 8,7% e 1,1% respectivamente. Mais recentemente, Neves e colaboradores (2013) não encontraram resistência à eritromicina e clindamicina em crianças saudáveis usuárias de creches. Essa diminuição da resistência pode ser explicada pelo controle das vendas de antibióticos em farmácias, regulamentada pelas RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) 44, de outubro de 2010, que restringe a venda de antimicrobianos somente com receita especial concedida pelo médico. Além disso, os macrolídeos são antimicrobianos de segunda escolha para o tratamento da PAC em crianças o que também restringe o uso dos mesmos (DIRETRIZES BRASILEIRAS EM PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE EM PEDIATRIA, 2007).

Apesar de existir mais de 92 sorotipos diferentes de *S. pneumoniae* (LIÑARES et al, 2010), cerca de quinze sorotipos parecem causar a maioria das doenças invasivas. Na América Latina, 13 sorotipos correspondem a mais de 85% dos isolados invasivos (DIAS et al, 2007). A identificação dos sorotipos do pneumococo pode ser realizada utilizando a sorologia convencional (Reação de Quellung) ou a técnica de PCR multiplex (PAI et al, 2006; DIAS et al, 2007).

O método considerado padrão ouro para determinar os sorotipos mais comuns é a sorotipagem convencional (Reação de Quellung), baseada na capacidade de o soro hiperimune específico reagir com a cápsula da bactéria em suspensão (AZARRI et al. 2010; CEYHAN et al. 2010; JOURDAIN et al. 2011). Porém, o alto custo do antissoro, a subjetividade na interpretação e as dificuldades intrínsecas da técnica da sorotipagem convencional limitam o seu uso a poucos laboratórios altamente especializados (PAI et al, 2006).

O desenvolvimento de sistemas de genotipagem baseados em *PCR tem o potencial de superar algumas dificuldades associadas à sorologia convencional, pois além de ser uma abordagem simples, apresenta um melhor custo-benefício* (PAI et al, 2006; DIAS et al, 2007, JOURDAIN et al. 2011).

No presente estudo foram identificados cerca de 90% dos genótipos capsulares pelo método de multiplex PCR, resultado que foi semelhante ao encontrado em trabalhos realizados na África do Sul (MORAIS et al. 2007), Espanha (ERCIBENGOA et al. 2012) e no Brasil (DIAS et al. 2007).

Alguns estudos que compararam a técnica de sorotipagem convencional (Quellung) com a técnica de genotipagem por multiplex PCR, afirmam que o multiplex PCR é o método de identificação capsular mais eficaz para amostras de nasofaringe de portadores de pneumococo (ANTONIO et al. 2009, RIVERA-OLIVERO et al. 2009, ERCIBENGOA et al. 2012). No presente estudo, conseguimos identificar 70% dos genótipos capsulares já na primeira reação, reduzindo, dessa maneira, os custos e o tempo de identificação dos mesmos.

A maior desvantagem da genotipagem baseada em PCR encontrada por nós, e que também foi relatada em outros estudos (PAI et al. 2006; DIAS et al. 2007; JOURDAIN et al. 2011), foi a incapacidade de diferenciar genótipos de sequências genéticas semelhantes, como o 6A e o 6B.

No presente estudo encontramos uma variedade de genótipos capsulares do pneumococo, porém cinco genótipos foram mais comumente encontrados. Quanto à

frequência dos genótipos encontrados neste estudo, em ordem decrescente foram: 6A/6B, seguido dos sorotipos 14, 15B/15C, 19F e 23F.

Os sorotipos 6A/B, 19F e 23F estão entre os mais comuns em diversos estudos realizados com portadores saudáveis, como em Portugal (NUNES et al. 2005), Londres (ROCHE et al. 2007), Gana (DAYIE et al. 2013), Taiwan (KUO et al. 2011), Faixa de Gaza (REGEV-YOCHAY et al. 2012), Israel (GREENBERG et al. 2011), México (LOS MONTEROS et al. 2007), Venezuela (RIVERA-OLIVEIRO et al. 2011) e Peru (MERCADO et al. 2012). No Brasil, esses quatro sorotipos também estão entre os mais comuns em trabalhos realizados estudo realizados em Goiânia (FRANCO et al. 2010) , São Paulo (BEREZIN et al. 2007) e Fortaleza (REY et al. 2002). Em um estudo realizado recentemente no Rio de Janeiro (NEVES et al. 2013), com crianças portadoras saudáveis usuárias de creches, além desses sorotipos mais comuns, também está entre os mesmos o genogrupo 15B/15C, resultado semelhante ao presente estudo.

Dados recentes do SIREVA II (2011) mostraram que os sorotipos mais prevalentes associados à doença invasiva em crianças menores que cinco anos de idade, no Brasil, foram o 14, 6A/6B, 19A, 3, 19F e 23F, sendo estes os responsáveis por aproximadamente 60% dessas doenças. Embora não tenhamos analisado isolados invasivos, estes sorotipos, exceto o 3 e o 19A, que não foram detectados, representaram 74% dos isolados de *S. pneumoniae* detectados no presente estudo.

Foi observado neste estudo que os sorotipos 6A/6B, 14, 19F, e 23F estão diretamente relacionados com a resistência aos antimicrobianos testados, resultado concordante por outros estudos realizados no Brasil (DI FABIO et al. 2001, BRANDILEONE et al. 2006, LAVAL et al. 2006, FRANCO et al. 2010).

No presente estudo, com os genótipos capsulares identificados, foi possível estimar a cobertura potencial da VPC-10, introduzida no ano de 2010 no calendário de vacinação do Brasil, que foi de 74,4%. Consideramos a cobertura potencial da PVC-13 igual a da PVC-10, pois os genótipos capsulares 6A (presente na PCV-13) e 6B, do genogrupo 6, são muito próximos geneticamente, o que leva a uma resposta imunológica cruzada, quando a PCV-10 é aplicada (LUCAREVSCHI et al. 2003; ROCHE et al. 2007; MEHR; WOOD. 2012).

A cobertura vacinal encontrada por nós foi maior que as encontradas em estudos realizados com crianças portadoras saudáveis, como na Tanzânia (MOYO et al. 2012), que foi de 55,7%, em Taiwan (KUO et al. 2011), que foi de 57,5% e no Peru (MERCADO et al. 2012), que foi de 50,2%. No Brasil, a cobertura estimada da PVC-10, foi de 45,5%, no Rio de

Janeiro (NEVES et al. 2013), de 59,3% em Goiânia (FRANCO et al. 2010) e de 55,4% em São Paulo (BEREZIN et al, 2007).

A vacinação é uma medida profilática importante, pois tem como objetivo prevenir a doença pneumocócica, através da imunização de crianças contra os sorotipos vacinais. Um estudo realizado na Colômbia (PARRA et al. 2012), mostrou uma diminuição na taxa de portadores e redução dos sorotipos relacionados à resistência. No Brasil, já foi relatado, em estudo realizado por Afonso e colaboradores (2013), utilizando os dados do Sistema Nacional de Informações Hospitalares, que após a introdução da VPC-10 no programa nacional de imunização, foi observado um declínio significativo nas internações por pneumonia em Belo Horizonte, Curitiba e Recife.

O presente trabalho gerou dados sobre a prevalência dos isolados de *S. pneumoniae* de crianças portadoras saudáveis, usuárias de creches, em Fortaleza. Também revelou dados fenotípicos e genotípicos acerca da resistência dos isolados frente ao antimicrobiano de escolha para o tratamento das doenças pneumocócicas. Dados sobre a resistência a penicilina, e a outras drogas escolhidas para substituí-la, em caso de resistência elevada da mesma, na região, é importante para guiar o tratamento das doenças pneumocócicas, uma vez que na maioria das vezes ele é empírico. Este trabalho também gerou dados sobre os sorotipos presentes entre os isolados de *S. pneumoniae* de crianças portadoras saudáveis, o que contribui para avaliar a cobertura potencial da VPC-10.

8. CONCLUSÃO

- A taxa de colonização de crianças saudáveis usuárias de creches, por pneumococo, em Fortaleza, apesar de menor que a encontrada em 2002 por Rey e colaboradores, é alta;
- As resistências das cepas de *S. pneumoniae* isoladas de crianças sadias usuárias de creches, à penicilina e ao sulfametoxazol-trimetoprim são elevadas.
- Os antimicrobianos amoxicilina e ceftriaxona seriam uma boa escolha para o tratamento empírico de doenças causadas por *S. pneumoniae* isolados neste estudo.
- Os genótipos de pneumococos mais prevalentes encontrados em crianças portadoras usuárias de creches foram o 6A/6B, 14, 15B/15C, 19F e 23F, estando de acordo com o que foi encontrado por outros pesquisadores.
- As cepas de *S. pneumoniae* que apresentaram as CIMs mais elevadas frente à penicilina, foram as que demonstraram duas ou mais PLPs alteradas.
- A cobertura potencial da VPC-10, em isolados de portadores saudáveis de *S. pneumoniae*, é alta quando comparada a outros estudos realizados no Brasil

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADETIFA, I.M. et al. Pre vaccination nasopharyngeal pneumococcal carriage in a Nigerian population: epidemiology and population biology. *PLoS One* 7: e30548, 2012.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, v. 128, n.6, p. 1037-1050, 2007.

ANDRADE, A. L. et al. Population-based surveillance for invasive pneumococcal disease and pneumonia in infants and young children in Goiania, Brazil. *Vaccine*, v. 30, n. 10, p. 1901-1909, 2012.

ANTONIO, M. et al. Evaluation of sequential multiplex PCR for direct detection of multiple serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions. *Journal of medical microbiology*. v. 58, n. 3, p. 296-302, 2009.

ARTAN, M. O.; BAYKAN, Z.; ARTAN, C. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in the oropharynx of healthy preschool children and identification of risk factors. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. v. 61, n. 4, p. 302-303, 2008.

ASLAN, G. et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains in the nasopharynx of healthy Turkish children. *Indian Journal Of Medical Research*, v. 125, n. 4, p. 582-587, 2007.

ASSEFA, A. et al. Nasopharyngeal Carriage and Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Streptococcus pneumoniae* among Pediatric Outpatients at Gondar University Hospital, North West Ethiopia. *Pediatrics & Neonatology*. v. 54, n. 5, p. 315-321, 2013.

AUSTRIAN, R. Pneumococcus: the first one hundred years. *Review of Infectious Diseases*. v. 3, n. 2, p. 183-189, 1981.

BANDETTINI, R.; MELIOLI, G. Laboratory diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections: past and future. *Journal of preventive medicine and hygiene*. v. 53, n. 2, 85-88, 2012.

BAQUERO, F. et al. Antimicrobial Resistance of 1,113 *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Patients with Respiratory Tract Infections in Spain: Results of a 1-Year (1996–1997) Multicenter Surveillance Study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. v. 43, n. 2, p. 357-359, 1999.

BAQUERO, F. et al. Antibiotic consumption and resistance selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 50, suppl. 2, p. 27-37, 2002.

BAUTISTA-MÁRQUEZ, A. et al. Prevalence of Pneumococcal Disease, Serotype Distribution, and Antimicrobial Susceptibility in Mexican Children Younger than 5 Years of Age. *Archives of medical research*, 2013.

BAYRAKTAR, M.R. et al. Nasopharyngeal carriage, antimicrobial susceptibility, serotype distribution and clonal relatedness of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children in Malatya, Turkey. *International journal of antimicrobial agents*. v. 26, n. 3, p. 241-246, 2005.

BEREZIN, E. N. et al. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in nasopharyngeal carriage and in invasive pneumococcal disease in Sao Paulo, Brazil. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. v. 26, n. 7, p. 643-645, 2007.

BOGAERT, D.; GROOT, R.; HERMANS, P.W.M. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet infectious diseases*. v. 4, n. 3, p. 144–154, 2004.

BOUSKRAOUI, M. et al. Étude du portage rhinopharyngé de *Streptococcus pneumoniae* et de sa sensibilité aux antibiotiques chez les enfants en bonne santé âgés de moins de 2ans dans la région de Marrakech (Maroc). *Archives de pédiatrie*, v. 18, n. 12, p. 1265-1270, 2011.

BRANDILEONE, M.C.C. et al. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. *Journal of Medical Microbiology*. v. 55, p.567-574, 2006.

CAMARGOS, P. et al. Penicillin resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America. *Paediatric respiratory reviews*. v. 7, n. 3, p. 209-214, 2006.

CECOVISA ENSP/FIOCRUZ. Vacina infantil 10-valente da GSK não possui aprovação do FDA. 9 ago. 2009. Disponível em: <<http://www4.ensp.fiocruz.br/visa/noticias/noticia.cfm?noticia=1945>>. Acesso em: 5 jan. 2010.

CEYHAN, M. et al. Pneumococcal serotypes causing pediatric meningitis in Turkey: application of a new technology in the investigation of cases negative by conventional culture. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, v. 29, n. 3, p. 289-293, 2010.

CHARALAMBOUS, B. M. *Streptococcus pneumoniae*: pathogen or protector?. *Reviews in Medical Microbiology*. v. 18, n. 4, p. 73-78, 2007.

CHEN, C. J. et al. Nasal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children and adults in northern Taiwan. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. v. 59, n. 3, p. 265-269, 2007.

CHEN, C. J. et al. Host and microbiologic factors associated with mortality in Taiwanese children with invasive pneumococcal diseases, 2001 to 2006. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. v. 63, n. 2, p. 194-200, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement. Approved standard M100-S17. Wayne, PA: CLSI; 2010.

CORNICK, J. E. Genomic identification of a novel co-trimoxazole resistance genotype and its prevalence amongst *Streptococcus pneumoniae* in Malawi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 57, n. 11, p. 5415-5422, 2013.

DAIKOS, G. L. et al. Evolution of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates in the prevaccine era. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 60, n. 4, p. 393-398, 2008.

DAYIE, N. T. et al. Penicillin resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* in Ghanaian children less than six years of age. *BMC infectious diseases*. v. 13, n.1, p. 490, 2013.

DE SOUSA, M.H.H. et al. Relatively penicillin-resistant pneumococcal meningitis in a Brazilian infant. *The Pediatric infectious disease journal*. v. 7, n. 6, p. 433-434, 1988.

DE VELASCO, E.A. et al. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines. *Microbiological reviews*. v. 59, n. 4, p. 591-603, 1995.

DEIBEL, R.H.; SEELEY, J.R. Family II: *Streptococcaceae*. Fam.nov. In: Buchanan, RE & Gibbons, NE, (ed). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1974. p. 490-517.

DEL AMO, E. et al. High invasiveness of pneumococcal serotypes included in the new generation of conjugate vaccines. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013.

DI FABIO J.L. et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-VigiaGroup, 1993 to 1999. *The Pediatric infectious disease journal*. v. 20, n. 10, p. 959–967, 2001.

DIAS, C.A. et al. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *Journal of medical microbiology*. v. 56, n. 9, p. 1185-1188, 2007.

DIRETRIZES BRASILEIRAS EM PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE EM PEDIATRIA. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. v. 33 (Supl 1), S 31-S 50, 2007;

DOERN, G. V. et al. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999–2000, including a comparison of resistance rates since 1994–1995. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 6, p. 1721-1729, 2001.

DŽIDIĆ, S.; ŠUŠKOVIĆ, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*. v. 46, n. 1, p. 11-21, 2008.

ELISSON, C. et al. Invasive pneumococcal infections in Vellore, India: clinical characteristics and distribution of serotypes. *BMC infectious diseases*. v. 13, n. 1, p. 532, 2013.

ERCIBENGOA, 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 Infectious Diseases*. v. 12, n. 1, p. 69, 2012.

FACKLAM, R.R.; WASHINGTON II, J.A. *Streptococcus* and related catalase-negative Gram-positive cocci. In: Balows A, Hausler WJJ, Herrmann KL, Isenberg HD, SHADOMY, H.J. (ed). *Manual of Clin. Microb.* 5th ed. Washington, DC: ASM Press; p. 238-257, 1991.

FADEN, H. et al. Changes in nasopharyngeal flora during otitis media of childhood *The Pediatric infectious disease journal*. v. 9, n. 9, p. 623-626, 1990.

FARRELL, D. J. et al. Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both *erm(B)* and *mef(A)* mediated macrolide resistance. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 42, n. 2, p. 764-768, 2004.

FLAMAING, J. et al. Pneumococcal bacteraemia in Belgium (1994–2004): the pre-conjugate vaccine era. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 61, n. 1, p. 143-149, 2008.

FONSECA, P.B.B. et al. Colonização nasofaríngea pelo *Streptococcus pneumoniae* em crianças com doença falciforme usando penicilina profilática. *Jornal de Pediatria (Rio J)*, v. 81, n. 2, p. 149-154, 2005.

FRANCO, C.M. et al. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. *The Pediatric infectious disease journal*. v. 29, n. 1, p. 77-79, 2010.

GARCÍA, E. et al. Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Research in microbiology*. v. 151, n. 6, p.429-435, 2000.

GLOVER, D. T.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. *Streptococcus pneumoniae* surface protein PcpA elicits protection against lung infection and fatal sepsis. *Infection and immunity*. v. 76, n. 6, p. 2767-2776, 2008.

GREENBERG, D. et al. Emergence of penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* invasive clones in Canada. *Journal of clinical microbiology*. v. 40, n. 1, p. 68-74, 2002.

GREENBERG, D. et al. Nasopharyngeal carriage of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes during pediatric pneumonia as a means to estimate serotype disease potential. *The Pediatric infectious disease journal*. v. 30, n. 3, p. 227-233, 2011.

HAKENBECK, R. et al. Molecular mechanisms of β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiology*. v. 7, n. 3, p. 395-410, 2012

HASHIDA, K. et al. Nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* carriage in Japanese children attending day-care centers. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. v. 75, n. 5, p. 664–669, 2011.

HAUSDORFF, W.P. et al. The epidemiology of pneumococcal, meningococcal, and Haemophilus disease in the Middle East and North Africa (MENA) Region—Current status and needs. *Vaccine*. v. 25, n. 11, p. 1935-1944, 2007.

HENRICHSEN, J. The pneumococcal typing system and pneumococcal surveillance. *Journal of infection*. v.1, p. 31-37, 1979.

HSIEH, Y. C. et al. Characterization of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* among Taiwanese children. *Clinical Microbiology and Infection*. v. 15, n. 11, p. 991-996, 2009.

HUNG, I. F. N. et al. Regional epidemiology of invasive pneumococcal disease in Asian adults: epidemiology, disease burden, serotype distribution, and antimicrobial resistance patterns and prevention. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 6, p. 364–373, 2013.

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*. v. 14, n.3, e197-e209, 2010.

JEFFERSON, T. et al. *Streptococcus pneumoniae* in western Europe: serotype distribution and incidence in children less than 2 years old. *The Lancet infectious diseases*. n. 6, v.7, p. 405-410, 2006.

JOURDAIN, S. et al. Sequential multiplex PCR assay for determining capsular serotypes of colonizing *S. pneumoniae*. *BMC infectious diseases*. v. 11, n. 1, p.100, 2011.

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

KANO, S.; RUBIN, B. K. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 23, n. 3, p. 590-615, 2010.

KATSAROLIS, I. et al. Risk factors for nasopharyngeal carriage of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from a nation-wide surveillance study in Greece. *BMC infectious diseases*. v. 9, 120. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/120>. Accessed: October 3, 2009.

KIM, K. H. et al. Nasopharyngeal pneumococcal carriage of children attending day care centers in Korea: comparison between children immunized with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and non-immunized. *Journal of Korean Medical Science*, v. 26, n. 2, p. 184-190, 2011.

KORONA-GLOWNIAK, I., NIEDZIELSKI, A., MALM, A. Upper respiratory colonization by *Streptococcus pneumoniae* in healthy pre-school children in south-east Poland. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, v. 75, n. 12, p. 1529-1534, 2011.

KUO, C. Y. et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan before and after the introduction of a conjugate vaccine. *Vaccine*. v. 29, n. 32, p. 5171-5177, 2011.

LAGOS, R. et al. Age-and serotype-specific pediatric invasive pneumococcal disease: insights from systematic surveillance in Santiago, Chile, 1994–2007. *Journal of Infectious Diseases*. v. 198, n. 12, p. 1809-1817, 2008.

LAUDERDALE, T.L. et al. Serotype and antimicrobial resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Taiwanese children: comparison of nasopharyngeal and clinical isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. v. 56, n. 4, p. 421-426, 2006.

LAVAL, C.B. et al. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. *Clinical Microbiology and Infection*. v.12, n. 1, p. 50-55, 2006.

LECLERCQ, R.; COURVALIN, P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 46, n. 9, p. 2727-2734, 2002.

LIÑARES, J. et al. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clinical Microbiology and Infection*. v. 16, n. 5, p. 402-410, 2010.

LUCAREVSCHI, B. R. et al. Oropharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by children attending day care centers in Taubaté, SP: correlation between serotypes and the conjugated heptavalent pneumococcal vaccine. *Jornal de pediatria*. v. 79, n. 3, p. 215-220, 2003.

LUND, E. On the nomenclature of the pneumococcal types. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v.20, n. 3, p. 321-323, 1970.

MANTESE, O. C. et al. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of pneumococcus in children: analysis of 9 years. *Jornal de Pediatria*. v. 85, n. 6, p. 495-502, 2009.

MAPA DA CRIMINALIDADE E DA VIOLÊNCIA EM FORTALEZA-PERFIL DA SER V, 2011. Disponível em: http://www.uece.br/labvida/dmdocuments/regional_V.pdf. Acessado em 11/11/2013.

MEHR, S.; WOOD, N. *Streptococcus pneumoniae* – a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. *Paediatric respiratory reviews*. v. 13, n. 4, p. 258-264, 2012.

MERCADO, E. H. et al. Pneumococcal serotypes in carrier children prior to the introduction of anti-pneumococcal vaccines in Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. v. 29, n. 1, p. 53-60, 2012.

MONTEROS, L.E.E. et al. *Streptococcus pneumoniae* isolates in healthy children attending day-care centers in 12 states in Mexico. *Salud Pública de México*. v. 49, n. 4, p. 249-255, 2007.

MORAIS, L. Sequential multiplex PCR for identifying pneumococcal capsular serotypes from South-Saharan African clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*. v. 56, n. 9, p. 1181–1184, 2007.

MORENO, J; CASTAÑEDA, E. Caracterización molecular de aislamientos invasores de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina recuperados de pacientes adultos. *Biomedica*. v. 23, n. 1, p. 77-86, 2003.

MOYO, S. J. et al. Penicillin resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal carrier children under 5 years of age in Dar es Salaam, Tanzania. *Journal of medical microbiology*. v. 61 (Pt 7), p. 952-959, 2012.

MYERS, C.; GERVAIX, A. *Streptococcus pneumoniae* bacteraemia in children. *International journal of antimicrobial agents*. v. 30, supl. 1, p. 24-28, 2007.

NAGAI, K. et al. Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and β -lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 48, n. 6, p. 915-918, 2001.

NELSON, A. L. et al. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infection and Immunity*. v.75, n. 1, p. 83-90, 2007.

NEVES, F. P. et al. Nasopharyngeal carriage, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children from Brazil before the introduction of the 10-valent conjugate vaccine. *BMC infectious diseases*. v. 13, n. 1, 318, 2013.

NOGUCHI, N. et al . Antimicrobial susceptibilities and distribution of resistance genes for beta-lactams and macrolides in *Streptococcus pneumoniae* isolated between 2002 and 2004 in Tokyo. *International Journal of Antimicrobials Agents*. v. 29, n.1, p. 26-33, 2007.

NUNES, S. et al. Trends in Drug Resistance, Serotypes, and Molecular Types of *Streptococcus pneumoniae* Colonizing Preschool-Age Children Attending Day Care Centers in Lisbon, Portugal: a Summary of 4 Years of Annual Surveillance. *Journal of clinical microbiology*. v. 43, n.3 p.1285–1293, 2005.

OBARO, S.; ADEGBOLA, R. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. *Journal of medical microbiology*. v. 51, n. 2, p.98-104, 2002.

PAI, R.; GERTZ, R.E.; BEALL, B. Sequential Multiplex PCR Approach for Determining Capsular Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 44, n. 1, p. 124-131, 2006.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION: INFORME REGIONAL DE SIREVA II, 2010: datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* em processos invasores. Washington, DC; 2011. http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3609&Itemid=

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION: INFORME REGIONAL DE SIREVA II, 2011: datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* em processos invasores. Washington, DC; 2012. http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3609&Itemid= Accessed 12 de Janeiro de 2014.

PARRA, E. L. et al. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution in invasive disease and nasopharyngeal carriage after the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine introduction in Bogotá, Colombia. *Vaccine*. v. 31, n. 37, p. 4033-4038, 2013.

Política de Educação Infantil do Município de Fortaleza; Prefeitura Municipal de Fortaleza, 2010. <http://www.opp.ufc.br/eventos/Politica%20de%20Educacao%20Infantil%20do%20Municipio%20de%20Fortaleza.pdf>.

PLETZ, M.W.R. et al. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 32, n. 3, p. 199-206, 2008.

REGEV-YOCHAY, G. et al. *Streptococcus pneumoniae* Carriage in the Gaza Strip. *PloS one*. v. 7, n. 4, e35061, 2012.

REINERT, R. R. et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 7, 2903-2913, 2005.

REY, L.C. et al. Antimicrobial susceptibility and serotypes of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* in children with pneumonia and in children attending daycare centres in Fortaleza, Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 20, n. 2, p. 86-92, 2002.

RICKETSON, L. J. et al. Trends in Asymptomatic Nasopharyngeal Colonization with *Streptococcus pneumoniae* After Introduction of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Calgary, Canada. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2014.

RIVERA-OLIVERO, I.A. et al. Pneumococcal Carriage among Indigenous Warao Children in Venezuela: Serotypes, Susceptibility Patterns and Molecular Epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*. v. 45, n.11, p.1427-1434, 2007.

RIVERA-OLIVERO, I. A. et al. Multiplex PCR reveals a high rate of nasopharyngeal pneumococcal 7-valent conjugate vaccine serotypes co-colonizing indigenous Warao children in Venezuela. *Journal of medical microbiology*, v. 58, n. 5, p. 584-587, 2009.

RIVERA-OLIVERO I.A. et al. Carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Caracas, Venezuela: the relative invasiveness of serotypes and vaccine coverage. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. v. 30, n. 12, p.1489-1495, 2011.

ROCHE, A. et al. Prevalence of nasopharyngeal carriage of pneumococcus in preschool children attending day care in London. *Archives of disease in childhood*, v. 92, n. 12, p. 1073-1076, 2007.

ROGERS, P.D. et al. Gene expression profiling of the response of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. v. 59, n. 4, p. 616-626, 2007.

ROSSI, F. et al. Susceptibility of *S. pneumoniae* to various antibiotics among strains isolated from patients and healthy carriers in different regions of Brazil (1999-2000). *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. v. 5, n. 6, p. 305-312, 2001.

SAKAI, F.; TALEKAR, S. J.; KLUGMAN, K. P.; VIDAL, J. E. Expression of *Streptococcus pneumoniae* Virulence-Related Genes in the Nasopharynx of Healthy Children. *Plos One*. v. 8, n. 6, e67147, 2013.

SIMELL, B. et al. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Review of Vaccines*. v. 11, n. 7, 841-855, 2012.

SONG, J.H. et al. High incidence of resistance to multiple antimicrobials in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. *Clinical Infectious Diseases*. v.28, n. 6, p.1206-11, 1999.

STRATCHOUNSKI, L. S. et al. Antimicrobial resistance of nasopharyngeal pneumococci from children from daycare centres and orphanages in Russia: results of a unique prospective multicentre study. *Clinical microbiology and infection*. v. 12, n. 9, p. 853-866, 2006.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

VALENZUELA, M.T.; DE QUADROS. Antibiotic resistance in Latin America: A cause for alarm. *Vaccine*, v. 27, p. C25-C28, 2009.

VANDERKOOI, O. G. et al. Predicting antimicrobial resistance in invasive pneumococcal infections. *Clinical Infectious Diseases*. v.40, n. 9, p. 1288-1297, 2005.

VAN DER POLL, T.; OPAL, S. M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *The Lancet*, v. 374, n. 9700, 1543-1556, 2009.

VELASQUEZ, P.A.G. et al. High prevalence of children colonized with penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in public day-care centers. *Jornal de Pediatria (Rio J)*. v. 85, n. 6, p. 516-522, 2009.

VIEIRA, A.C. et al. *Streptococcus pneumoniae*: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid. *Jornal de Pediatria (Rio J)*. v. 83, n. 1, p. 71-78, 2007.

WATSON, D.A. et al. A brief history of the pneumococcus in biomedical research : a panoply of scientific discovery. *Clinical infectious diseases*. v. 17, n. 5, p. 913-924, 1993.

WEISER, J.N. et al. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 100, n.7 p. 4215–4220, 2003.

YANG, F. et al. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Shanghai, China. *International journal of antimicrobial agents*. v. 32, n. 5, p. 386-391, 2008.

ZETTLER, E.W. et al. Polymerase chain reaction used to detect *Streptococcus pneumoniae* resistance to penicillin. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 30, n. 6, p. 521-527, 2004.

ZUCCOTTI, G. et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibilities of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* from healthy children in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era. *Vaccine*. v. 32, n. 5, p. 527-534, 2014).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization. Who position paper. *The Weekly Epidemiological Record*, v. 82, n. 12, p. 93-104, 2007.

APÊNDICE I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Consentimento para Participar no Estudo Prospectivo de *Streptococcus pneumoniae*: resistência a antimicrobianos, identificação de genes de resistência a penicilina e genotipagem capsular.

O que estamos tentando encontrar:

Nós convidamos sua criança para participar no estudo de pesquisa porque seu filho é sadio, e nós queremos descobrir se uma bactéria chamada pneumococo, está presente na parte de trás do nariz de crianças menores de cinco anos, em crianças sem doença. Seu filho/a foi selecionado porque ela/ele frequenta uma creche municipal de Fortaleza. O (a) Sr.(a) e sua criança será requisitada apenas para responder um questionário e colher o material para poder cultivar a bactéria do nariz.

O que acontecerá:

Se o (a) Sr. (a). permitir que sua criança participe do estudo sobre o pneumococo, nós vamos proceder da seguinte maneira:

- Fazer perguntas de um questionário para conhecer as condições de vida da sua família e da sua saúde, se toma remédios ou já se internou, entre outras informações.
- Vamos colher rapidamente um pouco de material da parte de trás do nariz da criança com um pequeno cotonete de haste comprida e flexível (mole), que se dobra com facilidade.
- Esse material será mandado para o Laboratório de Microbiologia Médica – Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal de Fortaleza onde será procurada a bactéria pneumococo que queremos estudar.
- Vamos ver se, caso seu (sua) filho(a) tenha o germe, se ele é resistente aos antibióticos que se costuma usar para infecção de ouvido, pneumonia ou até meningite.

Benefícios:

Sua criança receberá será examinada rapidamente para saber se está bem, depois será colhido o material para o laboratório. Queremos saber se seu(sua) filho(a) e outras crianças sadias carregam o pneumococo no nariz. Os resultados deste estudo podem ajudar no tratamento futuro de outras crianças com infecção grave, de ouvido ou com pneumonia por pneumococo, e até no desenvolvimento de uma vacina que proteja as crianças contra essas infecções.

Riscos:

A colheita do material do nariz é rápida e não apresenta risco porque se a haste encontra um obstáculo no nariz ela se dobra e não fere a criança. Esse procedimento já foi feito em centenas de crianças sadias menores de cinco anos em Fortaleza, sem nenhuma complicação. O único risco é um desconforto rápido na hora de colocar o swab (cotonete flexível). Algumas crianças podem ter enjôo ou ânsia na hora de passar o cotonete, mas que acaba logo. Pode acontecer também do cotonete vir sujo de sangue se a criança estiver gripada, mas isso é sem gravidade.

Confidencialidade

Todas as informações sobre sua criança serão guardadas de maneira confidencial em respeito à privacidade pessoal dela. Somente os investigadores, os membros do Comitê de Ética e pessoas ligadas ao financiamento do estudo terão acesso dados do questionário ou do

resultado do laboratório. Além disso, o nome de seu(sua) filho(a) ficará protegido das pessoas e substituído por um número de identificação.

Direitos de saída do estudo:

A participação de sua criança no estudo é completamente voluntária. Você é livre para saída do estudo em qualquer tempo sem prejudicar qualquer atendimento na creche ou de vacinas. Para isso, você precisa só comunicar aos pesquisadores, que não deseja mais participar do estudo.

Duração do participante no estudo:

Cada criança será examinada e terá uma amostra colhida somente uma vez.

Página de assinaturas

Assinando este termo por vontade própria você estará dando consentimento para a participação de sua criança no estudo de pesquisa clínica e para o uso dos dados coletados para análise científica e sua divulgação, desde que sua identidade pessoal não seja revelada. Você também dá direito ao Comitê de Ética, aos representantes locais e nacionais de regulação em pesquisa e do patrocinador, de comparar estes dados com outros arquivos originais do hospital. Você também está consciente dos procedimentos e necessidades deste estudo, e das possibilidades de risco e desconforto da sua criança que lhe foram explicadas. Todas as dúvidas foram respondidas e você está satisfeito (a) com as respostas que recebeu.

Nome da criança (letra de forma)

Nome do representante legal (letra de forma)

_____ Data: __/ __/ __ Hora _____
Assinatura do representante legal

Pessoa que obteve o consentimento

Eu confirmo que o estudo foi explicado ao representante legal do paciente acima, e que o consentimento para sua participação foi dado.

Nome da pessoa que obteve o consentimento (ou carimbo)

Testemunha imparcial

Eu testemunhei a discussão do termo de consentimento livre e esclarecido e confirmo que todas as informações do termo foram apropriadamente explicadas e aparentemente compreendidas pelo representante legal e que o consentimento foi dado espontaneamente.

Nome da testemunha (letra de forma)

Assinatura da testemunha

APÊNDICE II – Questionário

VIGILÂNCIA DO <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
QUESTIONÁRIO DE PORTADORES SADIOS	
ID do entrevistador (1, 2, 3)	ID <input type="text"/>
Número de identificação	NUMID <input type="text"/>

1. Identificação

1.1 Data da coleta	DATA COLE <input type="text"/>
1.2 LOCAL DA COLETA DE MATERIAL	Nome da creche <input type="text"/>
1.3 Nome da criança <input type="text"/>	SEXO (M,F) <input type="text"/>
1.4 Data de nascimento	DATANAS <input type="text"/>
1.5 Idade	IDADE <input type="text"/> anos <input type="text"/> meses
1.6 Quantas crianças moram na casa	CRIACASA <input type="text"/>
1.7 A criança recebeu a vacina VCP-10 1 Sim 2 Não	VACINA <input type="text"/>

2. Dados clínicos

2.2. A Sra. deu algum remédio para seu filho desde o dia ___ de ___ (30 DIAS ATRÁS) ? (9 = NS) 1 Sim 2 Não 3 Não sabe	DEUREMED <input type="text"/>
2.4. A Sra pode dizer o(s) nome(s) do(s) remédio(s) que seu filho tomou (se puder, mostrar a embalagem) NOME DO REMÉDIO <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
2.5. Onde a criança passa o dia quando ela está boa? 1 Casa 2 Creche 3 Casa de parentes, vizinhos 4 Outro local	CRIANFIC <input type="text"/>

ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Tertuliano Sales 544 – Vila União – Fortaleza – Ceará
Fone/Fax: (85) 3101.4212 – 3101.4283

Fortaleza, 30 de Agosto de 2010

Registro no CEP: 064/2010

Data da Aprovação: 30/09/2010

Título do Projeto: “Vigilância da Doença Pneumocócica e Estado de Portador de Streptococcus Pneumoniae em Crianças Menores de Cinco Anos em Fortaleza”

Pesquisador: Bruno Jaeggler Laranjeira

Orientador(a): Luís Carlos Rey

Instituição: Universidade Federal do Ceará (UFC)

Levamos ao conhecimento de V. S^a, que o Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do Hospital Infantil Albert Sabin – Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, aprovou o projeto supracitado.

O pesquisador deverá apresentar uma cópia do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa do HIAS.


Regina Lúcia Ribeiro Moreno
Coord^a. do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO II – Ponto de corte para determinação de sensibilidade, resistência intermediária e resistência plena para os antibióticos testados segundo o CLSI, 2010.

Table 2G. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			MIC Interpretive Standard (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS									
<p>(5) For nonmeningitis isolates, the penicillin MIC can predict susceptibility to other β-lactams as follows: Penicillin MICs ≤ 0.06 µg/mL (or oxacillin zones ≥ 20 mm) indicate susceptibility to ampicillin (oral or parenteral), ampicillin-sulbactam, cefaclor, cefdinir, ceftiofen, cefpodoxime, ceftrozil, ceftizoxime, cefuroxime, imipenem, loracarbef, and meropenem.</p> <p>Penicillin MICs ≤ 2 µg/mL indicate susceptibility to: amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone, and ertapenem.</p> <p>See comment (3).</p>									
A	Penicillin	1 µg oxacillin	≥ 20	-	-	-	-	-	(6) Isolates of pneumococci with oxacillin zone sizes of ≥ 20 mm are susceptible (MIC ≤ 0.06 µg/mL) to penicillin. Penicillin and cefotaxime or ceftriaxone or meropenem MICs should be determined for those isolates with oxacillin zone diameters of ≤ 19 mm, because zones of ≤ 19 mm occur with penicillin-resistant, intermediate, or certain susceptible strains. For isolates with oxacillin zones ≤ 19 mm, do not report penicillin as resistant without performing a penicillin MIC test.
A	Penicillin parenteral (nonmeningitis)	-	-	-	-	≤ 2	4	≥ 8	(7) Rx: Doses of intravenous penicillin of at least 2 million units every four hours in adults with normal renal function (12 million units per day) can be used to treat nonmeningeal pneumococcal infections due to strains with penicillin MICs ≤ 2 µg/mL. Strains with an intermediate MIC of 4 µg/mL may require penicillin doses of 18 to 24 million units per day. (8) For all isolates other than those from CSF, report interpretations for both meningitis and nonmeningitis.
A	Penicillin parenteral (meningitis)	-	-	-	-	≤ 0.06	-	≥ 0.12	(9) Rx: Use of penicillin in meningitis requires therapy with maximum doses of intravenous penicillin (eg, at least 3 million units every four hours in adults with normal renal function). (10) For CSF isolates, report only meningitis interpretations.
A	Penicillin (oral penicillin V)	-	-	-	-	≤ 0.06	0.12-1	≥ 2	
C	Amoxicillin (nonmeningitis)	-	-	-	-	≤ 2	4	≥ 8	
C	Amoxicillin-clavulanic acid (nonmeningitis)	-	-	-	-	≤ 2/1	4/2	≥ 8/4	

Table 2G
Streptococcus pneumoniae
M02 and M07

Table 2G. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			MIC Interpretive Standard (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
O	Cefepime (meningitis)	-	-	-	-	≤ 0.5	1	≥ 2	(11) For CSF isolates, report only meningitis interpretations. There is not an FDA-approved indication for the use of cefepime for meningitis.
B	Cefepime (nonmeningitis)	-	-	-	-	≤ 1	2	≥ 4	(12) In the United States, only report interpretations for nonmeningitis and include the nonmeningitis notation on the report.
B	Cefotaxime (meningitis)	-	-	-	-	≤ 0.5	1	≥ 2	(13) For CSF isolates, report only meningitis interpretations. (14) <i>Rx</i> : Use of cefotaxime or ceftriaxone in meningitis requires therapy with maximum doses. See comment (3).
B	Ceftriaxone (meningitis)	-	-	-	-	≤ 0.5	1	≥ 2	
B	Cefotaxime (nonmeningitis)	-	-	-	-	≤ 1	2	≥ 4	(15) For all isolates other than those from CSF, report interpretations for both meningitis and nonmeningitis.
B	Ceftriaxone (nonmeningitis)	-	-	-	-	≤ 1	2	≥ 4	
C	Cefuroxime (parenteral)	-	-	-	-	≤ 0.5	1	≥ 2	
CEPHEMS (ORAL)									
C	Cefuroxime (oral)	-	-	-	-	≤ 1	2	≥ 4	
O	Cefaclor	-	-	-	-	≤ 1	2	≥ 4	
O	Cefdinir	-	-	-	-	≤ 0.5	1	≥ 2	
O	Cefpodoxime	-	-	-	-	≤ 0.5	1	≥ 2	
O	Cefprozil	-	-	-	-	≤ 2	4	≥ 8	
O	Loracarbef	-	-	-	-	≤ 2	4	≥ 8	
CARBAPENEMS									
B	Meropenem	-	-	-	-	≤ 0.25	0.5	≥ 1	See comment (3).
C	Ertapenem	-	-	-	-	≤ 1	2	≥ 4	
C	Imipenem	-	-	-	-	≤ 0.12	0.25-0.5	≥ 1	
GLYCOPEPTIDES									
B	Vancomycin	30 µg	≥ 17	-	-	≤ 1	-	-	See comments (3) and (4).
MACROLIDES									
(16) Susceptibility and resistance to azithromycin, clarithromycin, and dirithromycin can be predicted by using erythromycin.									
(17) Not routinely reported on isolates from the urinary tract.									
A	Erythromycin	15 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 0.25	0.5	≥ 1	
O	Azithromycin	15 µg	≥ 18	14-17	≤ 13	≤ 0.5	1	≥ 2	
O	Clarithromycin	15 µg	≥ 21	17-20	≤ 15	≤ 0.25	0.5	≥ 1	
O	Dirithromycin	15 µg	≥ 18	14-17	≤ 13	≤ 0.5	1	≥ 2	

Table 2G. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			MIC Interpretive Standard (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
KETOLIDES									
B	Telithromycin	15 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4	
TETRACYCLINES									
B	Tetracycline	30 µg	≥ 23	19-22	≤ 18	≤ 2	4	≥ 8	(18) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline.
FLUOROQUINOLONES									
B	Gemifloxacin	5 µg	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 0.12	0.25	≥ 0.5	
B	Levofloxacin	5 µg	≥ 17	14-16	≤ 13	≤ 2	4	≥ 8	
B	Moxifloxacin	5 µg	≥ 18	15-17	≤ 14	≤ 1	2	≥ 4	
B	Ofloxacin	5 µg	≥ 16	13-15	≤ 12	≤ 2	4	≥ 8	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥ 21	18-20	≤ 17	≤ 1	2	≥ 4	
O	Grepafloxacin	5 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 0.5	1	≥ 2	
O	Sparfloxacin	5 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 0.5	1	≥ 2	
O	Trovafloxacin	10 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4	
FOLATE PATHWAY INHIBITORS									
A	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/ 23.75 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 0.5/9.5	1/19- 2/38	≥ 4/76	
PHENICOLS									
C	Chloramphenicol	30 µg	≥ 21	-	≤ 20	≤ 4	-	≥ 8	See comment (17).
ANSAMYCINS									
C	Rifampin	5 µg	≥ 19	17-18	≤ 16	≤ 1	2	≥ 4	(19) Rx: Rifampin should not be used alone for antimicrobial therapy.
LINCOSAMIDES									
B	Clindamycin	2 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 0.25	0.5	≥ 1	See comment (17).
STREPTOGRAMINS									
O	Quinupristin-dalfopristin	15 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4	
OXAZOLIDINONES									
C	Linezolid	30 µg	≥ 21	-	-	≤ 2	-	-	See comment (4).

ANEXO III - SEQUÊNCIA DOS PRIMERS E TAMANHO DOS AMPLICONS

	Sequência de Primers (5'-3')	Tamanho do produto (bp)	Referência
<i>CpsA</i>	<i>f</i> - GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC <i>r</i> - GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	160	<i>Pai et al . 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
1	<i>f</i> - CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA <i>r</i> -CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C	280	<i>Pai et al . 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
2	<i>f</i> -TAT CCC AGT TCA ATA TTT CTC CAC TAC ACC <i>r</i> - ACA CAA AAT ATA GGC AGA GAG AGA CTA CT	290	<i>Da Gloria Carvalho et al. 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618</i>
3	<i>f</i> - ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G <i>r</i> - CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G	371	<i>Pai et al . 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
4	<i>f</i> - CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G <i>r</i> - GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G	430	
5	<i>f</i> - ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG <i>r</i> - GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG	362	
6A/B/C/D	<i>f</i> - AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG <i>r</i> - TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA	250	
6C/D	<i>f</i> - CAT TTT AGT GAA GTT GGC GGT GGA GTT <i>r</i> - AGC TTC GAA GCC CAT ACT CTT CAA TTA	727	
7C	<i>f</i> - CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC GGG A <i>r</i> - GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC	260	<i>Pai et al. 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
7F	<i>f</i> - TCC AAA CTA TTA CAG TGG GAA TTA CGG <i>r</i> - ATA GGA ATT GAG ATT GCC AAA GCG AC	599	<i>Da Gloria Carvalho et al. 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618</i>
8	<i>f</i> - GAA GAA ACG AAA CTG TCA GAG CAT TTA CAT <i>r</i> - CTA TAG ATA CTA GTA GAG CTG TTC TAG TCT	201	
9N	<i>f</i> - GAA CTG AAT AAG TCA GAT TTA ATC AGC <i>r</i> - ACC AAG ATC TGA CGG GCT AAT CAA T	516	<i>Dias et al . 2007, J. Med. Microbiol. 56: 1185-1189</i>
9V	<i>f</i> - GGG TTC AAA G TC AGA CAG TG A ATC TTA A <i>r</i> - CCA TGA ATG A AA TCA ACA TT G TCA GTA GC	816	<i>Da Gloria Carvalho et al. 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618</i>
10 ^a	<i>f</i> - GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC <i>r</i> - GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C	628	<i>Pai et al . 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
10F	<i>f</i> - GGA GTT TAT CGG TAG TGC TCA TTT TAG CA <i>r</i> - CTA ACA AAT TCG CAA CAC GAG GCA ACA	248	<i>Da Gloria Carvalho et al. 2010. J. Clin. Microbiol. 48:</i>

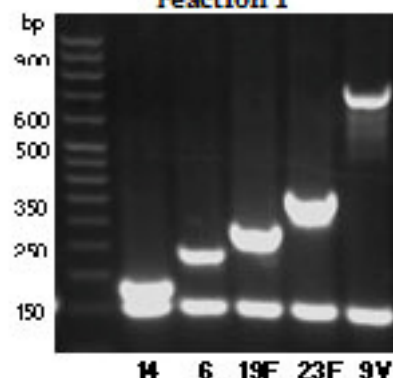
			1611-1618
11 ^a	<i>f</i> - GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G <i>r</i> - GAT TAT GAG TGT AAT TTA TTC CAA CTT CTC CC	463	<i>Pai et al . 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
12F	<i>f</i> - GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G <i>r</i> - CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC	376	
13	<i>f</i> - TAC TAA GGT AAT CTC TGG AAA TCG AAA GG <i>r</i> - CTC ATG CAT TTT ATT AAC CG C TTT TTG TTC	655	Da Gloria Carvalho et al. 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
14	<i>f</i> - GAA ATG TTA CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT <i>r</i> - GCC AAT ACT TCT TAG TCT CTC AGA TGA AT	189	<i>Dias et al . 2007, J. Med. Microbiol. 56: 1185-1189</i>
15 ^a	<i>f</i> - ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C <i>r</i> - GAT CTA GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC	434	<i>Pai et al . 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
15B/C	<i>f</i> - TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA <i>r</i> - CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C	496	
16F	<i>f</i> - GAA TTT TTC AGG CGT GGG TGT TAA AAG <i>r</i> - CAG CAT ATA GCA CCG CTA AGC AAA TA	717	Da Gloria Carvalho et al. 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
17F	<i>f</i> - TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG <i>r</i> - GAT GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC	693	<i>Pai et al . 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
18	<i>f</i> - CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC <i>r</i> - TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC	573	
19 ^a	<i>f</i> - GAG AGA TTC ATA ATC TTG CAC TTA GCC A <i>r</i> - CAT AAT AGC TAC AAA TGA CTC ATC GCC	566	<i>Pimenta et al . 2009. J. Clin. Microbiol. 17: 2353-2354</i>
19F	<i>f</i> - GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C <i>r</i> - GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG	304	<i>Pai et al . 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
20	<i>f</i> - GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G <i>r</i> - CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC	514	<i>Pai et al . 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
21	<i>f</i> - CTA TGG TTA TTT CAA CTC AAT CGT CAC C <i>r</i> - GGC AAA CTC AGA CAT AGT ATA GCA TAG	192	Da Gloria Carvalho et al. 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
22F	<i>f</i> - GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA TTG TC <i>r</i> - CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC	643	<i>Pai et al . 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
23 ^a	<i>f</i> - TAT TCT AGC AAG TGA CGA AGA TGC G <i>r</i> - CCA ACA TGC TTA AAA ACG CTG CTT TAC	722	Da Gloria Carvalho et al. 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
23B	<i>f</i> - CCA CAA TTA G CG CTA TAT TCA TTC AAT CG <i>r</i> - GTC CAC GCT GAA TAA AAT GAA GCT CCG	199	

23F	<i>f</i> - GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC <i>r</i> - CAC AAC ACC TAA CAC TCG ATG GCT ATA TGA TTC	384	<i>Pai et al. 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
24	<i>f</i> - GCT CCC TGC TAT TGT AAT CTT TAA AGA G <i>r</i> - GTG TCT TTT ATT GAC TTT ATC ATA GGT CGG	99	Da Gloria Carvalho et al. 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
31	<i>f</i> - GGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGT GC <i>r</i> - CCG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC	701	<i>Pai et al. 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
33F	<i>f</i> - GAA GGC AAT CAA TGT GAT TGT GTC GCG <i>r</i> - CTT CAA AAT GAA GAT TAT AGT ACC CTT CTA C	338	
34	<i>f</i> - GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC <i>r</i> - CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC	408	
35 ^a	<i>f</i> - ATT ACG ACT CCT TAT GTG ACG CGC ATA <i>r</i> - CCA ATC CCA AGA TAT ATG CAA CTA GGT T	280	Da Gloria Carvalho et al. 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
35B	<i>f</i> - GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG <i>r</i> - CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G	677	<i>Pai et al. 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>
35F	<i>f</i> - GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A <i>r</i> - GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC	517	
38	<i>f</i> - CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG <i>r</i> - ATG TTT GAA TTA AAG CTA ACG TAA CAA TCC	574	
39	<i>f</i> - TCA TTG TAT TAA CCC TAT GCT TTA TTG GTG <i>r</i> - GAG TAT CTC CAT TGT ATT GAA ATC TAC CAA	98	Da Gloria Carvalho et al. 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
<i>pbp 1a</i>	<i>f</i> - AAA CAA GGT CGG ACT CAA CC <i>r</i> - ATAT ACA TTG GTT TAT AGT AAG TT		Nagai, K. et al. <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy.</i> 48, 915-918, 2001
<i>pbp 2b</i>	<i>f</i> - CCTATATGGTCCAAACAGCCT <i>r</i> - GGTC AATTCTGTCGCAGTA		Nagai, K. et al. <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy.</i> 48, 915-918, 2001
<i>pbp 2x</i>	<i>f</i> - CCAGGTTCCACTATGAAAGTG' <i>r</i> - ATCCCAACGTTACTTGAGTGT-3'		Nagai, K. et al. <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy.</i> 48, 915-918, 2001

ANEXO IV - ESQUEMA DE MULTIPLEX PCR

REAÇÃO 1 (Sorotipos: 14; 6; 19F, 23F, 9V)

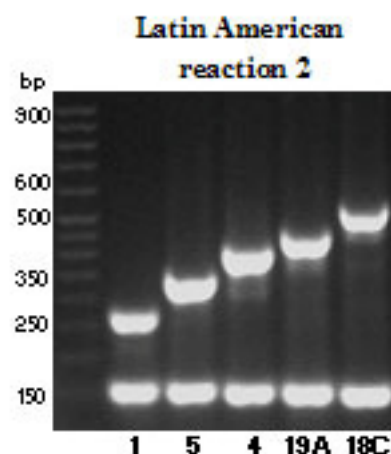
Latin American
reaction 1



Reação 1 (Primer ID)	Concentração original (µM)	Para 25 µM	
		Primer (µL)	Água (µL)
CPSA-F (419100)	303,97	20,56	229,44
CPSA-R (507012)	407,42	15,34	234,66
New 14-F2 (705182)	406,59	15,37	234,63
New 14-R2 (705183)	250,65	24,94	225,06
6A/B/C-R (613642)	397,1	15,74	234,26
6A/B/C-F (613641)	394,43	15,85	234,15
19F-F (508752)	418,99	14,92	235,08
19F-R (508753)	460,06	13,59	236,41
23F-F (705202)	241,38	25,89	224,11
23F-R (705203)	398,88	15,67	234,33
9V-F (613649)	405,55	15,41	234,59
9V-R (613650)	373,75	16,72	233,28

Conc. (µM)	PB
1 rx	
0,1	160
0,1	
0,3	189
0,3	
0,3	250
0,3	
0,5	304
0,5	
0,5	384
0,5	
0,5	753
0,5	

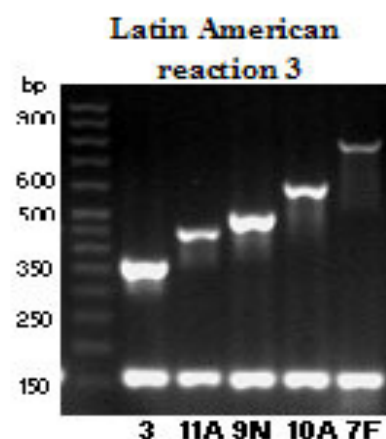
REAÇÃO 2 (Sorotipos: 1; 5; 4; 19A; 18)



Reação 2 (Primer ID)	Concentração original μM	Para 25 μM	
		Primer (μL)	Água (μL)
CPSA-F (419100)	303,97	20,56	229,44
CPSA-R (507012)	407,42	15,34	234,66
1-F (705158)	248,85	25,12	224,88
1-R (705159)	196,43	31,82	218,18
5-F (705164)	221,32	28,24	221,76
5-R (705165)	188,14	33,22	216,78
4-F (510061)	325,42	19,21	230,79
4-R (510062)	257,32	24,29	225,71
19A-F (705194)	389,67	16,04	233,96
19A-R (705195)	240,23	26,02	223,98
sg18-F (705192)	384,88	16,24	233,76
sg18-R (705193)	272,26	22,96	227,04

Conc. (μM)	PB
1 rx	
0,1	160
0,1	
0,3	280
0,3	
0,3	362
0,3	
0,3	430
0,3	
0,3	478
0,3	
0,3	573
0,3	

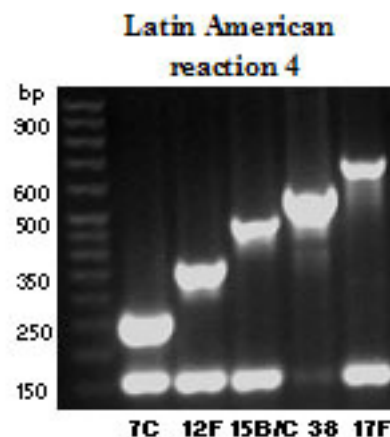
REAÇÃO 3 (Sorotipos 3; 11A; 9N; 10A, 7F)



Reação 3 (Primer ID)	Para 25 µM		
	Concentração Original µM	Primer (µL)	Água (µL)
CPSA-F (419100)	303,97	20,56	229,44
CPSA-R (507012)	407,42	15,34	234,66
3-F (705160)	330,52	18,91	231,09
3-R (705161)	221,61	28,20	221,80
11A-F (705178)	179,37	34,84	215,16
11A-R (705179)	277,59	22,52	227,48
9L/N-F (704852)	320,22	19,52	230,48
9L/N-R (704853)	527,81	11,84	238,16
10A-F (705176)	193,99	32,22	217,78
10A-R (705177)	400,31	15,61	234,39
7F-F (705168)	326,22	19,16	230,84
7F-R (705169)	249,86	25,01	224,99

Conc. (µM)	PB
1 rx	
0,1	160
0,1	
0,3	371
0,3	
0,3	463
0,3	
0,5	516
0,5	
0,5	628
0,5	
0,7	826
0,7	

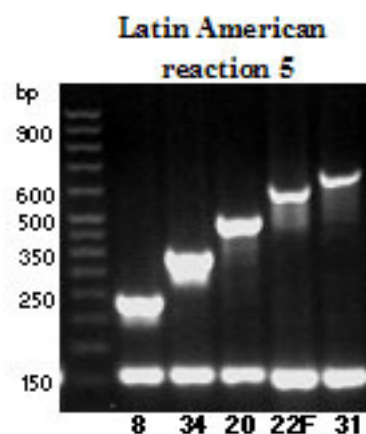
REAÇÃO 4 (Sorotipos 7C; 12F; 15B/C; 38; 17F)



Reação 4 (Primer ID)	Para 25 µM		
	Concentração Original µM	Primer (µL)	Água (µL)
CPSA-F (419100)	303,97	20,56	229,44
CPSA-R (507012)	407,42	15,34	234,66
7C-F (705170)	313,73	19,92	230,08
7C-R (705171)	269,85	23,16	226,84
12F-F (508764)	368,83	16,95	233,05
12F-R (508765)	323,06	19,35	230,65
15B/C-F (705186)	254,7	24,54	225,46
15B/C-R (705187)	218,95	28,55	221,45
38-F (705214)	335,46	18,63	231,37
38-R (705215)	340,23	18,37	231,63
17F-F (705190)	227,87	27,43	222,57
17F-R (705191)	254,52	24,56	225,44

Conc. (µM)	PB
1 rx	
0,1	160
0,1	
0,3	260
0,3	
0,5	376
0,5	
0,3	463
0,3	
0,3	574
0,3	
0,5	693
0,5	

REAÇÃO 5 (Sorotipos 8; 34; 20; 22F; 31)

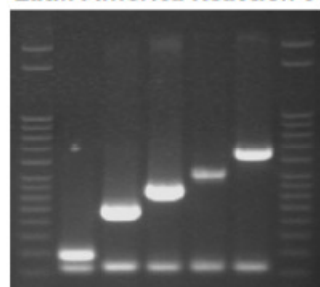


Reação 5 (Primer ID)	Para 25 µM		
	Concentração Original µM	Primer (µL)	Água (µL)
CPSA-F (419100)	303,97	20,56	229,44
CPSA-R (507012)	407,42	15,34	234,66
8new-F (802163)	200,45	31,18	218,82
8new-R (802164)	288,85	21,64	228,36
34-F (705208)	325,42	313,69	19,92
34-R (705209)	257,32	269,99	23,15
20-F (705198)	279,03	220,46	28,35
20-R (705199)	311,46	216,14	28,92
22F-F (613675)	385,48	16,21	233,79
22F-R (613676)	230,64	27,10	222,90
31-F (613679)	422,59	14,79	235,21
31-R (613680)	259,45	24,09	225,91

Conc. (µM)	PB
1 rx	
0,1	160
0,1	
0,2	201
0,2	
0,3	408
0,3	
0,3	514
0,3	
0,5	643
0,5	
0,5	701
0,5	

REAÇÃO 6 (Sorotipos 21; 33F/33A/37; 15A/15F; 35F/47; 16F; 13)

Latin America Reaction 6

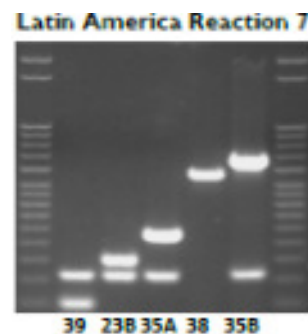


21 33F 15A 35F 13

Reação 6 (Primer ID)	Para 25 µM		
	Concentração original µM	Primer (µL)	Água (µL)
CPSA-F (913424)	454.92	13.74	236.26
CPSA-R (913425)	484.20	12.91	237.09
21-F (914857)	455.75	13.71	236.29
21-R (914829)	432.37	14.46	235.54
33F/33A/37-F (807842)	469.65	13.31	236.69
33F/33A/37-R (807843)	462.94	13.50	236.50
15A/15F-F (914847)	458.05	13.64	236.36
15A/15F-R (914848)	472.92	13.22	236.78
35F/47-F (807848)	534.78	11.69	238.31
35F/47-R (807849)	397.42	15.73	234.27
13-F (911987)	397.93	15.71	234.29
13-R (911988)	458.52	13.63	236.37

Conc. (µM)	PB
1 rx	
0,1	160
0,1	
0,2	192
0,2	
0,3	338
0,3	
0,3	434
0,3	
0,3	517
0,3	
0,4	655
0,5	

REAÇÃO 7 (Sorotipos 39; 23B; 35A/35C/42; 38/25F/25A; 35B)

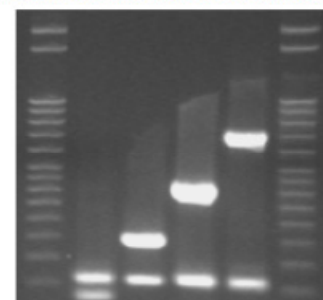


Reação 7 (Primer ID)	Para 25 µM		
	Concentração original µM	Primer (µL)	Água (µL)
39-F (911999)	416.04	15.02	234.98
39-R (912000)	428.01	14.60	235.4
CPSA-F (913424)	454.92	13.74	236.26
CPSA-R (913425)	484.20	12.91	237.09
23B-F (914859)	509.56	12.27	237.73
23B-R (914860)	461.18	13.55	236.45
35A/35C/42-F (911997)	503.85	12.40	237.60
35A/35C/42-R (911998)	488.57	12.79	237.21
38/25F/25A-F (807850)	453.44	13.78	236.22
38/25F/25A-R (804851)	412.76	15.14	234.86
35B-F (914863)	446.26	14.01	235.99
35B-R (918606)	431.88	14.47	235.53

Conc. (µM)	PB
1 rx	
0,2	98
0,2	
0,1	160
0,1	
0,2	199
0,2	
0,3	280
0,3	
0,3	574
0,3	
0,5	677
0,5	

REAÇÃO 8 (Sorotipos 24; 10F/10C/33C; 34; 31)

Latin America Reaction 8

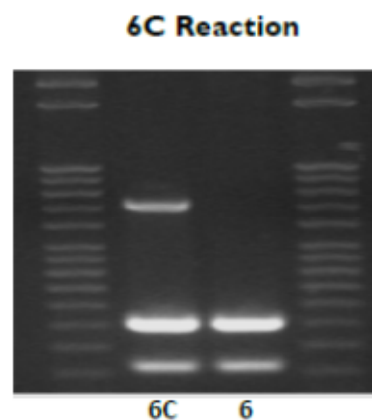


24 10F 34 31

Reação 8 (Primer ID)	Para 25 µM		
	Concentração original µM	Primer (µL)	Água (µL)
24(24A/24B/24F)-F (911995)	458.05	13.64	236.36
24(24A/24B/24F)-R (911996)	453.69	13.78	236.22
CPSA-F (913424)	454.92	13.74	236.26
CPSA-R (913425)	484.20	12.91	237.09
10F/10C/33C-F (911985)	450.73	13.87	236.13
10F/10C/33C-R (911986)	448.77	13.93	236.07
34-F (807844)	463.03	13.50	236.50
34-R (807845)	465.17	13.44	236.56
31-F (906193)	449.31	13.91	236.09
31-R (906194)	445.43	14.03	235.97

Conc. (µM)	PB
1 rx	
0,2	99
0,2	
0,1	160
0,1	
0,3	248
0,3	
0,3	408
0,3	
0,5	701
0,5	

REAÇÃO 6A/6B/6C (Sorotipo 6C)



Reação para 6C (Primer ID)	Para 25 µM		
	Concentração original µM	Primer (µL)	Tampão TE (µL)
CPSA-F (608673)	255,27	24,48	225,52
CPSA-R (608674)	271,86	22,99	227,01
6A/B/C-R (705166)	298,78	20,92	229,08
6A/B/C-F(705167)	257,47	24,27	225,73
6C-F (807798)	407,75	15,33	234,67
6C-R (807799)	409,55	15,26	234,74

Conc. (µM)	PB
1 rx	
0,1	160
0,1	
0,3	250
0,3	
0,5	727
0,5	