



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

Streptococcus pneumoniae: SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E
DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM ISOLADOS DE CRIANÇAS COM
PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE EM FORTALEZA, CEARÁ.

NAYARA SANTOS DE OLIVEIRA

FORTALEZA – CEARÁ

2013

NAYARA SANTOS DE OLIVEIRA

Streptococcus pneumoniae: SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E
DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM ISOLADOS DE CRIANÇAS COM
PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE EM FORTALEZA, CEARÁ.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Médica e Veterinária da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre
em Microbiologia Médica e Veterinária. Área de concentração:
Bacteriologia

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

FORTALEZA – CEARÁ

2013

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

-
- O45s Oliveira, Nayara Santos de.
 Streptococcus pneumoniae : sensibilidade a antimicrobianos e detecção de genes de resistência em isolados de crianças com pneumonia adquirida na comunidade em Fortaleza, Ceará / Nayara Santos de Oliveira. – 2013.
 82 f. : il., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Mestrado em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2013.
 Área de Concentração: Microbiologia Humana e Animal.
 Orientação: Profa. Cibele Barreto Mano de Carvalho.
1. Pneumonia Pneumocócica. 2. Pneumonia. 3. Genes. I. Título.

NAYARA SANTOS DE OLIVEIRA

Streptococcus pneumoniae: SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E
DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM ISOLADOS DE CRIANÇAS COM
PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE EM FORTALEZA, CEARÁ.

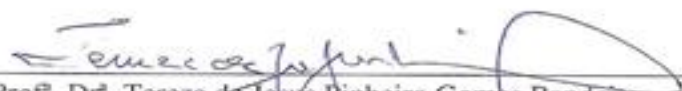
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Médica e Veterinária da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre
em Microbiologia Médica e Veterinária. Área de concentração:
Bacteriologia.

Data da Defesa: 10 / 12 / 2013

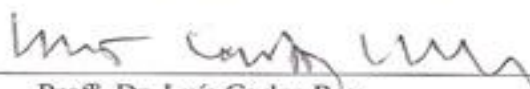
BANCA EXAMINADORA



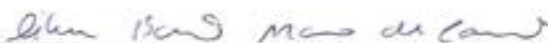
Prof.^o. Dr.^o. Danielle Malta Lima
Universidade de Fortaleza - UNIFOR



Prof.^o. Dr.^o. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof.^o. Dr. Luís Carlos Réy
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof.^o. Dr.^o. Cibele Barreto Mano de Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

*“À Deus, autor da vida e do conhecimento,
à quem devo tudo o que tenho e sou,
a força interior que me conduz a vencer
os obstáculos e a superar as dificuldades!*

*Aos meus pais, Francisca Franci dos Santos Oliveira e
Adelgísio Oliveira da Silva (em memória), por todo incentivo,
compreensão e carinho durante esta trajetória,
apoiando-me de todas as maneiras possíveis.*

*Ao meu noivo, Really Rodrigues,
que apesar de todo meu estresse,
esteve sempre presente, dando-me amor,
carinho e compreensão em cada etapa
desse trabalho”.*

AGRADECIMENTOS

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

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Cibele Barreto M. de Carvalho pela oportunidade, auxílio e constante aprendizado.

Aos membros da banca: Prof. Dr. Luís Carlos Rey, Prof^a. Dr^a. Tereza Bandeira e Prof^a. Dr^a. Danielle Malta, por terem aceitado gentilmente participar da avaliação desse trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Cristiane Cunha Frota por ter disponibilizado o equipamento para as análises de biologia molecular e pela cordialidade com que me recebeu em seu laboratório.

A Prof^a. Dr^a. Fernanda Edna Araújo Moura pela colaboração para realização deste trabalho, pois sem sua participação não seria possível a realização desta obra.

Aos amigos Bruno Jaegger Laranjeira e José Olavo Morais, pelo auxílio concedido para a realização desse trabalho, pelo companheirismo e pelo café de todos os dias.

À Carolinda Vilma S. de Oliveira, secretária do curso, por estar sempre disposta a ajudar, por suas palavras de incentivo e carinho, por sua dedicação e eficiência na resolução de etapas burocráticas.

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

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

Às minhas amigas Dyana Alves, Jucilene Mesquita, Priscila Vieira, Rebeca Candeias, Gabriela Santa, Kelvia Paz, e Denise Lemos pelo apoio e as palavras de carinho e incentivo em momentos difíceis e por compreender meu afastamento durante a conclusão deste trabalho.

Ao Irmão Emanuel, Irmão Lourenço e todos os participantes do Grupo Divina Misericórdia pelas palavras de incentivo e orações, que foram de extrema importância para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

A infecção respiratória aguda (IRA) é uma síndrome clínica, em que cerca de 80% das mortes são atribuídas à pneumonia, uma doença grave que atinge o trato respiratório inferior. O agente etiológico comumente isolado na pneumonia adquirida na comunidade (PAC) é o *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*). As doenças pneumocócicas começam com a colonização do *S. pneumoniae* na nasofaringe, podendo progredir para doença invasiva. Nas últimas décadas, o aumento do número de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a antibióticos β -lactâmicos e a macrolídeos tem dificultado o tratamento das infecções pneumocócicas. Os objetivos desse estudo foram determinar a prevalência de portadores de *S. pneumoniae* em crianças com PAC, o perfil de sensibilidade a antimicrobianos e distribuição dos sorotipos, em Fortaleza, Brasil. As cepas de *S. pneumoniae* foram isoladas de aspirados de nasofaringe de crianças com PAC atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS). Para a determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foi utilizado o método de *E-test* para os seguintes antimicrobianos: penicilina, ceftriaxona, sulfametoxazol/trimetoprim, amoxicilina, clindamicina e eritromicina. A genotipagem das cepas de *S. pneumoniae* foi realizada pela técnica de multiplex PCR. De 527 amostras de crianças com PAC, foram isolados *S. pneumoniae* em 30,17%. De 126 isolados de portadores foi encontrada uma taxa de resistência de 25,8% para penicilina, de 81,2% para sulfametoxazol/trimetoprim, de 21,4% para eritromicina, de 19% para clindamicina e de 0,8% para ceftriaxona e amoxicilina. Das 102 cepas genotipadas, os sorotipos mais comumente encontrados foram 6A/6B, seguido do 14, 19A e 19F. Foram selecionadas 29 cepas resistentes à penicilina para detecção das alterações proteínicas de ligação a penicilina (PBP). Foi encontrada alteração na *PBP 1a* em 69%, já para as *PBP 2b* e *PBP 2x* todas as cepas testadas apresentaram alteração. Já para clindamicina e eritromicina, foram selecionadas 24 cepas para detecção do gene *ermB*. Das 24 cepas testadas, 79,2% possuíam o gene *ermB*. O presente trabalho gerou dados sobre a prevalência de crianças portadoras com PAC de *S. pneumoniae*, revelou dados fenotípicos e genotípicos acerca da resistência dos isolados frente aos antimicrobianos utilizados na clínica e a distribuição dos sorotipos do pneumococo de crianças com PAC atendidas no HIAS.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*, Pneumonia Adquirida na Comunidade, Resistência a antibióticos, Sorotipo.

ABSTRACT

Acute respiratory infection is a clinical syndrome in which about 80% of deaths attributed to pneumonia, which is a serious disease that affects the lower respiratory tract. The etiologic agent commonly isolated in community-acquired pneumonia is *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*). Pneumococcal disease begins with colonization of *S. pneumoniae* in the nasopharynx, which may progress to invasive disease markedly. In recent decades, the increasing number of strains of *S. pneumoniae* resistant to β -lactam antibiotics and macrolides has hampered the treatment of pneumococcal infections. The objectives of this study were to determine: (1) the prevalence of carriers of *S. pneumoniae* in children with community-acquired pneumonia; (2) the profile of the sensitivity of the causative agent and the antimicrobial; (3) the distribution of serotypes existing in Fortaleza. The strains of *S. pneumoniae* were isolated from nasopharyngeal aspirates from children with community-acquired pneumonia treated at Children's Hospital Albert Sabin public. Penicillin, ceftriaxone, sulfamethoxazole / trimethoprim, amoxicillin, clindamycin and erythromycin: To determine the minimum inhibitory concentration method the E-test for the following antimicrobials were used. Genotyping of the strains of *S. pneumoniae* was performed by multiplex PCR. A total of 527 samples with carriers of community-acquired pneumonia in children were isolated 30.17% of strains of *S. pneumoniae*. Of the 126 isolates with community-acquired pneumonia cases a rate of 25.8% resistance to penicillin, a rate of 81.2% for sulfamethoxazole / trimethoprim, a rate of 21.4% to erythromycin, a fee of 19 found % clindamycin and a rate of 0.8% amoxycillin and ceftriaxone. Of the 102 genotyped strains, serotypes most commonly found were 6A / 6B, followed by the 14, 19A and 19F. 29 penicillin-resistant strains for the detection of changes in penicillin-binding proteins (PBP) were selected. Change was found in the PBP 1a in 69%, as for PBP 2b and PBP 2x all tested strains show changes. As for clindamycin and erythromycin 24 strains were selected for detection of ermB gene. Of the 24 strains tested, 79.2% had the ermB gene. This study generated data on the prevalence of children with diagnosis of community-acquired pneumonia carrier of *S. pneumoniae* revealed phenotypic and genotypic data on the resistance of the isolated strains against antimicrobial agents used and the distribution of serotypes of pneumococcal pneumonia in children with acquired in community met at Children's Hospital Albert Sabin.

Keywords: *S. pneumoniae* in community acquired pneumonia, antibiotic resistance and serotype.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Incidência dos casos de pneumonia clínica em crianças menores de 5 anos Adaptado de Rudan et al, 2008.....	16
FIGURA 2 - Sorotipos de pneumococos incluídos na vacina pneumocócica conjugada 7-valente, 10 valente e 13-valente atualmente licenciados.....	26
FIGURA 3 - Figura A. Crescimento em ágar sangue de colônias planas com alfa hemólise ao seu redor, características de <i>S. pneumoniae</i> . Figura B. Sensibilidade à optoquina.....	38
FIGURA 4 - Figura A. teste da solubilidade em bile. Figura B. Coloração de Gram de <i>S. pneumoniae</i>	39
FIGURA 5 - Teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de <i>E-test</i> para penicilina, ceftriaxona, sulfametoxazol/trimetoprim, amoxicilina, clindamicina e eritromicina.....	40
FIGURA 6 - Eletroforese da 1ª reação de multiplex-PCR em gel de agarose a 2% com brometo de etídio.....	47
FIGUARA 7 - Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio para visualização do produto da PCR do gene <i>ermB</i> das cepas de <i>S. pneumoniae</i> de crianças com PAC.....	49
FIGURA 8 - Eletroforese em gel de agarose a 2% brometo de etídio para visualização do produto da PCR do gene <i>PBP2b</i> das cepas de <i>S. penumoniae</i> de crianças com PAC.....	49
FIGURA 9 - Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio para visualização do produto da PCR do gene <i>PBP2x</i> das cepas de <i>S. pneumoniae</i> de crianças com PAC.....	50
FIGURA 10 - Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio para visualização do produto da PCR do gene <i>PBP1a</i> das cepas de <i>S. pneumoniae</i> de crianças com PAC.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Prevalência de crianças portadoras de <i>S. pneumoniae</i> distribuída por sexo.....	44
TABELA 2 – Prevalência de crianças portadoras de <i>S. pneumoniae</i> distribuída por idade.....	45
TABELA 3 - Teste de associação. Sorotipos x Resistência.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Positividade das amostras de aspirado de nasofaringe coletadas durante os anos de 2011 e 2012.....	44
GRÁFICO 2 - Percentual de sensibilidade e resistência das cepas de <i>S. pneumoniae</i> , frente aos antibióticos: amoxicilina, ceftriaxona, clindamicina, eritromicina, penicilina e sulfametoxazol/trimetoprima.....	46
GRÁFICO 3 - Prevalência de sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> durante os anos de 2011 e 2012.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BHI - Brain Heart Infusion

CDC - Center for Diseases Control and Prevencion

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical Laboratory Standard Institute

E-test - Epsilometer-test

HIAS - Hospital Infantil Albert Sabin

IgA1 - Imunoglobulina da classe A1

IRA - Infecção Respiratória Aguda

LytA - Autolisina pneumocócica

MLS_B - Macrolídeos, Licosamidas e Estreptogramina B

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

PAC - Pneumonia Adquirida na Comunidade

PAF - Fator de agregação plaquetária

PCho – Fosforilcolina

PcpA - Proteína de Ligação a Colina Pneumocócica A

PCR - Polymerase Chain Reaction

PBP - Proteína de Ligação a Penicilina

Ply - Pneumolisina

PspA - Adesina pneumocócica de superfície A

VPC - Vacina Pneumocócica Conjugada

SIREVA - Sistema Regional de Vacinas

SUS - Sistema Único de Saúde

VSRH – Vírus Sincicial Respiratório Humano

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
1.1 Importância Clínica do <i>Streptococcus pneumoniae</i>	15
1.2 Aspectos Históricos e Taxonômicos.....	17
1.3 Características Morfológicas e Fisiológicas.....	18
1.4 Fatores de Virulência.....	19
1.5 Epidemiologia e Sorotipos.....	22
1.6 Vacinas pneumocócicas.....	24
2. Resistência a Antimicrobianos.....	26
2.1 Resistência aos β -lactâmicos.....	29
2.2 Resistência aos Macrolídeos.....	31
2.3 Sorotipos e Resistência.....	33
3. Perguntas de Partida.....	35
4. Hipóteses Consideradas.....	35
5. Objetivos.....	36
5.1 Objetivos Gerais.....	36
5.2 Objetivos Específicos.....	36
6. Materiais e Métodos.....	37
6.1 Espécimes Clínicos.....	37
6.2 Aspectos Éticos.....	37
6.3 Coleta do Material de Nasofaringe.....	37
6.4 Isolamento Bacteriano e Identificação de <i>S. pneumoniae</i>	38

6.5	Estocagem das Amostras.....	39
6.6	Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos.....	39
6.7	Extração de DNA.....	41
6.8	Iniciadores.....	41
6.9	Esquema da PCR Multiplex.....	41
6.10	Detecção dos Genes de Resistência.....	42
6.11	Análises Estatísticas dos Resultados.....	43
7.	Resultados.....	44
7.1	Prevalência.....	44
7.2	Sensibilidade a Antimicrobianos.....	45
7.3	Sorotipos.....	46
7.4	Detecção de Genes de Resistência.....	48
8.	Discussão.....	51
9.	Conclusão.....	58
10.	Referências Bibliográficas.....	60
	ANEXOS.....	74
	Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	75
	Anexo II - Aprovação do Comitê de Ética.....	77
	Anexo III - Sequência dos iniciadores e tamanho dos amplicons.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância Clínica e Epidemiológica do *Streptococcus pneumoniae*

As infecções respiratórias agudas (IRAs) estão dentre as infecções que mais causam impactos na saúde pública, cujos agentes infecciosos mais comuns são vírus respiratórios, como o vírus sincicial respiratório humano (VSRH) e o vírus influenza e, em segundo lugar, como causa de IRAs estão as bactérias como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. As IRAs acometem principalmente as crianças, os idosos, as populações socialmente menos favorecidas de países em desenvolvimento e as minorias étnicas (REGAMEY et al., 2008; CARDOSO et al, 2010). Cerca de 80% das mortes por IRAs são atribuídas a pneumonia, uma doença grave que atinge o trato respiratório inferior e que se dissemina especificamente para os pulmões (RUDAN et al, 2008).

A pneumonia é uma das principais causas de morte de crianças, totalizando anualmente 2 milhões de mortes em todo o mundo e aproximadamente 68% dessas mortes ocorrem no primeiro ano de vida (HOMAIRA et al., 2012). São poucos os estudos realizados em países em desenvolvimento para avaliar o impacto da pneumonia na infância adquirida na comunidade (PAC) (RUDAN et al, 2008). A PAC é caracterizada por acometer pacientes fora de unidades hospitalares, ou com até 48 horas de hospitalização, é também uma das infecções mais comuns e mais graves na infância em todo o mundo (WILLIAMS et al, 2002; CORRÊA et al, 2009).

Vários são os agentes etiológicos que podem causar a PAC e a infecção por diferentes tipos de micro-organismos se distingue pela gravidade do quadro. O *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) é responsável por quase metade dos casos de PACs em pacientes pediátricos em todo o mundo. O *S. pneumoniae* também é responsável por doenças invasivas como meningite e bacteremias, e outras doenças não invasivas, como otite média e sinusite (HERNANDEZ-BOU et al. 2012).

Estima-se que ocorram cerca de 156 milhões de casos de pneumonia por ano no mundo em crianças com idade até cinco anos. Essa ocorrência é predominante nos países em desenvolvimento, onde são estimados 0,29 casos/criança/ano, enquanto nos países desenvolvidos são estimados cerca de 0,05 casos/criança/ano (RUDAN et al, 2008). A incidência de PAC nos Estados Unidos (EUA) é de 15-30 casos por 100.000

habitantes; a taxa é maior para pessoas ≥ 65 anos de idade (50-83 casos por 100.000 habitantes) e para crianças ≤ 2 anos de idade (160 casos por 100.000 habitantes), com taxa de letalidade global variando de 20% em adultos jovens a 60% em idosos (GINER et al, 2011). Na Europa e no Norte da América, a incidência anual de crianças com PAC é de aproximadamente 40 casos por 1000 a cada ano, portanto representa maior causa de mortalidade (CEVEY-MACHAREL et al, 2009). Na América Latina, como na maior parte dos países em desenvolvimento, são poucos os estudos sobre a epidemiologia da PAC e a incidência de pneumonia varia de 0,21 a 1,17/criança/ano. Na figura 1 é possível visualizar a incidência mundial de pneumonia clínica em crianças menores de 5 anos de idade (RUDAN et al, 2008).

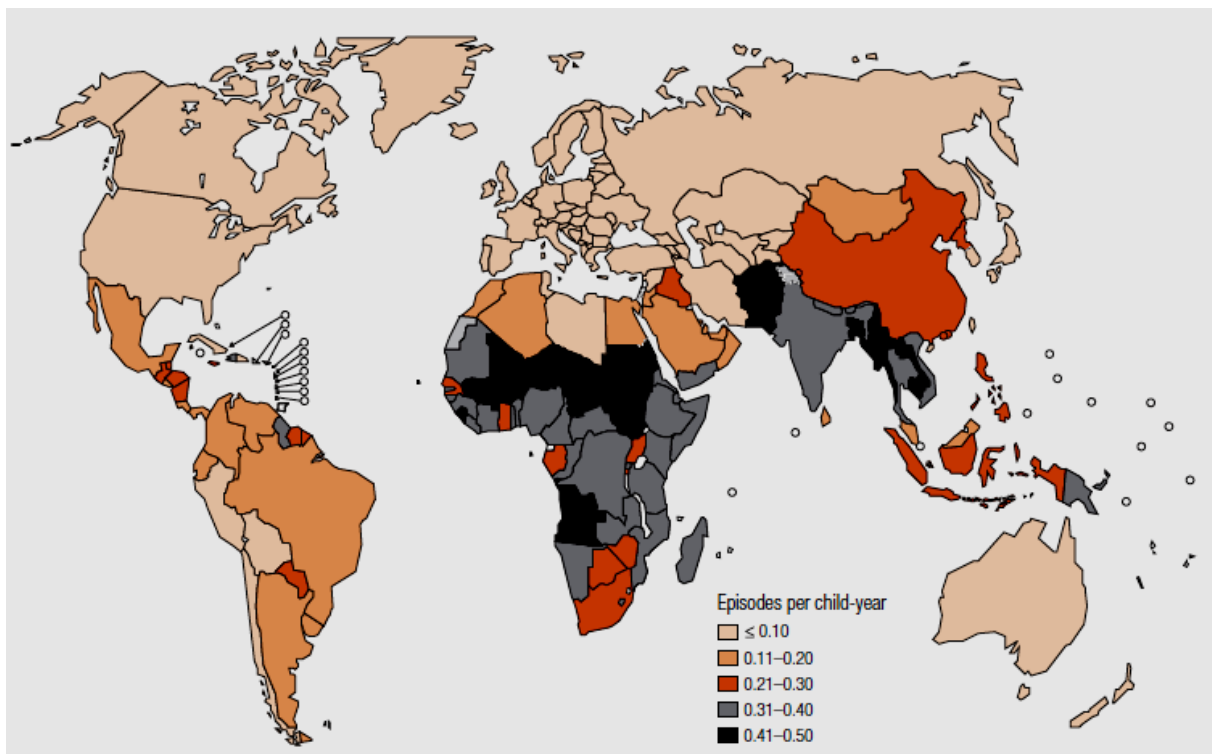


Figura 1. Incidência dos casos de pneumonia clínica em crianças menores de 5 anos no mundo. Adaptado de Rudan et al, 2008.

Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil em 2008, as infecções do trato respiratório foram uma importante causa de morte em menores de 14 anos de idade, nas diversas regiões do país, sendo 67,5% desses óbitos decorrentes de pneumonia. No Brasil, o número estimado de mortes entre os menores de 1 ano de idade, foram de 1.567 em 2008, correspondendo a 3,6% dos óbitos nessa faixa etária. Essas crianças mais novas, incluindo aquelas com menos de 4 semanas de vida, têm uma proporção

significativa de mortes por pneumonia, que pode corresponder a um quarto das mortes a cada ano. No grupo das crianças abaixo dos 14 anos de idade, foram 2.763 mortes em 2008, o que representa 4,5% de todos os óbitos anuais nessa faixa etária. (QUEIROZ, 2010).

Façanha e Pinheiro realizaram um estudo epidemiológico em Fortaleza, com objetivo de revisar todos os registros de atendimentos de pacientes com doença respiratória aguda, em serviços públicos do Sistema Único de Saúde (SUS), no período entre 1996 e 2001. Foram registrados 2.050.845 casos de doença respiratória aguda no período estudado. A faixa etária mais acometida foi a de quatro anos e os casos de pneumonias representaram 7,7% do número total de casos (FAÇANHA et al, 2004). Apesar desses altos índices de mortalidade associados à doença, a pneumonia continua sendo a principal causa de morte prevenível por vacinação em crianças (BLACK et al, 2010), sendo o seu reconhecimento e tratamento precoces importantes fatores que permitem que elas sejam salvas.

1.2 Aspectos históricos e taxonômicos

George Miller Sternberg nos EUA e Louis Pasteur em 1881 na França descreveram bactérias cocoides dispostas aos pares e com forma semelhante a lancetas. Na verdade, cada pesquisador havia descrito o mesmo micro-organismo que foi nomeado *Microbe septicemique de la salive* por Pasteur e *Micrococcus pasteurii* por Sternberg. Em 1886, esse organismo foi renomeado como *Pneumococcus* por Fraenkel, devido a sua propensão de causar doença pulmonar. Em 1920 foi renomeado de *Diplococcus pneumoniae*, uma denominação referindo-se aos cocos arranjados aos pares que causavam pneumonia. Em 1974, foi atribuída a nomenclatura atual ao pneumococo, *Streptococcus pneumoniae*, com base, principalmente, no seu crescimento característico de cocos dispostos em cadeias quando em meio líquido. O *S. pneumoniae* pertence à família Streptococcaceae da ordem Lactobacillales e faz parte do grupo *viridans* que inclui o *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus infantis* e *Streptococcus peroris* (WATSON et al, 1993).

1.3 Características morfológicas e fisiológicas

O *S. pneumoniae* também conhecido como pneumococo, é uma bactéria Gram positiva que se apresenta como cocos em forma de lança e podem permanecer arranjado aos pares ou disposto em pequenas cadeias. As células possuem um diâmetro de 0,5 a 1,2 μm . Apresentam uma cápsula de polissacarídeos que permite a tipagem com antissoros específicos (KELLOGG et al, 2001; BANDETTINI et al, 2012).

A parede dos pneumococos é composta por peptidoglicano e ácido teicóico e as subunidades alternadas de N-acetilglicosamina e de ácido N-acetilmurâmico estão ligadas a cadeia de oligopeptídios. O ácido teicóico dos pneumococos apresenta-se sob duas formas: uma é exposta e ligada à camada de peptidoglicano que se estende através da cápsula sobrejacente e a outra está ligada ao lipídio de membrana plasmática bacteriana chamada de antígeno F. Ambas as formas de ácido teicóico estão associadas a resíduos de fosforilcolina que é característica do pneumococo e desempenha um papel importante na regulação da hidrólise de parede celular destes micro-organismos (KELLOGG et al, 2001).

A morfologia colonial do pneumococo é variável, as cepas que são encapsuladas apresentam colônias que são geralmente grandes, redondas e mucóides e as colônias de cepas não encapsuladas, são menores e planas. O *S. pneumoniae* também apresenta colônias α -hemolíticas e esta característica é resultado da expressão da pneumolisina, uma enzima que degrada a hemoglobina, resultando em uma coloração esverdeada ao redor da colônia crescida em meio de cultura contendo sangue desfibrinado de carneiro. Os pneumococos 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 melhor crescimento em ambiente de microaerofilia e em anaerobiose o pneumococo pode apresentar colônias β -hemolíticas. São também exigentes nutricionalmente e requerem meios de culturas ricos em vitaminas e proteínas (BANDETTINI et al, 2012).

Os pneumococos não apresentam atividade de catalase e de citocromo oxidase. São sensíveis ao aquecimento a 60°C por 30 minutos, solúveis na presença de sais biliares e sensíveis à optoquina, exibindo após a incubação por 18 horas uma zona de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco, formando um halo ≥ 14 mm (KELLOGG et al, 2001).

O *S. pneumoniae* produz uma grande variedade de proteínas de superfície, algumas delas são especializadas para interagir com componentes celulares do hospedeiro durante a colonização ou disseminação da bactéria. A capacidade de adaptação do micro-organismo a diferentes nichos ecológicos do hospedeiro é o ponto crucial do seu mecanismo de patogênese.

1.4 Fatores de Virulência

O *S. pneumoniae* não é primariamente disseminado por indivíduos doentes, mas por portadores saudáveis que albergam a bactéria na nasofaringe. As crianças, por apresentarem elevado índice de colonização, assumem um papel importante na disseminação horizontal deste patógeno na comunidade. A taxa de colonização é maior na infância e é fortemente influenciada pela aglomeração, como, por exemplo, no caso de crianças que frequentam creches e escolas ou que convivem em orfanatos. (VELASQUEZ et al, 2009).

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 micro-organismo no hospedeiro durante a colonização (KADIOGLU et al, 2008). A colonização pode progredir para doença invasiva se as barreiras naturais forem ultrapassadas (BOGAERT et al, 2004).

A nasofaringe humana é o principal sítio de aquisição de bactérias patogênicas do trato respiratório, pois elas estabelecem um estado de colonização assintomática. Diversos estudos vêm confirmando a relação entre a colonização da nasofaringe pelo *S. pneumoniae* e o risco de desenvolver infecção do trato respiratório e doença invasiva (SCHULTZ et al, 2007; BORGARET et al, 2004; KADIOGLU et al, 2008).

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

A parede celular do pneumococo é constituída de peptidoglicano, ácidos teicóico e lipoteicóico que servem como uma âncora para as proteínas de superfície

associadas à parede celular. A fosforilcolina (*PCho*), presente na parede celular, funciona como adesina para o pneumococo que se liga ao receptor do fator de agregação plaquetária (rPAF) através da fixação da fosforilcolina presente na parede celular bacteriana, a ligação a esses receptores induz a internalização do pneumococo e promove a migração intracelular através do epitélio respiratório e endotélio vascular, resultando em doença invasiva (BOGAERT et al, 2004; VAN DER POLL et al, 2009).

Os pneumococos também possuem um grande número de proteínas de superfície e proteínas citoplasmáticas as quais podem ser liberadas ou excretadas para o meio extracelular em níveis variados, favorecendo o processo de adesão do micro-organismo a carboidratos de superfície celular presentes sobre o epitélio não inflamado (BOGAERT et al, 2004).

A aderência inicial dos pneumococos é mediada por proteínas de superfície associadas à parede celular, as adesinas, principalmente pela adesina pneumocócica A (*PspA - Pneumococcal Surface Protein A*) 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 (CHARALAMBOUS et al, 2007; KADIOGLU et al, 2008; BOGAERT et al, 2004). Além disso, a proteína de ligação à colina pneumocócica A (*PcpA*) mostra um aumento da afinidade com o ácido siálico e imobiliza citocinas de células humanas ativadas. A *PcpA* interage diretamente com o receptor de IgA polimérica, o que aumenta a migração dos pneumococos através da barreira da mucosa (BORGARET et al, 2004; GLOVER et al 2008).

A migração do pneumococo para o trato respiratório inferior pode ser evitada se a bactéria for envolvida pelo muco e removida das vias aéreas por ação das células epiteliais ciliadas. Entretanto, o pneumococo neutraliza esse envolvimento produzindo a protease contra a IgA secretora e pneumolisina. A IgA secretora retém o pneumococo à mucina, aumentando à capacidade do micro-organismo colonizar a mucosa do trato respiratório superior, uma vez que a enzima hidrolisa e inativa a IgA presente nas mucosas, multiplicando-se nos tecidos e causando a inflamação (CHARALAMBOUS et al, 2007; VAN DER POLL et al, 2009).

Após o processo de adesão e migração do pneumococo, ocorre a liberação da *LytA*, uma autolisina pneumocócica que cliva o N-acetilmurâmico-L-alanina do peptidoglicano. 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 (Ply) que é uma enzima citoplásmica que se acumula no interior das células do pneumococo (KADIOGLU et al, 2008; VAN DER POLL et al, 2009).

As propriedades de virulência de Ply são, portanto, diretamente dependentes da ação de autolisina. Ply tem várias funções distintas, especialmente na patogênese precoce da infecção por pneumococo. A Ply liga-se ao colesterol na membrana das células hospedeira produzindo poros; tal atividade pode destruir as células epiteliais ciliadas e as fagocíticas. A enzima também inibe a atividade bactericida de células fagocíticas, interrompe a motilidade dos cílios 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 neuraminidase, também conhecida como sialidase, é uma enzima que cliva os resíduos terminais de ácido siálico de glicoproteínas, glicolípidos e oligossacáridos de superfície celular. Além disso, tem um papel importante na disseminação e crescimento do *S. pneumoniae* em tecidos infectados, diminui também a viscosidade do muco que reveste o epitélio respiratório e altera a estrutura de oligossacarídeos, expondo os receptores e facilitando a colonização (PRADO, 2001; KADIOGLU et al, 2008).

A hialuronato liase (Hyl) é uma enzima liberada pelo pneumococo capaz de degradar o ácido hialurônico presente nas células do hospedeiro, com a finalidade de aumentar a permeabilidade dos tecidos, facilitando assim a invasão e disseminação do pneumococo (KADIOGLU et al, 2008).

O antígeno capsular é o mais importante fator de virulência do pneumococo, pois a cápsula tem um papel importante na colonização, invasão e disseminação do trato respiratório, além de proteger a bactéria contra a fagocitose (CHARALAMBOUS et al, 2007; VAN DER POLL et al, 2009). A cápsula é um polímero de alto peso molecular, composto de subunidades oligossacarídicas repetitivas, cada uma contendo de duas a oito moléculas, que tem como principal função proteger a célula bacteriana da fagocitose. A cápsula polissacarídica também é usada para a classificação sorológica das cepas, permitindo a identificação de 92 sorotipos de *S.pneumoniae* identificados até o momento. Os polissacarídeos capsulares purificados dos sorotipos prevalentes são usados em vacinas polivalentes. (LIÑARES et al, 2010).

A expressão da virulência varia de acordo com a localização da bactéria no hospedeiro e a densidade populacional. Pneumococos também são capazes de formar biofilmes que podem induzir meningite e pneumonia, entretanto pneumococos em biofilme apresentam menor capacidade de disseminação no sangue. Em contraste, células planctônicas, de vida livre, são mais propensas a induzir bacteremia, porém têm menos sucesso em causar pneumonia (OGGLIONI et al, 2006).

1.5 Epidemiologia e Sorotipos

Existem 92 sorotipos de *S. pneumoniae* imunologicamente distintos e identificados, diferindo na composição química dos seus polissacarídeos capsulares (LIÑARES et al, 2010). Dentre esses, cerca de quinze sorotipos parecem causar a maioria das doenças invasivas. Na América Latina, 13 sorotipos (1, 3, 4, 5,6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F) correspondem a mais de 85% dos isolados invasivos (DIAS et al, 2007). Os sorotipos responsáveis pela maior parte das infecções pneumocócicas são: 1, 3, 7, 9V, 6A, 14, 19A e 23F em adultos e em crianças 1, 5, 6B, 14, 19F, 7, 9V, 12 e 23F (MANTESE et al, 2009).

Camargos e colaboradores realizaram um estudo no ano de 1993 com isolados de *S. pneumoniae* de crianças de seis países da América Latina e verificaram que os sorotipos mais prevalentes são: 14, 5, 1, 6A/B, 23F, 7F, 9V, 19F, 18C, 19A e 9N (CAMARGOS et al, 2006). No Brasil, a distribuição dos sorotipos prevalentes, segundo um estudo realizado por Di Fabio e colaboradores de 1993 a 1999, em que foram coletadas 4.105 cepas pneumocócicas invasivas de crianças até 6 anos de idades, os sorotipos comumente encontrados durante o período de vigilância foram o 14, 6A/6B, 1, 18C, 5, 23F, 19F e 9V (DI FABIO et al, 2001). Em Fortaleza, em um estudo realizado por Rey e colaboradores (2002), isolou-se *S. pneumoniae* em 500 crianças portadoras sadias e crianças com pneumonia, atingindo o índice de 60% de crianças sadias portadoras, no mesmo estudo foi identificado também os sorogrupos mais comuns foram os 6, 19, 23 e 14.

A distribuição dos 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 (VIEIRA et al, 2007). A investigação sobre a distribuição dos sorotipos depende da sorotipagem convencional (Reação de Quellung) para determinação direta dos sorotipos de *S.*

pneumoniae. Entretanto, a utilização da sorotipagem convencional é restrita a poucos laboratórios altamente especializados devido ao alto custo do anti-soro, subjetividade na interpretação e dificuldades intrínsecas da técnica. O desenvolvimento de sistemas de genotipagem baseado 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).

Desde 1994, *Center for Diseases Control and Prevencion* e a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugerem que estudos de isolados da nasofaringe, quando provenientes de uma população representativa, podem ser úteis no monitoramento da resistência do pneumococo aos diversos antimicrobianos utilizados na comunidade (CDC 1997).

Dentre os 92 sorotipos de pneumococos identificados, existem alguns sorotipos específicos que estão mais associados à resistência a penicilina e a eritromicina na faixa pediátrica. Os chamado sorotipos pediátricos incluem os sorotipos 6B, 6A, 9V, 14, 15A, 19F, 19A e 23F (LIÑARES et al, 2010).

Estudos realizados no Brasil (ANDRADE et al, 2010), Rússia (STRATCHOUNSKI et al., 2006), Bélgica (MALFROOT et al, 2004) e Canadá (LAVAL et al, 2006) têm confirmado que a colonização da nasofaringe pelo *S. pneumoniae* em crianças pode refletir a distribuição de sorotipos e, principalmente, o perfil e a tendência de sensibilidade antimicrobiana da bactéria proveniente de doença invasiva.

No Brasil, em um estudo multicêntrico, realizado em um período de 12 anos (1993-2004) de vigilância de doença pneumocócica e realizado por Brandileone e colaboradores (2006), mostrou que dentre as 6470 cepas de *S. pneumoniae* invasivas identificadas, 69,3% foram isoladas do líquido cefalorraquidiano (LCR), 19,1% de pneumonia invasiva e 11,6% de bacteremia, sepse, artrite ou abscesso abdominal. Os sorotipos mais comumente isolados foram 14, 6B, 23F, 19A, 19F, 23B, 6A e 9V.

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 fumo e aglomerados (creches, quartéis e asilos). Em média, esta taxa de

colonização é de 30 a 50% em crianças pequenas e 10 a 20% em adultos (REY et al, 2002; BOGAERT et al, 2004; KATSAROLIS et al, 2009). Estes fatores também estão associados a infecções respiratórias virais recorrentes, sendo levantada a hipótese de que as infecções virais podem predispor em crianças, a doença pneumocócica invasiva (PELTOLA et al., 2011).

Vu e colaboradores realizaram um estudo em Nha Trang no Vietnam em 2006, que foram coletadas 550 amostras de crianças. Destas, 274 eram de crianças com pneumonia com confirmação radiológica e 276 amostras de crianças que estavam com infecção do trato inferior. Também foram incluídas no estudo, como controle, 350 crianças saudáveis. Foi demonstrado no estudo uma forte associação entre o aumento da carga bacteriana de *S. pneumoniae* e co-infecção viral em crianças com pneumonia. Vários vírus respiratórios (influenza A, VSRH, rinovírus) foram associados com um aumento na colonização por *S. pneumoniae* na nasofaringe de crianças com pneumonia. Também houve uma tendência para uma associação entre vírus menos comuns (metapneumovírus humano, bocavírus, adenovírus e vírus Parainfluenza-3) e uma maior carga de *S. pneumoniae*. Portanto, vários vírus respiratórios, parecem predispor para o início da colonização de *S. pneumoniae* na nasofaringe (MURDOCH et al, 2009; VU et al, 2011).

1.6 Vacinas pneumocócicas

Devido à alta morbidade e mortalidade das infecções pneumocócicas a prevenção, em todas as idades, é a abordagem mais eficaz para reduzir os números de casos da doença pneumocócica (MYERS et al, 2007). A vacinação é a maneira mais eficaz de prevenção, atualmente estão disponíveis três vacinas pneumocócicas, a mais antiga é a vacina polissacarídica 7-valente (VPC-7), seguida da vacina polissacarídica 10-valente (VPC-10) e a vacina polissacarídica conjugada 13-valente (VPC -13) (NEVES et al, 2013) (Figura 2).

A VPC-7 foi licenciada desde o ano 2000 em vários países, é composta por polissacarídeos capsulares conjugados a uma proteína carreadora do toxóide diftérico (CRM₁₉₇), tornando-se, dessa maneira, altamente imunogênica, pois é capaz de provocar uma resposta imunológica do tipo célula T-dependente (PLETZ et al., 2008). Durante quase uma década, VPC-7 tem demonstrado elevada eficácia contra as doenças pneumocócicas invasivas causadas pelos sorotipos da vacina em crianças menores de 2

anos de idade. Sua eficácia foi confirmada em uso rotineiro nos Estados Unidos (HICKS et al, 2007) e Canadá (KELLNER et al, 2009).

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). A VPC-10 é composta por 1µg de polissacarídeos dos sorotipos de pneumococos 1, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 23F e 3 µg do sorotipo 4 conjugados com uma proteína D de *Haemophilus influenzae*, 3 µg do sorotipo 19F conjugado toxóide diftérico (DT) e 3 µg do sorotipo 18C co

njugado com o toxóide tetânico (TT). O Brasil será o primeiro país a incluir a VPC-10 em sua política nacional de saúde pública em 2010 (CECOVISA ENSP/FIOCRUZ, 2009). Em muitos países da África, America do Sul e em algumas regiões da Ásia os sorotipos 1 e 5 são importantes causadores de morbidade e mortalidade. Já nos Estados Unidos, Canadá e muitos países europeus, o sorotipo 7F é a causa predominante de doença pneumocócica invasiva (PARADISO, 2011).

A VPC-13 possui em sua formulação com os mesmos sorotipos presentes na VPC-10, acrescida de três novos sorotipos (Figura 2). 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 et al, 2012). Os sorotipos incluídos na VPC-13 são importantes causas de doença invasiva nos Estados Unidos e na Europa e ambos têm sido associados com as altas taxas de mortalidade e infecções, devido ao sorotipo 3 ser cada vez mais relatado, especialmente em crianças mais velhas, em associação com pneumonia grave, incluindo empiema (PARADISO, 2011).

A vacina pneumocócica é uma maneira eficaz de prevenir as infecções pneumocócicas invasivas em pacientes imunocompetentes, portanto, para o amplo uso da vacina é necessário o adequado conhecimento da distribuição dos sorotipos prevalentes em cada região, assim como é necessário conhecer a sensibilidade dos pneumococos aos antimicrobianos para a escolha correta do esquema terapêutico (MORETTI et al, 2007).

VPC-7	4	6B	9V	14	18C	19F	23F							
VPC-10	4	6B	9V	14	18C	19F	23F	1	5	7F				
VPC-13	4	6B	9V	14	18C	19F	23F	1	5	7F	3	6A	19A	

Figura 2. Sorotipos de pneumococos incluídos na vacina pneumocócica conjugada 7-valente, 10 valente e 13-valente atualmente licenciados.

2. TRATAMENTO DA PAC E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

A OMS chama a atenção para os sinais clínicos da PAC que permitem o diagnóstico correto e a escolha do tratamento adequado para crianças de acordo com a faixa etária, pois para a maioria dos pacientes, não é possível definir o agente etiológico causador da PAC no momento da decisão terapêutica (Corrêa et al, 2008).

A escolha do tratamento da PAC bacteriana varia de acordo faixa etária e as características da infecção. Assim, a seleção do esquema terapêutico inicial é baseada na história clínica do paciente de tosse e dificuldade respiratória, com suspeita de pneumonia, devem ser avaliadas quanto à presença de tiragem subcostal e submetidas à contagem da frequência respiratória, para classificação do caso e indicação da melhor conduta terapêutica (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE PNEUMONIA, 2007; FERREIRA et al, 2009).

Em crianças maiores de 2 meses a 5 anos, as PACs podem ser classificadas em 2 grupos: pneumonia leve e pneumonia grave, de acordo com a presença ou ausência, respectivamente, de tiragem subcostal no exame físico. Em criança maiores de dois meses de idade não apresenta tiragem subcostal ou qualquer sinal de perigo ou de gravidade, mas apresenta frequência respiratória elevada, a classificação mais adequada é pneumonia leve, com indicação de tratamento ambulatorial. Nesses casos recomenda-se antibioticoterapia com amoxicilina, por sete dias, como primeira escolha. A penicilina procaína também pode ser usada em dose única diária por 7 dias. Caso haja suspeita de pneumonia atípica ou afebril, tratar com um macrolídeo, como, por exemplo, eritromicina, por 10 dias, ou com um dos chamados novos macrolídeos, como azitromicina, por 6 dias, ou claritromicina, por 10 dias (SILVEIRA et al, 2012).

A antibioticoterapia empírica está baseada na apresentação clínica, na idade e nos fatores epidemiológicos, e, se disponíveis, em dados laboratoriais imediatos e achados radiológicos. Dessa forma, as pesquisas epidemiológicas nesse campo são sempre necessárias para melhorar ou modificar as recomendações do tratamento, pois uma das maiores preocupações é se a antibioticoterapia empírica na pneumonia permanece efetiva em meio a essa era de resistência pneumocócica.

Por mais de 25 anos a penicilina permaneceu sendo a droga de escolha contra pneumococo, porém 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 mundo (CAMARGOS et al, 2006).

Desde 1991, a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) tem conduzido um estudo do perfil epidemiológico (Projeto SIREVA - Projeto Sistema Regional de Vacinas), sendo responsável pela vigilância laboratorial do *Streptococcus pneumoniae*, determinando a distribuição dos sorotipos que causam doença invasiva e seus padrões de resistência antimicrobiana na América Latina. No Brasil, este projeto foi instituído em 1993, patrocinado pela OPAS e pelo Ministério da Saúde, e desde então várias publicações têm mostrado alguma diversificação na distribuição de sorotipos e na taxa de resistência aos antimicrobianos nas diferentes regiões do país e ao longo do tempo (VIEIRA et al, 2007).

O aumento da resistência a antimicrobianos agora tem se tornado uma das principais preocupações da comunidade médica. A resistência pneumocócica aos antimicrobianos é resultado de mutações no genoma bacteriano, nesses casos os antibióticos devem ser prescritos em doses e frequência adequada para proporcionar concentrações preventivas e consistentes na corrente sanguínea ou no sítio alvo de destino da droga (JINNO et al, 2012).

Uma terapia imediata é essencial para alcançar um bom prognóstico: antibióticos β -lactâmicos são a escolha de primeira linha; por outro lado, em infecções do trato respiratórias e comunitárias em pacientes alérgicos β -lactâmicos, macrolídeos são amplamente utilizados (MONTAGNANI et al. 2008).

A resistência do *S. pneumoniae* aos macrolídeos ocorre principalmente devido a dois mecanismos: modificação do sítio de ligação da droga e efluxo ativo. O primeiro ocorre devido à aquisição do gene *ermB*, o qual confere resistência aos macrolídeos, lincosamídeos e estreptogramina B, sendo esta resistência múltipla, o que dá o nome ao fenótipo: MLS_B (ZETTLER et al, 2005). A expressão deste fenótipo pode ser constitutivo ou induzível, tornando-se ativo apenas na presença de indutores de macrolídeos (LIÑARES et al, 2010). O mecanismo de resistência ligado à bomba de efluxo ativo está associado ao gene *mefA*, que confere resistência somente aos membros quatorze e quinze dos macrolídeos (eritromicina, claritromicina e azitromicina), resultando no fenótipo M (ZETTLER et al, 2005). Variações na prevalência desses genes e mecanismos de resistência aos macrolídeos têm sido verificadas entre pneumococos isolados em diferentes regiões do mundo.

Em estudo realizado por Mendes e colaboradores nos anos 1999 a 2000, incluindo países da América Latina (Argentina, Brasil e México), a resistência à eritromicina encontrada foi de 15,3%, sendo de 6,5% nas amostras brasileiras. A resistência aos macrolídeos foi também avaliada na Alemanha, no período de 2002 a 2003, e 241 amostras de pneumococos foram analisadas e observaram-se 19,9% de cepas resistentes (REINERT et al, 2004). Em um trabalho realizado, Mendonça-Souza e colaboradores em 1999, com 931 amostras de pneumococo isoladas em várias cidades brasileiras, foram encontradas 40 amostras resistentes à eritromicina (4,3%), sendo que 37 destas apresentaram o fenótipo MLSB (92,5%) e 3 o fenótipo M (7,5%) (MENDONÇA-SOUZA et al, 2004).

Considerando-se, porém, o percentual relativamente pequeno, no Brasil, de amostras bacterianas resistentes a macrolídeos, estas drogas continuam sendo alternativas úteis na terapia empírica de casos não graves de pneumonia comunitária. Em se tratando de casos graves, que requerem hospitalização, têm sido reconhecida a eficácia da associação de cefalosporinas de terceira geração com macrolídeos, evidenciada em prognóstico mais favorável para pacientes (MARTINEZ et al, 2005).

2.1 Resistência Bacteriana aos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos possuem atividade antibacteriana bloqueando 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 "*Penicillin Binding*

Proteins" (PBPs) e o antibiótico (inibição competitiva). Os antibióticos β -lactâmicos bloqueiam a síntese de peptidoglicano pela inativação de múltiplas proteínas de ligação à penicilina, resultando na estimulação de enzimas endógenas autolíticas, as autolisinas, que degradam o peptidoglicano da parede celular bacteriana (CAMARGOS et al., 2006).

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 PBPs 1a, 1b, 2x, 2a, 2b e 3 e que passam a apresentar baixa afinidade de ligação com as penicilinas (ROSSONI et al, 2008). Nas cepas que apresentam resistência plena, que têm maior alteração nas PBPs 1a, 2b e 2x, ocorrem elevada resistência também para as cefalosporina e carbapenemas. Considerando que a resistência do *S. pneumoniae* não se deve à produção de beta-lactamases, a associação de inibidores destas enzimas a antibióticos beta-lactâmicos, como, por exemplo, a associação amoxicilina com ácido clavulânico, não oferece qualquer vantagem no combate às cepas resistentes (ZETTLER et al, 2005; CAMARGOS et al, 2006; SERRANO et al, 2007).

O surgimento de cepas de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina, decorrência de mutações cromossômicas e alterações nas proteínas ligadoras do antibiótico na parede bacteriana, repercutiu amplamente no uso clínico da droga. Essas cepas disseminaram-se pelo mundo e ganham espaço cada vez maior como agentes de infecções comunitárias e hospitalares (MARTINEZ et al, 2005).

Os padrões de resistência do pneumococo frente aos antibióticos variam em diferentes populações, em diferentes regiões geográficas e, provavelmente, ao longo do tempo, é importante o estabelecimento do perfil de resistência em uma determinada comunidade para fundamentar a escolha do melhor tratamento empírico inicial. (MANTESE, 2009).

Nos Estados Unidos, o "*Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin*" (PROTEKT) realizou um estudo com 39.495 pneumococos isolados de pacientes com infecções respiratórias adquiridas na comunidade. Este estudo demonstrou que aumentaram de 12,5% em 2000-2001 para 20% em 2003-2004 os pneumococos que apresentavam resistência intermediária frente à penicilina, enquanto a resistência plena à penicilina caiu de 26,3% em 2000-2001 para

16,5% em 2003-2004 (JENKINS et al, 2008). O Sistema de Vigilância da Resistência Antimicrobiana Europeia coletou 11.584 isolados invasivos de *S. pneumoniae* de 32 países no ano de 2008. Desses isolados, 1152 (10%) apresentaram resistência à penicilina (LIÑARES et al, 2010).

Castanheira e colaboradores realizaram um estudo no período de 1997 a 2000 em vários países da América Latina e isolaram 1.561 cepas de pneumococo. Os percentuais de resistência à penicilina entre os sete países participantes foi: México 25%, Uruguai 19,2%, Chile 18,3%, Colômbia e Argentina 9,9%, Brasil 3,9% e Venezuela 2,8% (CASTANHEIRA et al 2004).

No Brasil, um estudo foi realizado pelo Projeto de Sistema Regional de Vacinas (SIREVA II) entre 2000 e 2005 com isolamento de 8.993 cepas de pneumococos, das quais 36,4% provenientes de pacientes com diagnóstico de pneumonia. Foi realizado o teste de sensibilidade à penicilina e verificou-se que as cepas resistentes correspondiam a 37,8% dos isolados testados (CASTAÑEDA et al, 2009).

Nas últimas décadas, o aumento do número de cepas de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina e a outros antibióticos β -lactâmicos tem complicado o tratamento da infecção pneumocócica (HSIEH et al, 2009). O uso frequente de antibióticos tem sido identificado como o maior fator de risco para a seleção de resistência em pneumococos (BRANDILEONE et al, 2006). Com o crescimento da resistência do *S. pneumoniae* à penicilina, tem sido necessário o uso de drogas alternativas como os macrolídeos, tetraciclina, cloranfenicol, fluorquinolonas, entre outras (PALLARES et al, 2003). Entretanto, recentemente também tem sido observado um aumento significativo da resistência do pneumococo aos macrolídeos em vários países do mundo.

2.2 Resistência Bacteriana aos Macrolídeos

Os macrolídeos são largamente utilizados no tratamento de diversas doenças infecciosas, além de serem utilizados 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 serem sintetizadas, ocorrendo à morte celular (KANOH et al, 2010).

O aumento da resistência aos macrolídeos é preocupante, tendo em vista que esta classe de antibióticos é utilizada na terapêutica empírica das infecções respiratórias além de ser considerada em vários países como a primeira linha no tratamento da pneumonia adquirida na comunidade (PAC) (MOELLERING, 2002).

A aquisição do gene *ermB*, que reduz a afinidade de ligação de todos os macrólidos para o RNAr 23S (domínio V) do pneumococo, conduz à resistência cruzada aos macrólidos, 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 possuem gene *ermB* e têm o fenótipo MLSB normalmente, expressam alto nível de resistência aos antibióticos MLSB. O fenótipo MLSB pode ser expresso como uma resistência constitutiva (cMLSB) ou induzível (iMLSB) (FARRELL et al, 2004; LECLERQ et al, 2002). 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. Esse tipo de mecanismo é conferido pela presença do gene *mef* (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 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 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 também tem sido relatada em vários países europeus, como Espanha e França, que exibem as maiores taxas, 43,6% e 46,1%, respectivamente, e na Áustria o menor, de 10% (REINERT et al 2005).

A resistência conferida pelo gene *ermB* é mais intensa que a resistência conferida pelo gene *mefA*, ou seja, as concentrações inibitórias mínimas para os pneumococos que contêm o gene *ermB* são mais elevadas do que as cepas que possuem o gene *mefA* (NYS et al, 2005). Além disso, a metilação no resíduo adenina, causada pela metilase codificada pelo gene *ermB*, confere resistência a todos macrolídeos, lincosamina e estreptogramina B, enquanto a presença do gene *mefA* confere resistência para os macrolídeos do 14 e 15, resultando no fenótipo M. (ZETTLER et al, 2005; BONOFIGLIO et al, 2005).

O gene *ermB* é o genótipo prevalente em todo o mundo, sendo mais frequentemente encontrado na maioria dos isolados clínicos na Europa (FARREL et al, 2008). Nos Estados Unidos, o gene *mefA* é o genótipo mais comum com taxas de 66% encontrados nos anos 2001 e 2004. Já nos anos de 2005 e 2006, foram encontradas taxas de 54% (JENKINS et al, 2008), e a presença do genótipo *ermB* se manteve relativamente baixa. No entanto, relatos mais recentes observaram um aumento na porcentagem de isolados que transportam tanto *ermB* e *mefA* (LIU et al 2012).

2.3 Sorotipos e Resistência

A resistência do *S. pneumoniae* aos antimicrobianos usados no tratamento das doenças pneumocócicas tem aumentado significativamente em todo o mundo. Existem seis sorotipos (6A, 6B, 9V, 14, 19F e 23F) que são comumente associados com resistência aos antimicrobianos (JONES et al, 2010).

Ocorre uma grande variação no padrão de resistência aos antibióticos e a prevalência de sorotipos de pneumococo em diferentes populações e regiões geográficas e, provavelmente, ao longo do tempo também, por isso é importante o estabelecimento

do perfil dos sorotipos mais prevalentes numa determinada comunidade e o conhecimento das taxas de resistência para fundamentar a escolha do melhor tratamento empírico inicial e da melhor cobertura vacinal (MANTESE et al, 2009).

A vacina pneumocócica conjugada heptavalente (PVC7) que contém sete sorotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) foi licenciada em aproximadamente 90 países a partir do ano 2000. Sua composição foi baseada nos sorotipos mais frequentes nos EUA, Canadá e alguns países da Europa (PLETZ et al., 2008).

Assim, a proporção de sorotipos presentes na vacina PVC7 é alta nos EUA, Canadá e Austrália (80 a 90%), seguidos de Europa e África (70 a 75%), América Latina (aproximadamente 65%) e Ásia (aproximadamente 50%). Essa proporção é baixa na América Latina devido à prevalência alta dos sorotipos 1 e 5 nessa região. Surge, assim, a necessidade de novas vacinas que contenham sorotipos adicionais de importância na doença pneumocócica invasiva em vários países e regiões do mundo (YOSHIOKA et al 2011).

Atualmente, existem duas novas vacinas conjugadas para pneumococo: a vacina pneumocócica conjugada 10 valente (PVC10) com cobertura adicional para sorotipos 1, 5 e 7F, que foi introduzida, em 2010, no Programa Nacional de Imunizações no Brasil; e a 13-valente, que amplia a cobertura para sorotipos 1, 3, 5, 6 A, 7F e 19A (SHOUVAL et al, 2009). Portanto, dados sobre portadores do pneumococo saudáveis e com PAC são ferramentas úteis para monitorar o efeito da PVC10 em países como o Brasil (FRANCO et al. 2010; CHAPPUY et al, 2013).

No Brasil, a distribuição dos sorotipos, segundo um estudo realizado de 1993-1999, são o 14, 6A/6B, 1, 18C, 5, 23F, 19F e 9V (DI FABIO et al, 2001). O Projeto Sistema Regional de Vacinas (SIREVA) foi criado na América Latina com o objetivo de monitorar o padrão de resistência aos antimicrobianos e o perfil de sorotipos de pneumococo (MANTESE et al, 2009). O Projeto SIREVA captou de diferentes regiões do Brasil no período de 8 anos (de 2000 a 2005, em 2006 e em 2007) 6.548 cepas invasivas de pneumococo; destas, 5.742 foram sorotipadas, sendo 2.575 oriundas de crianças abaixo de 6 anos de idade. Os sorotipos mais frequentemente encontrados foram o 14, 6B, 18C, 19F, 23F, 1, 6A, 5, 19A, 9V, 3, 7F e 4, conferindo uma cobertura da PVC7 de 72,1% (incluindo o sorotipo 6A). Em Fortaleza, segundo Rey et al (2002), os sorogrupos mais comuns encontrados foram o 6, 19, 23 e 14.

Neste contexto, uma vez que a epidemiologia da doença pneumocócica varia com a região e ao longo do tempo, fazem-se necessárias avaliações periódicas com monitoramento dos sorotipos e do padrão de resistência antimicrobiana para uma melhor orientação terapêutica e definição de estratégias de controle. O objetivo principal deste estudo é identificar os sorotipos de pneumococo mais frequentemente isolados nas crianças com PAC, comparar os sorotipos com os incluídos em vacinas conjugadas e analisar sua sensibilidade aos antimicrobianos mais utilizados na faixa etária pediátrica.

3. PERGUNTAS DE PARTIDA

1. Qual o percentual de isolamento de pneumococos colonizantes da nasofaringe de pacientes com Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC), em um Hospital Infantil de Fortaleza, Ceará?
2. Qual o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de cepas de *S. pneumoniae* colonizantes de nasofaringe isolados de crianças com PAC?
3. Quais os sorotipos de pneumococo encontrados em portadores com PAC?
4. Quais as proteínas de ligação à penicilina (PBPs) que apresentaram alterações nas cepas resistentes?
5. As cepas que apresentaram resistência a macrolídeos possuem o gene *ermB*?

4. HIPÓTESES CONSIDERADAS

- A prevalência de *S. pneumoniae* em isolados de crianças portadoras com PAC em um hospital infantil de Fortaleza é alta.
- A taxa de resistência aos antibióticos é alta para a maioria dos antimicrobianos testados.
- Os sorotipos mais comumente encontrados são 14, 23F, 6A/6B e 19F como no restante do país.
- As cepas com resistência plena ou intermediária a penicilina apresentam uma ou mais alterações nas PBPs 1a, 2x e 2b.
- As cepas com resistência plena ou intermediária a macrolídeos apresentam o gene *ermB*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Identificar os sorotipos de pneumococo de pacientes com PAC, determinar a sensibilidade a antimicrobianos e identificar os genes associados à resistência à penicilina e macrolídeos.

5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *S. pneumoniae* isolados de portadores doentes.
2. Identificar os sorotipos de *S. pneumoniae* isolados de crianças com PAC.
3. Identificar alterações nas PBPs em cepas resistentes à penicilina.
4. Identificar a presença do gene *ermB* nas cepas de *S. pneumoniae* que apresentaram resistência a macrolídeos
5. Correlacionar a idade dos pacientes com o estado de portador.
6. Correlacionar os sorotipos isolados com resistência aos antimicrobianos testados.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Espécimes clínicos: amostras de crianças com suspeita clínica de infecção de vias aéreas inferiores.

No período compreendido entre janeiro de 2011 a setembro de 2012 foram coletadas amostras de pacientes de 0 a 16 anos de idade, de ambos os sexos, atendidos nos setores de emergência e enfermaria do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), em Fortaleza – Ceará, com sinais e sintomas de PAC. Foram coletadas informações sobre idade, sexo e uso de medicamentos através de aplicação do questionário.

6.2 Aspectos Éticos

O consentimento escrito para participação da criança no estudo foi obtido dos pais da criança ou seu guardião legal, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo), que foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), pelo número de protocolo 070/2009 (Anexo II). 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.

6.3 Coleta do Material de Nasofaringe

Aspirados de nasofaringe foram coletados nos turnos da manhã ou tarde, de segunda a sexta-feira, por membros da equipe do Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Ceará que realizaram uma busca ativa nos setores de emergência e enfermarias do Hospital Infantil Albert Sabin. O conteúdo aspirado foi identificado e armazenado em isopor com bobinas de gelo, sendo então transportado até o Laboratório de Virologia em até quatro horas após a coleta. As amostras clínicas foram processadas em capela de fluxo laminar NB-2 e alíquotadas em duas frações, uma para realização de testes para detecção de vírus respiratórios e a outra alíquota foi enviada para o Laboratório de Bacteriologia localizado no Centro de Biomedicina, Faculdade de Medicina/UFC, para realização de testes para a detecção de *S. pneumoniae*.

6.4 Isolamento Bacteriano e Identificação de *S. pneumoniae*

No Laboratório de Bacteriologia, a alíquota foi semeada em placa de Petri contendo o meio Columbia agar (DIFCO) suplementado com sangue desfibrinado de carneiro a 5% e gentamicina 5 µg/ml e em seguida foi incubado a 36 ± 1 °C em atmosfera de microaerofilia, 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 (α -hemólise) (Figura 1A). Estas colônias foram reisoladas em outras placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura, a fim de gerar uma maior massa celular bacteriana para realização da coloração de Gram, dos testes com disco de optoquina (5µg) (Figura 1B) e o teste da solubilidade em bile em solução de deoxicolato de sódio a 10% (Figura 2A). As cepas que apresentaram à microscopia a forma de diplococos Gram positivo (Figura 2B), sensibilidade à optoquina e solubilidade em bile foram identificadas como *S. pneumoniae*. (LAVAL et al, 2006).

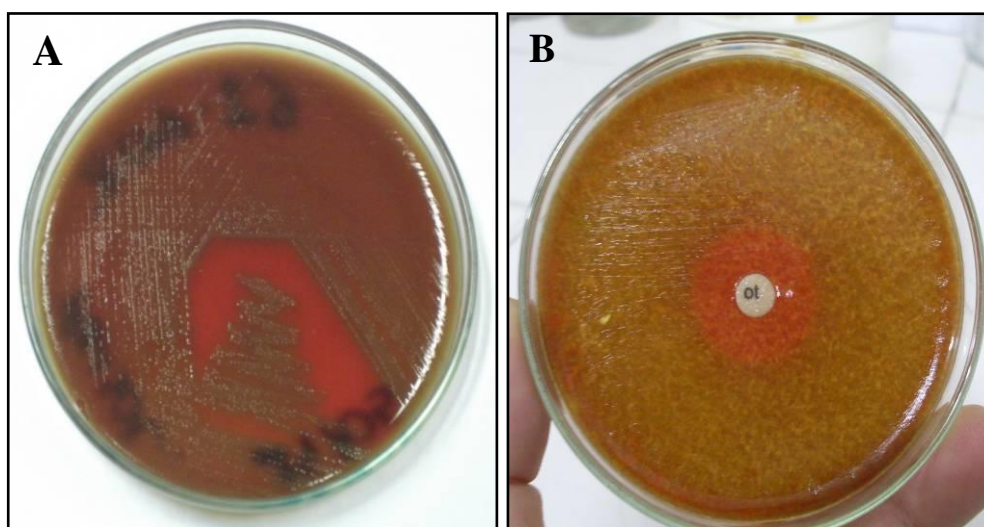


Figura 3: A. Crescimento em ágar sangue de colônias planas com α -hemólise ao seu redor, características de *S. pneumoniae*. B. Sensibilidade à optoquina. Fonte: Laboratório de Bacteriologia.

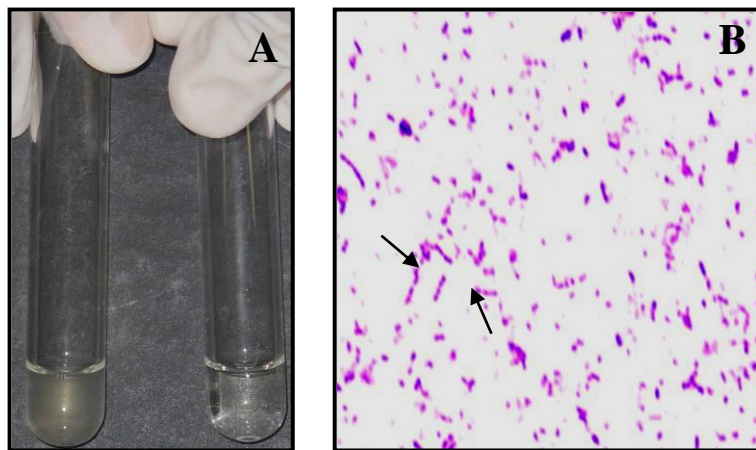


Figura 4: A. teste da bile solubilidade. B. *S. pneumoniae* corados pela técnica de Gram, na ponta da seta é possível visualizar cocos dispostos aos pares e m pequenas cadeias Fonte: Laboratório de Bacteriologia.

6.5 Estocagem das Amostras

Após a identificação das cepas, todas as amostras foram mantidas estocadas em caldo BHI com 16% (vol/vol) de glicerol e congeladas a -80°C (VIEIRA et al, 2007), para posterior avaliação da resistência antimicrobiana, genotipagem capsular e pesquisa de genes de resistência.

6.6 Teste de Sensibilidade a 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, ceftriaxona, sulfametoxazol/trimetoprim, amoxicilina, clindamicina e eritromicina 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 de 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, 0,002 a 32 µg/ml. Esta faixa corresponde a 15 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, havendo 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 3).

O ponto de corte para determinação de sensibilidade, resistência intermediária e resistência plena foram escolhidas seguindo os padrões do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2010). 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).

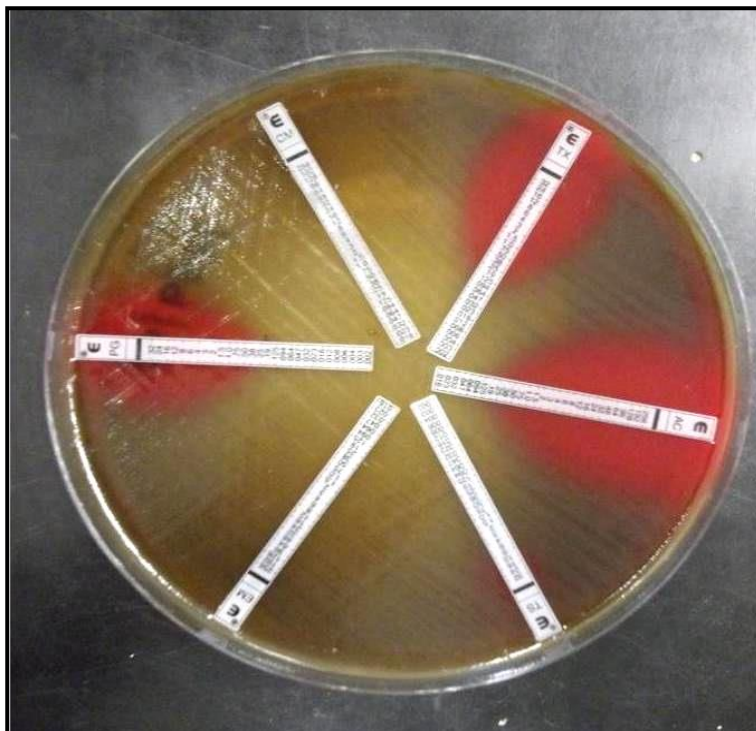


Figura 5. Teste de Sensibilidade a antimicrobianos pelo método de *E-test* para penicilina, ceftriaxona, sulfametoxazol/trimetoprim, amoxicilina, clindamicina e eritromicina. Fonte: Laboratório de Bacteriologia

6.7 Extração de DNA

Para a realização da extração do DNA as cepas de pneumococo foram retiradas do estoque e semeadas em placas contendo o meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) ágar (OXOID) suplementado com sangue desfibrinado de carneiro adicionado de 5 µg/ml de gentamicina e incubadas durante 24 horas a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$, em microaerofilia. As células bacterianas, crescidas na placa, foram transferidas para 2ml de BHI caldo que foram incubadas a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. A extração do DNA pneumocócico foi realizada conforme as recomendações do DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen® Group, 2011).

6.8 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. (PAI et al., 2006; DIAS et al, 2007).

6.9 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. Os iniciadores foram utilizados em oito reações de multiplex, e uma reação, para diferenciar os sorotipos 6A/B do 6C. Os iniciadores foram agrupados com base na distribuição dos sorotipos dos pneumococos invasivos encontrados no Brasil. Em cada reação foram colocados doze pares de iniciadores que tinham como alvo regiões sorotipo-específicas de doze diferentes sorotipos. Foi também incluída em cada reação como controle positivo interno a cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619 e um controle negativo o qual era colocado 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 e os 12 *iniciadores*. 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).

6.10 Detecção dos genes de resistência

✓ **Mutações nas Proteínas Ligadoras de Penicilina - PBPs**

Foram selecionadas as cepas que apresentaram resistência intermediária e plena a penicilina, estas então foram submetidas ao teste de PCR para a detecção das mutações nas PBPs 1a, 2b e 2x. Em cada reação foi realizada com os *iniciadores* desenhados por Nagai e colaboradores (2001). Os PCRs foram realizados em três soluções com volume final de 25 µl, cada mix da reação contendo: HotStarTaq® Master Mix Kit e os *iniciadores* iniciadores da PBP pesquisada. Ciclos térmicos foram realizados em GenePro Thermal Cyclor (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), ou seja, esta cepa apresentava-se sensível a penicilina. 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) 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 (50 pb ou 100 pb ladder; Fisher Bio Reagents). A ausência de produto de PCR da PBP pesquisada indica alteração no gene da *PBP*, gerando assim resistência à penicilina.

✓ Genes de resistência a macrolídeos

As cepas que apresentaram resistência intermediária ou plena a clindamicina e eritromicina foram submetidas ao teste de detecção do gene *ermB*, que é o principal responsável pela resistência a macrolídeos, lincosamidas estreptogramina B (MLS_B). Em cada reação foram utilizados os iniciadores desenhados por Nagai e colaboradores (2001). Para controle positivo na detecção de resistência do gene *ermB* foi incluído em cada reação a cepa *E. coli* V1910, cedida pela Universidade da Costa Rica. Um controle negativo também foi incluído em cada reação, o qual continha água mili-q ao invés do DNA pneumocócico.

Ciclos térmicos realizados em GenePro Thermal Cycler (Bioer Technology) nas seguintes condições: um ciclo a 94°C por 1 minuto seguido de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos (desnaturação), 50°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 2 segundos (extensão) e 72°C por 10 minutos (extensão final).

Os produtos da 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.)

6.11 Análise Estatística

Para avaliar se existe relação entre sexo e positividade de pneumococos, os dados foram organizados em tabelas do Excel e foram utilizado o teste estatístico de associação Qui-quadrado (χ^2) sendo considerado o valor-p <0,001. Para verificar a associação dos sorotipos e a resistência a penicilina, eritromicina e clindamicina, foi

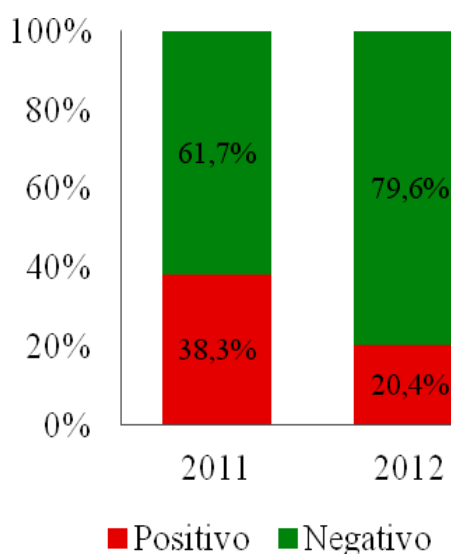
realizado o teste estatístico exato de Fisher que permite calcular a probabilidade de associação das características que estão em análise.

7. RESULTADOS

7.1 Prevalência

Entre janeiro de 2011 a setembro de 2012, foram coletadas 527 amostras de crianças com Pneumonia Adquirida na Comunidade atendidas no Hospital Infantil Alberto Sabin com idades entre 0 e 16 anos. Desse total de amostras, 54,5% (287) foram coletadas no ano de 2011 e 110 amostras (38,3%) apresentaram positividade na cultura de nasofaringe para *S. pneumoniae*. No ano de 2012, foram coletadas 240 (45,5%) amostras e destas 49 (20,4%) foram positivas para *S. pneumoniae* (Gráfico 1).

Gráfico1: Positividade das 527 amostras de aspirado de nasofaringe coletadas durante os anos de 2011 e 2012



Foram isoladas cepas de *S. pneumoniae* em 159 crianças, perfazendo uma taxa de portadores doentes de 30,17%. Oitenta e sete (16,51%) desses portadores eram do sexo masculino. A distribuição dos portadores de acordo com sexo é mostrada na tabela 1. Não houve relação estatística entre sexo dos portadores ($p > 0,376$).

Tabela 1: Prevalência das crianças portadores do *S. pneumoniae* distribuída por sexo

Positividade	Sexo		Total
	Masculino	Feminino	
Negativo	44,02% (232)	25,81% (136)	69,83% (368)
Positivo	16,51% (87)	13,66% (72)	30,17% (159)
Total	60,53% (319)	39,47% (208)	100,00% (527)

Do total de isolados de *S. pneumoniae*, 126 (23,91%) tinham até dois anos de idade. A distribuição dos portadores de acordo com idade é mostrada na tabela 2. Existe relação estatística entre a idade e o estado portador ($p=0,0253$).

Tabela 2: Prevalência das crianças portadoras *S. pneumoniae* distribuída por idade

Idade	Positivo	Negativo	Total
0-2 anos	23,91% (126)	48,39% (255)	72,30% (381)
> 2 anos	6,26% (33)	21,44% (113)	27,70% (146)
Total	30,17% (159)	69,83% (368)	100% (527)

7.2 Sensibilidade aos Antimicrobianos

Das 159 cepas de *S. pneumoniae* isoladas, foi realizado o teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método do *E-test* para 126 cepas, pois 33 cepas foram perdidas devido à contaminação durante o processo de reativação dels..

Das 126 cepas, 32 (25,4%) foram resistentes à penicilina, sendo que 27 (21,5%) apresentaram resistência intermediária e 5 (3,9%) resistência plena. Para ceftriaxona, 125 (99,2%) cepas foram sensíveis e apenas 1 (0,8%) apresentou resistência plena. Já para amoxicilina 125 (99,2%) cepas foram sensíveis e 1 (0,8%) apresentou resistência intermediária. Com relação à clindamicina 102 (80,9%) cepas foram sensíveis, 21 (16,7%) apresentaram resistência plena e 3 (2,4%) apresentaram resistência intermediária. Para eritromicina, 99 (78,6%) cepas foram sensíveis e 27 (21,4%) apresentaram resistência plena. Todos os isolados que apresentaram resistência plena ou intermediária à clindamicina foram resistentes a eritromicina. Já para o sulfametoxazol/trimetoprima, 23 (18,2%) dos isolados foram sensíveis, 41 (32,6%) e 62

(49,2%) apresentaram resistência intermediária e resistência plena respectivamente. A figura 1 mostra as taxas de sensibilidade e resistência dos isolados de *S. pneumoniae*, frente aos antibióticos testados. As variações de resistência encontradas nas cepas de pneumococo no ano de 2011 e 2012, apesar de não serem estatisticamente significantes ($p > 0,005$), são mostradas no gráfico 2. Houve uma pequena diminuição da resistência em relação à clindamicina e eritromicina, de 20,9% para 15% e de 33% para 20% respectivamente. Ocorreu um aumento em relação à resistência a penicilina, de 19,8% para 37,5%. Houve uma pequena redução na resistência do sulfametoxazol/trimetoprima do ano 2011 para 2012, de 85% para 75%, porém aumentou a resistência plena deste antimicrobiano de 41% para 67,5%.

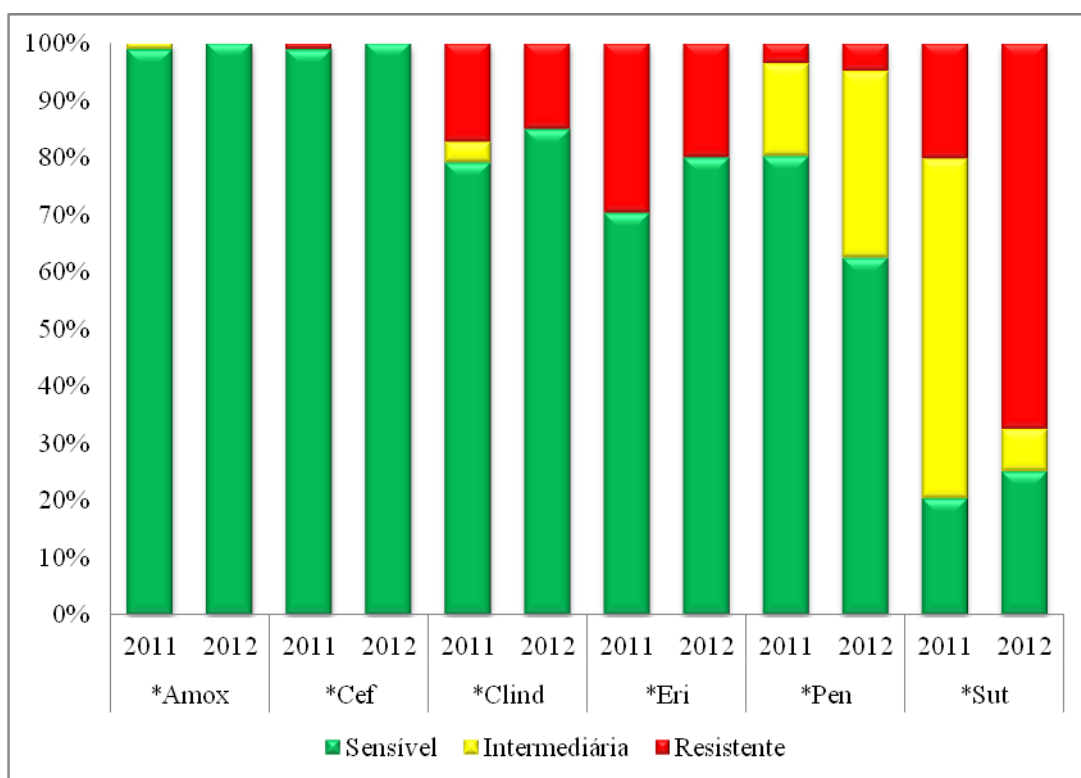


Gráfico 2: Percentuais de sensibilidade e resistência de 126 cepas de *S. pneumoniae* frente aos antibióticos testados nos anos de 2011 e 2012. *Amox: Amoxicilina; *Cef: Ceftriaxona; *Clind: Clindamicina; *Eri: Eritromicina; *Pen: Penicilina e *Sut: sulfametoxazol/trimetoprima

7.3 Sorotipos

A genotipagem das cepas de *S. pneumoniae* isolado de crianças com PAC foi feita através da técnica de multiplex PCR. Foram incluídas no estudo de genotipagem

capsular 102 cepas, pois 57 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*.

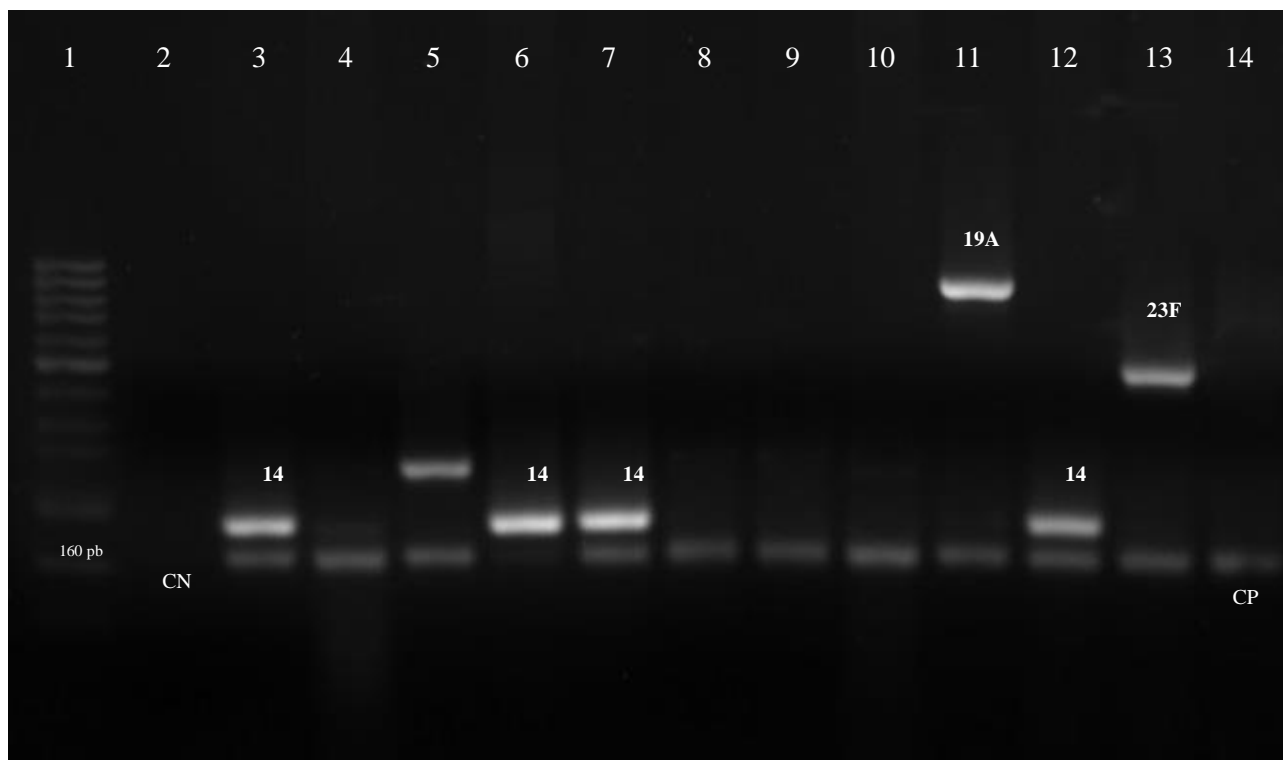


Figura 6. Eletroforese da 1ª reação de multiplex-PCR em gel de agarose a 2% com brometo de etídio. Linha 1: marcador de peso molecular de 50 pb; linha 2: controle negativo; Linha 3-14: controle interno gene *cpsA* (160 pb); Linha 3, 6, 7 e 12: genótipo 14 (189 pb); Linha 5: genótipo 6A/B/C/D (250 pb);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

Pela técnica de multiplex PCR, 93 cepas (91,2%) tiveram a genotipagem capsular identificada e 9 (8,8%) foram não-tipáveis. Na população estudada, foram identificados 18 sorotipos diferentes, sendo que 8 sorotipos foram predominantes em ambos os anos estudados (Gráfico 3). Quanto à frequência dos sorotipos encontrados no estudo em ordem decrescente, foram 6A/6B presentes em 35 (34,3%) cepas, seguidas de 14 (10,78%), 19A (9,8%) e 19F (6,9%). O sorotipo 19A foi observado com maior frequência no ano de 2011, já no ano de 2012 este sorotipo foi substituído pelo sorotipo 19F. Verificam-se também algumas diferenças na distribuição dos sorotipos entre os dois anos, mas nenhuma é estatisticamente significativa devido ao número de amostras. Alguns sorotipos só se apresentam em um dos anos estudados, como, por exemplo, os

sorotipos 23F, 16F, 23B, 13, 10A e 15A/15F que só foram identificados no ano de 2011, já os sorotipos 34, 17F, 7B/C foram encontrados no ano de 2012 (Gráfico 3).

Foi observado também que existe relação entre a resistência aos antimicrobianos testados e os sorotipos isolados. Os sorotipos relacionados com a resistência aos antimicrobianos eritromicina, clindamicina e penicilina em 2011 e em 2012 são mostrados na Tabela 3. Teste de associação de Fisher.

Gráfico 3. Prevalência de 102 sorotipos de *S. pneumoniae* isolados durante os anos de 2011 e 2012.

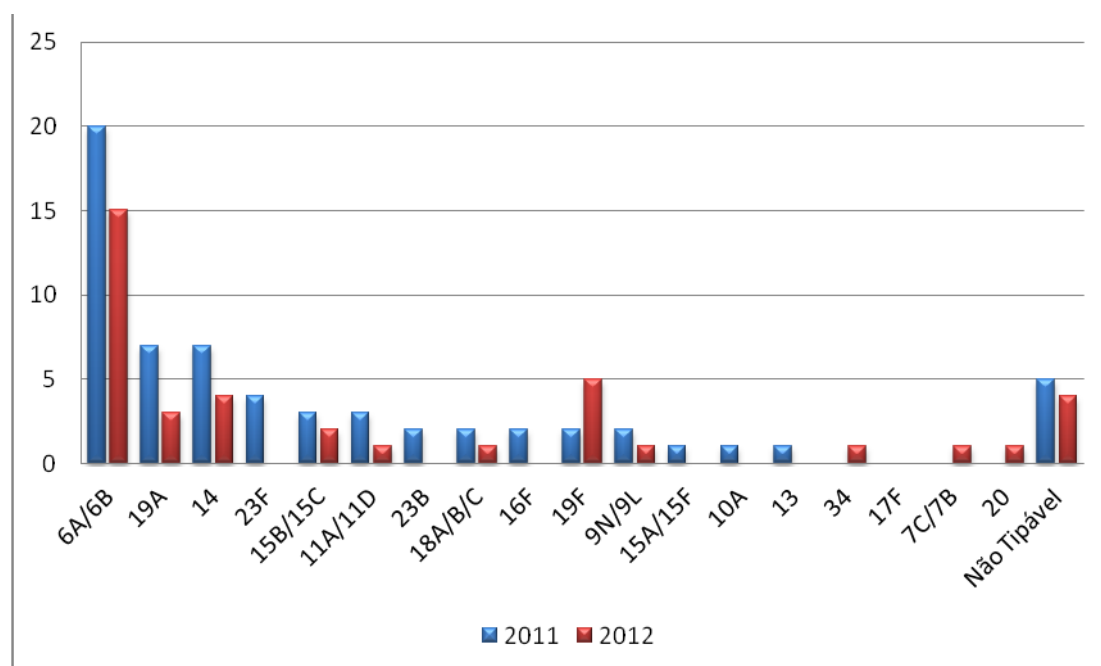


Tabela 3. Análise de associação entre os sorotipos isolados e a resistência a antimicrobianos nos anos de 2011 e 2012.

Antibiótico com Resistência	Sorotipos - 2011	Valor p	Sorotipos - 2012	Valor p
Penicilina	6A/6B, 14, 19A e 23 F	0,005	6A/6B, 14, 19A e 19F	0,037
Clindamicina		<0,001		0,009
Eritromicina		0,004		0,002

7.4 Detecção de Genes de Resistência

Foram selecionadas 24 isolados de *S.penumoniae* que apresentaram resistência intermediária e plena a clindamicina e eritromicina para detecção do genótipo *ermB*.

Dos 24 isolados testados, 19 (79%) possuíam o gene *ermB* e 5 (21%) foram negativas para o gene pesquisado (Figura 5).

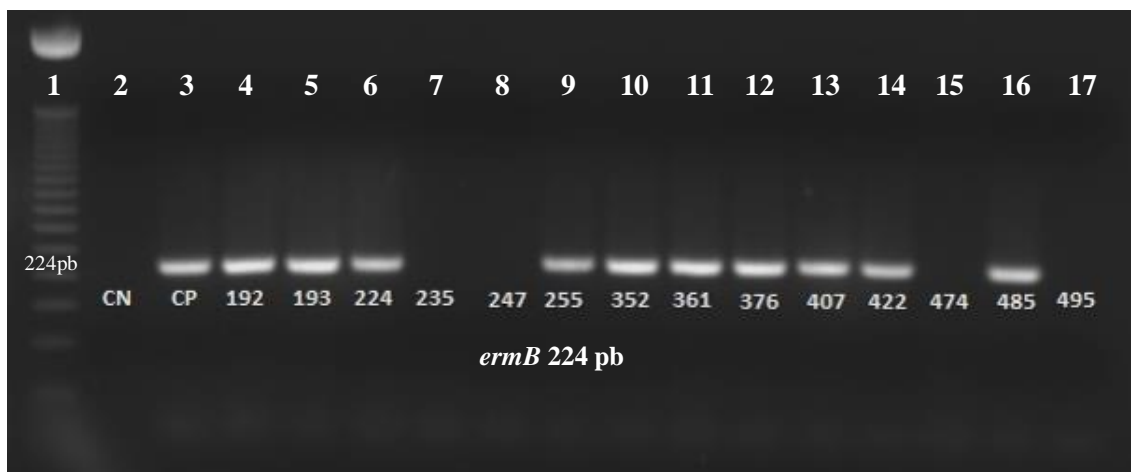


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio para visualização do produto da PCR do gene *ermB* em cepas de *S. pneumoniae* isoladas de crianças com PAC. Linha 1, marcador de peso molecular de 50 pb; linha 2, controle negativo; linha 3, controle positivo para o gene *ermB* (224 pb); linha 4-5-6-9-10-11-12-13-14 e 16 amostras positivas para o gene *ermB* (224pb); linha 7-8-15 e 17 amostras negativas para o gene *ermB*. Fonte: Laboratório de Bacteriologia

Foram selecionadas 29 cepas que apresentaram resistência intermediária e plena a penicilina para fazer verificar a alteração nas *PBP 1a*, *2b* e *2x*. Foi encontrada alteração na *PBP 1a* em 69% (20) das cepas testados e 31% (9) não apresentou alteração (Figura 8). Já para as *PBP 2b* e *PBP 2x*, todas as cepas testadas apresentaram alteração nas proteínas de ligação pesquisadas (Figuras 6 e 7).

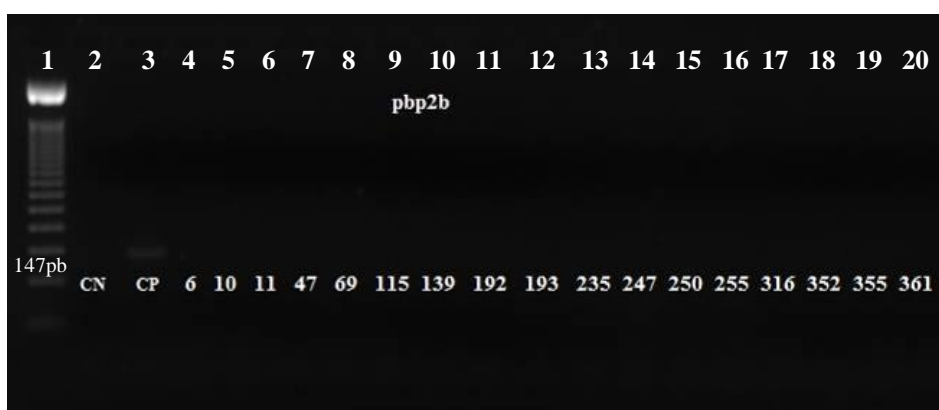


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 2% brometo de etídio para visualização do produto da PCR do gene *PBP 2b* das cepas de *S. pneumoniae* isoladas de crianças com PAC. Linha 1, marcador de peso molecular de 50 pb; linha 2, controle negativo; linha 3, controle positivo para *PBP 2b* (147 pb); linhas 4 a 20, amostras com alteração no gene *PBP 2b*. Fonte: Laboratório de Bacteriologia

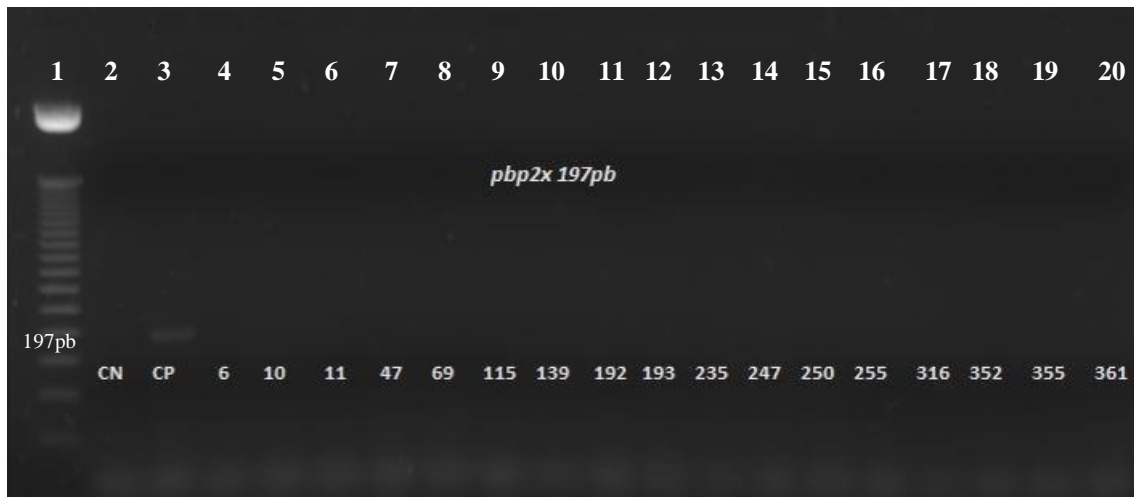


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio para visualização do produto da PCR do gene *PBP 2x* das cepas de *S. pneumoniae* isoladas de crianças com PAC. Linha 1, marcador de peso molecular de 50 pb; linha 2, controle negativo; linha 3, controle positivo para a *PBP2x* (197 pb); linha 4 a 20 amostras negativas para *pbp2x*. Fonte: Laboratório de Bacteriologia

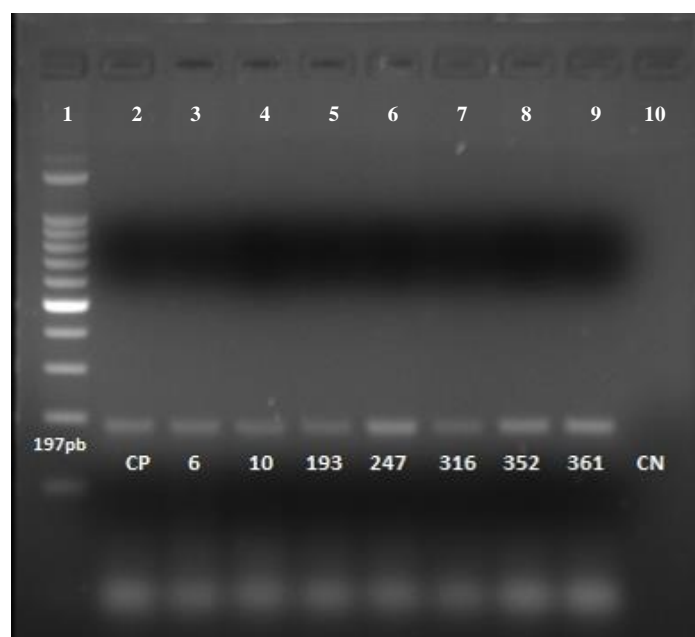


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio para visualização do produto da PCR do gene *PBP 1a* das cepas de *S. pneumoniae* isoladas de crianças com PAC. Linha 1, marcador de peso molecular de 100pb; linha 2, controle positivo; linha 3 a 9 amostras positivas para a *pbp 1a*; linha 10, controle negativo. Fonte: Laboratório de Bacteriologia

8. DISCUSSÃO

O estado portador de *S. pneumoniae* varia de acordo com a idade, a área geográfica estudada e ao longo do tempo, o que determina a necessidade de estudos epidemiológicos periódicos para estabelecimento de estratégias de controle da doença pneumocócica (MANTESE et al, 2009).

No estudo realizado em Israel por Greenberg e colaboradores em 2011, com crianças menores de 5 anos de idade diagnosticadas com PAC, foi encontrada uma taxa de portadores de 62,8%. Na Suíça, a taxa de portadores com PAC relatada em estudo realizado por Chappuy e colaboradores (2013) foi de 54%. Em um estudo realizado por Neves e colaboradores (2013), com crianças menores 6 anos de idade, atendidas na emergência de um hospital pediátrico no Rio de Janeiro, a taxa de portadores encontrada foi de 42,1%. Em Fortaleza, foi realizado um estudo por Rey¹ e colaboradores em 2002, com crianças menores de 5 anos de idade e diagnosticadas com pneumonia, e foi encontrada uma taxa de portadores com PAC de 50%. No presente estudo foi encontrada uma taxa média de portadores com PAC de 30,17% valor considerado baixo quando comparado com os percentuais citados acima. Esta variação nas taxa de colonização por pneumococo pode ser atribuída a reconhecidos fatores de risco para a colonização, tais como faixa etária, região geográfica, variações climáticas na época da coleta e condições socioeconômicas da população estudada (RUDAN et al, 2008; VELASQUEZ et al, 2009).

A taxa de portadores com PAC encontrada no presente estudo no ano de 2011 foi de 38,3%, porém no ano de 2012 a taxa de portadores foi 20,4%. Esta queda na taxa de portadores no ano de 2012 pode ser justificada pela introdução da vacina pneumocócica 10-valente (VPC-10) no calendário básico de vacinação da criança que ocorreu em março de 2010. Porém, no primeiro ano de implantação da vacina seguiu-se um esquema especial, em que foram vacinadas as crianças menores de dois anos e a partir dos 2 meses de idade, contemplando aproximadamente 6 milhões de crianças em todo país. Só a partir do segundo ano (2011) após sua implementação, a vacina passou a fazer parte do calendário vacinal infantil todas as crianças na faixa etária entre 2 a 6 meses de idade foram imunizadas. O estudo realizado por Afonso e colaboradores (2013), utilizando os dados do Sistema Nacional de Informações Hospitalares, demonstrou que após a introdução da VPC-10 no programa nacional de imunização

observou-se um declínio significativo nas internações por pneumonia em Belo Horizonte, Curitiba e Recife.

Nesse estudo não foi encontrada relação estatística entre o gênero e o estado de portador doente. Este resultado também foi descrito por outros autores (REY et al, 2002; VELASQUEZ et al, 2009; GREENBERG et al, 2011; NEVES et al, 2013).

Com relação à faixa etária foi observado no presente estudo que a taxa de portadores tende a ser maior em crianças menores de dois anos de 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 (MONTEROS et al, 2007; MEHR et al, 2012), confirmando que a idade da criança é um importante fator para a colonização por pneumococo, com alta prevalência em isolados a partir de crianças na faixa etária entre 2 e 5 anos (LO et al, 2003; VELASQUEZ et al, 2009).

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), confirmam que a colonização da nasofaringe de *S. pneumoniae*, em crianças pequenas, reflete diretamente na distribuição dos sorotipos e na sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de doenças invasivas.

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 utilizando a técnica de PCR superou as dificuldades associadas à sorologia convencional (Reação de Quellung), pois além de ser uma abordagem simples, apresenta um melhor custo-benefício (PAI et al, 2006; DIAS et al, 2007).

No presente estudo encontramos uma variedade de sorotipos do pneumococo, porém quatro sorotipos foram comumente encontrados em ambos os anos estudados. Quanto à frequência dos sorotipos encontrados neste estudo, em ordem decrescente de frequência foram: 6A/6B, seguido do sorotipo 14, 19A e 19F. Estes resultados são

concordantes com os sorotipos mais comuns encontrados em estudos realizados na Nigéria (ADETIFA et al, 2012), Coréia (AHN et al, 2012), Israel (GREENBERG et al, 2011), Estados Unidos (HUANG et al 2009), Venezuela (RIVERA-OLIVERO et al, 2011) e no Brasil (PIMENTA et al 2011). Os sorotipos comumente identificados neste estudo estão entre os sete sorotipos (6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F e 23F) que são comumente encontrados em crianças e que estão envolvidos com resistência à penicilina (JONES et al, 2010).

No Brasil, de 1993 a 1999, em 4.858 casos de doença pneumocócica invasiva, 63 sorotipos foram identificados. Onze sorotipos capsulares causaram 86,2% das pneumonias. Os sorotipos com forte associação com pneumonia foram em ordem decrescente de frequência: 14, 1, 5, 6A/6B, 23F e 19A (DI FÁBIO et al, 2001), quatro desses sorotipos foram identificados no presente estudo. Durante o período de vigilância da doença pneumocócica realizado pelo projeto SIREVA II (2000 a 2005), com 528 cepas de pneumococos isoladas de pneumonias no Brasil, os sorotipos mais frequentes foram: sorotipo 14, 1, 6B, 19A e 5 (CASTAÑEDA et al, 2009).

Neste estudo, não foram identificados os sorotipos 1 e 5, resultado discordante de outros estudos que relataram a identificação desses sorotipos em crianças com PAC (REY et al, 2002; CHAPPUY et al 2013). Porém, este resultado é concordante com o estudo realizado no Brasil por Neves e colaboradores (2013) e nos Estados Unidos Wroe e colaboradores (2012) que também não identificaram os sorotipos 1 e 5 na população estudada, este achado pode ser justificado pela cobertura parcial da VPC-10.

Identificamos também, que os sorotipos 15B/15C e 11A/11D estão circulando em 17,2% da população estudada. Estes sorotipos não são relatados na literatura por colonizar a nasofaringe de crianças, este resultado pode sugerir uma substituição dos sorotipos circulantes, resultado concordante com estudo realizado na Coreia (AHN et al, 2012) e Colômbia (PARRA et al, 2013) que também relataram estes sorotipos colonizando a nasofaringe de crianças com PAC. Estes sorotipos estão sendo considerados atualmente como reemergentes após a introdução da vacina pneumocócica conjugada em programas de imunização, pois nenhum desses sorotipos está contemplado nas vacinas pneumocócicas disponíveis no mercado atualmente (HUANG et al, 2009; PARRA et al, 2013).

Mundialmente os sorotipos comumente associados à resistência antimicrobiana são: 6B, 9V, 19F, 14, 23F, 6A e 19A. Destes sorotipos cinco (6B, 9V, 19F, 14 e 23F) estão incluídos na VPC-7 e PVC-10 e todos estão contemplados na VPC-13 (YOSHIOKA et al, 2011). No presente estudo quase todos os sorotipos que estavam associados à resistência estão contidos na VPC-10, com exceção do sorotipo 19A que está contemplado apenas na PVC-13. O sorotipo 19A, que foi prevalente no ano de 2012 no presente estudo, é comumente relatado na literatura por estar envolvido na doença pneumocócica invasiva e não invasiva, além disso, também está envolvido com a resistência a antimicrobianos (FRANCO et al, 2010; CHAPPUY et al, 2013).

A disseminação de cepas de *S. pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos tem causado crescente preocupação em todo mundo. 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 foi de 25,4% (21,5% resistência intermediária e 3,9% resistência plena). Esta taxa de resistência 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 em 48% das amostras de pneumococos isoladas de crianças com pneumonia, sendo que 4% destas isoladas possuíam resistência plena. A queda da resistência à penicilina pode ser justificada pela diminuição do uso deste antibiótico no tratamento da doença pneumocócica, devido relatos na literatura de resistência elevada, sendo então substituída pelo uso dos macrolídeos.

Quando comparamos os resultados encontrados no presente estudo, observamos uma pequena semelhança na taxa de resistência à penicilina com os resultados encontrados em estudo realizado com 6.470 isolados invasivos de *S. pneumoniae* de várias regiões do Brasil, que demonstrou durante o período estudado que a resistência à penicilina aumentou de 10,2% para 27,9% (BRANDILEONE et al, 2006).

O aumento gradativo da resistência à penicilina é explicado devido à modificação nas proteínas de ligação a penicilina (PBP), que reduz a afinidade de ligação do antibiótico β -lactâmico, à medida que a modificação na PBP ocorre à concentração inibitória mínima (CIM) aumenta gradualmente passa de sensível a

intermediária até chegar à resistência plena (MANDELLI, 2005). No presente estudo as cepas que apresentaram resistência à penicilina possuíam uma ou mais alterações nas PBP's pesquisadas, este resultado é concordante com o estudo de Chiba e colaboradores (2005) realizado no Japão com crianças com PAC que identificou uma ou mais alterações nas PBP's estudadas, 52,3% dos isolados tinham mutações nas três PBP's pesquisadas.

A ceftriaxona e a amoxicilina apresentaram uma alta taxa de sensibilidade (99,2%), este resultado é concordante com estudos realizados em Bangladesh (SHAHRIAR et al 2010), China (LIU et al, 2013) e São Paulo (YOSHIOKA et al, 2011) que relataram uma taxa de sensibilidade semelhante a encontrada no presente estudo.

Observou-se também que a sensibilidade dos isolados aos β -lactâmicos permanece favorável, porém estudos de vigilância epidemiológica se fazem necessários para a avaliação do tratamento empírico da PAC e a vigilância da resistência aos antimicrobianos a fim de avaliar a eficácia do tratamento.

A resistência fenotípica do *S. pneumoniae* aos macrolídeos foi determinada pelo método de *E-test* e a taxa de resistência plena encontrada para eritromicina (21,4%) e clindamicina (19,1%), corroborando com os resultados encontrados por Rey e colaboradores (2002), em estudo realizado em Fortaleza com crianças menores de 5 anos com pneumonia, que relatou que a prevalência de isolados resistentes a eritromicina e clindamicina foi de 23,8% e 19,1% respectivamente, o que demonstra que a resistência se manteve praticamente a mesma. A resistência a macrolídeos encontrada neste estudo foi alta quando comparada com os resultados encontrados no estudo de Zettler e colaboradores (2005), realizado em Porto Alegre, em que a taxa de resistência aos macrolídeos foi de 5,2%.

O estudo realizado por Chiba e colaboradores (2005) com crianças com PAC, no Japão, identificou o gene *ermB* em 48,5% dos isolados resistentes aos macrolídeos. Já no estudo realizado por Grivea e colaboradores (2012) na Grécia, observou que a taxa global de macrolídeos resistentes foi de 24%, neste mesmo estudo as cepas foram avaliadas genotipicamente e 52,9% dos isolados resistentes possuíam o gene *ermB*, este resultado corrobora com nosso achado, já que 79% das cepas pesquisadas apresentaram este gene.

Variações na prevalência do mecanismo de resistência aos macrolídeos têm sido verificadas entre pneumococos isolados em diferentes regiões do mundo. Variações geográficas, fenotípicas e genotípicas têm sido observadas, sendo fundamental a monitorização dos seus padrões locais, a fim de se orientar de maneira mais específica a terapêutica antimicrobiana adequada para cada região (ZETTLER et al 2005; GRIVEA et al, 2012).

O alto índice de resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim encontrado neste trabalho (81,8%) 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%. Liu e colaboradores (2013) relataram uma taxa de resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim de 100% em crianças menores de cinco anos com doença pneumocócica invasiva. Este alto índice de resistência pode ser justificado pelo alto consumo do sulfametoxazol-trimetoprim por ser um fármaco de baixo custo e de fácil acesso a este antimicrobiano no comércio farmacêutico.

Foi observado neste estudo que os sorotipos 6A/6B, 14, 19F, 19A e 23F estão diretamente relacionados com a resistência a penicilina, clindamicina e eritromicina, este resultado é discordante do estudo realizado por Shariff e colaboradores (2013), que relataram não haver relação entre os sorotipos e a resistência a antimicrobianos. Porém, o estudo de Hampton e colaboradores (2011) demonstrou haver uma relação do sorotipo 19A com os isolados de doença pneumocócica invasiva e a resistência à penicilina. Liu e colaboradores (2013) demonstraram que existe uma relação direta entre os sorotipos 19A, 19F, 14, 23F, 1, 4 e 6B e a resistência a antimicrobianos, sendo que o sorotipo de 19A parecia apresentar uma maior de resistência que os outros sorotipos.

A vacinação é uma medida profilática importante, uma vez que já foi relatado no Brasil, 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, observou-se um declínio significativo nas internações por pneumonia em Belo Horizonte, Curitiba e Recife. A cobertura potencial da VPC-10 encontrada neste estudo em relação aos sorotipos identificados foi de 61,76%, comparando-se aos outros trabalhos realizados no Brasil, que estimaram a potencial cobertura da vacina, é próxima ou maior que 50% (BEREZIN et al, 2007; PIMENTA et al, 2011; AFONSO et al, 2013).

O presente trabalho gerou dados sobre a prevalência dos isolados de *S. pneumoniae* de crianças com PAC em Fortaleza. Também revelou dados fenotípicos e genotípicos acerca da resistência dos isolados frente aos fármacos 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 dela, 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 com PAC, o que contribui para avaliar a cobertura da VPC-10.

9. CONCLUSÃO

Este trabalho gerou dados sobre a prevalência dos isolados de *S. pneumoniae* de crianças com PAC e o comportamento do pneumococo frente a alguns antimicrobianos comumente utilizados no tratamento da doença pneumocócica. Foi possível observar que o índice de resistência aos β -lactâmicos em Fortaleza diminuiu no período estudado, este fato pode estar relacionado à conscientização da classe médica com relação à prescrição de antibióticos e principalmente ao controle mais rigoroso por parte da secretaria de saúde quanto à solicitação de antibióticos somente com prescrição médica.

A utilização da penicilina no tratamento da infecção pneumocócica deve ser analisada com cautela, pois apesar do baixo índice de resistência encontrada neste estudo, todas as cepas que apresentaram resistência à penicilina apresentaram uma ou mais alterações genótípicas nas proteínas de ligação a penicilina. A alteração na proteína de ligação da penicilina pode conferir resistência a outros antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, conseqüentemente aumentar a concentração inibitória mínima necessária para alcançar atividade contra o pneumococo.

Os macrolídeos ainda podem ser considerados uma boa alternativa para o tratamento empírico da doença pneumocócica em caso de resistência aos β -lactâmicos, porém é importante a realização do antibiograma para que se possa avaliar de forma adequada as características da cepa estudada e diminuir o risco de falha terapêutica e o aumento dos índices de resistência.

O estudo da resistência genotípica aos antimicrobianos utilizados largamente no tratamento empírico da doença pneumocócica é de extrema relevância, uma vez que a presença de pneumococos resistentes na nasofaringe de crianças contribui diretamente para disseminação horizontal de cepas resistentes na comunidade, dificultando assim o tratamento eficaz da doença pneumocócica não invasiva e invasiva.

A utilização do sulfametoxazol-trimetoprim, de acordo com os dados obtidos neste trabalho, não foi eficiente, devido ao elevado índice de cepas que apresentaram resistência plena, diferente do que foi verificado para a amoxicilina e ceftriaxona que apresentaram boa atividade com o pneumococo, permanecendo assim uma opção para o tratamento da doença pneumocócica. Cabe salientar que os resultados encontrados neste

trabalho não são fixos e podem variar com o passar do tempo, por isso se faz necessário o controle periódico dos índices de resistência.

O conhecimento sobre a distribuição dos sorotipos é importante para avaliar o impacto da vacina pneumocócica como também monitorar a circulação de sorotipos na comunidade, uma vez que alguns sorotipos estão comumente associados com o surgimento da doença pneumocócica invasiva e a resistência aos antimicrobianos utilizados largamente na rotina clínica, a distribuição desses sorotipos pode variar de acordo com a região geográfica estudada.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADETIFA, I. M., ANTONIO, M., OKOROMAH, C. A., EBRUKE, C., INEM, V., NSEKPONG, D., ADEGBOLA, R. A. (2012). Pre-vaccination nasopharyngeal pneumococcal carriage in a Nigerian population: epidemiology and population biology. *Plos One*, 7(1), e30548.

AFONSO, E. T., MINAMISAVA, R., BIERRENBACH, A. L., ESCALANTE, J. J. C., ALENCAR, A. P., DOMINGUES, C. M., ANDRADE, A. L. (2013). Effect of 10-Valent Pneumococcal Vaccine on Pneumonia among Children, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 19(4), 589.

AHN, J. G., CHOI, S. Y., KIM, D. S., KIM, K. H. (2012). Enhanced detection and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* using multiplex polymerase chain reaction. *Korean Journal of Pediatrics*, 55(11), 424-429.

ANDRADE, A. L. S. S. D.; MARTELLI, C. M. T.; OLIVEIRA, R. M. D.; MORAIS NETO, O. L. D.; SIQUEIRA, J. B.; MELO, L. K.; DI FÁBIO, J. L. (2004). Population-based surveillance of pediatric pneumonia: use of spatial analysis in an urban area of Central Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 20(2), 411-421.

ANDRADE, A. L. S.; FRANCO, C. M.; LAMARO-CARDOSO, J.; ANDRÉ, M. C. D.; OLIVEIRA, L. L.; KIPNIS, A.; BRANDILEONE, M. C. C. (2010). Non-typeable *Streptococcus pneumoniae* carriage isolates genetically similar to invasive and carriage isolates expressing capsular type 14 in Brazilian infants. *Journal of Infection*, 61(4), 314-322.

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

BAUTISTA-MÁRQUEZ, A., RICHARDSON, V., ORTIZ-OROZCO, O., LUNA-CRUZ, M. E., CARNALLA-BARAJAS, M. N., ECHANIZ-AVILÉS, G., RUIZ-PALACIOS, G. M. (2013). Prevalence of Pneumococcal Disease, Serotype Distribution, and Antimicrobial Susceptibility in Mexican Children Younger than 5 Years of Age. *Archives of medical research*.

BEREZIN, E. N., CARDENUTO, M. D., FERREIRA, L. L., OTSUKA, M., GUERRA, M. L., BRANDILEONE, M. C. C. (2007). Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in nasopharyngeal carriage and in invasive pneumococcal disease in Sao Paulo, Brazil. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 26(7), 643-645.

BLACK, R. E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H. L.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; BASSANI, D. G., JHA P.; CAMPBELL H.; WALKER C.F.; CIBULSKIS R.; EISELE T.; LIU L.; MATHERS, C. (2010). Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *The Lancet*, 375(9730), 1969-1987.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. M. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(3), 144-154.

BONOFIOLIO, L.; OJEDA, M.I.; DE MIER C.; VAY, C.; FAMIGLIETTI, A.; GUTKIND, G.; MOLLERACH, M. (2005) Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* recovered from adult patients with community-acquired pneumonia in an Argentinian teaching hospital *Int..J. Antimicrob. Agents*. 25(3):260-3.

BRANDILEONE M.; CASAGRANDE S.;GUERRA M.; ZANELLA R.; ANDRADE A.; DI FABIO J. (2006). Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. *Journal Medical Microbiology*., v. 55, p.567-574.

BRASIL. (2011). Ministério da Saúde. Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações. Disponível em: <http://pni.datasus.gov.br/>. Acessado em 18/07/2013.

CAMARGOS, P., FISCHER, G. B., MOCELIN, H., DIAS, C., RUVINSKY, R. (2006). Penicillin resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America. *Paediatric Respiratory Reviews*, 7(3), 209-214.

CARDOSO, A. M. (2010). A persistência das infecções respiratórias agudas como problema. *Cad. Saúde Pública*, 26(7), 1270-1271.

CASTAÑEDA, E.; AGUDELO, C. I.; REGUEIRA, M.; CORSO, A.; BRANDILEONE, M. C.; BRANDÃO, A. P.; HOZ, F. (2009). Laboratory-based surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin

American countries: a SIREVA II project, 2000-2005. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 28(9), e265-e270.

CASTANHEIRA, M., GALES, A. C., MENDES, R. E., JONES, R. N., SADER, H. S. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America: results from five years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(7), 645-651.

Centers for Disease Control and Prevention (1997). Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* V. 46, p. 1-24.

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: 17 Agosto. 2013.

CEVEY-MACHEREL, M.; GALETTO-LACOUR, A.; GERVAIX, A.; SIEGRIST, C. A.; BILLE, J.; BESCHER-NINET, B.; GEHRI, M. (2009). Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized children based on WHO clinical guidelines. *European Journal of Pediatrics*, 168(12), 1429-1436.

CHAPPUY H., KEITEL K., GEHRI M., TABIN R., ROBITAILLE L., RAYMOND F., CORBEIL J., MASPOLI V., BOUAZZA N., ALCOBA G., LACROIX L., MANZANO S., GALETTO-LACOUR A., GERVAIX A. (2013). Nasopharyngeal carriage of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes during pediatric radiologically confirmed community acquired pneumonia following PCV7 introduction in Switzerland. *BMC Infectious Diseases*, 13:357.

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

CHIBA, N., KOBAYASHI, R., HASEGAWA, K., MOROZUMI, M., NAKAYAMA, E., TAJIMA, T., UBUKATA, K. (2005). Antibiotic susceptibility according to genotype of penicillin-binding protein and macrolide resistance genes and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolates from community-acquired pneumonia in children. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(4), 756-760.

CORRÊA, R. D. A.; LUNDGREN, F. L. C.; PEREIRA-SILVA, J. L.; SILVA, R. L. F.; CARDOSO, A. P.; LEMOS, A. C. M.; ROCHA, R. T. D. (2009). Diretrizes brasileiras para pneumonia adquirida na comunidade em adultos imunocompetentes-2009; Brazilian guidelines for community-acquired pneumonia in immunocompetent adults-2009. *J. bras. pneumol*, 35(6), 574-601.

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

DAIKOS, G. L., KOUTSOLIOUTSOU, A., TSIODRAS, S., THEODORIDOU, M., KOUTOUZIS, E. I., CHARISSIADOU, A., SYRIOPOULOU, V. P. (2008). Evolution of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates in the prevaccine era. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 60(4), 393-398.

DA GLORIA CARVALHO, M., PIMENTA, F. C., JACKSON, D., ROUNDTREE, A., AHMAD, Y., MILLAR, E. V. BEALL, B. W. (2010). Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1611-1618.

DI FABIO, J. L., CASTAÑEDA, E., AGUDELO, C. I., DE LA HOZ, F., HORTAL, M., CAMOU, T., DE QUADROS, C. (2001). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 20(10), 959-967.

DIAS, C. A.; TEIXEIRA, L. M.; DA GLÓRIA CARVALHO, M.; BEALL, B. (2007). Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *Journal of Medical Microbiology*, 56(9), 1185-1188.

DOERN, G. V.; HEILMANN, K. P.; HUYNH, H. K.; RHOMBERG, P. R.; COFFMAN, S. L.; BRUEGGEMANN, A. B. (2001). 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*, 45(6), 1721-1729.

- DŽIDIĆ, S.; ŠUŠKOVIĆ, J.; KOS, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*. 46(1), 11-21.
- FAÇANHA, M. C.; PINHEIRO, A. C. (2004). Distribution of acute respiratory diseases in Brazil from 1996 to 2001, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 38(3), 346-350.
- FARRELL, D. J., COUTURIER, C., HRYNIEWICZ, W. (2008). Distribution and antibacterial susceptibility of macrolide resistance genotypes in *Streptococcus pneumoniae*: PROTEKT Year 5 (2003–2004). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(3), 245-249.
- FARRELL, D. J.; MORRISSEY, I.; BAKKER, S.; MORRIS, L.; BUCKRIDGE, S.; FELMINGHAM, D. (2004). Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both *erm(B)* and *mef(A)* mediated macrolide resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), 764-768.
- FERREIRA, S.; MARCH, M. D. F. B. P. (2009) Tratamento das pneumonias comunitárias na infância. *Sumário Content*, 50.
- FONSECA, P. B., BRAGA, J. A. P., MACHADO, A. M. D. O., BRANDILEONE, M. C. D. C., FARHAT, C. K. (2005). Colonização nasofaríngea pelo *Streptococcus pneumoniae* em crianças com doença falciforme usando penicilina profilática. *J Pediatr*, 81(2), 149-54.
- FRANCO C. M., ANDRADE A. L., ANDRADE J. G., ALMEIDA E SILVA S., OLIVEIRA C. R., PIMENTA F. C., LAMARO-CARDOSO J., BRANDÃO A. P., ALMEIDA S. C., CALIX J. J., NAHM M. H., DE CUNTO BRANDILEONE M. C. (2010). Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 29(1): 77–79.
- GABASTOU, J. M., AGUDELO, C. I., BRANDILEONE, M. C. D. C., CASTAÑEDA, E., LEMOS, A. P. S. D., & DI FABIO, J. L. (2008). Caracterización de aislamientos invasivos de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis* en América Latina y el Caribe: SIREVA II, 2000-2005. *Rev Panam Salud Publica*, 24(1), 1-15.
- GINER, A. M.; KUSTER, S. P.; ZBINDEN, R.; RUEF, C.; LEDERGERBER, B.; WEBER, R. (2011). Initial management of and outcome in patients with pneumococcal

bacteremia: a retrospective study at a Swiss university hospital, 2003–2009. *Infection*, 39(6), 519-526.

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

GREENBERG, D., GIVON-LAVI, N., NEWMAN, N., BAR-ZIV, J., & DAGAN, R. (2011). Nasopharyngeal carriage of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes during pediatric pneumonia as a means to estimate serotype disease potential. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 30(3), 227-233.

GRIVEA, I. N., PANAGIOTOU, M., TSANTOULI, A. G., SYROGIANNOPOULOS, G. A. (2008). Impact of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among day-care center attendees in central Greece. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(6), 519-525.

HERNANDEZ-BOU, S.; GARCIA-GARCIA, J. J.; GENE, A.; ESTEVA, C.; DEL AMO, E.; MUÑOZ-ALMAGRO, C. (2012). Pneumococcal carriage in children attending a hospital outpatient clinic in the era of pneumococcal conjugate vaccines in Barcelona. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74(3), 258-262.

HICKS, L. A., HARRISON, L. H., FLANNERY, B., HADLER, J. L., SCHAFFNER, W., CRAIG, A. S., WHITNEY, C. G. (2007). Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998–2004. *Journal of Infectious Diseases*, 196(9), 1346-1354.

HOMAIRA, N., LUBY, S. P., PETRI, W. A., VAINIONPAA, R., RAHMAN, M., HOSSAIN, K., SNIDER, C. B., RAHMAN, M., ALAMGIR, A. S. M., ZESMIN, F., ALAM, M., GURLEY, E. S., ZAMAN, R. U., AZIM, T., ERDMAN, D. D., FRY, A. M., BRESEE, J. WIDDOWSON, M., HAQUE, R., AZZIZ-BAUMGARTNER, E. (2012). Incidence of respiratory virus-associated pneumonia in urban poor young children of Dhaka, Bangladesh, 2009–2011. *PloS one*, 7(2), e32056.

HAMPTON, L. M., FARLEY, M. M., SCHAFFNER, W., THOMAS, A., REINGOLD, A., HARRISON, L. H., MOORE, M. (2012). Prevention of antibiotic-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* with conjugate vaccines. *Journal of Infectious Diseases*, 205(3), 401-411.

HSIEH, Y. C., HUANG, Y. C., LIN, H. C., HO, Y. H., CHANG, K. Y., HUANG, L. M., HSUEH, P. R. (2009). Characterization of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* among Taiwanese children. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(11), 991-996.

HUANG, S. S., HINRICHSEN, V. L., STEVENSON, A. E., RIFAS-SHIMAN, S. L., KLEINMAN, K., PELTON, S. I., FINKELSTEIN, J. A. (2009). Continued impact of pneumococcal conjugate vaccine on carriage in young children. *Pediatrics*, 124(1), e1-e11.

JENKINS, S. G., BROWN, S. D., & FARRELL, D. J. (2008). Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1–4. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 7(1), 1.

JENKINS, S. G.; BROWN, S. D.; FARRELL, D. J. (2008). Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1–4. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 7(1),1.

JINNO, S.; JACOBS, M. R. (2012). Pneumonia Due to Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Current Infectious Disease Reports*. 14(3), 292-299.

JONES, R. N., JACOBS, M. R., SADER, H. S. (2010). Evolving trends in *Streptococcus pneumoniae* resistance: implications for therapy of community-acquired bacterial pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(3), 197-204.

KADIOGLU, A.; WEISER, J. N.; PATON, J. C.; ANDREW, P. W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 288-301.

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

KATSAROLIS, I., POULAKOU, G., ANALITIS, A., MATTHAIPOULOU, I., ROILIDES, E., ANTACHOPOULOS, C. KANELLAKOPOULOU, K. (2009). Risk factors for nasopharyngeal carriage of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from a nation-wide surveillance study in Greece. *BMC Infectious Diseases*, 9(1), 120.

KELLNER, J. D., VANDERKOOI, O. G., MACDONALD, J., CHURCH, D. L., TYRRELL, G. J., SCHEIFELE, D. W. (2009). Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease in Canada, 1998–2007: update from the Calgary-area *Streptococcus pneumoniae* research (CASPER) study. *Clinical Infectious Diseases*, 49(2), 205-212.

KELLOGG, J. A., BANKERT, D. A., ELDER, C. J., GIBBS, J. L., & SMITH, M. C. (2001). Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. *Journal of clinical microbiology*, 39(9), 3373-3375.

LAVAL, C. B., ANDRADE, A. L. S. S., PIMENTA, F. C., DE ANDRADE, J. G., OLIVEIRA, R. M., SILVA, S. A., BRANDILEONE, M. C. C. (2006). Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(1), 50-55.

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

LIÑARES, J.; ARDANUY, C.; PALLARES, R.; FENOLL, A. (2010). Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(5), 402-410.

LIU, C., XIONG, X., XU, W., SUN, J., WANG, L., LI, J. (2013). Serotypes and Patterns of Antibiotic Resistance in Strains Causing Invasive Pneumococcal Disease in Children Less than 5 Years of Age. *PloS One*, 8(1), e54254.

LIU, Z., NACHAMKIN, I., EDELSTEIN, P. H., LAUTENBACH, E., METLAY, J. P. (2012). Serotype emergence and genotype distribution among macrolide-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in the postconjugate vaccine (PCV-7) era. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(2), 743-750.

- LO, W. T., WANG, C. C., YU, C. M., CHU, M. L. (2003). Rate of nasopharyngeal carriage, antimicrobial resistance and serotype of *Streptococcus pneumoniae* among children in northern Taiwan. *J. Microbiol Immunol Infection* 36(3), 175.
- MALFROOT, A., VERHAEGEN, J., DUBRU, J. M., VAN KERSCHAUVER, E., LEYMAN, S. (2004). A cross-sectional survey of the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in Belgian infants attending day care centres. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(9), 797-803.
- MANTESE, O. C.; PAULA, A. D.; ALMEIDA, V. V. P.; AGUIAR, P. A. D. F. D.; WOLKERS, P. C. B.; ALVARES, J. R.; ALMEIDA, S. C. G.; GUERRA, M. L. L. S.; BRANDILEONE, M. C. D. C. (2009). Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of pneumococcus in children: analysis of 9 years. *Jornal de Pediatria*, 85(6), 495-502.
- MANDELLI, L. A. (2005). Antimicrobial resistance and treatment of community-acquired pneumonia. *Clinics in Chest Medicine*, 26(1), 57-64.
- MARTINEZ, R. (2005). Pneumococcal resistance to penicillin and macrolides: implications for the treatment of respiratory infections. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 31(4), iv-v.
- MENDES, C., MARIN, M. E., QUINONES, F., SIFUENTES-OSORNIO, J., CUILTY SILLER, C., CASTANHEIRA, M., FELMINGHAM, D. (2003). Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Latin America: results from the PROTEKT surveillance study (1999-2000). *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 7(1), 44-61.
- MCCRACKEN JR, G. H. (2000). Etiology and treatment of pneumonia. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 19(4), 373-377.
- MEHR, S. WOOD, N. (2012). *Streptococcus pneumoniae* a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. *Paediatric Respiratory Reviews*, 13(4), 258-264.
- MENDONÇA-SOUZA, C. R.; CARVALHO, M. D. G. S.; BARROS, R. R.; DIAS, C. A.; SAMPAIO, J. L. M.; CASTRO, A. C.; TEIXEIRA, L. M. (2004). Occurrence and characteristics of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in three major Brazilian states. *Microbial Drug Resistance*. 10(4), 313-320.

MICHELOW, I. C.; OLSEN, K.; LOZANO, J.; ROLLINS, N. K.; DUFFY, L. B.; ZIEGLER, T.; KAUPPILA, J.; LEINONEN, M.; MCCRACKEN, G. H. (2004). Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics*, 113(4), 701-707.

MOELLERING, R. C. (2002). The continuing challenge of lower respiratory tract infections. *Clinical Infectious Diseases*, 34(Supplement 1), S1-S3.

MONTAGNANI, F., FANETTI, A., STOLZUOLI, L., CROCI, L., ARENA, F., ZANCHI, A., CELLESI, C. (2008). Pneumococcal disease in a paediatric population in a hospital of central Italy: a clinical and microbiological case series from 1992 to 2006. *Journal of Infection*, 56(3), 179-184.

MONTEROS, L. E. E, JIMÉNEZ-ROJAS, V., AGUILAR-ITUARTE, F., CASHAT-CRUZ, M., REYES-LÓPEZ, A., RODRÍGUEZ-SUÁREZ, R., GÓMEZ-BARRETO, D. (2007). Streptococcus pneumoniae isolates in healthy children attending day-care centers in 12 states in Mexico. *Salud Pública De México*, 49(4), 249-255.

MORETTI, G. S., PEREIRA, J. L., SAKAE, T. M., DA SILVA, R. M. (2007). Vacina pneumocócica: histórico, indicações clássicas e efeitos indiretos. *Pulmão RJ*, 16(2-4), 91-6.

MURDOCH, D. R.; JENNINGS, L. C. (2009). Association of respiratory virus activity and environmental factors with the incidence of invasive pneumococcal disease. *Journal of Infection*, 58(1), 37-46.

MYERS, C.; GERVAIX, A. (2007) *Streptococcus pneumoniae* bacteraemia in children. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, v. 30, supl. 1, p. 24-28.

NAGAI, K., SHIBASAKI, Y., HASEGAWA, K., DAVIES, T. A., JACOBS, M. R., UBUKATA, K., APPELBAUM, P. C. (2001). 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*, 48(6), 915-918.

NELSON, A. L.; ROCHE, A. M.; GOULD, J. M.; CHIM, K.; RATNER, A. J.; WEISER, J. N. (2007). Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infection and Immunity*, 75(1), 83-90.

NEVES, F. P., PINTO, T. C., CORRÊA, M. A., DOS BARRETO, R., DE MOREIRA, L., RODRIGUES, H. G., TEIXEIRA, L. M. (2013). 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*, 13(1), 318.

NYS, S.; TJHIE, J.H.; BARTELDS, A.I.; HEIJNEN, M.L.; PEETERS, M.F.; STOBBERINGH, E.E. (2005) Erythromycin resistance in the commensal throat flora of patients visiting the general practitioner: a reservoir for resistance genes for potential pathogenic bacteria. *Int J. Antimicrob. Agents*. 26(2):133-7.

OGGIONI, M. R.; TRAPPETTI, C.; KADIOGLU, A.; CASSONE, M.; IANNELLI, F.; RICCI, S.; IANNELLI, F.; RICCI, S.; ANDREW, P.W.; POZZI, G. (2006). Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Molecular microbiology*, 61(5), 1196-1210.

OSTAPCHUK, M. I. C. H. A. E. L.; ROBERTS, D. M.; HADDY, R. I. C. H. A. R. D. (2004). Community-acquired pneumonia in infants and children. *American Family Physician*, 70, 899-908.

PAI, R.; GERTZ, R. E.; BEALL, B. (2006). Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(1), 124-131.

PALLARES, R., FENOLL, A., LIÑARES, J. (2003). The epidemiology of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and the clinical relevance of resistance to cephalosporins, macrolides and quinolones. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 15-24.

PARADISO, P. R. (2011). Advances in pneumococcal disease prevention: 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for infants and children. *Clinical Infectious Diseases*, 52(10), 1241-1247.

PARRA, E. L., HOZ, F. D. L., DÍAZ, P. L., SANABRIA, O., REALPE, M. E., MORENO, J. E. (2013). Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution in invasive disease and nasopharyngeal carriage after the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine introduction in Bogotá, Colombia. *Vaccine*.

PELTOLA, V. T., MCCULLERS, J. A. (2004). Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 23(1), S87-S97.

PIMENTA, F. C., MARIA DA GLORIA, S. C., GERTZ, R. E., BASTOS-ROCHA, C. G., OLIVEIRA, L. S., PIGOSSO, L. L., BEALL, B. W. (2011). Serotype and genotype distributions of pneumococcal carriage isolates recovered from Brazilian children attending day-care centres. *Journal of Medical Microbiology*, 60(10), 1455-1459.

PLETZ, M. W., MAUS, U., KRUG, N., WELTE, T., LODE, H. (2008). Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(3), 199-206.

PRADO, V. J. (2001). Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Chil Infect*, 18(Supl 1), 6-9.

QUEIROZ, R. S. (2010). Aspectos da admissão e evolução de crianças hospitalizadas com suspeita de pneumonia adquirida na comunidade em Salvador; Aspects of admission and outcome of children hospitalized with suspected community-acquired pneumonia in Salvador (Doctoral dissertation, Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz).

REGAMEY, N.; KAISER, L.; ROIHA, H. L.; DEFFERNEZ, C.; KUEHNI, C. E.; LATZIN, P.; FREY, U. (2008). Viral etiology of acute respiratory infections with cough in infancy: a community-based birth cohort study. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(2), 100-105.

REINERT, R. R.; FRANKEN, C.; LINDEN, M.; LÜTTICKEN, R.; CIL, M.; AL-LAHHAM, A. (2004). Molecular characterisation of macrolide resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated in Germany, 2002–2003. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 24(1), 43-47.

REINERT, R. R.; REINERT, S.; VAN DER LINDEN, M.; CIL, M. Y.; AL-LAHHAM, A.; APPELBAUM, P. (2005). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2903-2913.

REY¹, L. C., WOLF, B., MOREIRA, J. L. B., MILATOVIC, D., VERHOEF, J., & FARHAT, C. K. (2002). Antimicrobial susceptibility and serotypes of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* in children with pneumonia and in children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20(2), 86-92.

REY², L. C.; WOLF, B.; MOREIRA, J. L. B.; VERHOEF, J.; FARHAT, C. K. (2002). *S. pneumoniae* isolados da nasofaringe de crianças sadias e com pneumonia: taxa de colonização e suscetibilidade aos antimicrobianos. *J Pediatr (Rio J)*, 78(2), 105-12.

RIVERA-OLIVERO, I. A., BOGAERT, D., BELLO, T., DEL NOGAL, B., SLUIJTER, M., HERMANS, P. W., DE WAARD, J. H. (2007). Pneumococcal carriage among indigenous Warao children in Venezuela: serotypes, susceptibility patterns, and molecular epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*, 1427-1434.

ROSSONI, A. M. D. O., DALLA COSTA, L. M., BERTO, D. B., FARAH, S. S., GELAIN, M., BRANDILEONE, M. C. D. C., ... & ALMEIDA, S. M. D. (2008). Acute bacterial meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* resistant to the antimicrobial agents and their serotypes. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 66(3A), 509-515.

RUDAN, I.; BOSCHI-PINTO, C.; BILOGLAV, Z.; MULHOLLAND, K.; CAMPBELL, H. (2008). Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(5), 408-416B.

SAHM, D. F., BENNINGER, M. S., EVANGELISTA, A. T., YEE, Y. C., THORNSBERRY, C., BROWN, N. P. (2007). Antimicrobial resistance trends among sinus isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States (2001–2005). *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 136(3), 385-389.

SCHULTSZ, C.; CAMPBELL, J. I.; CHAU, N. V. V.; DIEP, T. S.; HOANG, N. V. M.; NGA, T. T. T.; FARRAR, J. J. (2007). Changes in the nasal carriage of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in urban and rural Vietnamese schoolchildren. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(5), 484-492.

SERRANO, I. D. (2007). Contribuição para a caracterização da população de *Streptococcus pneumoniae* causadora de infecções graves. Lisboa.

SHAHRIAR, M., MADAK, M., HAQUE, A., KABIR, S., SAHA, M. R. (2010). Current status of antimicrobial sensitivity pattern of *Streptococcus pneumonia* strains collected from clinical sources in Dhaka, Bangladesh. *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 59-62.

SHARIFF, M., CHOUDHARY, J., ZAHOOR, S., DEB, M. (2013). Characterization of *Streptococcus pneumoniae* isolates from India with special reference to their sequence types. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 7(02), 101-109.

SHOUVAL, D. S.; GREENBERG, D.; GIVON-LAVI, N.; PORAT, N.; DAGAN, R. (2009). Serotype coverage of invasive and mucosal pneumococcal disease in Israeli children younger than 3 years by various pneumococcal conjugate vaccines. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 28(4), 277-282.

SILVEIRA, C. D., FERREIRA, C. S., DE AMORIM CORRÊA, R. (2012). Adesão a diretrizes e impacto nos desfechos em pacientes hospitalizados por pneumonia adquirida na comunidade em um hospital universitário. *J Bras Pneumol*, 38(2), 148-157.

STRATCHOUNSKI, L. S., KOZLOV, R. S., APPELBAUM, P. C., KRETCHIKOVA, O. I., KOSOWSKA-SHICK, K. (2006). Antimicrobial resistance of nasopharyngeal pneumococci from children from day-care centres and orphanages in Russia: results of a unique prospective multicentre study. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9), 853-866.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA et al.(2007) Diretrizes brasileiras em pneumonia adquirida na comunidade em pediatria-2007. *J. bras. pneumol*, v. 33, n. supl. 1, p. s31-s50.

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

VANDERKOOI, O. G.; LOW, D. E.; GREEN, K.; POWIS, J. E.; MCGEER, A. (2005). Predicting antimicrobial resistance in invasive pneumococcal infections. *Clinical Infectious Diseases*. 40(9), 1288-1297.

VELASQUEZ, P. A.; PARUSSOLO, L.; CARDOSO, C. L.; TOGNIM, M. C. B.; GARCIA, L. B. (2009). High prevalence of children colonized with penicillin-resistant

Streptococcus pneumoniae in public day-care centers. *Jornal de Pediatria*, 85(6), 516-522.

VIEIRA, A. C.; GOMES, M. C.; ROLO FILHO, M.; EUDES FILHO, J.; BELLO, E. J.; FIGUEIREDO, R. B. (2007). *Streptococcus pneumoniae*: estudo das cepas isoladas de liquor. *J Pediatr (Rio J)*, 83, 71-78.

VU, H.T.; YOSHIDA, L.M.; SUZUKI, M.; NGUYEN, H.A.; NGUYEN, C.D.; NGUYEN A.T.; OISHI, K.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, K.; VU, T.D. (2011). Association Between Nasopharyngeal Load of *Streptococcus pneumoniae*, Viral Coinfection, and Radiologically Confirmed Pneumonia in Vietnamese Children. *Pediatr Infect Dis J*. 30(1):11-8.

WATSON, D. A.; MUSER, D. M.; JACOBSON, J. W.; VERHOEF, J. (1993). A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clinical Infectious Diseases*, 17(5), 913-924.

WILLIAMS, B. G.; GOUWS, E.; BOSCHI-PINTO, C.; BRYCE, J.; DYE, C. (2002). Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(1), 25-32.

WROE, P. C., LEE, G. M., FINKELSTEIN, J. A., PELTON, S. I., HANAGE, W. P., LIPSITCH, M., HUANG, S. S. (2012). Pneumococcal carriage and antibiotic resistance in young children before 13-valent conjugate vaccine. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 31(3), 249.

YOSHIOKA, C. R., MARTINEZ, M. B., BRANDILEONE, M. C., RAGAZZI, S. B., GUERRA, M. L., SANTOS, S. R., GILIO, A. E. (2011). Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. *Jornal de Pediatria*, 87(1), 70-75.

ZETTLER, F. R.; ZETTLER, E. W.; SCHMITT, V. M.; JAHNS, M. T.; DIAS, C. A. G.; FRITSCHER, C. C. (2005). Phenotypic and genotypic study of macrolide resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in hospitals in Porto Alegre, in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 31(4), 312-317.

ANEXOS

ANEXO I

1. TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: PNEUMONIAS ADQUIRIDAS NA COMUNIDADE DE ETIOLOGIA VIRAL EM CRIANÇAS ATENDIDAS POR DOENÇA RESPIRATÓRIA AGUDA NO HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN: PREVALÊNCIA, APRESENTAÇÕES CLÍNICAS E COMPLICAÇÕES.

Seu filho está sendo convidado a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos (ou estaremos) fazendo. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos o prazer de esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao(à) seu filho(a).

Eu,RG, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a) nascido (a) em ____ / ____ / ____ , seja voluntário do estudo “PNEUMONIAS ADQUIRIDAS NA COMUNIDADE DE ETIOLOGIA VIRAL EM CRIANÇAS ATENDIDAS POR DOENÇA RESPIRATÓRIA AGUDA NO HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN: PREVALÊNCIA, APRESENTAÇÕES CLÍNICAS E COMPLICAÇÕES.” Declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente que:

- I) Este estudo tem como objetivo conhecer a diversidade do vírus respiratório sincicial que esteja associado a infecções respiratórias agudas em crianças atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin.
- II) Para isso, será coletada por aspiração a secreção da narina do meu (minha) filho (a) por um dos membros da equipe do estudo, isto é, biomédico, enfermeiro e

médico ou estudantes dos cursos de Enfermagem, Biomedicina ou Medicina treinados nesse procedimento. Esse procedimento geralmente é indolor, mas geralmente incômodo, o que leva a criança ao choro na sua execução. Raramente durante o processo da coleta poderá ocorrer um trauma na mucosa nasal o que pode resultar em pequeno sangramento.

- III) Informações fornecidas por mim serão úteis no preenchimento de uma ficha com dados de identificação, sintomas e sinais exibidos na doença atual além de breve histórico médico do meu filho (a);
- IV) A participação do meu filho (a) nesse estudo em nada influenciará o seu tratamento;
- V) A participação do meu filho (a) neste estudo não acarretará custo algum para mim;
- VI) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação. A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao (a) meu (minha) filho (a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médico a que ele (ela) estiver sendo submetido. Caso deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo;
- VII) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o de meu filho (a) sejam mencionados;
- VIII) Caso deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo.

OBS: Assinalar com (X):

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Fortaleza, de de 20.....

Paciente / Responsável _____

Médico Responsável: _____

Pesquisadora Responsável pelo Projeto: _____

Dra. Fernanda Edna Araújo Moura

Anexo II



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

Anexos III

	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	Pai et al . 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131
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	Da Gloria Carvalho et al. 2010. J. Clin. Microbiol. 48: 1611-1618
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	Dias et al . 2007, J. Med. Microbiol. 56: 1185-1189
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	628	<i>Pai et al . 2006, J. Clin. Microbiol. 44: 124-131</i>

	TCT C		
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	Da Gloria Carvalho et al. 2010. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 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.</i> 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
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. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 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.</i> 2007, <i>J. Med. Microbiol.</i> 56: 1185-1189
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.</i> 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
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	<i>Da Gloria Carvalho et al.</i> 2010. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 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.</i> 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
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	
19A	<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.</i> . 2009. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 17: 2353-2354
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.</i> 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
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.</i> 2006, <i>J. Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
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. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 48: 1611-1618
22F	<i>f</i> - GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA	643	<i>Pai et al.</i> 2006, <i>J.</i>

	TTG TC <i>r</i> - CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC		<i>Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
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. <i>J. Clin.</i> <i>Microbiol.</i> 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.</i> <i>Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
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 CCG	99	Da Gloria Carvalho et al. 2010. <i>J. Clin.</i> <i>Microbiol.</i> 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.</i> <i>Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
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. <i>J. Clin.</i> <i>Microbiol.</i> 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.</i> <i>Clin. Microbiol.</i> 44: 124-131
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. <i>J. Clin.</i> <i>Microbiol.</i> 48: 1611-1618
<i>ermB</i>	<i>f</i> - CGTACCTTGGATATT CACCG <i>r</i> - GTAAACAGTTGACGATATTCT CG	224	Nagai et al. 2001. <i>J. of</i> <i>Antimicrobial</i> <i>Chemotherapy</i> , 48(6), 915- 918.
<i>pbp 1a</i>	<i>f</i> - AAACAAGGTCGGACTCAACC	195	

	<i>r</i> - ATATACATTGGTTTATAGTAAGTT		
<i>pbp 2b</i>	<i>f</i> - CCTA TATGGTCAAACAGCCT <i>r</i> - GGTC AATTC CTGTCCGAGTA	147	
<i>pbp 2x</i>	<i>f</i> - CCAGGTTCCACTATGAAAGTG <i>r</i> - ATC CCAACGTTACTTGAGTGT	197	